

ALBA VALÉRIA DA SILVA PEREIRA

**Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae*
Patogênico ao Mamão**

**RECIFE
MARÇO - 2009**

ALBA VALÉRIA DA SILVA PEREIRA

**Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae*
Patogênico ao Mamão**

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

**RECIFE – PE
MARÇO - 2009**

Ficha catalográfica

P436s Pereira, Alba Valéria da Silva
Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de
Lasiodiplodia theobromae patogênico ao mamão / Alba
Valéria da Silva Pereira. -- 2009.
57 f. : il.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui referências.

CDD 632.952

1. *Carica papaya*
2. Podridão peduncular
3. Resistência
4. Inibidores da biossíntese ergosterol
5. Benzimidazóis
 - I. Câmara, Marcos Paz Saraiva
 - II. Título

**Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae*
Patogênico ao Mamão**

ALBA VALÉRIA DA SILVA PEREIRA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

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

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Co-orientador

Dr. Ricardo Brainer Martins (UFRPE) – Co-orientador

**RECIFE – PE
MARÇO – 2009**

**Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae*
Patogênico ao Mamão**

ALBA VALÉRIA DA SILVA PEREIRA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 16 de março de 2009.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profª Drª. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

Dr. Ricardo Brainer Martins (UFRPE)

Drª. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues (MAPA)

**RECIFE – PE
MARÇO - 2009**

“Sê forte e corajoso; não temas nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares” (Js 1:9)

“mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águas, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”(Is 40:31)

Obrigada, meu Deus!

AGRADEÇO

Ao meu pai João Ângelo (*in memoria*) e especialmente a minha mãe Alice Maria, pela educação, compreensão e paciência e pela coragem e sabedoria em meio a tantas dificuldades, me ensinando a seguir em frente.

Ao meu irmão Alexandre Bruno, pelo incentivo.

A amiga Luiza Marques pela amizade e pelo carinho nas horas mais difíceis.

DEDICO

Ao meu esposo Edvanho, pelo amor, paz e a tranquilidade. E pelo apoio nos momentos mais importantes da minha trajetória.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor eterno e incondicional;

Ao professor *Sami Jorge Michereff* e ao Dr. *Ricardo Brainer* pela orientação e confiança;

Ao professor *Marcos Câmara* pela orientação e compreensão, principalmente em momentos decisivos da minha vida. Aprendi que as vezes a primeira impressão não é a que fica;

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

Aos todos professores da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso durante o curso, em especial as professoras *Sônia Maria Alves de Oliveira* e *Rosa Mariano*;

Meu sincero agradecimento a toda equipe do Laboratório de Micologia da UFRPE, *Valéria Costa, Isadora França, Cintia Bezerra, Francisco, Marcelo Bezerra, Jean Herlington* pela intensa disposição durante a realização deste trabalho;

A todos os amigos de turma o meu muito obrigada por todos os momentos compartilhados;

Aos amigos *Valéria Costa, Isadora França, Cintia Bezerra, Robson Nascimento, Ana Paula, Vanessa, Társsó e Mercia* pela amizade compartilhada e ótimos momentos de descontração, em especial a *Alessandra Garcia*, sabendo que amigos mais chegados que irmãos;

Aos funcionários *Adriana Melo, Darcy Martins e Romildo Angeiras* pela amizade, atenção;

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte de mais uma conquista.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
RESUMO	iv
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I – Introdução Geral	12
Mamoeiro	12
Podridão Peduncular	14
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	15
Manejo.....	16
Resistência a fungicidas.....	19
Adaptabilidade.....	22
Referências Bibliográficas	24
 CAPÍTULO II – Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Patogênico ao Mamão.....	32
ABSTRACT.....	32
RESUMO.....	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Origem dos isolados.....	36
2.2. Sensibilidade a fungicidas <i>in vitro</i>	37
2.3. Adaptabilidade.....	39

2.3.1. Crescimento micelial <i>in vitro</i> e agressividade a mamão sob diferentes temperaturas	39
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Sensibilidade a fungicidas <i>in vitro</i>	41
3.2. Adaptabilidade.....	42
3.2.1. Crescimento <i>in vitro</i> e agressividade a mamão sob diferentes temperaturas.....	42
4. DISCUSSÃO.....	43
5. AGRADECIMENTOS.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	47
CONCLUSÕES GERAIS	57

RESUMO

A aplicação de fungicida é a principal medida de manejo para podridão peduncular e não há informações sobre a sensibilidade e custos adaptativos decorrentes da redução de sensibilidade do seu agente causal, *Lasiodiplodia theobromae*. Cento e vinte isolados monospóricos, coletados em áreas produtoras da região Nordeste do Brasil, foram divididos em seis populações. Avaliou-se a sensibilidade *in vitro* (inibição de crescimento micelial) dos isolados aos fungicidas das classes dos benzimidazóis e inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs) e a adaptabilidade *in vitro* e *in vivo* (crescimento micelial e agressividade) de isolados com níveis distintos de sensibilidade aos fungicidas testados. A CE₅₀ média para os IBEs variou de 0,141 a 4,054, 0,045 a 0,691 e 0,001 a 1,529 para o tebuconazol, prochloraz e imazalil, respectivamente. O nível de sensibilidade aos IBEs não diferiu entre populações. Para os benzimidazóis a CE₅₀ de 91,6% dos isolados variou de 0,002 a 0,14 e 0,36 a 1,272 (benomyl e tiabendazol, respectivamente). Os 8,4%, classificados como não sensíveis (NS), não foram inibidos na maior concentração avaliada (100µg de i.a. ml⁻¹). Todos os isolados NS foram oriundos de uma mesma população. A agressividade dos isolados NS foi menor. Para os IBEs, não foi detectado nenhum custo adaptativo.

Palavras-chaves: resistência, inibidores da biossíntese de ergosterol, benzimidazóis, podridão peduncular, *Carica papaya*.

ABSTRACT

Application of fungicide is the main measure of management to stem-end rot and there is no information on the sensitivity and on the fitness costs arising from the reduction in sensitivity of its causal agent, *Lasiodiplodia theobromae*. One hundred and twenty monosporic isolates collected in producing areas of the Northeast region of Brazil, were divided into six populations. We evaluated the *in vitro* sensitivity (inhibition of mycelial growth) of the isolates to class the fungicides belonging to two groups: benzimidazoles and sterol demethylation inhibitors (DMIs). We also evaluated the fitness of isolates with different levels of sensitivity the fungicides both *in vitro* and *in vivo* (mycelial growth and aggressiveness). The average EC₅₀ for DMIs ranged from 0,141 to 4,054, 0,045 to 0,691 and from 0,001 to 1,529 for tebuconazole, prochloraz and imazalil, respectively. The level of sensitivity to DMIs did not differ among populations. For the benzimidazoles EC₅₀ of 91.6% of the isolates ranged from 0,002 to 0,14 and 0,36 in 1,272 (benomyl and thiabendazole, respectively). The 8.4% isolates, classified as not sensitive (NS) were not inhibited at the highest concentration evaluated (100µg ml of a.i⁻¹). All NS isolates were from the same population. The aggressiveness of NS isolated was lower.

Key words: resistance, sterol demethylation inhibitors, benzimidazoles, stem-end rot, *Carica papaya*

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO

Mamoeiro

A família Caricaceae, abrange cinco gêneros (*Carica*, *Jacaratia*, *Cylicomorpha*, *Jarilla* e *Horovitzia*), os quais englobam 34 espécies, sendo o mamoeiro (*Carica papaya* L.) a espécie predominantemente cultivada (MEDINA, 1989; COSTA; PACOVA, 2003). É uma planta herbácea, de coloração verde, crescimento rápido, que pode alcançar de 3 a 8 m de altura e produzir durante 20 anos. A propagação pode ser feita de forma vegetativa (estacas e enxertia) ou, mais freqüentemente, por sementes (CENTEC, 2004). O mamoeiro é uma planta de origem tropical, podendo ser cultivada durante todo o ano em locais onde a temperatura média anual situa-se em torno de 25°C, com limites extremos de 21° a 33°C (MEDINA, 1989; COSTA; PACOVA, 2003).

As variedades de mamoeiro são classificadas em dois grupos, de acordo com o tamanho dos frutos: i) Solo, também conhecido como “Mamão Havai” ou “Papaya”, com casca lisa de formato periforme a ovalado, polpa alaranjada e cavidade interna estrelada; e ii) Formosa com frutos alongados e cor da polpa laranja-avermelhada (COSTA; PACOVA, 2003). Essas variedades são as mais plantadas no Brasil, sendo as variedades do grupo Formosa destinadas aos mercados interno, e as do Solo para os mercados interno e externo (LIBERATO; ZAMBOLIM, 2002). Cada variedade de mamão possui particularidades como ponto ideal para maturação, formato, aparência da casca e da polpa. A colheita é realizada através do método mecânico ou manual e os frutos são colhidos quando passam da cor verde-escura para a verde-clara e apresentam uma ou duas faixas ligeiramente amareladas (BLEINROTH; SIGRIST 1989; BRAPEX, 2009).

Do mamoeiro são obtidos produtos destinados ao setor alimentício e a saúde. Alguns dos produtos pouco conhecidos incluem os que recebem em sua composição o látex, ou compostos obtidos destes, como a enzima proteolítica com propriedades digestivas, a qual é extraída, principalmente, de frutos imaturos e é empregada na indústria alimentícia, na fabricação de cerveja, queijo e processamento de carnes e couro; na indústria farmacêutica, a carpaína, alcalóide extraído das sementes, folhas e frutos é utilizada como ativadora do músculo cardíaco (DANTAS; CASTRO NETO, 2000). Mas, o principal produto ainda é o próprio fruto, o qual é comercializado e consumido, predominantemente, *in natura* (BORGES; SOUZA, 2005; BRAPEX, 2009).

