



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes
do cacaueiro ao fungicida difenoconazole**

JOSELENE VIANA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA/DF

MAIO/2024

JOSELENE VIANA DA SILVA

Sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do cacaueiro ao fungicida difenoconazole

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Luiz Eduardo Bassay Blum

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2024

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
vocês foram minha motivação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a mim, por não ter desistido desse trabalho árduo, de ter levantado todos os dias e feito o que tinha para fazer, embora boa parte de tudo não fizesse sentido. Aos meus pais, por sempre terem acreditado em mim e investido na minha educação, mesmo em tempos difíceis e aos meus amigos sempre prestativos que trilharam esse caminho comigo.

Ao professor, Luiz Eduardo Bassay Blum, pela orientação e paciência;

Ao professor, Danilo Batista Pinho, pela cessão do laboratório, orientação e paciência e por compreender determinadas situações.

Aos professores, Willie Anderson Vieira e Silvino Intra Moreira, pela amizade, orientação, momentos de descontração, esclarecimento de dúvidas e ensinamentos.

Aos professores Armínio e Quelmo, pela amizade, ensinamentos e paciência.

A Ian Carlos, pela excelente amizade e bons conselhos.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (UNB), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meninos de iniciação científica, estagiários, visitantes e toda equipe do laboratório de micologia, meus sinceros agradecimentos. A todos os amigos que fiz durante a vida, em especial Cláudia Vitor, Valentina (D^a Maria) Larissa Adelita, Joi Santos, Sandra, Ian Carlos, Erivaldo, Joyce Paes e Eli.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Luiz Eduardo Bassay Blum**, com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do cacaueiro ao fungicida difenoconazol

JOSELENE VIANA DA SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA em XX/XX/2024 por:

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller
Examinador interno

Dr. Nédio Rodrigo Tormen
Examinador externo

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2024

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
Theobroma cacao	11
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	16
Controle	20
Fungicidas em cacaueteiro	22
Difenoconazol	25
Resistência a fungicidas	26
REFERÊNCIAS	31
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Coleta e isolamento	41
2.2. Extração de DNA	41
2.3. Realização de PCR	42
2.4. Sensibilidade in vitro de <i>Lasiodiplodia</i> spp. ao difenoconazol	47
2.5. Análises de componentes de aptidão	48
2.6. Teste de virulência	49
2.7. Taxa de crescimento micelial	50
2.8. Sensibilidade osmótica	50
3. RESULTADOS	51
3.1. Análise dos componentes de aptidão	55
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Lasiodiplodia</i> sp. recuperadas de folhas, caule e vagens doentes de <i>Theobroma cacao</i> . (A) Vista superior da aparência da colônia, (B) Vista reversa da aparência da colônia, (C) Conidioma, (D) Conídios imaturos, (E) conídios maduros, (F) células conidiogênicas e paráfises. Adaptado de Huda Shakirah et al.2022.	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Lasiodiplodia</i> spp. (Adaptado de Moreira Morrillo et al.2021).....	19
Figura 3. Sintomas causados por <i>Lasiodiplodia</i> spp. em <i>Theobroma cacao</i> . [Adaptado de Huda Shakirah et al. 2022 e Santos H,2023 (Arquivo pessoal)].....	20
Figura 4. Estrutura da molécula de Difenconazol	25
Figura 5. Distribuição das médias referentes ao PIC (A) e ao IVC (B) de duas populações de <i>Lasiodiplodia</i> spp. do Brasil e do Equador.....	54
Figura 6. A. Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 122 isolados. S = sensível; NS = Não sensível. B. Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 61 isolados. S = sensível; NS = Não sensível da população brasileira. C. Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 61 isolados. S = sensível; NS = Não sensível da população equatoriana.	55
Figura 7. A. Curva da CE50 para isolados oriundos do Brasil e do Equador B. Distribuição de CE50 separadas por país C. Distribuição da CE50 por local de coleta de isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. no Brasil e no Equador.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Código CCUB, hospedeiro e local de coletados isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. usados no experimento de sensibilidade in vitro e na avaliação de componentes adaptativos.	43
Tabela 2. Código CCUB dos isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. usados para os testes de aptidão	49
Tabela 3. Comparação da CE50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$), IVCm (mm/dia) e Pic (mm) entre isolados sensíveis e não-sensíveis de <i>Lasiodiplodia</i> spp. oriundos do Brasil e do Equador.	52
Tabela 4. Comparação do IVCm e PIC entre as populações de <i>Lasiodiplodia</i> spp. oriundas do Brasil e Equador.	53
Tabela 5. Comparação da taxa de crescimento micelial TCM, sensibilidade osmótica CE50 N e Virulência entre isolados sensíveis e não-sensíveis de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	56
Tabela 6. Identificação molecular dos isolados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. associadas ao cacaueteiro	57

