



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação De Mestrado

**Sensibilidade e adaptabilidade de espécies de
Botryosphaeriaceae de mangueira a fungicidas MBC**

Kledson Mendes dos Santos

**Recife - PE
2017**

KLEDSON MENDES DOS SANTOS

**SENSIBILIDADE E ADAPTABILIDADE DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERIACEAE DE MANGUEIRA A FUNGICIDAS MBC**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Ueder Pedro Lopes (UFRPE-UAG)

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

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2017**

Ficha Catalográfica

S237s Santos, Kledson Mendes dos
Sensibilidade e adaptabilidade de espécies de
Botryosphaeriaceae de mangueira a fungicidas MBC / Kledson
Mendes dos Santos. – 2017.
71 f. : il.

Orientador: Ueder Pedro Lopes.
Coorientador: Sami Jorge Michereff.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. *Mangifera indica* L. 2. Morte descendente 3. Podridão
peduncular 4. Mecanismo de resistência 5. Tiabendazol
6. Tiofanato metílico I. Lopes, Ueder Pedro, orient. II. Michereff,
Sami Jorge, coorient. III. Título

CDD 632

**SENSIBILIDADE E ADAPTABILIDADE DE ESPÉCIES DE
BOTRYOSPHAERIACEAE DE MANGUEIRA A FUNGICIDAS MBC**

KLEDSON MENDES DOS SANTOS

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 21/02/2017

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ueder Pedro Lopes (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Kamila Câmara Correia (UFCA)

Prof. Dr. Alessandro Nicoli (UFRPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2017**

Aos meus pais, Celso Mendes e Joselita do Carmo

Meus irmãos Celso Jr e Josiclêcia, sobrinha Sophia

Ao meu eterno e infinito amor da minha vida Jeniffa Lira “noiva” (†)

Às minhas avós Liberalina do Carmo “Belinha” (†) e Miriam Mendes “Mariínha” (†)

Avô Manoel Bispo “Bigode” e Marinho (†)

Minha tia Maria do Carmo (†)

DEDICO

Minha eterna Gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me curar e sempre me proporcionar energias positivas.

Aos meus pais, Joselita do Carmo e Celso Mendes, irmãos Celso Mendes e Josiclêcia Mendes, e sobrinha Sophia por todo amor, confiança, apoio incondicional, ajuda em superar todos os momentos, sendo alicerce, inspiração e combustível para todas minhas conquistas.

Aos meus eternos amados avós Liberalina do Carmo (†), Miriam Mendes (†) e Manoel Bispo (†) e à minha amada tia Maria do Carmo (†), que sempre acreditaram em mim, torceram para meu melhor e sempre proporcionaram muita luz em meu caminho.

Ao meu eterno e infinito amor da minha vida Jêniffa Lira “noiva” (†), por todo amor, amizade, paciência, compreensão, cumplicidade, dedicação, força, torcida e sempre apoiando em todos momentos por quase uma década, e eternamente será minha essência, base e combustível para todas minhas inspirações, determinações, conquistas e superações.

Ao orientador Prof. Dr. Ueder Pedro Lopes e coorientador Prof. Dr. Sami Jorge Michereff, por todo acolhimento, incentivos e suporte para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu orientador de graduação, Prof. Dr. Ricardo Brainer Martins (UFAL), por todos os ensinamentos e abertura das portas do mundo da Fitopatologia.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e a todos os professores, funcionários e colegas de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra. Susan Tsuji e Dra. Rejane Lopes pelo auxílio nos métodos biologia molecular.

A toda equipe do Laboratório de Fitopatologia (UFRPE-UAG), em especial Diego, Jacielle, João, Felipe, Erivaldo, Marthony e Carol pela amizade e valiosa contribuição durante a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial, Cinthia Conforto, Fábio, Soraya, Tamires e Catarina por todo suporte e amizade.

À Iwanne, Leandro, Joelma, Cinthia, Alessandra, Gerson e Nelson por toda amizade, suporte, ensinamentos, conselhos que foram fundamentais para superação de vida e curso.

À Dulce, Moara, Claudiane, Marli, Luciana, Rezânio e Emanuel por toda amizade.

A todos que, involuntariamente, não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	10
1. Importância da cultura da manga.....	11
2. Doenças da mangueira.....	12
2.1. Morte descendente e podridão peduncular causadas por Botryosphaeriaceae	13
2.2. Espécies de Botryosphaeriaceae associadas à mangueira no Brasil.....	14
3. Controle da morte descendente e da podridão peduncular da mangueira	15
4. Resistência de fungos a fungicidas	16
4.1. Resistência aos MBCs	19
4.2. Resistência a fungicidas em espécies de Botryosphaeriaceae	21
5. Adaptabilidade e estabilidade de isolados resistentes a fungicidas.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO II - Sensitivity and fitness of Botryosphaeriaceae species from Brazilian Northeast mango orchards to MBC fungicides	33
Abstract.....	35
Introduction	36
Materials and methods.....	40
Results	45
Discussion.....	47
Acknowledgements	53
References	53
CONCLUSÕES GERAIS	70

RESUMO GERAL

A morte descendente e a podridão peduncular, causadas por espécies de Botryosphaeriaceae, são importantes doenças na cultura da mangueira no Brasil. Embora os fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico (metil carbamato de benzimidazol - grupo MBC) sejam comumente aplicados em pomares de manga no Nordeste do Brasil, não há dados disponíveis sobre a sensibilidade, estabilidade da sensibilidade, eficácia de controle, adaptabilidade e mecanismo de resistência de Botryosphaeriaceae a estes fungicidas. Por isso, isolados de Botryosphaeriaceae provenientes de pomares de manga do Nordeste brasileiro foram analisados quanto à sensibilidade aos fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico. A concentração efetiva do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial (CE_{50}) de 154 isolados foi estimada *in vitro*. Foram selecionados dez isolados com os menores valores de CE_{50} (sensíveis, S) e dez com os maiores valores (menos sensíveis, MS) para ambos os fungicidas. Estes isolados foram comparados quanto à sensibilidade, estabilidade da sensibilidade, presença de mutação, componentes de adaptabilidade (taxa de crescimento micelial, sensibilidade osmótica e agressividade) e eficácia de controle da doença em frutos de manga. A sensibilidade média dos isolados MS ($2,48 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $7,65 \mu\text{g ml}^{-1}$ para tiabendazol e tiofanato metílico, respectivamente) foi maior do que para os isolados S ($0,12 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ para tiabendazol e tiofanato metílico, respectivamente) ($P < 0,05$). Apesar disso, nenhuma mutação foi encontrada no códon 198 do gene da β -tubulina para os isolados MS. Foi observada uma correlação positiva e significativa ($r=82$; $P < 0,01$) entre a sensibilidade aos dois fungicidas. Não foram observadas diferenças na sensibilidade dos isolados S e MS após dez transferências sequenciais em meio BDA sem fungicida ($P > 0,05$). O crescimento micelial *in vitro* e a agressividade em frutos de manga foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os isolados S e MS, considerando ambos os fungicidas. No entanto, os isolados MS apresentaram menor sensibilidade osmótica ($P < 0,05$). Os fungicidas foram capazes de controlar a infecção em frutos de manga inoculados com os isolados S e MS. Este é o primeiro estudo sobre a sensibilidade de populações de Botryosphaeriaceae em pomares de manga aos fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico, em nível mundial. Os resultados demonstram que estes fungicidas podem ser utilizados na cultura da mangueira, embora com cautela, devido ao risco iminente de aumento da insensibilidade na população.

Palavras-chave: *Mangifera indica* L., mecanismo de resistência, morte descendente, podridão peduncular, tiabendazol, tiofanato metílico.

GENERAL ABSTRACT

Dieback and stem-end rot caused by Botryosphaeriaceae species are an important mango disease in Brazil. Thiabendazole and thiophanate-methyl (both belonging to methyl benzimidazole carbamate group - MBC) are common fungicides used in mango orchards in northeastern Brazil. There are no data available on the sensitivity to these fungicides, stability of sensitivity, molecular mechanisms of resistance and fitness-related variables on Botryosphaeriaceae to these fungicides. Thus, evaluate the sensitivity to fungicides thiophanate-methyl and thiabendazole in Botryosphaeriaceae isolates collected from different commercial mango orchards in the Brazilian Northeastern. Thus, the effective concentration that results in 50% of mycelial growth inhibition (EC_{50}) of 154 isolates were established. Ten isolates with lower (sensitive, S) and high (less-sensitive, LS) values of EC_{50} values for thiabendazole and thiophanate-methyl were evaluated for sensitivity, stability of sensitivity, molecular mechanisms of resistance, components of fitness (mycelial growth rate, osmotic sensitivity and virulence) and effectiveness to disease control in mango fruits. The mean EC_{50} value for the LS isolates ($2.48 \mu\text{g ml}^{-1}$) and ($7.65 \mu\text{g ml}^{-1}$) was significantly higher ($P \leq 0.05$) than that for the S isolates ($0.12 \mu\text{g ml}^{-1}$) and ($0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$) for thiabendazole and thiophanate-methyl, respectively. Despite this, no mutation was found in codon 198 of the β -tubulin gene when compared LS and S isolates. Significant and positive correlation ($P < 0.01$; $r = 0.81$) was detected between the sensitivity of the isolates to thiabendazole and thiophanate-methyl. No significant difference was observed in stability of sensitivity for the S and LS. No significant difference was found ($P > 0.05$) between S and LS isolates for mycelial growth and virulence on mango fruits for both fungicides. In contrast, LS isolates showed an increased capacity of growing under salt stress. The fungicides were able to control both S e LS isolates showed control efficacy in mango fruits. This is the first study about the sensitivity to the fungicides thiabendazole and thiophanate-methyl in isolates of Botryosphaeriaceae from mango orchards. The results demonstrate that these fungicides can be used in mango orchards, although with caution due to the imminent risk of increasing the insensitivity in the population.

Keywords: *Mangifera indica* L., dieback, stem-end rot, thiabendazole, thiophanate-methyl, mechanisms of resistance

CAPÍTULO I

Introdução Geral

SENSIBILIDADE E ADAPTABILIDADE DE ESPÉCIES DE BOTRYOSPHAERIAEAE DE MANGUEIRA A FUNGICIDAS MBC

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância da cultura da manga

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma das frutíferas mais importantes economicamente no mundo e a manga, a fruta mais exportada pelo Brasil (FAO, 2016). Em 2015, a produção anual brasileira atingiu 1.132.449 toneladas, em uma área estimada em 70 mil hectares, gerando cerca de US\$ 184 milhões. Considerando a renda e o volume exportado, a manga ocupa o primeiro lugar no segmento de frutas frescas e secas no Brasil, com receita de US\$ 184.342 milhões e 156.337 t de frutas, respectivamente (TREICHEL et al., 2016).

A região Nordeste do Brasil é a principal produtora de manga, sendo responsável por 70% da produção nacional (ALICEWEB, 2016), sendo concentrada principalmente no Sub-médio do Vale do São Francisco, embora outras regiões como o Vale do Assú também tem produzido esta fruta. O Sub-médio do Vale do São Francisco, localizada entre os estados da Bahia e Pernambuco, foi responsável por 84% de toda exportação brasileira de manga em 2015: os embarques somaram 131,5 mil toneladas e uma receita de US\$ 147 milhões. Entre os principais clientes estão a União Européia (93,6 mil toneladas) e os Estados Unidos (27 mil toneladas) (TREICHEL et al., 2016).

A produção de manga também desempenha um importante papel social, gerando mais de 25.000 empregos diretos e 75.000 empregos indiretos somente no Vale do São Francisco. Além do volume produzido, essa região se destaca, principalmente, pelos altos rendimentos obtidos e excelente qualidade dos frutos produzidos (SILVA; CORREIA, 2010). Esse desempenho da cultura se deve aos fatores climáticos da região e ao uso de tecnologias avançadas de produção, permitindo a obtenção de duas safras por ano, com o uso da indução floral e execução da atividade por empresas de grande porte e elevada organização da cadeia de produção e comercialização (BATISTA; BARBOSA; TERAPO, 2011).

Atualmente, diferentes variedades de manga são cultivadas no Brasil destinadas à exportação, com destaque para a Tommy Atkins, Harden, Keitt, Kent, Palmer, Rosa e Shelly (ARAUJO; CORREIA; LIMA, 2015; ARAUJO; GARCIA, 2012). Além da alta

produtividade e regularidade de produção, outras características como coloração dos frutos, presença de poucas fibras, sabor agradável e resistência ao manuseio e transporte são fundamentais para uma maior aceitação no mercado. A variedade mais produzida e com maior participação na comercialização, tanto no Brasil quanto no mundo, é a Tommy Atkins, devido principalmente à sua coloração intensa, alta produtividade e resistência ao transporte a longas distâncias. No Brasil, essa variedade representa 90% das exportações, e no vale do São Francisco ocupa 95% dos 30 mil hectares cultivados (ARAÚJO; CORREIA; LIMA, 2015; CORREIA; ARAÚJO; SILVA, 2015).

2. Doenças da mangueira

No Brasil, são estimadas perdas anuais de 28% na cadeia produtiva de manga (REETZ et al., 2015). Vários fatores influenciam diretamente na produção e comercialização de frutas frescas e, se não forem devidamente considerados, podem levar à redução da competitividade das frutas no mercado interno e externo. Dentre os fatores bióticos, as doenças possuem grande relevância por ocorrerem em todos os estádios de desenvolvimento da cultura e resultarem em queda da produtividade e da qualidade dos frutos (PLOETZ, 2003; PRAKASH, 2004; PRUSKY et al., 2009; ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004).