A comercialização dos frutos ocorre nos mercados interno e externo. Dentre os países produtores, o Brasil ocupa o primeiro lugar com uma produção de 1.898.000t, seguido pelo México (800.000t), Nigéria (765.000t), Índia (700.000t) e Indonésia (645.000t) (FAO, 2009).

Dentre as regiões brasileiras produtoras, o Nordeste destaca-se com 1.093.838t, sendo o estado da Bahia o líder em produção, com 863.828t, seguido pelo Rio Grande do Norte (89.203t), Paraíba (28.027t) e Pernambuco (9.262t). Entretanto, o estado com a maior relação produção/exportação é o Espírito Santo, o segundo maior produtor nacional. Aproximadamente 49% do que é produzido no estado capixaba é destinado à exportação. Para BA e RN os percentuais de exportação do que é produzido são de 20 e 24%, respectivamente (BRAPEX, 2009; IBGE, 2009).

No Brasil, a área plantada com mamão vem aumentando devido a sua aceitação nos mercados consumidores. Para exportação desta fruta é necessário o conhecimento das exigências fitossanitárias impostas pelos países exportadores, deste modo as frutas são classificadas e inspecionadas, conforme as especificações para certificação (RITZINGER; SOUZA, 2000). Apesar do rigoroso controle as doenças que incidem nesta cultura destacam-se por causar perdas econômicas na produção, exportação e comercialização de frutos, tendo

como um dos destaques na pós-colheita a podridão peduncular (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

Podridão peduncular

A podridão peduncular é considerada uma das principais doenças na pós-colheita, causando grandes danos em frutos. A doença atinge a região do pedúnculo, tomando a parte basal do fruto, geralmente no início do amadurecimento. (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). As lesões cobrem uma ampla margem de tecido, o qual 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. A área infectada torna-se, aos poucos, desprovida do tecido parenquimatoso e os frutos perdem sua consistência e vigor. Sob condições favoráveis o fruto pode ser mumificado (ALVAREZ; NISHIJIMA, 1987; REZENDE; FANCELLI, 1997).

Com exceção da podridão por *Rhizopus stolonifer* (Erh. Ex Fr.) Vuillemin e *Phytophthora palmivora* Butler, todas as doenças pós-colheita do mamão se iniciam no campo, onde os patógenos se estabelecem no fruto imaturo e permanecem em estágio quiescente, sem o aparecimento de sintomas, até que haja condições climáticas favoráveis para que o processo de infecção ocorra (BENATO; CIA; SOUZA, 2001, NERY-SILVA et al., 2001). Dentre as espécies associadas às podridões destacam-se a *Alternaria alternata* (Fr) Kiessler, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *Mycosphaerella* sp. *Phoma caricae-papayae* (Tarr.), *Phomopsis caricae-papayae* Petr. & Cif., *R. stolonifer* e *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (ALVAREZ; NISHIJIMA, 1987; BLEINROTH; SIGRIST, 1989; DANTAS et al., 2003). A incidência desses fitopatógenos pode atingir mais

de 80% dos frutos de mamoeiro na fase de comercialização, causando consideráveis perdas pós-colheita, sendo a podridão peduncular responsável por aproximadamente metade dessas perdas (DANTAS et al., 2003).

A ocorrência de *L. theobromae*, antes considerado um fungo oportunista e comumente associado a plantas estressadas, tem sido associada a podridões de caule e frutos, e vêm ocasionando sérios problemas em fruteiras para produtores em todo o Brasil (FREIRE et al., 2004). De acordo com Viana et al. (2007), este fungo possui caráter destrutivo, o qual tem se verificado pela capacidade de destruir todo um pomar de mamoeiro, seja do tipo Solo ou Formosa, demonstrando sua importância para os produtores da cultura.

Lasiodiplodia theobromae

Lasiodiplodia theobromae (sin.= *Botryodiplodia theobromae* Pat. (SUTTON, 1980) é um fungo típico de regiões tropicais e subtropicais, sendo patogênico a numerosas espécies vegetais como Coqueiro (*Cocos nucifera* L.), Mangueira (*Mangifera indica* L.), Goiabeira (*Psidium guajava* L.), Mamoeiro (*C. papaya*), Videira (*Vitis* sp.), entre outras (NISHIJIMA et al., 1994; FREIRE et al., 2004).

As colônias de *L. theobromae* são de coloração acinzentada a negras (a cor varia de acordo com o substrato), com abundante micélio aéreo (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). Os picnídios podem ser simples ou compostos, freqüentemente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides para elipsóides – oblongos, com parede espessa e base truncada. Quando maduros, os conídios tornam-se uniseptados e de coloração castanho – amarelados, sendo longitudinalmente estriados. As dimensões dos conídios variam entre (20 – 30 x 10 – 15 µm). As paráfises, quando presentes, são hialinas, cilíndricas, algumas vezes septadas, tendo mais de 50 µm de comprimento. O micélio pode ser imerso ou superficial, ramificado,

septado e de coloração acinzentada (SUTTON, 1980). Nos caules e frutos de plantas infectadas, os picnídios são imersos, tornando-se erumpentes. Podem ocorrer isoladamente ou agrupados, apresentando 2 a 4 mm de largura. São ostiolados e freqüentemente pilosos e podem apresentar extrusão de conídios com aspecto de uma massa preta (NISHIJIMA et al., 1994). A fase sexual de *L. theobromae* era descrita como o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & Curt.) von Arx, (SUTTON, 1980), no entanto, estudos recentes em relação ao gênero *Botryosphaeria* têm demonstrado que este gênero deve ser restrito apenas aos teleomorfos de *Fusicoccum aesculi* (*B. dothidea*) e *Fusicoccum* sp. (*B. corticis*) (Demaree & Wilcox) Arx & E. Müll. Para outras espécies com teleomorfo tipo *Botryosphaeria*, como *Lasiodiplodia* spp., nenhum nome foi proposto para fase sexual (CROUS et al., 2006).

Manejo

A colonização de fungos em frutos de mamoeiro pode determinar perdas quantitativas e qualitativas, decorrentes dos efeitos da exteriorização do fungo e suas conseqüências como descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis inviabilizando a sua comercialização (BENATO; CIA; SOUZA, 2002; VIANA et al., 2007). Com o objetivo de minimizar as perdas ocasionadas por esses patógenos são empregadas medidas de manejo de doenças, as quais são baseadas em princípios epidemiológicos, ecológicos e econômicos (REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

O manejo das podridões pós-colheitas não se resume à aplicação de tratamentos químicos e utilização de técnicas de conservação após a colheita, constitui-se na verdade, no emprego de um conjunto de medidas que envolvem o eficiente controle de fontes de inóculo no pomar (ZAMBOLIM et al., 2002). Como exemplo, tem-se as seguintes recomendações: colher frutos no estágio de maturação ideal; evitar ferimentos na epiderme; mantê-los limpos

e realizar rigorosa sanitização de todas as instalações; realizar tratamento pós-colheita, como imersão dos frutos em água quente e/ou fungicidas registrados para a cultura; e armazenamento em condições que retardem ou diminuam o apodrecimento de frutos sem afetar a qualidade dos mesmos (OLIVEIRA; TAVARES; DANTAS, 2001). De acordo com o Ministério da Agricultura há vários fungicidas registrados para a cultura do mamoeiro, no entanto, o único fungicida registrado para o controle da podridão peduncular causada por *L. theobromae* é o tiabendazol, pertencente ao grupo dos Benzimidazóis (AGROFIT, 2009).

Os fungicidas podem atuar como inibidores de vários processos metabólicos vitais ou ter ação específica sobre a célula fúngica causando sua morte (GHINI; KIMATI, 2000). A partir da década de 60 fungicidas com mecanismos de ação específica, assim denominados por interferirem em processos específicos do metabolismo dos fungos começaram a ser desenvolvidos e comercializados. Estes processos podem ser exemplificados como a inibição da biossíntese de esterol, síntese de lipídeos, síntese de ácido nucléico, inibição mitótica e divisão celular, inibição da síntese de proteínas e aminoácidos, e inibição da respiração (VENANCIO et al., 2005; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Os fungicidas de ação específica são absorvidos pelas plantas dentro das quais se translocam somente no órgão tratado, pelo xilema ou pelo floema. Também são mais seletivos a número limitado de grupo taxonômico, podendo a sensibilidade se restringir a um gênero ou espécie e, mais comumente a uma classe ou ordem de fungos. Como exemplo, cita-se o grupo dos Benzimidazóis, que são mais tóxicos a fungos da classe dos Ascomycetes e Deuteromicetes e o grupo dos Dicarboximidas, que possuem espectro de ação sobre fungos produtores de escleródios ou não (GHINI; KIMATI, 2000).

Fungicidas específicos atuam também interrompendo a síntese de esterol, o qual é responsável pelo crescimento de muitos fungos fitopatogênicos (DAMICONE, 2004). O ergosterol, principal esterol presente na membrana celular, aumenta as propriedades da

bicamada lipídica tornando-a menos fluída, e a redução da disponibilidade de ergosterol resulta no rompimento da membrana e no extravasamento de solutos iônicos com conseqüente morte da célula (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Os fungicidas que atuam na síntese de esterol pertencem ao grupo dos Triazóis (tebuconazol, propiconazol e flutriafol), Imidazóis (imazalil e prochloraz), Pirimidás (fenarimol), sendo os dois primeiros considerados os mais importantes (GOULART, 1995).

Os Triazóis são fungicidas orgânicos, de ação sistêmica, com importância para a agricultura por possuir características positivas como a elevada fungitoxidade, rápida penetração/translocação e efeito residual prolongado. Podem agir como protetores, exercendo ação tóxica sobre a formação do tubo germinativo e no apressório, ou de forma curativa, impedindo o crescimento micelial e o desenvolvimento do haustório (FORCELINI, 1994). Os Imidazóis possuem alta sistemicidade, com atividade curativa e preventiva controlando várias doenças em baixas dosagens. Ambos Triazóis e Imidazóis atuam inibindo uma enzima específica, C14-demethylase, que desempenha um papel na produção esterol (GOULART, 1995).