RESUMO GERAL

Silva, Joselene Viana da. **Sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. provenientes do cacaueiro ao fungicida difenoconazole**, 2024. Número de páginas (78p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A morte descendente causada por *Lasiodiplodia* spp. tem emergido como uma importante doença na lavoura cacaueira em alguns países produtores. Apesar de não ser registrado para o controle da morte descendente, o princípio-ativo difenoconazol é utilizado na cultura do cacaueiro e as populações de *Lasiodiplodia* estão expostas à pressão de seleção realizada pelo princípio ativo em campo. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* spp. ao difenoconazol e sua influência nos componentes adaptativos. Para isso, foi estimado *in vitro* a concentração efetiva que resulta em 50% de inibição do crescimento micelial (CE_{50}) de 122 isolados oriundos do Brasil e Equador. Três componentes de adaptabilidade foram avaliados para 11 isolados com valores de CE_{50} superiores e inferiores a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Dos 122 isolados, 11,47% apresentaram comportamento não-sensível, com CE_{50} superior ou igual a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, considerados assim devido à ausência de dados na literatura no que diz respeito a um intervalo de classificação que separa sensíveis de resistentes, enquanto os restantes (88,5%) foram sensíveis com uma CE_{50} , inferior a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Os componentes de adaptabilidade avaliados não apresentaram diferença significativa (Teste t, $p=0.05$), indicando a ausência de custos adaptativos. Concluiu-se, portanto, que não se detectou isolados considerados resistentes e que não houve custos adaptativos em relação a virulência e taxa de crescimento micelial.

Palavras-chave: cacau, dieback, DMI

GENERAL ABSTRACT

Silva, Joselene Viana da. **Sensitivity of *Lasiodiplodia* spp. isolates from cocoa to the fungicide difenoconazole.** 2024. Number of pages (78p) Dissertation (Master in Plant Pathology) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Dieback, caused by *Lasiodiplodia* spp., has emerged as a significant threat to cocoa crops in certain producing regions. Despite not being officially registered for controlling this disease, the active ingredient difenoconazole is commonly utilized in cocoa cultivation, exposing *Lasiodiplodia* populations to its selection pressure in the field. This study aimed to characterize the sensitivity of *Lasiodiplodia* spp. isolates to difenoconazole and its potential impact on adaptive traits. To achieve this, we estimated the effective concentration resulting in 50% inhibition of mycelial growth EC₅₀ for 122 isolates collected from Brazil and Ecuador. Subsequently, we evaluated three components of adaptability for 11 isolates with EC₅₀ values above and below 1 µg ml⁻¹. Among the 122 isolates tested, 11.47% exhibited non-sensitive behavior, with an EC₅₀ equal to or greater than 1 µg ml⁻¹, considered as such due to the lack of data in the literature regard to a classification interval that separates sensitive from resistant while the remaining 88.5% displayed sensitivity, with an EC₅₀ lower than 1 µg ml⁻¹. The analysis of adaptability components did not reveal any significant differences t test, p=0.05 between isolates, suggesting the absence of adaptive costs associated with difenoconazole sensitivity. Consequently, it was concluded, therefore, that no isolates considered resistant were detected and that there were no adaptive costs in relation to virulence and mycelial growth rate.

Keywords: cocoa, dieback, DMI

REVISÃO DE LITERATURA

Theobroma cacao

Theobroma cacao (2 n = 2x = 20) é uma árvore nativa de ambientes úmidos, oriundo da América do Sul, que vegeta no sub-bosque, podendo ser encontrado em bosques escuros em uma altitude que varia de 0 a 1000 metros, podendo ser cultivado em sistemas agroflorestais, cabruca ou a pleno sol. Seu centro de origem está localizado na América do sul, de modo que a forma que foi introduzido é difusa, não sabendo assim se foi de forma natural ou através da intervenção humana, todavia, no entanto acredita-se que sua domesticação ocorreu na América do Sul, em seguida espalhou-se para a América Central e finalmente, ao sul do México provavelmente carregado por comunidades indígenas migratórias (Motamayor et al. 2002; Reyes 2012; Bhattacharjee 2018)

É considerado a bebida dos deuses, historicamente foi considerado de origem divina e usado como moeda no período pré-hispânico. Relata-se que o primeiro forasteiro a experimentar o chocolate foi Colombo, em 1502 durante sua busca por uma rota marítima para as especiarias, contudo, Hernan Cortés, liderando uma expedição ao império asteca que levou consigo à Espanha a receita asteca do chocolate que após ter adição do açúcar, tornou-se uma bebida das cortes fazendo com que houvesse um aumento da demanda pelo cacau, estendendo assim o cultivo para as principais colônias: África, Ásia, Caribe e para a América Latina (Reyes 2012)