Embora as novas variedades introduzidas nas últimas décadas possuam boa aceitabilidade no mercado, são altamente suscetíveis ao ataque de patógenos (ARAÚJO; GARCIA, 2012; BATISTA et al., 2015). Aliado a isso, a expansão da área cultivada, a intensificação das técnicas de manejo e o cultivo de extensas áreas com material homogêneo têm levado a um aumento da ocorrência de doenças, resultando em redução da produtividade e da qualidade dos frutos (SILVA; COELHO, 2010). Dentre as doenças que afetam a cultura no Brasil, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum* spp.), a morte descendente e a podridão peduncular (espécies de *Botryosphaeriaceae*), oídio (*Oidium mangiferae* Bert.) e a malformação floral e vegetativa (*Fusarium mangiferae* Wollenweb e Reinking). No entanto, sob certas condições, também têm sido registrados danos causados pela mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae indicae* (Patel, Moniz e Kulkarni) Robbs, Ribeiro e Kimura), verrugose (*Elsinoe mangiferae* Bit e Jenkins) e seca da mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis e Halsted) (BATISTA et al., 2015; MICHEREFF; CORREIA, 2015). A morte descendente e podridão peduncular, causadas por um complexo de fungos, com destaque para membros da família *Botryosphaeriaceae* são consideradas umas das doenças mais importante da mangueira do Nordeste do Brasil (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012;

MARQUES et al., 2013ab), perdendo apenas para antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum* (LIMA et al., 2013).

2.1. Morte descendente e podridão peduncular causadas por Botryosphaeriaceae

A podridão peduncular e a morte descendente da mangueira foram registradas pela primeira vez no Brasil em 1991 (TAVARES; MENEZES; CHOUDHURY, 1991). Desde então, vêm aumentando de intensidade e importância no Nordeste brasileiro (BATISTA; BARBOSA; TERAQ, 2011; COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013ab), levando em alguns casos à completa perda da produção e eliminação de pomares inteiros (KHANZADA et al., 2004; TAVARES, 2002). Atualmente, a podridão peduncular é considerada a segunda mais importante da cultura nas áreas produtoras do Nordeste do Brasil (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012; MARQUES et al., 2013ab).

A doença leva à desfolha e seca progressiva dos ramos em direção ao caule (*die-back*), podendo atingir o tronco da planta, ocasionando a exsudação de goma na casca dos ramos e caule e, em casos mais severos, levando à morte da planta (KHANZADA et al., 2004). A podridão peduncular possui um elevado potencial de provocar sérios danos aos frutos, principalmente em condições de grande intensidade pluviométrica e altas temperaturas no período da colheita. Estas condições tornam o ambiente propício para infecção e desenvolvimento de sintomas de podridões que afetam o pedúnculo e a porção basal do fruto, que pode agravar durante o transporte para exportação e comercialização (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000; RIBEIRO, 2005; TAVARES, 2002). Em frutos jovens, o patógeno infecta a região do pedúnculo, levando à podridão e queda. Em frutos maduros, os patógenos causam uma podridão de aspecto mole e aquoso, deixando-os impróprios para o consumo. O patógeno pode infectar frutos ainda no campo e permanecer quiescente na região do pedúnculo, manifestando-se na pós-colheita (BATISTA; BARBOSA; TERAQ, 2011; PLOETZ, 2003; PRAKASH, 2004; PRUSKY et al., 2009; RIBEIRO, 2005; ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004).

Essas doenças constituem um sério problema para as regiões agrícolas do Brasil e do mundo, ocasionando diversos danos aos pomares de manga, uma vez que reduz a vida útil, diminui a produção, desqualifica as frutas para fins de comercialização e aumenta os custos de cultivo, sendo seu controle ainda um desafio (CUNHA; SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 2000; TAVARES, 2002). A ocorrência da podridão peduncular em pós-colheita tem deixado

os produtores apreensivos, em virtude de riscos de rechaço das mangas destinadas à União Europeia e aos Estados Unidos (BATISTA; BARBOSA; TERAQ, 2011).

2.2. Espécies de Botryosphaeriaceae associadas à mangueira no Brasil

A morte descendente e a podridão peduncular da mangueira associadas à Botryosphaeriaceae já foram relatadas em quase todos os continentes (COSTA et al., 2010; JAVIER-ALVA et al., 2009; NI et al., 2012; SLIPPERS et al., 2005), ocorrendo em Barbados, Brasil, El Salvador, Estados Unidos da América, México, Porto Rico e Peru, na América; Egito e África do Sul, na África; Coréia, Emirados Árabes Unidos, Índia, Irã, Japão, Omã, Paquistão, Tailândia e Taiwan, na Ásia; Austrália, na Oceania (CABI, 2016; FARR; ROSSMAN, 2016). Os estudos sobre as espécies de Botryosphaeriaceae associadas a essas doenças são recentes em nível mundial, sendo que os primeiros resultados envolvendo filogenia molecular foram divulgados a partir de 2010.

Mundialmente, foram associadas com a morte descendente e a podridão peduncular da mangueira 20 espécies de Botryosphaeriaceae, sendo nove espécies de *Lasiodiplodia*. (CABI, 2016; FARR; ROSSMAN, 2016). No Brasil, estas doenças eram atribuídas, exclusivamente à *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl (COSTA et al., 2010; FREIRE et al., 2003; PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). No entanto, estudos recentes usando métodos moleculares revelaram que essas doenças, em áreas produtoras do Nordeste, são causadas por sete espécies de *Lasiodiplodia*, *L. crassispora* Burgess & Barber,, *L. egyptiaca* A.M. Ismail, *L. Lombard* & Crous, *L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips, *L. iraniensis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips, *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *L. theobromae* e *Lasiodiplodia* sp. (MARQUES et al., 2013a), além de mais sete espécies também da família Botryosphaeriaceae: (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Cophinforma mamane* (= *Botryosphaeria mamane*) (D.E. Gardner) A.J.L. Phillips e A. Alves; *Botryosphaeria fabicerciana* (= *Fusicoccum fabicercianum*) (S.F. Chen, D. Pavlic, M.J. Wingf. e X.D. Zhou) A.J.L. Phillips e A. Alves; *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 2006,; *Neofusicoccum brasiliense* M.W. Marques, A.J.L. Phillips e M.P.S. Câmara; *Neoscytalidium hyalinum* (= *Neoscytalidium dimidiatum*) (C.K. Campb. e J.L. Mulder) A.J.L. Phillips, Groenewald e Crous; e *Pseudofusicoccum stromaticum* (Mohali, Slippers e M.J. Wingf.) Mohali, Slippers e M.J. Wingf.) (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 20012; MARQUES et al., 2013b).

3. Controle da morte descendente e da podridão peduncular da mangueira

A erradicação dos fungos causadores da morte descendente e podridão peduncular após a infecção da mangueira é muito difícil. No entanto, na perspectiva de minimizar as perdas ocasionadas por estes patógenos, existe uma série de medidas que devem ser seguidas no manejo integrado, incluindo medidas naturais e uso de fungicidas (BARBOSA et al., 2011; PLOETZ, 2003; PRUSKY et al., 2009; SANTOS FILHO; MATOS, 2000; ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004; YAHIA, 2005, 2011). Tais medidas tendem a evitar infecções e reduzir a fonte de inóculo. Dentre elas, podemos citar: vistorias periódicas do pomar para verificar os primeiros sintomas da doença; realização de poda de limpeza para retirada de ramos com morte dos ponteiros; retirada de plantas mortas ou que apresentem a doença em estágio avançado; utilização de ferramentas de poda frequentemente desinfestadas em solução de água sanitária (hipoclorito de sódio 2,0%); aplicação de pasta cúprica nos locais podados; pulverização das plantas com fungicidas à base de difenoconazol nos períodos críticos da cultura (na poda, no estresse hídrico, na indução floral, na floração e na frutificação); e controle adequado de insetos que possam causar ferimentos que sirvam de porta de entrada para o fungo (PLOETZ, 2003; PRUSKY et al., 2009; SANTOS FILHO; MATOS, 2000; ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004; YAHIA, 2005, 2011). Para o controle da podridão peduncular, as medidas de controle devem ser realizadas durante toda cadeia produtiva, devendo-se atentar para cuidados durante a colheita e pós-colheita: realizar a colheita do fruto no estágio de maturação ideal, manusear cuidadosamente durante a colheita e pós-colheita para evitar danos físicos, manter o pedúnculo (1-2 cm), realizar o tratamento hidrotérmico com água quente à temperatura de 52 °C durante 5 minutos, armazenar e transportar os frutos em ambiente refrigerado, visando manter a qualidade (BARBOSA et al., 2011; PLOETZ, 2003; PRUSKY et al., 2009; SANTOS FILHO; MATOS, 2000; ZAMBOLIM; JUNQUEIRA, 2004; YAHIA, 2005, 2011). Dentre as medidas de manejo da doença, o controle químico é uma das mais utilizadas. No entanto, os produtores têm encontrado dificuldade para o manejo eficiente da doença.

Na perspectiva de entender a etiologia da morte descendente e podridão peduncular e fornecer informações para dar suporte ao manejo de doenças, foram realizados vários estudos de identificação, prevalência e distribuição de espécies de Botryosphaeriaceae em regiões produtoras de manga no mundo. Embora várias medidas sejam desenvolvidas e utilizadas por produtores para reduzir os danos causados por estas doenças, o uso de fungicidas tem demonstrado resultados promissores (SALLES JUNIOR et al., 2009). No entanto, são

escassas as informações sobre a eficácia de controle de doenças e o comportamento de populações do patógeno expostas aos fungicidas.

No Brasil, difenoconazol (grupo dos triazóis) é o único fungicida registrado para o controle de *L. theobromae* em manga e seu uso é restrito ao tratamento em campo (MAPA, 2016). No entanto, vários outros princípios ativos são aplicados nos pomares de manga do Nordeste brasileiro para o controle de diversas doenças, dentre os quais podemos citar: anilidas (boscalida), benzimidazóis (tiabendazol e tiofanato metílico), carboximidas (fluxapiraxade), estrobirulinas (azoxistrobina, piraclostrobina), imidazóis (imazalil, procloraz e triflumizol), triazóis (bromuconazol, tebuconazol e tetraconazol), e inorgânicos (enxofre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre e óxido cuproso (BATISTA; BARBOSA; TERAQ, 2011; MAPA, 2016). Dentre os fungicidas mais comumente utilizados para o controle de doenças na mangueira no Nordeste brasileiro, destacam-se o tiabendazol e o tiofanato metílico, pertencentes ao grupo do carbamato de metil benzimidazol (MBCs). O tiabendazol é registrado para tratamentos pós-colheita, visando ao controle da antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc., e em campo para o controle de *O. mangiferae* e *C. gloeosporioides* (MAPA, 2016). O tiofanato metílico é registrado para o controle da antracnose causada por *C. gloeosporioides*, por meio de aplicações durante a fase de produção.

Entre os fungicidas com atividade sistêmica, os MBC são comumente utilizados para o controle de doenças em frutíferas no Nordeste brasileiro, com destaque para os fungicidas tiabendazol, tiofanato metílico e carbendazim. Estes fungicidas são efetivos contra uma gama considerável de fungos, sendo considerados um marco importante na história do desenvolvimento dos fungicidas (DELEN; TOSUN, 2004; PICININI, 1994). No entanto, os MBC são listados como um grupo de alto risco para o surgimento de resistência, que já foi registrada em mais de 150 espécies de fungos (FRAC, 2016). Até o momento, são inexistentes os estudos sobre a interação de populações de Botryosphaeriaceae ocorrendo em pomares de manga no Brasil, com os fungicidas utilizados na cultura.

4. Resistência de fungos a fungicidas

A resistência a fungicidas 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). Constitui um problema originado no campo, que pode ser detectado por um declínio no desempenho do fungicida (HOLLOMON, 2015). Este

processo é lento e gradual, porém, quanto maior a pressão de seleção imposta pela aplicação do fungicida, maiores as chances de ocorrência de resistência em menor intervalo de tempo (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). 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, que ao perceberem que o fungicida não controla a doença, tendem a aumentar o número de aplicações e as doses, chegando aos consumidores, que tendem a receber um produto com maiores resíduos de fungicidas e preços elevados (GHINI; KIMATI, 2002).

Os indivíduos resistentes ocorrem naturalmente na população e podem tornar-se dominantes sob pressão de seleção imposta pela aplicação de um fungicida específico, levando a falhas no controle da doença (AZEVEDO, 2001; MA; MICHAILIDES, 2005). A seletividade e especificidade em um único sítio de ação são provavelmente os principais fatores que determinam a vulnerabilidade ao alto risco de resistência (AZEVEDO, 2001; BRENT; HOLLOWOMON, 2007; GHINI; KIMATI, 2002; HOLLOWOMON, 2015). Embora diversos mecanismos conhecidos possam levar um indivíduo a tornar-se resistente, as alterações no sítio de ação do fungicida, devido a uma mutação gênica, é o principal mecanismo de resistência encontrado em fungos (BRENT; HOLLOWOMON, 2007). No entanto, outros mecanismos, como o aumento da síntese da proteína/enzima inibida, desenvolvimento de uma via metabólica alternativa, exclusão ou expulsão do fungicida através de proteínas transportadoras (bombas de efluxo) e degradação metabólica do fungicida, também podem estar envolvidos (FUJIMURA et al., 2015).

A velocidade com que indivíduos resistentes surgem na população depende da especificidade do fungicida, da possibilidade de resistência cruzada, do uso repetitivo de fungicidas com mesmo modo de ação, da rápida multiplicação do patógeno, da variabilidade natural da espécie do patógeno, dentre outros (BRENT; HOLLOWOMON, 2007). Na população podem existir raros indivíduos, estáveis e distintos geneticamente, aptos a sobreviver e aumentar em frequência em relação aos demais, caso seja imposta uma pressão de seleção. O surgimento de resistência a um fungicida tem estreita relação com o seu mecanismo de ação. Se o alvo do fungicida for um ponto específico, uma única mutação pontual, causando uma troca de aminoácido, pode efetivamente bloquear a ligação do fungicida ao sítio alvo, levando à resistência (HOLLOWOMON, 2015).

Estudos de detecção e monitoramento da resistência de fungos a fungicidas são antigos, embora ainda incipientes. Dentre as técnicas utilizadas, destacam-se o cultivo *in vitro*, com a análise do crescimento micelial e/ou análise da germinação dos fungos quando

expostos ao fungicida, e a detecção de mecanismos moleculares associados à mutação. As primeiras tentativas para diagnosticar a resistência a fungicida utilizando técnicas moleculares foram desenvolvidas no início de 1990 e envolveram estudos de monitoramento da resistência ao fungicida benomil (KOENRAADT; SOMERVILLE; JONES 1992). A maioria dos genes de resistência a fungicidas estão localizados em cromossomos nucleares, embora possam também estar presentes em determinantes genéticos extracromossômicos. O genoma mitocondrial, que codifica algumas proteínas da cadeia respiratória, é o mais relevante elemento extracromossômico dos fungos afetando a resistência a fungicidas. Na maioria dos casos, há somente uma cópia do 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).