Outro exemplo de fungicidas específicos são os que atuam na inibição da mitose e divisão celular. A seqüência da divisão celular é a formação da fusão mitótica e a subseqüente separação dos cromossomos. Para que ocorra essa divisão, a tubulina, um importante elemento para formação dos microtubulos, é ativada. Os fungicidas do grupo dos Benzimidazóis (benomyl, carbendazim, tiabendazole e tiofanato metílico) possuem uma alta afinidade pelas proteínas tubulinas, apesar da sua natureza altamente conservada. Esses fungicidas agem interrompendo a fusão mitótica, causando a falha na separação de novos núcleos e a conseqüente morte da célula (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007; GENET, 2009). No entanto, por serem altamente seletivos, essa afinidade apresenta inicialmente risco para alguns isolados, onde pequena alteração nos aminoácidos pode

conferir resistência. A ainda assim, são amplamente utilizados e continuam a ser valiosos na produção agrícola mundial (GENET, 2009).

Resistência a fungicidas

Os fungicidas têm sido empregados por cerca de 200 anos com o objetivo de proteger as plantas de doenças provocadas por ataques de fungos. Nos anos 60 e 70 um grande número de fungicidas, com nova estrutura, na sua maioria com atividade sistêmica foram introduzidos. Dentre estes novos compostos, estão os Benzimidazóis, Carboxinilidas, Dicarboximidas, e Inibidores de demetilação (DMI) (BRENT, 1995). A maior qualidade destes fungicidas, a seletividade, também é o seu maior ponto fraco. Por atuarem em um ou poucos passos do metabolismo celular fúngico, a chance de surgir resistência na população do fungo alvo também é elevada, principalmente quando o do fungicida é intensivo (GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência aos fungicidas é caracterizada pela adaptação estável e herdável de um fungo a uma determinada dose de fungicida, o qual previamente proporcionava um bom controle (GHINI; KIMATI, 2000). Dentre os grupos de fungicidas com maior número de ocorrência de resistência, destacam-se os Benzimidazóis (AZEVEDO, 2003; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). A ineficiência dos fungicidas pertencentes a este grupo tem sido demonstrada, por exemplo, em mamão, para o controle micelial de isolados de *C. gloeosporioides*, bem como menor inibição da germinação dos esporos na dosagem de 100 ppm (TAVARES; SOUSA, 2005). Em campo essa ineficiência em relação ao grupo dos Benzimidazóis (benomyl e tiofanato metílico) foi relatada por Domingues et al. (2001), onde não houve controle satisfatório *C. acutatum* em morangueiro, principalmente quando aplicados após o início da epidemia. A explicação para surgimento da resistência ao grupo dos

Benzimidazóis está no gene da β -tubulina. Esse gene tem papel importante na fusão e segregação dos cromossomos na divisão celular, e sua mutação impede a ligação com o fungicida (AZEVEDO, 2007). O gene da β -tubulina já foi identificado para muitos fungos. Em *Fusarium moniliforme* uma mutação pontual foi identificado no gene *tub2*. Essa mutação resulta em uma única substituição do aminoácido asparagina para tirosina na posição 50 e provavelmente confere resistência benomyl (YAN; DICKMAN, 1996).

A resistência de fungos a fungicidas também pode ser definida como quantitativa ou qualitativa e resistência cruzada ou múltipla (GHINI; KIMATI, 2000). A resistência quantitativa ou multigênica é governada por um conjunto de genes com efeitos menores e relaciona-se mais com fungicidas com risco moderado, já a resistência qualitativa ou oligogênica é governada por um ou poucos genes dominantes e para muitos fungicidas a mutação em um único gene é suficiente para o surgimento de isolados não sensíveis. A resistência cruzada refere-se à resistência de um fungo a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação ou similaridade química, conferida pelo mesmo fator genético. Como exemplos, podem ser citados os fungicidas do grupo dos Benzimidazóis. A resistência múltipla refere-se aquela que é conferida por diferentes fatores genéticos, ou seja, a resistência a fungicidas com modo de ação diferente (GHINI; KIMATI, 2000; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Ma et al. (2002), na avaliação da sensibilidade de isolados de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr) Ces. & De Not. a dois fungicidas do grupo Triazol (tebuconazole e propiconazole) e um fungicida do grupo dos Benzimidazóis (benomyl), utilizaram duas populações (A e B) com histórico de pulverização múltipla de fungicidas e demonstraram que um dos isolados da população B (PB22) apresentou uma menor sensibilidade em relação aos demais isolados, ao fungicida tebuconazole com EC_{50} (0,291mg de i. a.mL⁻¹) bem como a propiconazole e ao benomyl.

O desenvolvimento da resistência depende da frequência de isolados não sensíveis, e do grau de resistência, magnitude da diferença de sensibilidade dos isolados sensíveis e não sensíveis sendo este expresso pelo Fator de Resistência ($FR = CE_{50}$ de isolados não sensíveis/ CE_{50} de isolados sensíveis ou MCI de isolados não sensíveis/ MCI de isolados sensíveis, onde CE_{50} é a concentração efetiva capaz de causar mortalidade de 50% da população e MCI é a mínima concentração inibitória) (GHINI; KIMATI, 2000).

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de isolado não sensível como produto aplicado, intensidade de uso e características do organismo (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). A aplicação de fungicida pode ser manipulada em função de estratégias anti-resistência. Estas estratégias são baseadas no princípio de que quando há aplicação do fungicida, também é exercida uma pressão de seleção sobre a população do patógeno, podendo, a longo ou curto prazo, dependendo da resistência genética envolvida, resultar na seleção e predominância de indivíduos não sensíveis na população do fungo alvo (GHINI; KIMATI, 2000). As características do patógeno que contribuem para a ocorrência de isolados não sensíveis são o tamanho da população do fungo no momento da aplicação (quanto maior a população, maior a chance de ocorrência de isolados não sensíveis) e presença de reprodução sexual (a qual pode aumentar as chances de surgir isolados não sensíveis). Logo após o surgimento de uma nova população em decorrência da utilização de fungicidas, a seleção de isolados não sensíveis na natureza pode ocorrer em função do próprio patossistema devido ao potencial reprodutivo do patógeno, da sua adaptabilidade ao meio ou “fitness” e da pressão de seleção exercida sobre a população sensível (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001).

Adaptabilidade

A adaptabilidade de uma linhagem é definida como a habilidade do fungo de se desenvolver, reproduzir e sobreviver, comparada a outras linhagens nas mesmas condições. Assim, algumas mudanças metabólicas que determinam um isolado não sensível podem estar ligadas a uma menor adaptabilidade na presença ou ausência do fungicida (GHINI; KIMATI, 2000). Para o grupo dos benzimidazóis, isolados de *B. cinerea* não sensíveis são da mesma maneira adaptados quando comparados com isolados sensíveis e persistem mesmo sem uso do fungicida (BERESFORD, 1994). Existem também outros casos em que a resistência pode não estar ligada a redução da adaptabilidade (GHINI; KIMATI, 2000), como sugerido por Karaoglanidis, Thanassouloupoulos e Ioannidis (2001), quando avaliaram a adaptabilidade de isolados de *Cercospora beticola* Sacc. a fungicidas inibidores da demetilação (DMIs), quanto a virulência e a produção de esporos, mostraram que caso a proporção de isolados não sensíveis em populações mistas seja alta, a aplicação de fungicidas poderá selecionar isolados do patógeno não sensíveis a DMIs e que apresentem também uma maior adaptabilidade.

Isolados não sensíveis podem apresentar adaptabilidade a temperaturas extremas, e estar relacionada com mesmo ponto de mutação para resistência a fungicidas. Esse fato foi verificado por Yan e Dickman (1996) em *F. moniliforme*, onde a resistência ao benomyl e sensibilidade a baixa temperatura ocorre devido a mutação no códon 50 no gene *tub2*. Enquanto que para *Monilinia taxa* os isolados resistentes com mutações no gene da β -tubulina no codon 240 podem ser mais sensível ao calor (MA et al. 2005).

Com isso, quando ocorre mutação em um ou poucos genes que conferem características importantes, a adaptabilidade do isolado resistente pode ser reduzida, mas, se, no entanto esses genes apresentam características pouco importantes, os isolados não sensíveis apresentam alta adaptabilidade (GHINI; KIMATI, 2000).

Devido à ocorrência de casos de resistência após o uso contínuo de fungicidas para o controle de patógenos, e visto que, no Brasil não há registro de trabalhos desenvolvidos quanto à resistência de *L. theobromae* a fungicidas causando podridão peduncular no mamão, tem-se o objetivo de conhecer a sensibilidade de *L. theobromae* a diferentes fungicidas, considerada a importância da cultura do mamão para a produção interna e externa.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

AGROFIT - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 14 fev. 2009.

ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. T. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 8, p.681-686, 1987.

AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda, 2003. 346 p.

AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas sistêmicos: teoria e prática. Fundamentos para o uso racional**. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda, 2007. 290 p.

BENATO, E. A.; CIA, P.; SOUZA, N. L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 2001. v. 9, p. 403-440.

BERESFORD, R. **Understanding fungicide resistance**. Auckland: University in England, 1994. Disponível em: <<http://www.hortnet.co.nz/publications/science/orch94.htm>>. Acesso em: 09 dez. 2008.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: conseqüências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n 2, p.119-127, 2001.

BRAPEX. **Associação Brasileira de Exportadores de Papaya**. Linhares. Disponível em: <http://www.brapex.net/index_1024.asp/>. Acesso em: 25 jan. 2009.

BLEINROTH, E. W.; SIGRIST, J. M. M. II - Matéria-prima. In: **ITAL Mamão: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1989. p.179-254. (Frutas tropicais 7)

BORGES, A. L.; SOUSA, L. S. **Produção orgânica de frutas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 4 p. (Embrapa, Comunicado Técnico, 113)

BRENT, K. J. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** Brussels: GCPF, 1995. 49 p. (FRAC Monograph, 1).