Atualmente, os países africanos dominam a produção cacaueira com uma produção equivalente a 74.9 % da produção mundial, seguido das Américas, Ásia e Oceania com a estimativa de que na safra 2021/22 esse percentual aumente (ICCO, 2024). No Brasil, este fruto possui um alto valor agregado, com uma ênfase especial ao Sul da Bahia onde sua introdução remonta da metade do século XVIII, quando a economia canavieira entrou em crise e este proporcionou um incremento na exportação em décadas

diversas, fazendo com que o Brasil alcançasse destaque na exportação, iniciando assim o ciclo do cacau para exportação no Sul da Bahia onde chegou a ocupar áreas de até 600.000 hectares (Ferrão-Gonzales et al. 2013; Santana & Soares 2020)

Theobroma cacao encontra-se inserido no filo Streptophyta, ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma*. Tal gênero compreende diversas espécies, contudo *Theobroma cacao* L. é a mais importante dentre estas, sendo amplamente cultivado em diversas regiões do mundo (Colli-Silva et al. 2024). Suas folhas são avermelhadas quando o jovem e logo se tornam verde escuro, podendo chegar até 30 cm de comprimento, comprimento semelhante a seus frutos que por sua vez possui coloração variáveis desde o verde até o amarronzado. Interiormente podemos encontrar um número variável de sementes entre 30 e 50 e a polinização de suas flores é feita por pequenos insetos (Conab 2017).

No norte Brasil, atualmente, após estudos, notou-se que a expansão da cultura do cacaueiro, tem sido benéfica tanto para os produtores quanto para a floresta, pois além de aumentar a renda nacional, constatou-se que 70% das áreas cultivadas é além de serem cultivados em áreas degradadas e em sistemas agroflorestais. Dessa forma promove-se assim uma recuperação de áreas, que antes eram pastagens, tendo como consequência a redução de incêndios florestais e do desmatamento na região (Adriano Venturieri & Ana Laura Lima 2022)

Por outro lado, a produção cacaueira baiana, está concentrada predominantemente na região sul do estado. Sua principal característica é o cultivo no sistema “cacaucabruca”, sendo considerado um sistema agroflorestal único no mundo, consistindo no cultivo do cacau sob a copa das árvores da mata atlântica, ao longo de rios, vales e montanhas, bem drenados.

Este agro ecossistema, essencialmente contribui para a conservação do bioma mata atlântica, tanto da fauna quanto da flora. Outro ponto importante desse sistema de manejo, é que quando bem manejado, mantém um microclima local e único para os cacaueiros, possibilitando altas produtividades (Ministry of Agriculture & Livestock 2023). No entanto são cultivados também em associação com outras culturas, como seringueira, coco e açaí desempenhando um papel importante na recuperação de áreas degradadas. Mais recente o cultivo vem se expandindo para áreas não tradicionais da Bahia como Luiz Eduardo Magalhães e Barreiras, com produção a pleno sol, investindo-se altamente em tecnologias.

Sua colheita se dá manualmente duas vezes ao ano, de forma delicada, para que não cause danos à árvore e após essa colheita esses frutos são abertos e faz-se a retirada de amêndoas e polpas, a partir das quais se procede a fermentação. Esse processo se dá 180 dias após a polinização.

Sua semente desidratada, é matéria prima para diversos produtos tais quais: chocolate, produtos para indústria farmacêutica e cosmética dentre outros. Um dos produtos mais conhecidos e consumidos é o chocolate. Em 2021, o consumo global foi estimado em 8 milhões de toneladas, movimentando US\$ 105 bilhões. No Brasil, o consumo de chocolate chega a 1,9 kg per capita e este produziu uma receita de R\$ 4,17 milhões (Abicab 2021). Segundo dados do IBGE (2022), a produção de amêndoas obteve um rendimento médio de 464 Kg ha⁻¹, em uma área colhida de 590.232 hectares.

Theobroma cacao é a matéria prima do chocolate, sendo afetado por doenças altamente destrutivas, independentemente de onde é cultivado. Algumas doenças são endêmicas, todavia, à medida que o cacau foi avançando dentro floresta amazônica, este começou a ter contato com outras doenças (Marelli et al. 2019). As doenças estabelecidas

que causam maiores perdas são Vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e podridões de *Phytophthora*. No entanto outros patógenos nesse patossistema desempenham papel importante e alguns não possuem sua biologia totalmente elucidada, os quais podemos ressaltar: *Ceratobasidium theobromae* (morte por estrias vasculares), doença de broto inchado (*Cacao swollen shoot virus*), monilíase (*Moniliophthora roreri*).