Atualmente, com os avanços da biologia molecular, diversas técnicas estão disponíveis para a rápida detecção e monitoramento de indivíduos resistentes. A reação em cadeia da polimerase (PCR) está no centro da maioria dos métodos descritos, no qual a detecção é baseada na hibridação ou amplificação com *primers* específicos, uso de enzimas de restrição e/ou sequenciamento. No diagnóstico molecular, geralmente se identifica um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) (HOLLOMON; ISHII, 2015). Estes métodos apresentam uma série de vantagens em relação ao convencional, tais como: reduzir o trabalho; não demandar isolamento do patógeno que pode requerer meios específicos; possibilidade de trabalhar com patógenos de crescimento lento; e não necessitar de repicagens constantes que podem levar à perda de patogenicidade (HOLLOMON; ISHII, 2015; MA; MICHAILEDIS, 2005). Embora essas técnicas sejam bastante úteis, sua utilização só é possível para constatar a resistência em mutações já identificadas e associadas ao mecanismo de resistência (HOLLOMON; ISHII, 2015). Portanto, essa técnica pode falhar quando o indivíduo resistente apresentar mutação associada à resistência em pontos ainda não explorados. Em muitos casos, é necessário um estudo complexo de regiões gênicas que conferem a mutação (GISI et al., 2007). Portanto, para esses casos, torna-se indispensável a realização de bioensaios de sensibilidade (análise do crescimento micelial, germinação e produção de esporos), que proporcionarão não apenas a medida da sensibilidade de cada isolado, mas também um fator de resistência (RF) (HOLLOMON; ISHII, 2015).

O desenvolvimento da resistência pode ser estudado por dois importantes fatores: a frequência, que corresponde à proporção de indivíduos resistentes *versus* sensíveis na

população, e a sensibilidade, que é obtida por meio de teste de sensibilidade usando bioensaios para analisar germinação de esporos e/ou crescimento micelial (CORIO-COSTET, 2015). Com estes resultados, é possível verificar a diferença da sensibilidade entre indivíduos e populações sensíveis e resistentes (CORIO-COSTET, 2015; GHINI; KIMATI, 2002; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

4.1. Resistência aos MBCs

Os MBCs foram um dos primeiros fungicidas sistêmicos lançados no mercado. Estes fungicidas possuem ação contra muitos ascomycetes, alguns Basidiomycotas e fungos mitospóricos (DELEN; TOSUN, 2004). Estes fungicidas possuem seis princípios ativos, benomil, carbendazim, fuberidazol, tiabendazol (grupo químico benzimidazol), tiofanato e tiofanato metílico (grupo químico tiofanato) (DELEN; TOSUN, 2004; FRAC, 2016; YOUNG, 2015). O fungicida benomil foi retirado do mercado em 1992 (MAY-DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011), o que levou à forte introdução de fungicidas como o tiofanato metílico e tiabendazol em diversas culturas.

Os fungicidas MBC atuam sobre a proteína fúngica tubulina, que é formada pelas subunidades α e β . A tubulina 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 (YOUNG, 2015). Os MBC, ao se ligarem à β -tubulina, levam ao bloqueio da divisão nuclear, impedindo que ocorra a polimerização dos microtúbulos formadores do fuso mitótico e interrompendo a mitose na fase de metáfase (DAVIDSON et al., 2006; DELEN; TOSUN, 2004; YOUNG, 2015). Devido à especificidade destes fungicidas, apenas uma mutação no gene da β -tubulina, pode reduzir a afinidade da proteína codificada com o fungicida, o que pode implicar no surgimento de indivíduo resistente (ISHII, 2011).

Embora apresente um baixo número de princípios ativos, o grupo MBCs é considerado de alto risco para o desenvolvimento de resistência, devido ao seu modo de ação específico e à possibilidade de resistência cruzada (AZEVEDO, 2001). Este grupo se destaca por apresentar o maior número de ocorrência de casos de resistência (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007), sendo conhecidas mais de 150 espécies de fungos fitopatogênicos resistentes (FRAC, 2016). A resistência aos fungicidas MBC foi relatada em diversos patógenos dois anos após sua introdução no mercado (BRENT; HOLLOMON, 2007; KUCK;

LEADBEATER; GISI, 2012). Em muitos casos, tem sido demonstrado que os mutantes resistentes persistem na população por muitos anos, mesmo após a utilização dos MBCs ter sido descontinuada (WALKER et al., 2013). Além disso, geralmente ocorre a resistência cruzada entre diferentes fungicidas deste grupo (CAVALCANTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2012;), o que pode ocasionar a perda de eficácia para todos os MBCs (DELP, 1995).

Resultados de vários estudos têm demonstrado que a resistência a MBCs em fungos fitopatogênicos pode estar associada a mutações em diferentes códons no gene β -tubulina: 6 (COOLEY; CATEN, 1993; MA; YOSHIMURA; MICHAILIDES, 2003), 50 (MCKAY; COOK, 1997), 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), 200 (LEE et al., 2011; SHI et al., 2013) e 240 (ALBERTINI; GREDT; LEROUX, 1999; MA et al., 2005).

Estudos realizados com diferentes fungos têm identificado vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) associados com a resistência a MBCs. Os SNPs mais comumente relatados estando associados à resistência aos benzimidazóis estão localizados nos códons 198 e 200 do gene β -tubulina, conferindo resistência a diversas espécies fitopatogênicas (ALBERTINI; GREDT; LEROUX, 1999; KOENRAADT et al., 1992; LEE et al., 2011; MCKAY; COOK, 1997; SHI et al., 2013; TSUJI, 2016; YARDEN; KATAN, 1993). Isolados de *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter resistentes a benomil apresentaram uma mutação no códon 200, alterando uma fenilalanina para tirosina (KOENRAADT et al., 1992). Isolados de *Botrytis cinerea* Pers. resistentes a benomil apresentaram uma mutação no códon 200 (de fenilalanina para tirosina) e no códon 198 (de ácido glutâmico para lisina) (YARDEN; KATAN, 1993). Em diferentes isolados de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. resistentes a tiabendazol, verificou-se uma mutação no códon 200 (de fenilalanina para tirosina) e no códon 198 (de ácido glutâmico para alanina) (MIIN-HUEY et al., 2011). Em *Helminthosporium solani* Durieu e Mont. foi detectada uma mutação no códon 198 (de ácido glutâmico para alanina ou glutamina) em indivíduos resistentes ao tiabendazol (MCKAY; COOK, 1997). Isolados de *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey com alta resistência a benomil e tiofanato metílico também apresentaram a mutação no códon 198 (de ácido glutâmico para alanina) (MA; YOSHIMURA; MICHAILIDES, 2003). Em isolados de *L. theobromae* resistentes a tiofanato metílico foi observada uma mutação no códon 198, com a substituição de ácido glutâmico por lisina (E198K) (TSUJI, 2016).

4.2. Resistência a fungicidas em espécies de Botryosphaeriaceae

Estudos envolvendo a análise da resistência a fungicidas em espécies de Botryosphaeriaceae têm sido desenvolvidos mundialmente. No entanto, ainda são escassos e limitados a poucas espécies, sendo inexistentes trabalhos relacionados à cultura da mangueira em nível mundial. Recentemente, espécies de Botryosphaeriaceae têm sido associadas a danos em diversas culturas, o que aumentou a preocupação com o seu controle e, conseqüentemente, o estudo da sensibilidade a fungicidas (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; LATORRE et al. 2013; PEREIRA et al., 2012; PITT et al. 2012; SERRANO et al., 2015. TORRE et al., 2013)

A sensibilidade de isolados de *N. parvum*, *B. dothidea*, *Diplodia seriata* De Not. e *L. theobromae* associados à videira aos fungicidas fludioxonil, carbendazim, fluazinam, tebuconazole, flusilazole, penconazole, procymidone, iprodione, myclobutanil, pyraclostrobin, fenarimol, clorotalonil, triadimenol, cyprodonil, boscalid e pyrimethanil foi estudada por Pitt et al. (2012). Torres et al. (2013) estimaram a sensibilidade das espécies *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 2006, e *N. parvum* encontradas na videira frente aos fungicidas inibidores da demetilação (DMIs). Latorre et al. (2013) estudaram a sensibilidade de isolados de *N. parvum* oriundos de mirtilo aos fungicidas benomyl, tebuconazol e iprodione. Serrano et al. (2015) analisaram a sensibilidade de *B. corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, aos fungicidas tiofanato metílico, carbendazim, difenoconazol, piraclostrobina e sulfato de cobre. Para *B. berengeriana* De Not., analisou a sensibilidade a carbendazim (Liu et al., 2009). Isolados de *B. dothidea* foram analisados quanto à sensibilidade à iprodione (MA; LUO; MICHAILIDES, 2001), tebuconazol (FAN et al., 2016; WANG, et al., 2010), difenoconazol e flusilazol (LIU et al., 2013) e difenoconazol, flusilazol, iprodione, procimidona, tiofanato metílico, clorotalonil, kresoxim-metil, boscalida (ZHANG et al, 2011), trifloxistrobina (DAI et al 2017).

No Brasil, os estudos envolvendo resistência a fungicidas de espécies de Botryosphaeriaceae têm sido restritos a populações de *L. theobromae* coletadas em pomares de mamão no Nordeste brasileiro. Estas populações foram analisadas quanto à sensibilidade aos fungicidas imazalil, procloraz, tebuconazole, benomil e tiabendazol (PEREIRA et al., 2012), difenoconazol (BANDEIRA et al., 2016), tiofanato metílico (CAVALCANTE et al., 2014), azoxistrobina, difenoconazol e tiofanato metílico (TSUJI, 2016).

A análise de 120 isolados de *L. theobromae* mostrou que 8,4% apresentaram baixa sensibilidade aos MBCs ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), enquanto a maioria da população (91,6%) se mostrou sensível ao benomil (média - $0,08 \mu\text{g/ml}$) e tiabendazol (média - $0,76 \mu\text{g/ml}$). Estes mesmos isolados foram sensíveis aos DMIs, imazalil (média - $0,63 \mu\text{g/ml}$), procloraz (média - $0,20 \mu\text{g/ml}$) e tebuconazole (média - $0,49 \mu\text{g/ml}$). Não houve evidência de resistência múltipla, mas foi constatada resistência cruzada (PEREIRA *et al.*, 2012). Em outro estudo, foram analisados 109 isolados de *L. theobromae* quanto à resistência ao fungicida tiofanato metílico, onde 20,2% foram resistentes ao fungicida, com $CE_{50} > 300 \mu\text{g/ml}$, enquanto 79,8% foram sensíveis (média de $CE_{50} = 1,87 \mu\text{g/mL}$) (CAVALCANTE *et al.*, 2014). Para difenoconazol, foram avaliados 107 isolados, dos quais 2,8% tiveram $CE_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$, enquanto 64,5% dos isolados apresentaram CE_{50} entre 0,01 e $1,00 \mu\text{g/mL}$. Houve diferença na sensibilidade entre os dez isolados sensíveis ($0,10 \mu\text{g/mL}$) e dez menos sensíveis ($7,27 \mu\text{g/ml}$), sendo verificada uma baixa eficácia de controle dos isolados menos sensíveis em frutos de mamão (BANDEIRA *et al.*, 2016). Recentemente, esta população foi analisada quanto aos mecanismos moleculares envolvidos com a resistência a azoxistrobina, difenoconazol e tiofanato metílico. Para azoxistrobina, não foi encontrada mutação no gene do citocromo b (CYTB) em isolados apresentando média ($1,01\text{-}90 \mu\text{g/mL}$) e alta resistência ($>300 \mu\text{g/mL}$), indicando que outro mecanismo deve ser o responsável pela resistência. Para difenoconazol, não foram encontradas mutações no gene CYP51 em isolados moderadamente resistentes ($> 6 \mu\text{g/mL}$), embora tenha sido observada a superexpressão do gene CYP51 em isolados de elevado valor de CE_{50} , em comparação com isolados com baixos valores de CE_{50} ($<6 \mu\text{g/mL}$). A análise de isolados resistentes ($>300\mu\text{g/mL}$) ao tiofanato metílico revelou uma mutação no códon 198, com a substituição de ácido glutâmico por lisina, associada à resistência (TSUJI, 2016).

5. Adaptabilidade e estabilidade de isolados resistentes a fungicidas

Dentre os fatores que podem influenciar o desenvolvimento de indivíduos resistentes na população está a adaptabilidade (MIKABERIDZE; MCDONALD, 2015), que é expressa como a eficiência competitiva de indivíduos resistentes em relação aos sensíveis. Em outras palavras, é a capacidade de uma determinada linhagem em se desenvolver, reproduzir e sobreviver, quando comparada à outra linhagem exposta às mesmas condições (GHINI; KIMATI, 2002; ZAMBOLIM, 2008; ISHI, 2015). Após o aparecimento de mutantes resistentes, o aumento destes indivíduos na população só ocorrerá se possuírem uma boa

adaptabilidade, ou seja, uma boa capacidade competitiva (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). Dentre as diferentes características que definem um bom potencial adaptativo podemos destacar a capacidade de infecção, a velocidade de colonização dos tecidos do hospedeiro, a capacidade de esporulação, a sobrevivência e principalmente a capacidade de competir com indivíduos sensíveis na ausência do fungicida (MIKABERIDZE; MCDONALD, 2015).

A maioria dos estudos indicam que a perda em adaptabilidade de isolados resistentes é baixa ou até mesmo inexistente (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; KIM; XIAO, 2011; PEREIRA et al., 2012). As chances de mutantes resistentes prevalecerem em uma população são maiores para aqueles indivíduos resistentes que não sofreram decréscimo em sua adaptabilidade (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001; ISHII, 2015). Por essa razão, a adaptabilidade pode ser estimada, por exemplo, por meio da avaliação de características epidemiológicas. Assim, fatores potencialmente ligados à eficiência de fungos fitopatogênicos em causar doença, tais como a taxa de crescimento micelial, a temperatura ótima para o crescimento micelial, produção de esporos, sensibilidade osmótica e agressividade, têm sido mensurados como forma de estimar a adaptabilidade (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; KIM; XIAO, 2011; PEREIRA et al., 2012;). Os custos da adaptabilidade em indivíduos resistentes podem variar em função da espécie do fitopatógeno e do fungicida (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; KIM; XIAO, 2011; VEGA; DEWDNEY, 2014; ZHENG; OLAYA; KOLLER, 2000).