CENTEC - Instituto Centro de Ensino Tecnológico. **Produtor de mamão**. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 72 p. (Cadernos Tecnológicos)

COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds.). **A cultura do mamoeiro: tecnologia de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 59-102.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, Utrecht , v. 55, n. 1, p. 235-253, 2006.

DAMICONE, J. **Fungicide resistance management**. Oklahoma: Oklahoma State University, 2004. Disponível em: <<http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2317/F-7663web.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2008.

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, n. 5, p. 528-533, 2003.

DANTAS, J. L. L.; CASTRO NETO, M. T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, V. A. (Org). **Mamão produção**. Brasília: Embrapa, 2000. p. 11-14. (Frutas do Brasil, 3).

DOMINGUES, R. J. TÖFOLI, J. G.; OLIVEIRA, S. H. F.; GARCIA JÚNIOR, O. Controle químico da flor preta (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) do morangueiro em condições de campo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 37-42, 2001.

FAO. **A folder available on the Internet**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 25 jan. 2009.

FORCELINI, C. A. Resistência de fungos a fungicidas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1994. v. 2, p. 335-355.

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

GENET, J. L. **Benzimidazóis.** Fungicide Resistance Action Committee – FRAC, 2004. Disponível em: <<http://www.frac.info/frac/index.htm>> acesso em: 25 jan. de 2009.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.78 p.

GOULART, A. C. P. Fungicidas inibidores do esterol. II. Imidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1995. v. 3, p. 365-390.

[IBGE. SIDRA 96 – Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.](#) Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=11&i=P&c=1612>> Acesso em 25 de jan. 2009.

KARAOGLANIDIS, G. S.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; IOANNIDIS, P. M. Fitness of *Cercospora beticola* Field Isolates – Resistant And – Sensitive to Demethylation Inhibitor Fungicides. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 337-347, 2001.

LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em mamoeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. L.; MONTEIRO, A. J. A;

COSTA, H (Eds.). **Controle de doenças de plantas:** fruteiras. Viçosa: UFV, 2002. p. 1023-1170.

MA, Z. et al. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 829–835, 2002.

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

MEDINA, J. C. Cultura. In: **ITAL Mamão:** cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 1989. p. 1-179. (Frutas tropicais 7)

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O.; RESENDE, M. L. V. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciências e Agrotécologia**, Lavras, v. 25, n.3, p. 519-524, 2001.

NISHIJIMA, W. T.; DICKMAN, M. B.; KO, W. H.; OOKA, J. J. Papaya diseases caused by fungi. In: PLOETZ, R. C., ZENTMYER, G. A., NISHIJIMA, W. T., ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Eds.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 58-64.

OLIVEIRA, S. M. A.; TAVARES, S. C. C. H.; DANTAS, S. A. F. Diagnose e manejo de doenças das fruteiras tropicais no Nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R.

(Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife : Imprensa Universitária da UFRPE, 2001. p. 183-223.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas**: Guia para o controle de doenças de plantas. Passo Fundo: UPF Editora, 2007.153p.

REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M. I. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: H. KIMATI, L. AMORIM, A. BERGAMIN FILHO, L.E.A. CAMARGO, J.A.M. REZENDE (Eds.) **Manual de fitopatologia** – doenças das plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres, 1997. p.486-496.

RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Fitossanidade na exportação de mamão. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Org.). **Mamão fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2000. p. 9-11. (Frutas do Brasil, 11).

SUTTON, B. C. **Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew: Surrey, England, **C.M.I.**, 1980. p. 696.

TAVARES, G. M.; SOUZA P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; SOUZA, N. L.; BEGLIOMINI, E.; PERES, N. A. Efeitos fisiológicos de fungicidas sobre plantas – Parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 2005. v. 13, p. 49-73.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamão: tecnologia e produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 229-308.

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

YAN, K.; DICKMAN M. B. Isolation of a β -Tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 22, n. 8, p. 3053-3056, 1996.

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

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

Capítulo II

Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* Patogênico ao Mamão

1 **Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae***
2 **Patogênico ao Mamão**

3

4 Alba V. da S. Pereira, Ricardo B. Martins, Sami J. Michereff, Marcelo B. da Silva &
5 Marcos P. S. Câmara

6 Área de Fitopatologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
7 Pernambuco, CEP. 52171-900 Recife, PE

8

9 Título resumido: Sensibilidade de *L. theobromae* a fungicidas

10

11 Autor para correspondência: Marcos Paz Saraiva Câmara, e-mail:
12 mcamara@depa.ufrpe.br

13

14 **ABSTRACT**

15

16 Application of fungicide is the main measure of management to stem-end rot and
17 there is no information on the sensitivity and on the fitness costs arising from the
18 reduction in sensitivity of its causal agent, *Lasiodiplodia theobromae*. One hundred
19 and twenty monosporic isolates collected in producing areas of the Northeast region
20 of Brazil, were divided into six populations. We evaluated the *in vitro* sensitivity
21 (inhibition of mycelial growth) of the isolates to class the fungicides belonging to two
22 groups: benzimidazoles and sterol demethylation inhibitors (DMIs). We also
23 evaluated the fitness of isolates with different levels of sensitivity the fungicides both
24 *in vitro* and *in vivo* (mycelial growth and aggressiveness). The average EC₅₀ for DMIs
25 ranged from 0,141 to 4,054, 0,045 to 0,691 and from 0,001 to 1,529 for tebuconazole,
26 prochloraz and imazalil, respectively. The level of sensitivity to DMIs did not differ

27 among populations. For the benzimidazoles EC₅₀ of 91.6% of the isolates ranged
28 from 0,002 to 0,14 and 0,36 in 1,272 (benomyl and thiabendazole, respectively). The
29 8.4% isolates, classified as not sensitive (NS) were not inhibited at the highest
30 concentration evaluated (100µg ml of a.i.⁻¹). All NS isolates were from the same
31 population. The aggressiveness of NS isolated was lower.

32

33 **Key words:** resistance, sterol demethylation inhibitors, benzimidazoles, stem-end rot,
34 *Carica papaya*

35

36 RESUMO

37

38 A aplicação de fungicida é a principal medida de manejo para podridão peduncular e
39 não há informações sobre a sensibilidade e custos adaptativos decorrentes da
40 redução de sensibilidade do seu agente causal, *Lasiodiplodia theobromae*. Cento e
41 vinte isolados monospóricos, coletados em áreas produtoras da região Nordeste do
42 Brasil, foram divididos em seis populações. Avaliou-se a sensibilidade *in vitro*
43 (inibição de crescimento micelial) dos isolados aos fungicidas das classes dos
44 benzimidazóis e inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs) e a adaptabilidade *in*
45 *vitro* e *in vivo* (crescimento micelial e agressividade) de isolados com níveis distintos
46 de sensibilidade aos fungicidas testados. A CE₅₀ média para os IBEs variou de 0,141
47 a 4,054, 0,045 a 0,691 e 0,001 a 1,529 para o tebuconazol, prochloraz e imazalil,
48 respectivamente. O nível de sensibilidade aos IBEs não diferiu entre populações.
49 Para os benzimidazóis a CE₅₀ de 91,6% dos isolados variou de 0,002 a 0,14 e 0,36 a
50 1,272 (benomyl e tiabendazol, respectivamente). Os 8,4%, classificados como não
51 sensíveis (NS), não foram inibidos na maior concentração avaliada (100µg de i.a. ml⁻¹).
52 Todos os isolados NS foram oriundos de uma mesma população. A agressividade

53 dos isolados NS foi menor. Para os IBEs, não foi detectado nenhum custo
54 adaptativo.

55

56 **Palavras-chaves adicionais:** resistência, inibidores da biossíntese de ergosterol,
57 benzimidazóis, podridão peduncular, carica papaya.

58

59 1. INTRODUÇÃO

60

61 O Brasil, maior produtor e um dos maiores exportadores de mamão,
62 arrecadou 30 milhões de dólares com a venda de frutos de mamoeiro (*Carica papaya*
63 L.) em 2006. Grande parte do volume exportado é oriunda da região Nordeste,
64 principalmente dos estados da Bahia, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte,
65 os quais, em conjunto, são responsáveis por aproximadamente 58% da produção
66 nacional (Fao, 2009).

67 A maior parte dos frutos é destinada ao consumo *in natura*. Assim, qualquer
68 alteração morfológica acarreta redução do valor comercial. Muitos fatores,
69 principalmente as doenças pós-colheita, podem levar a redução quantitativa ou
70 qualitativa da produção de frutos. A incidência desses fitopatógenos atinge 82,53%
71 dos frutos de mamoeiro na fase de comercialização causando consideráveis perdas
72 pós-colheita, tendo a podridão peduncular apresentado uma maior incidência de
73 aproximadamente 40% (Dantas *et al.*, 2003).

74 A doença atinge a região do pedúnculo, tomando a parte basal do fruto,
75 geralmente no início do amadurecimento, reduzindo significativamente sua vida de
76 prateleira (Ventura *et al.*, 2003). Várias espécies fúngicas podem estar associadas à
77 podridão peduncular, incluindo *Lasiodiplodia theobromae* (Alvarez & Nishijima, 1987;
78 Bleinroth & Sigrist, 1989; Dantas *et al.*, 2003). Até recentemente, *L. theobromae* era

79 considerado um fungo oportunista, normalmente associado a plantas estressadas.
80 Entretanto, sua importância como fitopatógeno vem crescendo (Freire *et al.*, 2004;
81 Viana *et al.*, 2007). Com o aumento da importância, o interesse no estabelecimento
82 de medidas de controle também tem crescido. As medidas de controle empregadas
83 para as podridões pedunculares incluem prevenção e erradicação de infecções;
84 evitar ferimentos e supressão do desenvolvimento e disseminação da doença;
85 tratamento pós-colheita com imersão dos frutos em água quente e/ou fungicidas
86 além de armazenamento em condições que retardem ou diminuam o apodrecimento
87 de frutos sem afetar a qualidade dos mesmos e pulverizações com fungicidas no
88 campo (Oliveira *et al.*, 2001). De acordo com o Ministério da Agricultura há vários
89 fungicidas registrados para a cultura do mamoeiro, porém, o único registrado para o
90 controle da podridão peduncular causada por *L. theobromae* é o tiabendazol,
91 pertencente ao grupo dos benzimidazóis.

92 Vários fatores podem ocasionar fracassos das aplicações de fungicidas, além
93 das condições climáticas desfavoráveis, época de aplicação e erros na dosagem. No
94 entanto, o ponto principal é o desenvolvimento da resistência (Azevedo, 2007).

95 A resistência a fungicida é uma adaptação estável e herdável de um fungo a
96 uma determinada dose de fungicida, a qual, previamente, proporcionava bom
97 controle. (Ghini & kimati, 2000). Vários estudos vêm relatando a perda de
98 sensibilidade de fungos a fungicidas: em *Botrytis cinerea* a benomyl (Kimura *et al.*,
99 2001); *Monilinia fructicola* a tebuconazol (Yoshimura *et al.*, 2004); *Colletotrichum*
100 *lindemuthianum* a tiofanato metílico (Sartorato, 2006); *C. gloeosporioides* a benomyl
101 (Sanders *et al.*, 2000); *Botryosphaeria dothidea* a tebuconazol (Ma *et al.*, 2002).

102 Um dos fatores que influenciam a velocidade do desenvolvimento da
103 resistência é a adaptabilidade de um isolado (Ghini & kimati, 2000), definida como a
104 habilidade do fungo de se desenvolver, reproduzir e sobreviver, comparada a outras

105 linhagens nas mesmas condições (Domingues *et al.*, 2003). A adaptabilidade esta
106 relacionada com os genes envolvidos na resistência, assim, alterações metabólicas
107 nos genes que conferem resistência estão ligados a perda de adaptabilidade na
108 presença (Ghini & kimati, 2000). Exemplos de perdas de adaptabilidade associadas
109 à resistência são vistos entre os fungicidas do grupo dicarboximida em *B. cinerea* e
110 em *Monilinia fructicola* (Beresford, 1994).

111 Por outro lado, Karaoglanidis *et al.* (2001) ao avaliarem a adaptabilidade de
112 isolados de *Cercospora beticola* a fungicidas inibidores da demetilação (DMIs)
113 quanto a virulência e a produção de esporos, sugeriram que, caso a proporção de
114 isolados resistentes em populações mistas seja alta, a aplicação de fungicidas
115 poderá selecionar isolados do patógeno resistentes a DMIs e que apresentem
116 também uma maior adaptabilidade.

117 No Brasil, não há registro de trabalhos desenvolvidos quanto à resistência de
118 *L. theobromae* a fungicidas causando podridão peduncular no mamão. O uso
119 contínuo de fungicidas poderá levar a resistência deste patógeno em várias culturas,
120 sendo, portanto, de grande relevância o conhecimento da sua sensibilidade a
121 diferentes fungicidas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a
122 sensibilidade sobre o crescimento micelial de 120 isolados de *L. theobromae in vitro*,
123 a cinco produtos de diferentes grupos químicos de ação sistêmica; e analisar a
124 adaptabilidade de 27 isolados selecionados aleatoriamente de acordo com a sua
125 população de origem e níveis de sensibilidade aos fungicidas testados.

126

127 2. MATERIAL E METODOS

128

129 2.1. Origem dos isolados

130 Durante os anos de 2006 e 2007, uma coleção de isolados de *L. theobromae*
131 foi estabelecida a partir de mamões com sintoma de podridão peduncular
132 provenientes de várias áreas de cultivo do Nordeste brasileiro (Dados não
133 publicados). Um isolado monospórico foi obtido para cada isolado da coleção. Em
134 seguida, para realização dos estudos, selecionou-se 120 isolados monospóricos,
135 escolhidos aleatoriamente de acordo com o local de origem. Os isolados
136 selecionados foram agrupados em seis populações, de acordo com a distância
137 geográfica entre as lavouras de origem (Fig. 1). A preservação dos isolados foi
138 realizada em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA comercial e mantidos a
139 5 °C, no escuro.

140 Para os estudos de sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade empregou-se
141 colônias com cinco dias de idade como fonte de propágulos. Estas colônias foram
142 obtidas por meio da transferência de fragmentos de meio contendo estruturas do
143 fungo dos tubos para placas de Petri contendo BDA comercial, as quais foram
144 mantidas a temperatura ambiente (± 28 °C).

145

146 **2.2. Sensibilidade a fungicidas *in vitro***

147 A sensibilidade a fungicidas de *L. theobromae* foi estimada por meio do cultivo
148 dos 120 isolados em BDA comercial contendo diferentes concentrações de cinco
149 fungicidas selecionados para estudo [ingrediente ativo (i.a.) / grupo químico]:
150 tebuconazol / triazol; prochloraz e imazalil / imidazol; benomyl e tiabendazol /
151 benzimidazol. Destes, o tiabendazol é registrado para uso no controle de *L.*
152 *theobromae* na cultura do mamoeiro no país e os inibidores da biossíntese de
153 ergosterol (IBEs), tebuconazol, prochloraz e imazalil, para controle de outros
154 patógenos da cultura. O Benomyl não é registrado para uso no mamoeiro. Cada
155 isolado foi cultivado em nove concentrações de cada fungicida: 0 (controle, sem

156 adição de fungicida); 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1 e 3 μg de i.a. mL^{-1} . Adicionalmente,
157 as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram empregadas para o benomyl e
158 tiabendazol. Para preparo das concentrações, os fungicidas foram solubilizados em
159 dimetil sulfóxido (DMSO) e adicionados a BDA fundido (± 45 °C), o qual foi em
160 seguida depositado em placas de Petri. Em todas as concentrações, inclusive no
161 controle, o volume de DMSO adicionado ao meio foi de 0,01% (v/v). Discos de meio
162 (5 mm de diâmetro) contendo estruturas fúngicas de cada isolado foram depositados
163 em placas de Petri contendo BDA mais o fungicida, sendo quatro repetições por
164 concentração. Os isolados foram incubados por trinta horas a 25 ± 1 °C, no escuro.
165 Em seguida, procedeu-se a mensuração do crescimento da colônia.

166 A inibição de crescimento micelial (ICM) para cada concentração foi expressa
167 em porcentagem e calculada como: $\text{ICM} = 100 - (\text{raio da concentração } i \times 100) / \text{raio}$
168 $\text{da concentração } 0$, onde i corresponde ao raio das concentrações testadas. Em
169 seguida, a concentração efetiva capaz de inibir o crescimento micelial em 50%
170 (CE_{50}) para cada repetição por isolado foi estimada por meio da utilização dos
171 parâmetros calculados pela regressão do ICM *versus* o \log_{10} da concentração do
172 fungicida. Em seguida, a diferença da frequência de isolados com níveis distintos de
173 sensibilidade entre populações foi estimada pelo teste não paramétrico Kolmogorov-
174 Smirnov (KSa). Posteriormente, os isolados foram agrupados de acordo com os
175 diferentes níveis de sensibilidade. Para isto, construiu-se uma matriz de
176 dissimilaridade pela aplicação da distância de Mahalanobis para os dados de CE_{50}
177 dos fungicidas IBEs e efetuou-se análise de agrupamento aos pares utilizando
178 médias aritméticas (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean - UPGMA).
179 Dos três dendrogramas resultantes, diferenciaram-se grupos de isolados similares
180 quanto à sensibilidade aos fungicidas avaliados. Para o Benomyl e tiabendazol, a

181 discriminação foi feita pela presença/ausência de crescimento na maior
182 concentração avaliada.

183 Adicionalmente, foi procedida análise de correlação de Pearson com os dados
184 de CE₅₀ para identificação de resistência cruzada e/ou múltipla.

185 Para avaliação do crescimento micelial e agressividade de *L. theobromae* a
186 mamão em diferentes temperaturas, 27 isolados foram selecionados aleatoriamente
187 de acordo com o nível de sensibilidade aos fungicidas testados e população de
188 origem.

189

190 **2.3. Adaptabilidade**

191

192 **2.3.1. Crescimento micelial *in vitro* e agressividade a mamão sob diferentes** 193 **temperaturas**

194 Para realização dos experimentos, para cada isolado, discos de BDA (5 mm
195 de diâmetro) contendo estruturas fúngicas foram obtidos a partir da margem de
196 colônias em crescimento ativo.

197 Para avaliar a influência da temperatura no crescimento *in vitro*, discos de
198 BDA foram e depositados em placas de Petri contendo BDA. As placas foram
199 acondicionadas a 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, três placas por temperatura, no
200 escuro. Após 30h, o diâmetro da colônia foi mensurado.

201 A influência da temperatura na agressividade dos isolados foi avaliada através
202 da inoculação de frutos e acondicionamento destes sob diferentes temperaturas.
203 Para isto, mamões (cv. Surine Solo), no quarto estágio de maturação (Brापex, 2009),
204 foram superficialmente desinfestados por lavagem com água e sabão, imersão por 5
205 min em hipoclorito de sódio (3:1), e lavagem com água destilada. Posteriormente,
206 após a secagem, a epiderme de cada fruto foi ferida em quatro pontos equidistantes.

207 Os ferimentos, com 3 mm de profundidade, foram realizados com o emprego de
208 almofada de alfinetes esterilizada. Discos de BDA foram depositados sobre cada
209 lesão e os frutos acondicionados em bandejas plásticas recobertas por sacos
210 plásticos. Para propiciar condição de umidade elevada, o fundo de cada bandeja foi
211 revestido com papel toalha umedecido com água destilada. As bandejas foram então
212 mantidas a 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 °C, quatro frutos por isolado temperatura⁻¹.
213 Após 24 h, o saco plástico e papel toalha foram removidos e os frutos mantidos nas
214 mesmas condições. Após 30 h agressividade foi avaliada por meio da mensuração
215 do diâmetro das lesões com o auxílio de uma régua milimétrica.