Em relação aos componentes de adaptabilidade em Botryosphaeriaceae, existem casos em que não houve alteração e/ou redução, como em isolados de *L. theobromae* resistentes aos MBCs benomil, tiabendazol e tiofanato metílico (CAVALCANTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2012). Para os fungicidas difenoconazole (BANDEIRA et al., 2016) e tebuconazol em *B. dothidea* (MA et al., 2002), foi observada uma redução na produção de esporos (CAVALCANTE et al., 2014), nenhum custo de adaptabilidade para os componentes, tendo o crescimento em meio de cultura sem fungicida, germinação de esporos, sensibilidade osmótica e agressividade em frutos mamão (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; PEREIRA et al., 2012) e agressividade em pistacho (MA et al., 2002).

Outra característica importante para o sucesso dos indivíduos resistentes é a estabilidade da resistência ao fungicida, que é definida como a capacidade do fungo em manter o mesmo nível de sensibilidade após sucessivas gerações, sob exposição ou não ao

fungicida (VEGA; DEWDNEY, 2014). Em estudos com *L. theobromae*, constatou-se que não houve alteração significativa da sensibilidade a difenoconazol após dez gerações em meio de cultura sem o fungicida (BANDEIRA et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados para isolados de *B. dothidea* resistentes ao tebuconazol (FAN et al., 2016). Isolados resistentes aos fungicidas MBC são conhecidos por apresentarem estabilidade da resistência ao longo de gerações, mesmo na ausência do fungicida (ISHII, 2015).

Devido à falta de informações sobre a sensibilidade e adaptabilidade de isolados de Botryosphaeriaceae oriundos de pomares de manga no Nordeste brasileiro frente aos fungicidas MBC, esta pesquisa foi desenvolvida com os seguintes objetivos: (i) determinar a sensibilidade de isolados de Botryosphaeriaceae coletados de diferentes pomares comerciais de manga no Nordeste do Brasil aos fungicidas tiofanato metílico e tiabendazol; (ii) classificar os isolados de Botryosphaeriaceae quanto à sensibilidade ao tiofanato metílico e tiabendazol; (iii) avaliar a estabilidade da sensibilidade aos fungicidas em isolados sensíveis e menos sensíveis; (iv) avaliar a eficácia de controle dos fungicidas tiofanato metílico e tiabendazol em frutos de manga inoculados com isolados sensíveis e menos sensíveis; (v) determinar a relação entre a sensibilidade aos fungicidas e a adaptabilidade em isolados sensíveis e menos sensíveis; (vi) investigar uma possível mutação no códon 198 do gene β -tubulina associada à resistência aos fungicidas MBC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, C.; GRETT M.; LEROUX P. Mutations of β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazol em resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 64, p. 17-31, 1999.
- ALICEWEB. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2016. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 30 de jan. 2017.
- 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.
- ARAUJO, J. L. P.; CORREIA, R. C.; LIMA, J. R. F. Mercado. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira**. 3. ed. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2015. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7743&p_r_p_-996514994_topicoId=8288> Acesso em: 30 de jan. de 2017.
- ARAUJO, J. L. P.; GARCIA, J. L. Estudo do Mercado de Manga na União Européia. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 289-308, 2012
- AZEVEDO, L.A.S. **Proteção integrada de plantas com fungicidas**: teoria, prática e manejo. São Paulo: Ed. do Autor, 2001, 230 p.
- 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, M.; BERTOLONI, 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.
- BARBOSA, L. F.; AMORIM, E.P.R.; SANTOS, D.V.; COSTA, M.G.S.; SILVA, J.C.; SILVA, T.A. Utilização da termoterapia no controle pós-colheita da podridão peduncular da manga (*Lasiodiplodia theobromae* (pat) Griffon & Maubl). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44. 2011, Bento Gonçalves, Brasil. **Resumos ...** Brasília: Tropical Plant Pathology, 2011, v. 36, Suplemento, p.531.
- BATISTA, D. C.; TERÃO, D.; BARBOSA, M. A. G.; TAVARES, S. C. C. H. Doenças. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira**. 3. ed. Petrolina:Embrapa Semi-Árido, 2015. Disponível em: < <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/> > Acesso em: 30 de jan. de 2017.
- BATISTA, D. C.; BARBOSA, M. A.G.; TERAIO, D. Epidemiologia e manejo de fungos associados com morte descendente e podridão peduncular em mangueira. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves, Brasil. **Resumos ...** Brasília; Tropical Plant Pathology, 2011, v. 36, Suplemento, p. 35-36.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências 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.

CABI. *Lasiodiplodia theobromae*. In: CABI. **Invasive species compendium**. Wallingford: CAB International, 2016 [online]. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/40844>>. Acesso em: 30 fev. 2017.

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.

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.

CORIO-COSTET, M. F. Monitoring Resistance in Obligate Pathogens by Bioassays Relating to Field Use: Grapevine Powdery and Downy Mildews. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 251-279.

CORREIA, R. C.; ARAUJO, L. P.; SILVA, P. C. G. Socioeconômica. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira**. 3. ed. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2015. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7743&p_r_p_-996514994_topicoId=8288> Acesso em: 30 de jan. de 2017.

COSTA, V. S. O.; MICHEREFF, S. J.; LIMA, G. S. A.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, n. 4, p. 509-519, 2010.

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

CUNHA, M. M.; SANTOS FILHO, H. P.; NASCIMENTO, A. S. **Manga: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 104 p.

DAI, D. J.; WANG, H. D.; WANG, Y. P.; ZHANG, C. Q. Management of Chinese hickory (*Carya cathayensis*) trunk canker through effective fungicide application programs and baseline sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to trifloxystrobin. **Australasian Plant Pathology**. (2017). doi:10.1007/s13313-017-0465-4

DAVIDSON, R.M.; HANSON, L. E.; FRANC, G. D.; PANELLA, L. Analysis of b-tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and tolerant *Cercospora beticola*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 321–328, 2006.

DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: modo de ação e resistência. Parte 2: Fungicidas com modos de ação específicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.12, p.27-90, 2004.

DELP, C. J. Benzimidazole and related fungicides. In: LYR, H. (Ed.). **Modern selective fungicides** - properties, applications, mechanisms of action. 2º. ed. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1995. p. 291-303.

FAN, K.; WANG, J.; FU, L.; LI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; ZHAI, H.; QU, J. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole in China. **Crop Protection**. Guildford, v. 87, p.1-5, 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Faostat, 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 30 de jan. 2017.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal database**: fungus–host distributions [online]. In: USDA. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory – ARS/USDA, 2016. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

FRAC - Fungicide Resistance Action Committee 2016. **List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents**. Disponível em: <<http://www.frac.info/frac/index.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

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

FUJIMURA, M.; BANNO, S.; ICHIISHI, A.; FUKUMORI, F. Histidine Kinase Inhibitors. In: Ishii, H., & Hollomon, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 181–197.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 78.

GISI, U.; WALDNER, M.; KRAUS, N.; DUBUIS, P.H.; Sierotzki, H. Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 199–208, 2007.

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.

HOLLOMON, D. W.; ISHII, H. Monitoring Resistance Using Molecular Methods. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 295-309.

HOU, Y.; LOU, Q.; CHEN, C.; ZOU, M. Application of cycleave PCR to the detection of a 28 point mutation (F167Y) in the β 2-tubulin gene of *Fusarium graminearum*. **Pest**

Management Science, Sussex, v. 67, p. 1124–1128, 2011.

ISHII, H. Resistance of *Venturia nashicola* benzimidazoles and sterol demethylation inhibitors. In: THIND, T. S (Eds.) **Fungicide resistance in crop protection**. Wallingford: CAB International, 2011, p. 21–31.

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

JAVIER-ALVA, J.; GRAMAJE, D.; ALVAREZ, L. A.; ARMENGOL, J. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 93, n. 4, p. 426, 2009.

SALLES JUNIOR, R.; NUNES, G. H. S.; LIMA, L. L.; GUIMARÃES, I. M.; MORAIS, P. L. D. Chemical control stem rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* on mangoes fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 907-910, 2009.

KHANZADA, M. A.; LODHI, A. M.; SHAHZAD, S. 2004. Mango dieback and gummosis in Sindh, Pakistan caused by *Lasiodiplodia theobromae*. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 57, p. 381, 2004.

KIM, Y. K.; XIAO, C. L. Stability and Fitness of Pyraclostrobin and Boscalid Resistant Phenotypes in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 11, p.1385-1391, 2011.

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

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

LATORRE, B. A.; TORRES, R.; SILVA, T.; ELFAR, K. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. **Ciencia e investigación agrarian**, Santiago de Chile. v. 40, n. 3, p. 547-557. 2013.

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.

LI, X. J.; FAN, K.; QU, J. L.; ZHANG, Y.; WANG, T.; QI, B. Determination of the sensitivity of *Botryosphaeria berengiana* to Carbendazim fungicide. **International Journal of Fruit Science**, Philadelphia, v. 26, p.516-519, 2009..

LIMA, N. B.; BATISTA, M. V. A.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A.G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 75-88, 2013.

LIU, B.Y., ZHANG, W., LUAN, B.H., WANG, P.S., WANG, Y.Z. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to difenoconazole and flusilazole and cross resistance of different fungicides. **Acta Phytopathologica Sinica**, Budapest, v. 43, n. 5, p. 541-548, 2013.

MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Resistance of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio to Iprodione. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p.183–188, 2001.

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

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. 449–457, 2005.

MA, Z.; YOSHIMURA, M.A.; MICHAILIDES, T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *monilinia fructicola* from stone fruit orchards in california. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7145-7152, 2003.

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: 30 fev. 2016.

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

MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; SOUZA, C. R. B. First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticumin* Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 144–145, 2012.

MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p. 195-208, 2013b.

MAY-DE MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 821–827, 2011.

- MCKAY, G.J.; COOK, L.R. A PCR – based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, p. 371-378, 1997.
- 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: UFV, 2015. p. 36-53.
- MIKABERIDZE, A.; MCDONALD, B. A. (2015). Fitness cost of resistance: impact on management In: Ishii, H., & Hollomon, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 77–89.
- MIIN-HUEY, L.; SHIAH-MEI, P.; TIENG-WUI, N.G.; PO-SHENG, C.; LI-YUAN, W.; KUANG-REN, C. 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.
- NI, H. F.; YANG, H. R.; CHEN, R. S.; LIO, R. F.; HUNG, T. H. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity. **Botanical Studies**, Taipei, v. 53, n. 4, p. 467–478, 2012.
- 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., & CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.132, p. 489-498, 2012.
- PICININI, E.C. **Fungicidas benzimidazoles**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.2, 1994, p. 357-409.
- PITT, W.M.; SOSNOWSKI, M.R.; HUANG, R.; QIU, Y.; STEEL, C.C.; SAVOCCHIA, S. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria canker of grapevines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 1303–1308, 2012.
- PLOETZ, R. C. Diseases of mango. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Wallingford: CAB International, 2003. p. 327-363.
- PRAKASH, O. Diseases and disorders of mango and their management. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables**. Dordrecht: Kluwer, 2004. v. 1, p. 511-619.
- PRUSKY, D.; KOBILER, I.; MIYARA, I.; ALKAN, N. Fruit diseases. In: LITZ, R. E. (Ed.). **The mango: botany, production and uses**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2009. p. 210-230.
- REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. (Eds.). **Anuário brasileiro da fruticultura 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104 p.
- RIBEIRO, I. J. A. Doenças da mangueira (*Mangifera indica* L.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de**

fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, n. 4, p. 457–465.

SANTOS FILHO, H. P.; MATOS, A. P. Doenças e seu controle. In: In: Matos, A. P. (Org.). **Manga produção: aspectos técnicos.** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 50-54. (Frutas do Brasil, 4).

SERRANO M. S.; ROMERO M. A.; JIMÉNEZ J. J.; VITA P.; AVILA A.; TRAPERRO A.; SÁNCHEZ M. E. Preventive control *Botryosphaeria* canker affecting *Quercus suber* in southern Spain. **Forestry**, Oxford, v. 88, p. 500–507, 2015.

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.

SILVA, P. C. G.; COELHO, R. C. Socioeconomia. In: MOUCO, M. A. C. (Ed.). **Cultivo da mangueira.** 2. ed. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010 [online]. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/index.htm>. Acesso em: 30 jan. 2017.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G. I.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 99-110, 2005.

TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – Situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, p. 46-52, 2002.

TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M.; CHOUDHURY, M. M. Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região Semi-Árida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, p. 163-166, 1991.

TORRES, C.; LATORRE, B.A.; UNDURRAGA, P.; BESOAIN, X. Evaluation of DMI fungicides against species of *Diplodia* and *Neofusicoccum* associated with *Botryosphaeria* canker of grapevine. **Ciencia e investigación agrarian**, Santiago de Chile, v. 40, p.131–138, 2013.

TREICHEL, M.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; CARVALHO, C.; BELING, R.R. (Eds.). **Anuário brasileiro da fruticultura 2016.** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p.

TSUJI, S. S. **Sensibilidade de populações de *Lasiodiplodia theobromae* de mamoeiro a azoxistrobina e análise dos mecanismos moleculares de resistência a tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina.** 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. QoI-resistance stability in relation to pathogenic and saprophytic fitness components of *Alternaria alternata* from citrus. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 98, p. 1371–1378, 2014.

WALKER, A. S.; MICOUD, A.; RÉMUSON, F.; GROSMAN, J.; GRETT, 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.

WANG, Y. Z.; ZHANG, W.; LIU, B. Y.; LUAN, B. H.; WANG, P. S. Research on resistance and geographical distribution of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole in Shandong Province. **International Journal of Fruit Science**, Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 961-964, 2010.

YAHIA, E. M. Mango (*Mangifera indica* L.). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. v. 3, p. 492-565.

YAHIA, E. M. Postharvest technology and handling of mango. In: DRIS, R. (Ed.). **Crops: quality, growth and biotechnology**. Helsinki: WFL Publisher, 2005. p. 478-512.