216 O delineamento dos experimentos de adaptabilidade foi inteiramente
217 casualizado com três repetições (crescimento micelial; uma placa=uma repetição) e
218 quatro repetições (agressividade; um fruto=uma repetição). Ambos os experimentos
219 foram repetidos no tempo. Calculou-se, para cada isolado, o diâmetro médio da
220 colônia (DMC) e diâmetro médio da lesão (DML) por temperatura.

221 A estimativa de variáveis para comparação da adaptabilidade entre isolados *in*
222 *vitro* e *in vivo* foi feita por meio do ajuste dos dados do DMC e DML,
223 respectivamente, ao modelo cúbico $Y = a + bX + cX^2 + dX^3$, onde $Y = \text{DMC ou DML}$,
224 e $X = \text{temperatura}$. A partir deste modelo, estimou-se a: área abaixo da curva de
225 crescimento micelial (AACCM), temperatura mínima crítica para o crescimento
226 micelial *in vitro* (TM), amplitude de crescimento micelial *in vitro* (AC), temperatura
227 ótima para o crescimento micelial *in vitro* (TO1), área abaixo da curva de
228 desenvolvimento da doença (AACDD), e a temperatura ótima para o
229 desenvolvimento da doença (TO2). Verificou-se a homogeneidade de variância entre
230 experimentos pelo teste de Levene. A comparação de médias entre isolados foi
231 efetuada por meio do teste de Tukey (P=0,05) para AACDD e Mann-Whitney
232 (P=0,05) para as demais variáveis.

233 3. RESULTADOS

234

235 3.1. Sensibilidade a fungicidas *in vitro*

236 A resposta de sensibilidade variou de acordo com o fungicida. Para os
237 benzimidazóis, 8,4% dos isolados não tiveram o crescimento inibido na maior
238 concentração avaliada e a CE_{50} não pôde ser estimada para ambos os fungicidas.
239 Estes isolados foram denominados como não sensíveis (NS) ($CE_{50} > 100 \mu\text{g}$ de i.a.
240 ml^{-1}). Para os 91,6% restantes, denominados como sensíveis (S), a CE_{50} média foi
241 de 0,083 (amplitude: 0,002 - 0,14) e 0,765 (0,36 - 1,272) para o benomyl e
242 tiabendazol, respectivamente. Considerando a freqüência de distribuição dos
243 isolados nas populações amostradas, todos os isolados NS foram oriundos da
244 população 5, constituídas por isolados dos municípios de Parnamirim e São José do
245 Mapitu, representando 44,5 e 54,5% dos isolados destas cidades, respectivamente.

246 As concentrações avaliadas propiciaram uma resposta de inibição contínua
247 entre os extremos de sensibilidade para os IBEs. A CE_{50} média foi de 0,494 (0,141 -
248 4,054), 0,192 (0,045 - 0,691) e 0,569 (0,001 - 1,529) para o tebuconazol, prochloraz e
249 imazalil, respectivamente. Considerando a freqüência de distribuição dos isolados
250 nas populações amostradas, não houve diferença no nível de sensibilidade entre as
251 populações (tebuconazol: $P = 0,21$; prochloraz: $P=0,26$; e imazalil: $P=0,22$) (Tabela
252 1).

253 Os agrupamentos gerados para os dados de dissimilaridade propiciaram a
254 distinção de classes de isolados com níveis de sensibilidade distintos para os
255 fungicidas, sendo para o tebuconazol: S [constituído por 97% dos isolados, com CE_{50}
256 média de 0,44 (amplitude de 0,141-0,907)], Moderadamente Sensíveis (MS) [1,67%,
257 $CE_{50}= 1,869$ (0,313-3,341)] e Pouco Sensíveis (PS) [0,893%, $CE_{50} = 4,05$ (0,149-
258 8,25)]; prochloraz: S [90,8%, $CE_{50}= 0,166$ (0,045-0,304)], MS [8,33%, $CE_{50}= 0,428$

259 (0,357-0,524)] e PS [0,83%, $CE_{50} = 0,69$ (0,36-1,022)]; e imazalil: S [89,17%, $CE_{50} =$
260 0,5 (0,001-0,954)], e MS [10,83%, $CE_{50} = 1,2$ (1,011-1,529)].

261 Considerando o nível de sensibilidade dos isolados aos diferentes fungicidas,
262 não foi evidenciada existência de resistência múltipla. Entretanto, houve resistência
263 cruzada dos isolados para os benzimidazóis, sendo positiva a correlação do nível de
264 sensibilidade aos dois fungicidas ($r=0,99$; $P<0,0001$) (isolados NS aos benzimidazóis
265 não foram considerados na correlação). Isto fica mais evidente considerando-se que
266 os isolados classificados como NS ao benomyl e tiabendazol foram os mesmos.

267

268 3.2. Adaptabilidade

269

270 3.2.1. Crescimento *in vitro* e agressividade a mamão sob diferentes 271 temperaturas

272 A maioria dos isolados teve o crescimento micelial inibido nas temperaturas
273 de 10 (81% do total) e 40°C (96%). Nos testes de agressividade, por motivos
274 operacionais, apenas os dados de 13 isolados puderam ser analisados. Destes,
275 todos tiveram o desenvolvimento de lesão inibido nas temperaturas de 10, 15 e
276 40°C.

277 Dentre modelos testados, o de melhor ajuste às curvas DMC e DML foi o
278 cúbico, tendo como critérios para sua escolha o R^2 , gráfico de resíduos e
279 simplicidade matemática. Para todas as variáveis estimadas não foi detectada
280 diferença quanto a homogeneidade de variância entre os experimentos pelo teste de
281 Levene: AACCM ($P=0,86$), TO1($P=0,94$), TM ($P=0,82$), AC ($P=0,82$), AACDD
282 ($P=0,33$), e TO2 ($P=0,18$). Assim, os dados de ambos os experimentos foram
283 analisados em conjunto.

284 Todos os isolados diferiram quanto aos parâmetros estimados (Figura 2). Não
285 foi detectada relação entre o nível de sensibilidade ao tebuconazol, imazalil e
286 prochloraz com as variáveis (dados não mostrados). Já para os isolados NS aos
287 benzimidazóis a tendência observada *in vitro* foi de que eles possuem as TO1 e TM
288 mais baixas e maiores AC (Figura 2B, C, F). Já *in vivo*, a tendência para TO2 foi
289 inversa, mais elevada (Figura 2E). Com relação a AACCM, não observou-se
290 tendência enquanto que para AACDL, os isolados NS tiveram as menores áreas
291 (Figura 2A, D).

292

293 4. DISCUSSÃO

294

295 Este é o primeiro relato da sensibilidade de *L. theobromae*, patogênicos ao
296 mamão, a fungicidas IBEs e benzimidazóis no Brasil. Foi detectada elevada
297 diferença entre os extremos de sensibilidade a todos os fungicidas avaliados,
298 principalmente para os benzimidazóis. Adicionalmente, também foi verificada menor
299 adaptabilidade *in vivo* de isolados NS aos benzimidazóis.

300 A classificação de isolados quanto ao nível de sensibilidade é um tema
301 controverso quando se trata da resistência a fungicidas cuja resposta de
302 sensibilidade é contínua entre isolados. Nas definições existentes, como a
303 apresentada por Ma & Michailides (2005) “Resistência a fungicida é uma adaptação
304 estável e herdável de um fungo a um fungicida que resulta na redução de
305 sensibilidade do fungo ao fungicida”, fica explícito que qualquer redução na
306 sensibilidade pode ser caracterizada como resistência. Entretanto, nem sempre é
307 definido com clareza o quanto um isolado tem que ser menos sensível do que o outro
308 para ser rotulado como resistente (Davidson *et al*, 2006, Karaoglanidis e
309 Thanassoulopoulos, 2002, Karaoglanidis *et al.*, 2003). Por exemplo, três trabalhos

310 distintos, que avaliaram a sensibilidade do mesmo fungo, *Cercospora beticola*, a um
311 mesmo triazol, flutriafol, definiram como isolados sensíveis aqueles cuja CE₅₀ foi
312 inferior a 0,4 µg mL⁻¹ (Davidson *et al.*, 2006), 0,1 (Karaoglanidis &
313 Thanassoulopoulos, 2002) e 0,12 (Karaoglanidis *et al.*, 2003). Já os isolados
314 resistentes foram aqueles com CE₅₀ superior a 0,75 (Davidson *et al.*, 2006), 2,7
315 (Karaoglanidis & Thanassoulopoulos, 2002) e 8 (Karaoglanidis *et al.*, 2003). Assim,
316 para evitar que fosse adotado um critério dúbio, preferiu-se classificar os isolados de
317 *L. theobromae* de acordo com a amplitude de variação dos valores de CE₅₀ para os
318 IBEs. Para os benzimidazóis, a classificação foi mais simples, uma vez que a
319 resposta de sensibilidade foi qualitativa, onde isolados extremamente insensíveis
320 não sofreram qualquer inibição de crescimento nas concentrações testadas.