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**, Saint. Paul, v. 83, n. 12, p. 1478-1483, 1993.

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

ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas. In: ZAMBOLIM, L.; PIKANÇO, M.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R.; JESUS JUNIOR, W.C.; FERREIRA, F.A (Eds). **Produtos fitossanitários: fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas**. Viçosa: UFV, 2008, p. 213 – 262.

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

ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo integrado de doenças da mangueira, In: ROZANE, D. E.; DAREZZO, R. J.; AGUIAR, R. L.; AGUILERA, G. H. A.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: UFV, 2004. p. 377-408.

ZHANG, C.Q.; ZHANG, Z. P.; SUN, P. L.; CHEN, W. M.; YU, C. L.; BAO, C. Q.; XU, Z. H. Comparison of sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to 7 fungicides and its basal ine sensitivity to difenoconazole. **Chinese Journal of Pesticide Science**, Beijing v. 13, p 84–86, 2011. (Resumo Inglês)

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**, London, v. 84, n. 1, p. 53-60, 2013.

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

CAPÍTULO II

Sensitivity and fitness of Botryosphaeriaceae species from Brazilian Northeast mango orchards to MBC fungicides

Submissão: **European Journal of Plant Pathology**

Dordrecht, Holanda

Qualis CAPES (Ciências Agrárias I) = A2

**Sensitivity and fitness of Botryosphaeriaceae species from Brazilian
Northeast mango orchards to MBC fungicides**

**Kledson Mendes dos Santos • Susan Satie Tsuji • Marcos Paz Saraiva Câmara • Sami
Jorge Michereff • Ueder Pedro. Lopes^{b*}**

K. M. Santos • S. S. Tsuji • M. P. S. Câmara • S. J. Michereff

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife,
PE, Brazil.

U. P. Lopes (✉)

Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 55292-270

Garanhuns, PE, Brazil.

E-mail: ueder.lopes@ufrpe.br

Abstract

Thiabendazole and thiophanate-methyl (MBC group) are fungicides commonly used in mango orchards in Brazilian Northeast, although they are not registered to control dieback and stem-end rot. Little is known on sensitivity of Botryosphaeriaceae population to these fungicides in mango crop. Therefore, the sensitivity of 154 isolates was evaluated by analyzing the effective concentration to inhibit 50% of the mycelial growth (EC_{50}). Ten isolates with lowest (sensitive-S) and highest (less-sensitive- LS) EC_{50} values for thiabendazole and thiophanate-methyl were evaluated for stability of sensitivity, molecular mechanisms involved with the low sensitivity, effectiveness of MBCs to disease control in mango fruits and components of fitness. Botryosphaeriaceae isolates exhibited of EC_{50} values, ranging from 0.03 to 6.86 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and from 0.0001 to 10.70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for thiabendazole and thiophanate-methyl, respectively. Significant and positive correlation ($P < 0.01$; $r = 0.81$) was detected between the sensitivity of the isolates to thiabendazole and thiophanate-methyl. The isolates showing low sensitivity to the fungicides were able to maintain this characteristic after ten generations and were not penalized on adaptability when compared with S isolates. Nevertheless, the most common mutation associated with low sensitivity to MBCs (at codon 198) was not found. Both fungicides were able to control the infection caused by S and LS isolates similarly. Thus, thiabendazole and thiophanate-methyl can be used to control dieback and stem-end rot in mango orchards in the main producing and exporting region in Brazil. However, their use must be done with caution due to the imminent risk of increasing the insensitivity in the population.

Keywords *Mangifera indica* · Dieback · Stem-end rot · Fungicide resistance · Competitive ability · Molecular mechanisms of resistance

Introduction

The mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most economically important fruit species in the world and the most exported tropical fruits in Brazil (FAO 2016). In 2015 the Brazilian annual production reached 1,132,449 tons of fruit in an estimated area at 70 thousand hectares, generating about US\$ 588 million. Considering both, income and exported volume, mango occupied the third place in the segment of fresh fruit, with revenues of US\$ 184,342 million and 156,337 tons of fruit, respectively. These results were up 17.52% in tons and 12.59% in revenue in 2014, respectively (Treichel et al. 2016).

The Brazilian Northeast concentrates the major mango producing areas. The São Francisco Valley, located between the borders of Bahia and Pernambuco states, accounted for 84% of all Brazilian mango exports in 2015: shipments amounted to 131.5 thousand tons and brought in revenue of US\$ 147 million (Treichel et al. 2016). The major export partners were the European Union (93.6 thousand tons) and the United States (27 thousand tons), followed by Netherlands, United Kingdom, Spain, Portugal and other countries (AliceWeb 2016).

Because the most Brazilian mango is destined for exportation and mainly for fresh fruit market, there are strict measures to ensure the production of healthy and quality fruit (Treichel et al. 2016). Several factors can negatively influence the mango production and the quality of the fruits, but the diseases stand out economically because they cause severe losses in the stages of production, marketing and exportation (Paull and Duarte 2011). Among the wide range of diseases that impact on mango production in Brazil, dieback and stem-end rot have increased in importance (Costa et al. 2010; Marques et al. 2013ab), in some cases with severe losses in production, resulting in the elimination of entire orchards (Tavares et al. 1991; Tavares 2002). In Brazil, these diseases were reported in the early

1900s, but recently they have gained importance mainly in the Brazilian Northeastern. Dieback occurs in young twigs which first wilt at the base, extending along the veins of leaf edges. The affected leaves fall, leaving a dead branch. In severe conditions, the branches dry one by one, resulting in death of the whole tree (Khanzada et al. 2004). Stem-end rot is an important postharvest disease of mango in Brazil, causing losses of production and reduction of the commercial value of the fruit. In periods of high rainfall, these diseases cause severe damage in orchards that do not adopt any control measures (Yahia 2011).

Although mango dieback and stem-end rot are caused by a complex of fungi, members of the Botryosphaeriaceae family are considered the most important (Al Adawi et al. 2003; Slippers et al. 2005; Javier-Alva et al. 2009; Costa et al. 2010; Ismail et al. 2012; Marques et al. 2013ab). Historically, this disease has been attributed exclusively to *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., but recent studies using molecular methods of fungal identification has revealed the presence of other species causing the disease. Seven species of *Lasiodiplodia* and eight different Botryosphaeriaceae species have been associated with mango dieback and stem-end rot in Brazilian Northeastern (Costa et al. 2010; Marques et al. 2012; Marques et al. 2013ab).

The management of dieback and stem-end rot, regardless of the species involved, includes pruning and removal of symptomatic branches, regular spraying with fungicides from early fruiting, heat treatment and storage at low temperatures (Santos Filho and Matos 2000; Ploetz 2003; Prusky et al. 2009; Yahia 2011). In Brazil, only the fungicide difenoconazole (demethylation inhibitor group - DMI) is registered for the control of *L. theobromae* in mango, and its use is limited to field treatment. However, other fungicides are applied in orchards located in Brazilian Northeastern to control other diseases. Thiabendazole (methyl benzimidazole carbamate - MBC group) is registered to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in postharvest

and to control *Oidium mangiferae* Berthet and *C. gloeosporioides* in the field. Thiophanate-methyl (MBC group) is registered and applied in mango orchards in Brazilian Northeastern to control anthracnose caused by *C. gloeosporioides* (MAPA 2017).

The MBC group includes the fungicides carbendazim, benomyl, fuberidazole, thiophanate, thiophanate-methyl and thiabendazole (FRAC 2016), and presents a high risk of pathogens resistance, with cases in 150 species of phytopathogenic fungi (FRAC 2016). Furthermore, the cross-resistance between MBC fungicides is common (Ishii 2015) and several cases, resistant mutants have been persistent in the population for many years, even after the discontinuation of MBC use (Leroux et al. 2005; Walker et al. 2013). The MBC fungicides act in the mitosis and cell division by inhibition of microtubule assembly by binding to β -tubulin (FRAC 2016). Single point mutations in the β -tubulin gene may result in a qualitative resistance (Ma and Michailides 2005; Sierotzki 2015; Young 2015). Previous study demonstrated that *L. theobromae* isolates from papaya in Brazilian Northeastern were resistant to thiophanate-methyl and this resistance was associated with a mutation in the codon 198 (E198K) of the β -tubulin gene (Tsuji et al. 2017).

The application of MBC fungicides to control anthracnose and powdery mildew in mango orchards leads to the exposure of Botryosphaeriaceae populations to these fungicides in the field, which makes the risk of emergence of resistance eminent. Several studies have analyzed the sensitivity of Botryosphaeriaceae species to MBC fungicides: *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. from pistachio to benomyl (Ma et al. 2001), from grapevines to carbendazim (Pitt et al. 2012) and thiophanate-methyl (Zhang et al. 2011); *Botryosphaeria berengeriana* De Not. from apple to carbendazim, (Liu et al. 2009); *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) Shoemaker from grapevine to benomyl (Bester et al. 2007); *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque from *Quercus suber* to carbendazim and thiophanate-methyl (Serrano et al. 2015); *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. from

grapevine to thiophanate-methyl (Amponsah et al. 2012); *Diplodia seriata* De Not. from grapevine to carbendazim (Pitt et al. 2012); *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips from grapevine to benomyl (Bester et al. 2007) and from blueberry (Latorre et al. 2013) and *Quercus suber* to carbendazim, (Serrano et al. 2015); *N. austral* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips from grapevine to benomyl, carbendazim and thiophanate-methyl (Bester et al. 2007; Amponsah et al. 2012); *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips from grapevine to carbendazim and thiophanate-methyl (Amponsah et al. 2012) and *L. theobromae* from grapevine to benomyl and carbendazim (Bester et al. 2007; Pitt et al. 2012).

Studies involving the analysis of fungicide resistance, stability of fungicide resistance and fitness components in *L. theobromae* populations in papaya orchards in the Brazilian Northeast to benomyl and thiabendazole founded high EC_{50} values. Furthermore, cross-resistance of the isolates was found, although without significant differences on fitness components between sensitive and less-sensitive isolates (Pereira et al. 2012). On the other hand, the less-sensitive isolates to thiophanate-methyl showed fitness penalty (Cavalcante et al. 2014).

Due to the inexistence of information on the sensitivity and fitness of Botryosphaeriaceae populations of mango orchards to MBC fungicides in Brazil, this research is very important to provide subsidies for a more effective management of the disease in the main Brazilian producing and exporting region. Thus, the objectives of this study were: (1) to evaluate the sensitivity to the MBC fungicides thiophanate-methyl and thiabendazole in Botryosphaeriaceae isolates collected from different commercial mango orchards in the Brazilian Northeastern; (2) to assess the cross-resistance between the fungicides thiophanate-methyl and thiabendazole; (3) to evaluate the stability of fungicide sensitivity in sensitive and less-sensitive isolates; (4) to assess the effectiveness of the fungicides to control sensitive and

less-sensitive isolates in mango fruits; (5) to verify the relationship between sensitivity to these fungicides and fitness-related variables; and (6) to investigate the molecular mechanisms of resistance associated to MBC.

Materials and methods

Obtaining isolates

In total of 154 isolates of Botryosphaeriaceae from Culture Collection of Phytopathogenic Fungi "Prof. Maria Menezes" (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil) were used in this study. These isolates were collected in mango orchards in the Brazilian Northeast (Figure 1) and identified by phylogenetic inference using the complete sequence of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region and the partial sequence of the EF (Elongation Factor) gene. Among the isolates several species were present: *Botryosphaeria dothidea* (37), *Fusicoccum fabicercianum* (3), *Lasiodiplodia hormozganensis* (5), *L. iraniensis* (14), *L. pseudotheobromae* (13), *L. theobromae* (29), *L. viticola* (17), *Neofusicoccum parvum* (11) and *Pseudofusicoccum stromaticum* (25) (Costa et al. 2010; Marques et al. 2012; Marques et al. 2013ab).

Sensitivity assay to MBCs

The fungicides thiophanate-methyl (Cercobin 700 WP, 700 g Kg⁻¹ active ingredient (a.i.), Iharabras, Sorocaba-SP, Brazil) and thiabendazole (Tecto 480 SC, 480 g Kg⁻¹ a.i., Syngenta Crop Protection, São Paulo, Brazil) were solubilized in sterile distilled water (SDW) and added to molten (45°C) Potato Dextrose Agar (PDA) medium at seven concentrations: 0.0,

0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$, and 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, and 3.0 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$, respectively.. Five-mm diameter mycelial plugs were obtained from the edge of a four-day-old colony of each isolate and transferred to PDA medium amended with the fungicides at different concentrations. Three replicates of each isolate were used to evaluate each fungicide concentration and the control. Two days after the incubation at 25 °C, the colony diameter in each plate was measured in two perpendicular directions, and the original mycelial plug diameter (5 mm) was subtracted from this measurement. The percentage of inhibition of mycelial radial growth compared to control was calculated for all the concentrations of both fungicides. The effective fungicide concentration ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) to inhibit 50% of mycelial growth (EC_{50}) was calculated for all combinations isolate-fungicide by linear regression of the mycelial growth inhibition versus the \log_{10} transformation for each concentration of the fungicide. Frequency distribution of the isolates between the intervals of EC_{50} values was established and the isolates were grouped according to the degree of sensitivity to MBCs. Ten isolates with lowest EC_{50} values were considered sensitive (S) and ten with highest EC_{50} values were denominated less-sensitive (LS). These isolates were used to evaluate the stability of sensitivity, the effectiveness of MBCs to control diseases in mango fruits, the fitness components (mycelial growth rate, osmotic sensitivity and virulence) and the molecular detection of resistance.

Stability of sensitivity of the isolates to MBC

To determine the stability of sensitivity of S and LS isolates, mycelial plugs (5 mm diameter) of each isolate were transferred to fungicide-free PDA medium, every seven days, totaling ten sequential transfers. Fungicide sensitivity was based on the mycelial growth test, as described previously, and carried out prior to the transfer (T_0) and after the ten transfers (T_{10}).