321 Os valores de CE₅₀ foram altos para os IBEs. A CE₅₀ média dos isolados PS
322 foi de 4,05 para o tebuconazol, 0,69 para o prochloraz e 1,2 para os isolados MS ao
323 imazalil. Estes valores são elevados, considerando-se, principalmente, a EC₅₀ média
324 relatada para espécies filogeneticamente relacionadas a *L. theobromae*, como *B.*
325 *dothidea*, *B. obtusa* e *B. protearum*, cujos valores para o tebuconazol são de 0,021 a
326 0,291, 0,036 e 1,32, respectivamente (Parker & Sutton, 1993, Arauz & Sutton, 1990,
327 Ma *et al.*, 2001, Ma & Michailides, 2002, Ma *et al.*, 2002, Denman *et al.*, 2004). Para
328 outros IBEs, os valores relatados para *B. dothidea* e *B. obtusa* não ultrapassam 0,5
329 µg mL⁻¹ (Parker & Sutton, 1993, Arauz & Sutton, 1990, Ma *et al.*, 2002). O único
330 trabalho encontrado em que foi estimada a CE₅₀ para *L. theobromae*, patogênico a
331 videira, os valores foram de 0,17 para tebuconazol e 0,6 para o prochloraz (Bester *et*
332 *al.*, 2007). Esses valores tornam-se mais relevantes se for considerado que não há
333 nenhum IBE registrado para o controle de *L. theobromae* em mamão no país. Os
334 IBES avaliados no presente estudo são autorizados para o controle de outros
335 patógenos de ocorrência comum na cultura, como *C. gloeosporioides* e *A. alternata*.

336 Assim, a baixa sensibilidade aos IBEs pode ser resultado da exposição da população
337 de *L. theobromae* presente nos pomares aos fungicidas utilizados para controle de
338 outros patógenos. Isso pode ser um fato comum nas áreas de cultivo, considerando
339 que não houve diferença entre as populações quanto ao nível de sensibilidade
340 (Tabela1).

341 A resistência ao grupo dos IBEs é denominada quantitativa e envolve a
342 interação de vários genes, os quais codificam a resistência ao fungicida (Schnabel &
343 Jones, 2001). Essa interação é caracterizada por pequenos aumentos na resistência
344 a cada mutação, não usualmente mensurável em campo a curto tempo. Nestes
345 casos, o risco da resistência é considerado baixo ou moderado, visto que a
346 velocidade das mudanças ocasionadas pela resistência é determinada pela
347 epidemiologia do patógeno e a frequência ou duração da pressão de seleção
348 aplicada (Azevedo, 2007). Ainda que esse nível de sensibilidade seja encontrado ao
349 longo do tempo, o manejo dos fungicidas do grupo dos IBEs pode evitar o
350 surgimento de isolados não sensíveis em uma população no campo.

351 A distribuição de isolados NS aos benzimidazóis foi localizada. Todos os
352 isolados NS foram oriundos de uma única população, representando 50% da
353 população 5. Como citado anteriormente, o único fungicida regulamentado para
354 manejo da podridão de pedúnculo causada por *L. theobromae* é o tiabendazol. Ele é
355 utilizado no tratamento pós-colheita dos frutos e, considerando que após o
356 tratamento os frutos são escoados para os mercados consumidores, é de se esperar
357 que, caso o tratamento esteja selecionando indivíduos resistentes, estes sejam
358 escoados para fora das áreas produtoras juntamente com os frutos. Entretanto,
359 como comumente ocorre com patógenos causadores de podridões em frutos, o
360 contato de *L. theobromae* com o mamão ocorre no campo, principalmente durante a
361 colheita. Assim, a principal fonte de inóculo localiza-se no campo. Como, além do

362 tiabendazol, outros benzimidazóis são empregados nas lavouras para controle de
363 outros patógenos, *A. caricae* e *Oidium caricae*, pode estar ocorrendo o fenômeno de
364 resistência cruzada. Este fenômeno é comum entre espécies fúngicas aos
365 benzimidazóis e é amplamente relatado na literatura (Ma & Michailides, 2005,
366 Davidson *et al.*, 2006). Isto ocorre principalmente por causa do mecanismo de
367 resistência consistir, na grande maioria dos casos estudados, em mutação pontual
368 do gene da β -tubulina (Ma & Michailides, 2005). Desse modo, como citado acima
369 para os IBEs, a população de *L. theobromae* pode estar sofrendo pressão de
370 seleção ainda no campo.

371 As evidências de custo adaptativo variou de acordo com o experimento. Nos
372 experimentos *in vitro*, não foi detectado indício de custo adaptativo para os isolados
373 NS aos benzimidazóis (Figura 2). Eles tiveram a maior AC e TO1 mais baixas
374 (Figuras 2B, F). Entretanto, nos experimentos *in vivo* as evidências são contrárias.
375 De modo geral, a tendência foi de que eles tivessem a TO2 mais elevada e menor
376 AACDD, significando que a severidade dos sintomas incitados nos frutos foi menor,
377 uma vez que a amplitude de crescimento *in vivo* foi a mesma para os isolados NS e
378 S (dados não mostrados). Mesmo com uma adaptabilidade menor, essa situação é
379 preocupante porque embora os isolados NS tenham menor capacidade de causar
380 doença, eles foram aptos a infectar e colonizar os tecidos. Isso pode levar a
381 problemas práticos de controle, principalmente se for considerado que o fungicida
382 utilizado na pós-colheita é um tiabendazol. Os relatos de custo adaptativo
383 relacionados a resistência aos benzimidazóis indicam a ocorrência de efeitos
384 pleiotrópicos associados a mutações no gene da β -tubulina (Ma & Michailides, 2005).
385 Evidências experimentais apontam que sensibilidade a temperaturas extremas
386 observadas em isolados resistentes são correlacionadas com mutações em códons
387 específicos. Por exemplo, um isolado resistente de *Fusarium moniliforme* com uma

388 mutação no códon 50 foi mais sensível ao frio (Yan & Dickman, 1996), enquanto que
389 isolados de *Monilina laxa* e *Monilina fruticola* com mutações nos códons 240 e 198,
390 respectivamente, foram mais sensíveis ao calor (Ma *et al.*, 2003, 2005). Cabe
391 ressaltar que os efeitos descritos diferem dos encontrados para *L. theobromae*, já
392 que não houve diferença entre os isolados NS e S quanto a AC.

393 Até pouco tempo *L. theobromae* era considerado um fungo oportunista e
394 relacionado a plantas estressadas, no entanto, nas duas últimas décadas, os relatos
395 de danos causados por este patógeno a diversas plantas hospedeiras tem crescido
396 no Brasil (Freire *et al.*, 2004). Em mamoeiro ele era relacionado apenas à podridão
397 peduncular em frutos, mas já há relatos de morte de plantas no campo associada ao
398 patógeno (Freire *et al.*, 2004). Os valores elevados de CE₅₀ estimados para todos os
399 fungicidas, especialmente para os benzimidazóis, são um indicativo de que a
400 população do patógeno associada aos pomares de mamão podem estar sofrendo
401 uma pressão de seleção para resistência aos IBEs e benzimidazóis pelo uso
402 intensivo de fungicidas para o controle de outras doenças. Novos estudos deverão
403 ser conduzidos com um número maior de isolados para quantificação de outras
404 variáveis indicativas de adaptabilidade para que estratégias de manejo da doença
405 possam ser desenvolvidas

406

407 5. AGRADECIMENTOS

408

409 Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo
410 apoio institucional e ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
411 Tecnológico pelo apoio financeiro

412

413 6. REFERENCIAS

- 414 Alvarez AM, Nishijima WT (1987) Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease*
415 71:681-686.
- 416 Arauz LF, Sutton TB (1990) Protectant and after-infection activity of fungicides
417 against *Botryosphaeria obtusa* on apple. *Plant Disease* 74:1029-1034.
- 418 Azevedo LAS (2007) Fungicidas sistêmicos: teoria e prática. fundamentos para o uso
419 racional. Campinas: Emopi Gráfica Editora Ltda.
- 420 Beresford R (1994) Understanding fungicide resistance.
421 <http://www.hortnet.co.nz/publications/science/orch94.htm>. Acesso em: 09 dez. 2008.
- 422 Bester W, Crous PW, Fourie PH (2007) Evaluation of fungicides as potential
423 grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian*
424 *Plant Pathology* 36:73-77.
- 425 Bleinroth EW, Sigrist JMM (1989) II - Matéria-prima. In: ITAL Mamão: cultura,
426 matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL. pp.179-
427 254.
- 428 Dantas SAF, Oliveira SMA, Michereff SJ, Nascimento LC, Gurgel LMS, Pessoa
429 WRLS (2003) Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados
430 na Central de Abastecimento do Recife. *Fitopatologia Brasileira* 28:528-533.
- 431 Davidson RM, Hanson LE, Franc GD, Panella L (2006) Analysis of β -tubulin gene
432 fragments from benzimidazole-sensitive and -tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of*
433 *Phytopathology* 154:321-328.
- 434 Davidson RM, Hanson LE, Franc GD, Panella L (2006) Analysis of β -tubulin gene
435 fragments from benzimidazole-sensitive and -tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of*
436 *Phytopathology* 154:321-328.
- 437 Domingues RJ, Tófoli JG, Pinto RF (2003) Sensibilidade “in vitro” a iprodione, taxa
438 de crescimento e patogenicidade de linhagens de *Botrytis cinerea* à *Rosa* sp. *Revista*
439 *Ecossistema* 28: 35-40.

- 440 Freire FCO, Viana FMP, Cardoso JE, Santos AA (2004) Novos hospedeiros do fungo
441 *Lasiodiplodia theobromae* no estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria
442 Tropical, 6 p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 91).
- 443 Ghini R, Kimati H (2000) Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna. Embrapa
444 Meio Ambiente.
- 445 Karaoglanidis GS, Thanassoulopoulos CC, Ioannidis PM (2001) Fitness of
446 *Cercospora beticola* Field Isolates - Resistant And - Sensitive to Demethylation
447 Inhibitor Fungicides. European Journal of Plant Pathology 107:337-347.
- 448 Karaoglanidis GS, Thanassoulopoulos CC (2002) Phenotypic instability of
449 *Cercospora beticola* Sacc. strains expressing resistance to the sterol demethylation-
450 inhibiting (DMI) fungicide flutriafol after cold exposure. Journal of Phytopathology
451 150:692-696.
- 452 Karaoglanidis GS, Menkissoglu-Spiroudi U, Thanassoulopoulos CC (2003) Sterol
453 composition of DMI-Resistant and -Sensitive field isolates of *Cercospora beticola*.
454 Journal of Phytopathology 151:431-435.
- 455 Kimura MK, Souza PE, Castro HA (2001) Sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a
456 Fungicidas. Ciências Agrotécnicas 25:1150-1160.
- 457 Ma Z, Luo Y, Michailides TJ (2001) Resistance of *Botryosphaeria dothidea* from
458 Pistachio to Iprodione. 85:183-188.
- 459 Ma Z, Michailides TJ (2002) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* Isolates
460 collected from pistachio and other plant hosts in California. Phytopathology 92:519-
461 526.
- 462 Ma Z, Morgan DP, Felts D, Michailides TJ (2002) Sensitivity of *Botryosphaeria*
463 *dothidea* from California pistachio to tebuconazole. Crop Protection 21:829-835.

- 464 Ma Z, Yoshimura M, Michailides TJ (2003) Identification and characterization of
465 benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California.
466 *Applied and Environmental Microbiology* 69:7145-7152.
- 467 Ma Z, Michailides TJ (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of
468 fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in
469 phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.
- 470 Ma Z, Yoshimura M, Holstz BA, Michailides TJ (2005) Characterization and PCR-
471 based detection of benzimidazole resistant isolates of *Monilinia laxa* in California.
472 *Pest Management Science* 61:449-457.
- 473 Parker KC, Sutton TB (1993) Effect of temperature and wetness duration on apple
474 fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*.
475 *Plant Disease* 77:181-185.
- 476 Oliveira SMA, Tavares SCCH, Dantas SAF (2001) Diagnose e Manejo de Doenças
477 das Fruteiras Tropicais no Nordeste Brasileiro. In: Michereff SJ, Barros R (Eds.)
478 *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife. Imprensa Universitária da
479 UFRPE. pp. 183-223.
- 480 Sanders GM., KL. Wehner FC (2000) Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum*
481 *gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa.
482 *European Journal of Plant Pathology* 106: 745-752.
- 483 Sartorato A (2006) Sensibilidade "in vitro" de isolados de *Colletotrichum*
484 *lindemuthianum* a fungicidas. *Pesquisa Agropecuária Tropical (UFG)* 36: 211-213.
- 485 Schnabel G, Jones AL (2001) The 14a-demethylase (*CYP51A1*) gene is
486 overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil.
487 *Phytopathology* 91:102-110.

488 Ventura JA, Costa H, Tatagiba JS (2003) Manejo das doenças do mamoeiro. In:
489 Martins DS, Costa AFS (Eds.) A cultura do mamão: tecnologia e produção. Vitória
490 ES. INCAPER. pp. 229-308.

491 Viana FMP, Cardoso JE, Souza RNM, Holanda VO (2007) Controle da Podridão-da-
492 Haste-do-Mamoeiro no Estado do Ceará. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical.
493 4 p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 133).

494 Yoshimura MA, Luo Y, Ma Z, Michailides TJ (2004) Sensitivity of *Monilinia fructicola*
495 from stone fruit to thiophanate-methyl, prodione, and tebuconazole. Plant Disease
496 88:373-378.

497

498 **RECURSOS DA INTERNET**

499

500 FAO. A folder available on the Internet. <http://apps.fao.org>. Acesso em: 13 de fev.
501 2009

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513 Tabela 1. Sensibilidade de seis populações de *L. theobromae* a três fungicidas
 514 inibidores da demetilação.

POPULAÇÃO	Tebuconazol		Imazalil		Prochloraz	
	¹ CE50	² Amplitude	CE50	Amplitude	CE50	Amplitude
1	0.634	0.299 - 4.054	0.530	0.245 - 1.164	0.195	0.108 - 0.304
2	0.311	0.141 - 0.404	0.362	0.195 - 0.615	0.124	0.045 - 0.259
3	0.630	0.276 - 2.226	0.603	0.001 - 1.529	0.218	0.050 - 0.524
4	0.404	0.207 - 0.649	0.515	0.204 - 1.276	0.147	0.069 - 0.477
5	0.445	0.296 - 0.704	0.494	0.208 - 0.856	0.218	0.091 - 0.454
6	0.512	0.324 - 0.792	0.835	0.414 - 1.357	0.246	0.091 - 0.691
³ KSa= 2.334		P= 0.21	KSa= 2.436	P= 0.22	KSa= 2.799	P= 0.26

515 ¹CE₅₀ média em µg mL⁻¹.

516 ²Amplitude de Crescimento entre os isolados na mesma população

517 ³Diferença de sensibilidade entre populações Kolmogorov-Smirnov (KSa)

518

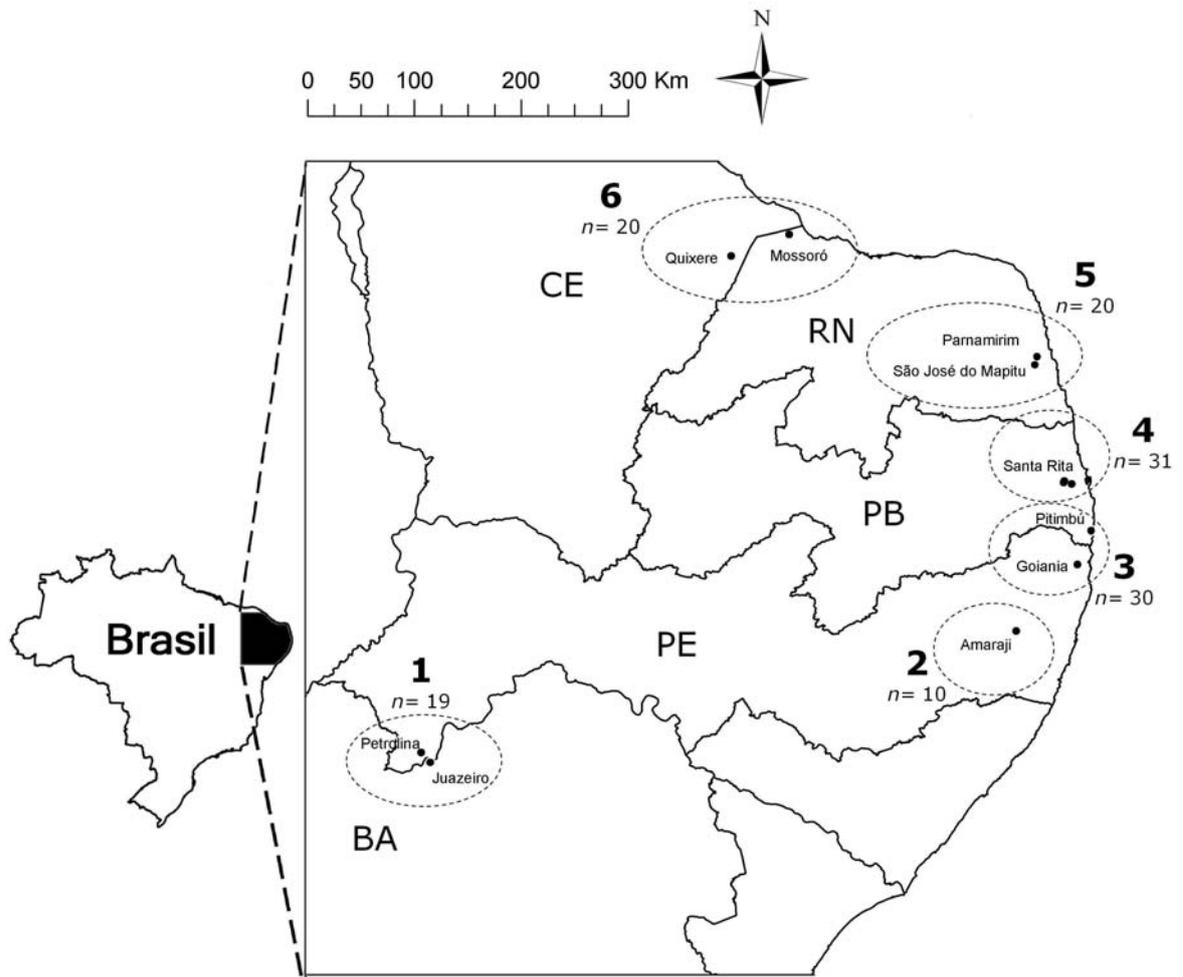
519 **Figura 1.** Pontos de coleta de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* nos estados da
520 Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Rio Grande do Norte (RN) e Ceará
521 (CE), Brasil. Os nomes próximos aos pontos correspondem aos municípios dos
522 pomares amostrados. Os semicírculos pontilhados representam as populações
523 definidas para estudo, sendo o número ao lado de cada semicírculo correspondente
524 a numeração atribuída a população e n = número de isolados em cada população.

525

526 **Figura 2.** Componentes de adaptabilidade estimados *in vitro* (crescimento micelial) e
527 *in vivo* (agressividade a mamão) de isolados de *L. theobromae* sensíveis (S) e não
528 sensíveis (NS) aos fungicidas tiabendazol e benomyl. **A.** Área abaixo da curva de
529 crescimento micelial; **B.** Temperatura em que o crescimento micelial foi máximo; **C.**
530 Temperatura mínima crítica para o crescimento micelial; **D.** Área abaixo da curva de
531 desenvolvimento de doença; **E.** Temperatura em que o desenvolvimento de lesão foi máximo; e **F.** Amplitude de crescimento micelial *in vitro*.
532 Barras com uma mesma letra não diferem entre si (Mann-Whitney; $P=0,05$).

534

535 Figura 1.



536

537

538

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. É necessário o estudo sobre manejo de fungicidas do grupo DMIs, utilizados nas áreas cultivadas com mamoeiro para evitar o surgimento de isolados não sensíveis em uma população no campo.
2. Com o aumento da importância de *L. theobromae* como fitopatógeno para as regiões produtoras de mamão o uso intensivo de fungicidas do grupo dos benzimidazois pode resultar no surgimento de isolados não sensíveis.
3. Aplicações alternadas de fungicidas de modo de ação diferentes podem ajuda a manejar a resistência nas áreas onde o patógeno tem uma maior expressão.