Effectiveness of MBC fungicides to control S and LS isolates infecting mango fruits

To evaluate the effectiveness of the fungicides thiabendazole and thiophanate-methyl to control S and LS isolates, mango fruits (cv. Tommy Atkins) were treated with the fungicides and then inoculated with the different isolates. To this, mango fruits at maturation stage four (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2012) were surface disinfested with detergent, rinsed with distilled water, immersed for 5 min in 1% NaOCl, rinsed two times with distilled water and kept on clean surface until dry. After drying, two 5 × 2 mm (diameter x depth) plugs were removed, one on each side of the fruit, with the aid of a cork borer. Fungicides manufacturer's recommended doses to control anthracnose in field (Cercobin 700 WP - 0.9ml l⁻¹ and Tecto 480 SC - 1.0 ml l⁻¹) were prepared and sprayed onto the fruits to runoff using a spray bottle, three hours before inoculation. Untreated fruits were sprayed with distilled sterile water. The plugs were replaced by mycelium plugs of equal dimension, obtained from the margins of 4-day-old cultures. Wound-inoculated fruits without fungicide treatment were used as control. After inoculation, the plastic boxes were sealed with plastic bags to keep the relative humidity around 100% and maintained at 30 °C in the dark. Five replicates (4 fruits per replicate) per isolate were used. The plastic bag was removed after 48 h, and mango fruits were kept at the same temperature for an additional 24 h period. Lesion diameter (LD; mm) was measured 72 h after inoculation in two perpendicular directions in both sides, and an average was obtained.

Fitness components of S and LS isolates

Three fitness components were determined for S and LS isolates of Botryosphaeriaceae to thiabendazole and thiophanate-methyl: (i) mycelial growth rate, (ii) osmotic sensitivity and (iii) virulence.

To evaluate the mycelial growth rate, a mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of a 4-day-old culture of each selected isolate and transferred to the center of a Petri plate containing fungicide-free PDA. The plates were incubated in the dark at 30 °C. Five replicate plates per isolate were used. The colony diameter was measured at 24 h and 36 h in two perpendicular directions and averaged to calculate the mycelial growth rate (MGR; mm hour⁻¹).

The osmotic sensitivity was evaluated by mycelial growth in PDA medium containing NaCl. Mycelial plugs (5 mm in diameter) were removed from the margins of 4-day-old culture of each isolate and transferred to the center of the PDA Petri plates amended with 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 or 8.0% (wt vol⁻¹) of NaCl. Petri plates containing only PDA medium, without NaCl, were used as control. Five replicate plates for each isolate-NaCl concentration combination were used. The plates were incubated for 36 h at 30 °C in the dark. The diameter of each colony was measured in two perpendicular directions, and the original mycelial plug diameter (5 mm) was subtracted from this measurement. The percentage of mycelial growth inhibition related to the control was calculated for all the concentrations of NaCl. The effective NaCl concentration (%) to inhibit 50% of mycelial growth (EC_{50N}) was calculated for individual isolates.

The virulence of the S and LS isolates was evaluated by analyzing the lesion diameter (LD). Mango fruits (cv. Tommy Atkins) were disinfested, inoculated, incubated and evaluated as described above for the tests of effectiveness of MBCs control in fruits.

Statistical analysis

In vitro sensitivity, stability of sensitivity, effectiveness of control in detached fruit and fitness components (mycelial growth rate, osmotic sensitivity and virulence) variables were analyzed by using a Student's t-test ($P=0.05$). The correlation between sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl was analyzed by Person correlation. All experiments were performed twice. Data of two independent replicates for each experiment were pooled after testing homogeneity of variance using the Levene test and no heterogeneity was detected. All analyses were performed using the Statistix 9.0 software (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Molecular detection of MBC resistance in Botryosphaeriaceae species

The isolates of Botryosphaeriaceae S and LS were analyzed for mutation at codon 198 of the β -tubulin gene. The isolates were grown in BDA medium at 25°C in the dark for eight days. The mycelium was scraped from the culture medium and transferred to 1.5 ml microtubes. The tubes were freezing and the mycelium was macerated with a pistil until obtaining a fine powder. Genomic DNA was extracted using the Wizard™ Genomic DNA Purification kit (Promega) following the manufacturer's instructions. The extracted DNA was visualized on 1% agarose gel containing SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) under UV light. DNA concentrations were measured using a spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) and the samples were diluted to a final concentration of 50 ng. μ l⁻¹ and stored at -20 °C.

To investigate the molecular basis of sensitivity, the DNA of isolates with differing phenotypes (L and LS) was used as template to amplify a β -tubulin gene fragment containing the codon 198, using the primers Tub_F1 (AGTATGGCAATCTTCTGAACG) and Tub_R1

(TTGGGGTCGAACATCTGCTG) (Tsuji et al. 2017). The PCR was performed using the Kit GoTaq™ G2 Colorless Master Mix (Promega) following as manufacturer's recommendations. The amplification parameters 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 (Tsuji et al. 2017). PCR products were verified on 1% agarose gel under UV light. Unincorporated primers and remaining dNTPs were removed from PCR products using ExoSAP-IT™ reagent according to the manufacturer's instructions. Sequencing was conducted at LABCEN/CCB sequencing platform at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). The nucleotide sequences were assembled, aligned and analyzed with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 7.0 (MEGA, Pennsylvania, USA) in order to verify the presence of a mutation at the codon 198.

Results

In vitro sensitivity of isolates to MBC

Among the isolates of Botryosphaeriaceae, the sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl was variable (Table 1). The estimated EC₅₀ values for thiabendazole ranged from 0.03 to 6.86 µg ml⁻¹. This value was <0.30 µg ml⁻¹ in 33.77% of the isolates, from 0.31 to 0.60 µg ml⁻¹ in 35.71%, from 0.61 to 0.90 µg ml⁻¹ in 11.04%, from 0.91 to 1.20 µg ml⁻¹ in 13.64% and >1.21 µg ml⁻¹ in 5.84% of the isolates (Fig. 2A). For thiophanate-methyl the estimated EC₅₀ values ranged from 0.0001 to 10.7 µg ml⁻¹. The EC₅₀ values were <1.25 µg ml⁻¹ in 66.23% of the isolates, from 1.26 to 2.5 µg ml⁻¹ in 20.78%, from 2.51 to 3.75 µg ml⁻¹ in 5.20%, from 3.76 to 6.25 µg ml⁻¹ in 3.25% and > 6.26 µg ml⁻¹ in 4.54% of the isolates (Fig. 2B).

Grouping the isolates according to the extremes of sensitivity, the EC₅₀ values of ten more sensitive (S) isolates ranged from 0.03 to 0.18 µg ml⁻¹ (mean 0.12 µg ml⁻¹) for thiabendazole. These values were significantly lower ($P<0.05$) when compared to the ten less-sensitive (LS) isolates, which EC₅₀ values ranged from 1.17 to 6.86 µg ml⁻¹ (mean 2.48 µg ml⁻¹) (Table 2). To thiophanate-methyl, EC₅₀ values of ten S isolates ranged from 0.0001 to 0.09 µg ml⁻¹ (mean 0.05 µg ml⁻¹) and were significantly ($P<0.05$) lower than the ten LS isolates, which EC₅₀ values ranged from 5.7 to 10.7 µg ml⁻¹ (mean 7.65 µg ml⁻¹) (Table 2).

Correlation between the sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl

The significant and positive correlation ($P<0.01$; $r=0.82$) was detected between the sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl (Fig.3).

Stability of sensitivity of isolates L and LS to MBC fungicides

No significant change was observed in the sensitivity of the isolates S and LS to thiabendazole and thiophanate-methyl after successive transfers to fungicide-free PDA, every seven days for a period of ten weeks ($P>0.05$) (Table 3). This result indicates that the sensitivity of Botryosphaeriaceae to thiabendazole and thiophanate-methyl verified in this study was stable.

Effectiveness of MBC to control S and LS isolates in mango fruits

Mango fruits treated with thiabendazole or thiophanate-methyl prior to inoculation with S and LS isolates of Botryosphaeriaceae showed significant reduction of the disease severity (lesion

diameter - LD) when compared with fruits untreated with fungicide ($P<0.05$) (Table 4). The fungicides were able to control both S e LS isolates, reducing the LD by more than 40%. The application of thiabendazole reduced 48.6% of the LD in the isolates S and 44.0% in the isolates LS whereas with thiophanate-methyl this reduction was 49.1% and 41.65%, respectively.

Fitness components of S and LS isolates

Considering the mycelial growth on fungicide-free medium and the virulence on mango fruits no differences were found ($P>0.05$) between S and LS isolates to thiabendazole and thiophanate-methyl. On the other hand, LS isolates showed an increased capacity of growing under salt stress when compared to the S isolates ($P<0.05$) for both fungicides (Table 5).

Molecular detection of the insensitivity to MBC in Botryosphaeriaceae

The sequences (745-bp) of the β -tubulin gene of all isolates, S and LS to both fungicides, were similar and did not show the mutation at the codon 198. Thus, the insensitivity should be related to another mechanism different from the codon 198 mutation of the β -tubulina gene.

Discussion

This is the first study about the sensitivity to the fungicides thiabendazole and thiophanate-methyl in isolates of Botryosphaeriaceae from mango orchards in Brazilian Northeastern. Previous studies with Botryosphaeriaceae were performed in *L. theobromae* populations from

papaya orchards using the MBC fungicides benomyl and thiabendazole (Pereira et al. 2012) and thiophanate-methyl (Cavalcante et al. 2014).

In Brazil, only the fungicide difenoconazole is registered for field application to control dieback and stem-end rot. Thiabendazole is registered to control anthracnose in postharvest and in the field and to powdery mildew (MAPA 2017), while thiophanate-methyl is registered for field applications to anthracnose control. Although thiabendazole and thiophanate-methyl are not registered in Brazil to control Botryosphaeriaceae in mango, both are extensively used in orchards located in Brazilian Northeastern, leading to the exposure of Botryosphaeriaceae population to these MBC fungicides.

The assays of insensitivity to MBCs in isolates of Botryosphaeriaceae in mango exhibited a narrow range of EC₅₀ values, ranging from 0.03 to 6.86 µg ml⁻¹ and from 0.0001 to 10.70 µg ml⁻¹ for thiabendazole and thiophanate-methyl, respectively. The maximum EC₅₀ value for thiabendazole (6.86 µg ml⁻¹) and thiophanate-methyl (10.70 µg ml⁻¹) verified in Botryosphaeriaceae population from mango orchards was low compared with the EC₅₀ value to *L. theobromae* population from papaya orchards, which was >100 µg ml⁻¹ for thiabendazole (Pereira et al., 2012) and 482.90 µg ml⁻¹ for thiophanate-methyl (Cavalcante et al. 2014).

In this study, isolates of *L. theobromae* showed EC₅₀ maximum value of 1.06 µg ml⁻¹ and 2.60 µg ml⁻¹ for thiabendazole and thiophanate-methyl, respectively, which is much lower than those observed in isolates from papaya orchards of the Brazilian Northeast. The average EC₅₀ values for *L. theobromae* sensitive isolates (0.45 µg ml⁻¹) to thiabendazole, (1.31 µg ml⁻¹) to thiophanate-methyl, were similar in comparison to isolate sensitive (0.76 µg ml⁻¹) to thiabendazole (Pereira et al. 2012) and 1.86 µg ml⁻¹ to thiophanate-methyl (Cavalcante et al. 2012). The average EC₅₀ values for *B. dothidea* the EC₅₀ values obtained with thiabendazole (0.097 µg ml⁻¹) and thiophanate-methyl (2.64 µg ml⁻¹) were similar than those verified in

other studies, involving *Botryosphaeria* spp.: *B. dothidea* to carbendazim ($0.07 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Pitt et al. 2012); *B. obtusa* to benomyl ($0.39 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Bester et al. 2007); *Botryosphaeria panicle* to benomyl ($1.18 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Ma et al. 2002); *B. berengriana* f. sp. *piricola* to carbendazim ($0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Li et al. 2009). On the other hand, to *Neofusicoccum parvum* the EC_{50} values for thiabendazole ($1.27 \mu\text{g ml}^{-1}$) and thiophanate-methyl ($3.86 \mu\text{g ml}^{-1}$) were in general higher than those observed in other studies with this genera: *N. parvum* to benomyl ($0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Latorre et al. 2013) and $0.47 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Bester et al. 2007)) and carbendazim ($0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Pitt et al. 2012); *N. australe* to thiophanate-methyl and carbendazim ($1.08 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.023 \mu\text{g ml}^{-1}$), respectively (Amponsah et al. 2012), and benomyl ($0.55 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Bester et al. 2007); *N. luteum* to thiophanate-methyl ($1.24 \mu\text{g ml}^{-1}$) and carbendazim ($0.061 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Amponsah et al. 2012).

The values of sensitivity found in this research become more relevant considering that both thiabendazole and thiophanate-methyl are not registered to control Botryosphaeriaceae causing dieback and stem-end rot on mango in Brazil. Thus, the sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl shown by some isolates, although in low values, may result from the exposure of Botryosphaeriaceae populations to fungicides used to anthracnose and powdery mildew control.

A significant and positive correlation between the sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl of the isolates of Botryosphaeriaceae was verified. This phenomenon is known as cross-resistance and is common between fungicides belonging to MBC group, since the mechanisms governing the fungal resistance are similar (Ma and Michailides 2005; Davidson et al. 2006; Ishii 2015). Cross-resistance was also observed in a population of *L. theobromae* from papaya orchards in Brazilian Northeast, when analyzing the sensitivity to thiophanate-methyl, benomyl and thiabendazole (Pereira et al. 2012; Cavalcante et al. 2014).

These findings demonstrate the need to perform the rotation with fungicides of different modes of action, aiming to delay the emergence of resistance in the field.

The sensitivity of the isolates was maintained after ten successive replications on free-fungicide medium. Stability of fungicide insensitivity is defined as the ability of the pathogen to retain the same level of insensitivity after successive generations of either exposure or no exposure to the target fungicide (Vega and Dewdney 2014). To MBC fungicides, the stability of resistance is common (Ishii 2015), and insensitive mutants have been shown to persist in the population for many years, even with the discontinued use of MBC (Walker et al. 2013), as demonstrated for *Cercospora kikuchii* in soybean (Hasegawa 2003).

The evaluation of fitness components as mycelial growth rate and virulence did not show significant differences between S and LS isolates to both fungicides thiabendazole and thiophanate-methyl. This similarity in fitness between sensitive and less-sensitive isolates has also been reported to *L. theobromae* from Brazilian papaya orchards (Pereira et al. 2012; Cavalcante et al. 2014). No differences on mycelial growth rate or virulence were observed between sensitive and less-sensitive isolates to benomyl and thiabendazole (Pereira et al. (2012). Regarding the thiophanate-methyl, no differences were observed on mycelial growth on fungicide-free medium, optimum temperature for mycelial growth, pycnidia production, spore germination, osmotic sensibility and virulence on papaya fruits (Cavalcante et al. 2014). Here, the LS isolates showed a gain in fitness, as demonstrated by their increased capacity to grow under salt stress. In the contrast, isolates of *Alternaria longipes* showing high insensitive to dicarboximides or phenylpyrroles fungicides were sensitive to osmotic stress (Luo et al. 2013). A point mutation in a putative osmosensor histidine kinase has been detected in dicarboximide-resistant isolates, which induces the accumulation of glycerol by

the fungus in response to osmotic stress (Fujimura, 2015). To our knowledge, this is the first report of this phenomenon in Botryosphaeriaceae.

Although a significant difference had been observed in the EC_{50} values of isolates S and LS to thiabendazole and thiophanate-methyl, commercial doses of the fungicides were able to control both S and LS isolates of Botryosphaeriaceae in artificially infected mango fruits. The effectiveness of MBCs against Botryosphaeriaceae has been previously reported in Botryosphaeria spp. on cork oak (Luque et al. 2008) and grapevine (Amponsah et al. 2012), *N. luteum* on grapevine (Amponsah et al. 2012) and *D. seriata* and *D. mutila*. on grapevine (Pitt et al. 2012), *D. corticola* and cork oak (Serrano et al. 2015). The MBC fungicides are systemic and easily absorbed, provide an excellent control with a wide range of performance and are cheap. Thus, they are a good option for management of plant diseases. However, their effectiveness has been threatened by the emergence of resistant pathogen populations in the field. These fungicides are considered as high-risk for development of resistance (FRAC 2016), which depends on the fungicide and the pathogen characteristics. Regarding the fungicide, the specificity of the mode of action and the frequency of application are important, while for the pathogen, biochemical, epidemiological and genetic characteristics should be considered. Botryosphaeriaceae possess characteristics that favor the occurrence of resistance: availability of resistance mechanisms (biochemical); dispersion by rain, abundant sporulation, short life cycle, ability to infect all crop stages which requires repeated treatments with fungicides, isolation of pathogen populations preventing the re-entry of more competitive sensitive genotypes (epidemiological); relative abundance of genotypes with different sensitivities and fitness properties, sexual or asexual reproduction and high rate of mutation (genetic) (Hollomon 2015). Because of this, the use of MBC fungicides to control Botryosphaeriaceae must be carried out with caution due to the risk of emergence of resistant population in the field.

Although isolates with low sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl have been found in this study, no mutation was observed in the β -tubulin gene, specifically at the codon 198. This mutation has been associated with high levels of resistance to MBCs (Chen et al. 2014). Besides, mutations in different codons of β -tubulin gene can lead to MBC resistance, including codon 6 (Cooley and Caten 1993), 50 (Mckay et al. 1998), 167 (Baraldi et al. 2003; Hou et al. 2011; Zhang et al. 2013), 198 (Cunha and Rizzo, 2003; Kongtragoul et al. 2011; Lee et al. 2011; Shi et al. 2013), 200 (Lee et al. 2011; Shi et al. 2013) and 240 (Albertini et al. 1999; Ma et al. 2005). Recent studies with populations of *L. theobromae* from papaya orchards in Brazilian Northeast revealed a nucleotide change at the codon 198, from GAG (glutamic acid) to AAG (lysine) in all resistant isolates (Tsuji et al. 2017). However, the mutant isolates presented EC_{50} values ($>300.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) much higher than those obtained in this study, which did not exceed $6.86 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $10.70 \mu\text{g ml}^{-1}$ to thiabendazole and thiophanate-methyl, respectively. The mutations E198A/G/K/Q and F200Y are the most commonly found (Ma and Michailides 2005) and have been described in important pathogens like *Botrytis cinerea* Pers. (Luck and Gillings 1995), *Helminthosporium solani* Durieu e Mont. (Mckay; Cook, 1997), *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey (Ma et al. 2005), *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc (Miin-Huey et al. 2011), *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (Koenraad et al. 1992) and *L. theobromae* (Tsuji et al. 2017).

The present study showed the occurrence of a narrow range of EC_{50} values for the sensibility to thiabendazole and thiophanate-methyl in Botryosphaeriaceae populations from important producing regions of mango in Brazil. The isolates identified here with low sensitivity to the fungicides were able to maintain this characteristic after ten generations and were not penalized on adaptability when compared with sensitive isolates. Nevertheless, the most common mutation associated with low sensitivity to MBCs was not found. Both fungicides thiabendazole and thiophanate-methyl were able to control the infection caused by

sensitive and less- sensitive isolates. In general, these fungicides can be used to control dieback and stem-end rot, but their use must be done with caution to avoid the selection of insensitive isolates. Thus, the implementation of monitoring programs is essential for assessing the risk of resistance and early detection of reduction in sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl. This information will provide subsidies for a more effective management of disease involving Botryosphaeriaceae in mango orchards in the producing and exporting regions in the Brazilian Northeast.

Acknowledgements

The first author was partially supported by a master scholarship of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Culture Collection of Phytopathogenic Fungi "Prof. Maria Menezes" (CMM). The Profs. U.P. Lopes, S. J. Michereff and M. P. S. Câmara thanks the (CNPq) for his research fellowship.

References

- Al Adawi, A. O., Deadman, M. L., Al Rawahi, A. K., Khan, A. J., & Al Maqbali, Y. M. (2003). *Diplodia theobromae* associated with sudden decline of mango in the Sultanate of Oman. *Plant Pathology*, 52, 419.
- Albertini, C., Gredt, M., & Leroux, P. (1999). 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*, 64, 17–31.
- AliceWeb. System analysis of foreign trade information by internet of the Ministry of Development, Industry, and Foreign Trade. <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Accessed on 30 January 2017.

- Amponsah, N. T., Jones, E., Ridgway, H. J., & Jaspers, M. V. (2012). Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria dieback* diseases of grapevines. *Pest management science*, *68*, 676–683.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, E., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: Pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*, *52*, 362–370.
- Bester, W., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australas Plant Pathology*, *36*, 73–77.
- Cavalcante, R. D., Lima, W. G., Martins, R. B., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., & Câmara, M. P. S. (2014). Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, *140*, 251–259.
- Cooley, R. N., & Caten, C. E. (1993). Molecular analyses of the *Septoria nodorum* β -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. *Molecular Genetics and Genomics*, *237*, 58–64.
- Costa, V. S. O., Michereff, S. J., Martins, R. B., Gava, C. A. T., Mizubuti, E. S. G., & Camara, M. P. S. (2010). Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. *European journal plant pathology*, *127*, 509–519.
- Chen, S. N., Shang, Y., Wang, Y., Schnabel, G., Lin, Y., Yin, L. F., & 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 Disease*, *98*, 1555–1560.
- Cunha, M. G., & Rizzo, D. M. (2003). Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* populations from California. *Plant Disease*, *87*, 798-803.

- Davidson, R. M., Hanson, L. E., Franc, G. D., & Panella, L. (2006). Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and -tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of Phytopathology*, 154, 321–328.
- FAO (2016). Faostat. (2016). Resourced document. Food and Agricultural Organization. <http://faostat3.fao.org/home/E>. Accessed on 30 January 2017.
- FRAC (2016). Benzimidazoles: resistance risk and current status. Resource document. <http://www.frac.info/expertfora/benzimidazoles/resistance-risk-and-current-status>. Accessed on 30 January 2017.
- Fujimura, M., Banno, S., Ichiishi, A., & Fukumori, F. (2015). Histidine Kinase Inhibitors. In: Ishii, H., & Hollomon, D. W. (Ed.), *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management* (pp. 181–197). Tokyo: Springer Japan.
- Hasegawa, M. (2003). Abstr 13th Symp Res Com Fungic Resist. Phytopathol Soc Jpn: 9–16. (in Japanese with English abstr)
- Hollomon, D. W. (2015). Fungicide resistance: 40 years on and still a major problem. In: Ishii, H., & Hollomon, D. W. (Ed.), *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management* (pp. 3–11). Tokyo: Springer Japan.
- Hou, Y., Lou, Q., Chen, C., & Zou, M. (2011). Application of cycleave PCR to the detection of a 28 point mutation (F167Y) in the β 2-tubulin gene of *Fusarium graminearum*. *Pest Management Science*, 67, 1124–1128.
- IBGE (2016). Est@dos: Banco de dados. Resource document. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>. Accessed 30 January 2017.
- Ishii, H. (2015). Stability of resistance. In: Ishii, H., & Hollomon, D. W. (Eds.). *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management* (pp. 35–48). Tokyo: Springer Japan.

- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Lombard, L. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australia Plant Pathology*, 41, 649–660.
- Javier-Alva, J., Gramaje, D., Alvarez, L. A., & Armengol, J. (2009). First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Disease*, 93, 426.
- Khazada, M. A., Lodhi, A. M., & Shahzad, S. (2004). Mango dieback and gummosis in Sindh, Pakistan caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Online. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/PHP-204-0302-01-DG.
- Koenraadt, H., Somerville, S. C., & Jones, 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.
- Kongtragoul, P., Nalumpang, S., & Miyamoto, Y (2011). Mutation at codon 198 of Tub2 gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *Journal of Plant Protection Research*, 51, 378–384.
- Latorre, B. A., Torres, R., Silva, T., & Elfar, K. (2013). Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Ciencia e investigación agrarian*, 40, 547-557.
- Lee, M. H., Pan, S., Ng, T., Chen, P., Wang, L., & Chung, K. (2011). 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*, 150, 157–163.
- Leroux, P., Gredt, M., Walker, A. S., Moinard, J.M., & Caron, D. (2005). Resistance of the wheat leaf blotch pathogen *Septoria triticitro* fungicides in France. In: Dehne H. W. Gisi,

- U. Kuck, K. H. Russell, P.E. Lyr, H. (Ed.), *Modern fungicides and antifungal compounds IV* (pp 115–124). The British Crop Protection Council, Alton.
- Li, X. J., Fan, K., Qu, J. L., Zhang, Y., Wang, T., Qi, B (2009). Determination of the sensitivity of *Botryosphaeria berengriana* to Carbendazim fungicide. *International Journal of Fruit Science*, 26, 516-519.
- Luo, Y. Y., Yang, J. K., Zhu, M. L., Liu, C. J., Li, H. Y., Lu, Z. B., Pan, W. Z., Zhang, Z. H., Bi, W., & Zhang, K. Q. (2013). The group III two-component histidine kinase AlHK1 is involved in fungicides resistance, osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes*. *Current Microbiology*, 64, 449–456
- Luck, J. E., & Gillings, M. R. (1995). Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycological Research*, 99, 1483–1488.
- Luque, J., Pera, J., & Parlade, J. (2008). Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology*, 38, 147–155.
- Marques, M. W., Lima, N. B., Michereff, S. J., Câmara, M. P. S., & Souza, C. R. B. (2012). First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. *Plant Disease*, 96, 144–145.
- Marques, M. W., Lima, N. B., Morais Junior, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., & Câmara, M. P. S. (2013a) Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61, 181–193.
- Marques, M. W., Lima, N. B., Morais Junior, M. A., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., & Câmara, M. P. S. (2013b). *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61, 195-208.

- 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.
- Ma, Z., Yoshimura, M. A., Holtz, B. A., & Michailides, T. J. (2005). Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Management Science*, *61*, 449-452.
- Ma, Z., Morgan, D. P., Felts, D., & Michailides, T. J. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. *Crop Protection*, *21*, p. 829–835.
- MAPA. (2017). Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Resource database. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed on 30 January 2017.
- Mckay, G. J., & Cook, L.R. (1997). A PCR – based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, *152*, 371–378.
- Mckay, G. J., Egan, D., Morris, E., & Brown, A. E. (1998). Identifiacion of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycological Research*, *102*, 671–676.
- Miin-Huey, L., Shiah-Mei, P., Tieng-Wui, N. G., Po-Sheng, C., Li-Yuan, W., & Kuang-Ren, C. (2011). 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*, *150*, 157–163.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012). Regulamento técnico da manga. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1754709875>. Accessed on 30 January 2017.
- Paull, R. E., & Duarte, O. Tropical fruits. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2011. 400 p.

- 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.
- Pitt, W. M., Sosnowski, M. R., Huang, R., Qiu, Y., Steel, C. C. & Savocchia, S. (2012) Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*, *96*, 1303–1308.
- Ploetz, R. C. Diseases of mango. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). Diseases of tropical fruit crops. Wallingford: CAB International, 2003. p. 327–363.
- Prusky, D., Kobiler, I., Miyara, I., & Alkan, N. (2009), Fruit diseases. In: LITZ, R. E. (Ed.). *The mango: botany, production and uses*. (pp. 210–230). Wallingford: CAB International.
- Santos Filho, H. P., & Matos, A. P (2000). Doenças e seu controle. In: In: Matos, A. P. (ed.). *Manga produção: aspectos técnicos*. (pp. 50–54). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Serrano M. S., Romero, M. A., Jiménez, J. J., Vita, P., Avila, A., Trapero A., & Sánchez, M. E. (2015). Preventive control *Botryosphaeria* canker affecting *Quercus suber* in southern Spain. *Forestry*, *88*, 500–507.
- Shi, H., Wu, H., Zhang, C., & Shen, X. (2013). Monitoring and characterization of resistance development of strawberry *Phomopsis* leaf blight to fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, *135*, 655–660.
- Sierotzki, H. (2015). Respiration inhibitors: complex III. In: ISHII, H., HOLLOMON, D. W. (Ed.). *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 119–144). Tokyo: Springer Japan.
- Slippers, B., Johnson G. I., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B., & Wingfield, M. J. (2005). Phylogenetic and morphological reevaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia*, *97*, 99–110.

- Tavares, S. C. C. H., Menezes, M., & Choudhury, M. M. (1991). Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Pat. na região semiárida de Pernambuco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 13, 163–166.
- Tavares, S. C. C. H. (2002). Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. *Tropical Plant Pathology*, 27, 46–52.
- Treichel, M., Kist, B.B., Santos, C.E., Carvalho, C., & Beling, R.R. (2016). Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta.
- Tsuji, S. S., Bandeira, M. A., Câmara, M. P. S., Hu, M., Schnabel, G., & Michereff, S. J. (2017). Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to azoxystrobin and molecular mechanisms of resistance to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Disease*. (submitted)
- Vega, B., & Dewdney, M. M. (2014). QoI-resistance stability in relation to pathogenic and saprophytic fitness components of *Alternaria alternate* from citrus. *Phytopathology*, 98, 1371–1378.
- Walker, A. S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., & Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science*, 69, 667–678.
- Yahia, E. M. (2011). Mango (*Mangifera indica* L.). In: YAHIA, E. M. (Ed.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango*. (pp. 492–565). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Young, D. H. (2015). Anti-tubulin agents. In: ISHII, H., HOLLOMON, D. W. (Eds.). *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management* (pp. 93–104). Tokyo: Springer Japan

- Zhang, C. Q., Zhang, Z. P., Sun, P. L., Chen, W. M., Yu, C. L., Bao, C. Q., & Xu, Z. H. (2011). Comparison of sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* to 7 fungicides and its baseline sensitivity to difenoconazole. *Chinese Journal of Pesticide Science*, *13*, 84–86.
- Zhang, L., Jia, X., Chen, C., & Zhou, M. (2013). Characterization of carbendazim sensitivity and *trichothecene* chemotypes of *Fusarium graminearum* in Jiangsu Province of China. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *84*, 53-60.

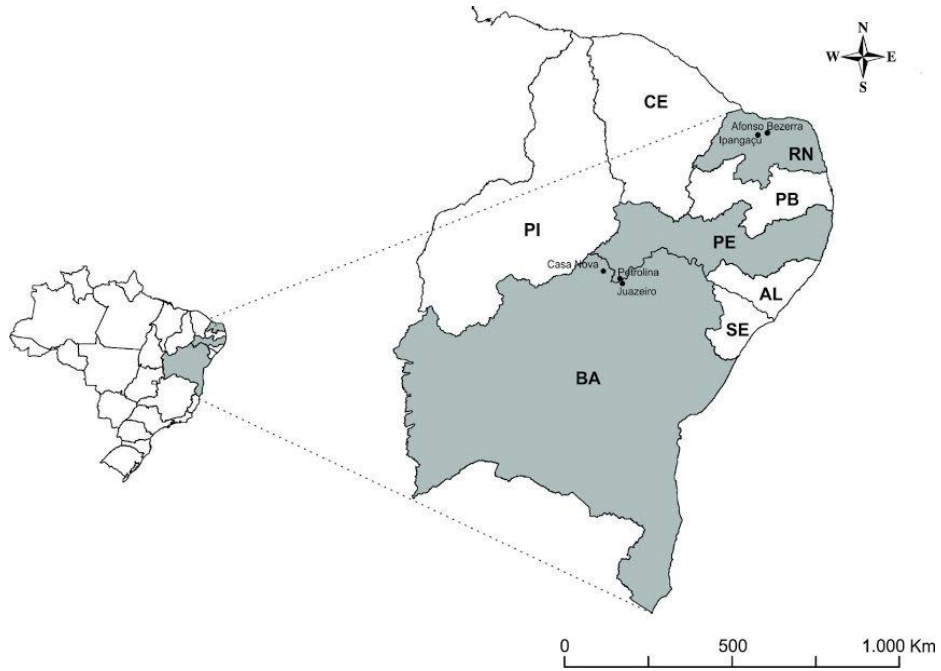


Fig. 1 Collection sites of isolates of Botryosphaeriaceae from Brazilian mango orchards located in the states of Bahia (BA), Pernambuco (PE) and Rio Grande do Norte (RN).

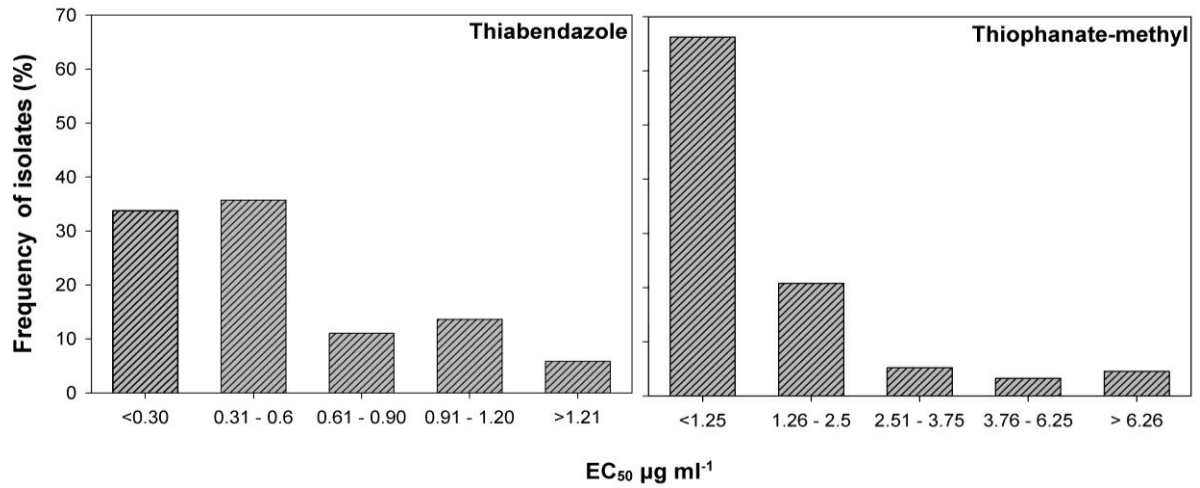


Fig. 2 Frequency distribution of effective fungicide concentration to inhibit 50% of the mycelial growth (EC₅₀) of 154 isolates of Botryosphaeriaceae collected from Brazilian mango orchards. A- Thiabendazole. B- Thiophanate-methyl.

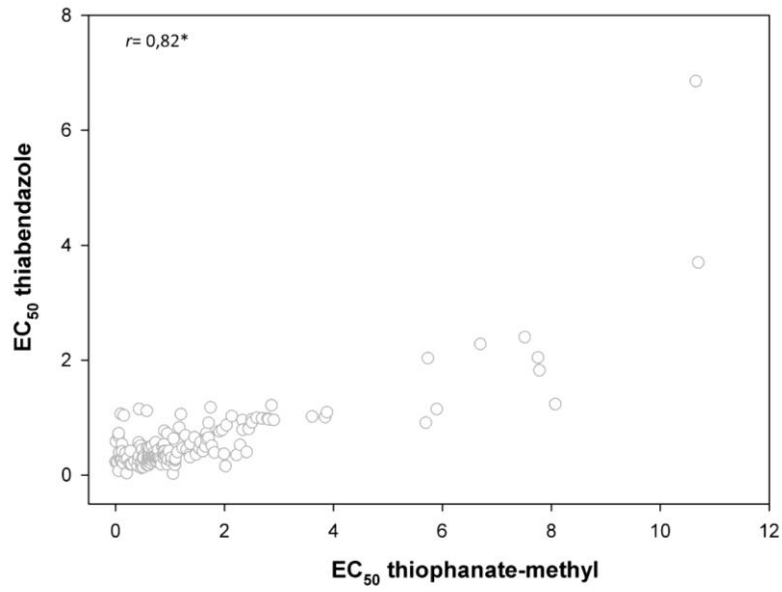


Fig. 3 Correlation between the values of effective concentration to inhibit 50% of the mycelial growth (EC₅₀) of thiophanate-methyl and thiabendazole. Each point represents an isolate (n = 154).

Table 1 Sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl of Botryosphaeriaceae species from mango orchards in Brazilian Northeast

Botryosphaeriaceae species	EC ₅₀ (µg i.a. ml ⁻¹) ^a		
	Nº of isolates	Thiabendazole	Thiophanate-methyl
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	37	0.97 (0.19-6.86)	2.64 (0.15-10.12)
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	3	0.32 (0.26-0.41)	0.63 (0.62-0.65)
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	5	0.35 (0.26-0.42)	1.02 (0.88-1.14)
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	14	0.31 (0.17-0.54)	0.64 (0.18-0.89)
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	13	0.43 (0.18-0.99)	0.86 (0.42-2.70)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	29	0.45 (0.07-1.06)	1.31 (0.05-2.60)
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	17	0.51 (0.17-1.15)	0.76 (0.0001-1.81)
<i>Neofusicoccum parvum</i>	11	1.27 (0.21-3.70)	3.86 (0.50-10.7)
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	25	0.34 (0.03-1.07)	0.59 (0.03-2.81)
Total	154	0.61 (0.03-6.86)	1.28 (0.01-10.7)

^a Values (µg i.a. ml⁻¹) are means and the values in parentheses represent the EC₅₀ range.

Table 2 Sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl of sensitive and less-sensitive isolates of Botryosphaeriaceae from Brazilian mango orchards

Isolate class ^a	EC ₅₀ (µg i.a. ml ⁻¹) ^b	
	Thiabendazole	Thiophanate methyl
Sensitive	0.12 (0.03-0.18, 0.012) a	0.05 (0.0001-0.09, 0.002) a
Less-sensitive	2.48 (1.17-6.86, 0.079) b	7.65 (5.70-10.7, 0.210) b

^aEach class is composed of ten isolates, selected by lowest and highest EC₅₀ values for thiabendazole and thiophanate-methyl

^bValues (µg i.a. ml⁻¹) are means from two independent experiments because no heterogeneity was detected between them according to Levene test ($P > 0.05$). Averages followed by the same letter in the column not differ significantly according to Student's t-test ($P=0.05$). Values in parentheses represent the range of EC₅₀ followed by the standard error.

Table 3 Stability of sensitivity to thiabendazole and thiophanate-methyl of sensitive and less-sensitive Botryosphaeriaceae isolates from mango orchards in Brazilian Northeast

Isolate class ^a	Transfer times / EC ₅₀ (µg i.a. ml ⁻¹) ^b			
	Thiabendazole		Thiophanate-methyl	
	T ₀	T ₁₀	T ₀	T ₁₀
Sensitive	0.12 (0.01) a	0.13 (±0.03) a	0.05 (±0.02) a	0.04 (±0.03) a
Less-sensitive	2.48 (0.08) a	2.37 (±0.07) a	7.65 (±0.21) a	7.89 (±0.27) a

^aEach class is composed of ten isolates, selected by lower and higher EC₅₀ values for thiabendazole and thiophanate-methyl

^b Values (µg i.a. ml⁻¹) are means from two independent experiments because no heterogeneity was detected between them according to Levene test ($P > 0.05$). Averages followed by the same letter in the line not differ significantly according to Student's t-test ($P=0.05$). Values in parentheses represent the standard error.

Table 4 Disease severity (lesion diameter) on detached mango fruit treated with thiabendazole and thiophanate-methyl prior to inoculation with sensitive and less-sensitive isolates of Botryosphaeriaceae

Isolate class ^a	Lesion diameter (mm) ^b			
	Thiabendazole		Thiophanate-methyl	
	Without Fungicide	With Fungicide	Without Fungicide	With Fungicide
Sensitive	31.11 (\pm 1.07) a	16.00 (\pm 0.42)b	37.77 (\pm 1.46) a	19.24 (\pm 0.48)b
Less-sensitive	33.13 (\pm 1.24) a	18.54 (\pm 0.42)b	33.59 (\pm 1.10) a	19.60 (\pm 0.61)b

^aEach class is composed of ten isolates, selected by lowest and highest EC₅₀ values for thiabendazole and thiophanate-methyl

^b Values (mm) are means from two independent experiments because no heterogeneity was detected between them according to Levene test ($P > 0.05$). Averages followed by the same letter in the line not differ significantly according to Student's t-test ($P=0.05$). Values (\pm) in parentheses represent the standard error.

Table 5 Comparison of mycelial growth rate (MGR) on fungicide-free agar medium, osmotic sensitivity (EC₅₀N) and virulence on mango fruits (lesion diameter - LD) between isolates of Botryosphaeriaceae sensitive and less-sensitive to thiabendazole and thiophanate-methyl

Isolate class ^a	Thiabendazole		
	MGR (mm h ⁻¹) ^b	EC ₅₀ N (%NaCl) ^b	LD (mm) ^b
Sensitive	1.14 (±0.02) a	0.34 (±0.02) a	31.11 (±1.07) a
Less-sensitive	1.01 (±0.04) a	1.33 (±0.05) b	33.13 (±1.24) a
	Thiophanate-methyl		
	MGR (mm h ⁻¹) ^b	EC ₅₀ N (%NaCl) ^b	LEDF (mm) ^b
Sensitive	1.03 (±0.03) a	0.34 (±0.02) a	37.77 (±1.46) a
Less-sensitive	1.00 (±0.02) a	1.52 (±0.05) b	33.59 (±1.10) a

^aEach class is composed of ten isolates, selected by lowest and highest EC₅₀ values for thiabendazole and thiophanate-methyl

^b Values are means from two independent experiments because no heterogeneity was detected between them according to Levene test ($P > 0.05$). Averages followed by the same letter in the column not differ significantly according to Student's t-test ($P=0.05$). Values (±) in parentheses represent the standard error.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Isolados de Botryosphaeriaceae obtidos de pomares de manga do Nordeste brasileiro apresentaram diferentes níveis de sensibilidade aos fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico;
2. A sensibilidade aos fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico foi correlacionada positivamente;
3. Os fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico apresentaram eficácia de controle em frutos de manga (cv. Tommy Atkins), mesmo quando isolados menos sensíveis foram inoculados;
4. Isolados de Botryosphaeriaceae menos sensíveis aos fungicidas apresentaram estabilidade de sensibilidade e boa adaptabilidade (*fitness*);
5. A menor sensibilidade dos isolados não está relacionada à mutação no códon 198 do gene β -tubulina;
6. Os fungicidas tiabendazol e tiofanato metílico são eficientes para manejo das doenças causadas por Botryosphaeriaceae em pomares de manga no Nordeste brasileiro. No entanto, seu uso deve ser realizado com cautela, devido ao risco iminente de aumento de insensibilidade na população;
7. O monitoramento em pomares de manga será importante para avaliar a evolução da insensibilidade em áreas de cultivo no Brasil.