A vassoura-de-bruxa, atualmente, encontra-se no ranking de uma das doenças mais importantes da cultura. Causada pelo basidiomiceto *Moniliphthora perniciosa*, causa perdas de até 90% da produção, sendo responsável por atacar tecidos meristemáticos, ocasionando sintomas típicos de desequilíbrio hormona (Morato et al. 2023). Por muitos anos esteve endêmica na Amazônia e apenas em 1989, disseminou de forma rápida para a Bahia, principal produtor de cacau, devido às condições ambientais favoráveis, levando a uma redução significativa de 600.000 toneladas para apenas 150.000 (George Andrade Sodré 2017; Sousa Filho et al. 2021)

O controle desta, envolve o uso de técnicas de manejo integrado como o uso de clones com resistência a doença e tratos culturais, sistemas agroflorestais, controle biológico, incluindo ainda o uso de fungicidas como o tebuconazol, epoxiconazol e piraclostrobina (George Andrade Sodré 2017; Sousa Filho et al. 2021; Agrofit 2023).

A monilíase causada por *Moniliphthora roreri* também é uma doença de grande importância para a cultura e foi detectada no Brasil, em 2020, em Cruzeiro do Sul no Acre (Ceplac 2022). Esta doença ataca todas as fases do fruto do cacau e do cupuaçu e quando instalada causa perdas de 100% na produção. Seu controle, exige o uso de manejo integrado, com emprego de tratos culturais como poda, controle de plantas espontâneas.

Neste patossistema uso de fungicidas é uma importante ferramenta no manejo desta (Gramacho et al. 2018). Atualmente, de acordo com o Agrofit,2023 os produtos

químicos registrados para seu controle são produtos do grupo das estrobilurinas (Azoxistrobina) e triazóis (Difenoconazole, flutriafol) e o clorotalonil.

Outra doença altamente importante é causada por *Phytophthora* spp., e estas, causam as maiores perdas em relação as demais doenças, podendo apresentar sintomas como podridão de vagens, cancro dentre outros que podem também se manifestar em ambientes de viveiros. Dentre as espécies envolvidas, as mais importantes são *P. magakarya* e *P. palmivora* as quais se originaram fora do centro de origem do cacau e mundialmente essas espécies causam perdas de 20-30% (Marelli et al. 2019). O manejo dessa doença, requer uma integração de manejos, que vão desde melhoramento genético, controles químicos e culturais. Práticas como compostagem ou enterramento de frutos doentes, contribuem para redução do nível de inóculo (Marelli et al. 2019; Toala et al. 2019).

Ceratobasidium theobromae por sua vez, é um basidiomiceto, extremamente agressivo ao cacaueiro e ausente no Brasil. Sua presença foi constatada no sul sudeste Asiático, Nova Grã Bretanha, Província de Hainan, na China, no estado de Kerala e norte da Índia, onde causa perdas locais no rendimento de até 80% e mundialmente de até 60.000 toneladas anuais (McMahon & Purwantara 2016; Marelli et al. 2019). Seus sintomas são clorose, os quais se espalham rapidamente para as folhas adjacentes e necrose que se iniciam pelas bordas foliares. Afeta também os botões florais causando sintomas “cabo de vassoura”, além do aumento das lenticelas e estrias escurecidas, indicando comprometimento do xilema e do parênquima (Parawansa et al. 2022).

Uma das medidas eficazes de conter a propagação desse fungo é a quarentena, de modo que as plantas devem estar livres do sintoma por pelo menos 6 meses; assim como podas de ramos doentes. Os estudos sobre resistência, por sua vez, são complexos, todavia

os estudos têm mostrado que híbridos com resistência parcial e bem nutridos tem tolerado bem a doença (McMahon & Purwantara 2016; Marelli et al. 2019)

Cacao swollen shoot virus é um vírus presente em países africanos como Gana, Nigéria, Costa do Marfim, Libéria, Serra Leoa e embora não esteja presente em outras áreas produtoras como o Camarões, há probabilidade de que as alcancem futuramente (Marelli et al. 2019). É causado por um badnavirus, o qual é transmitido por cochonilhas.

Seus sintomas principais são: estrias avermelhadas em folhas jovens, clareamento ou clorose ao longo das nervuras, inchaço em caules, raízes e brotos, distorção no formato e tamanho da vagem, descoloração de folhas e morte descendente. Dentre as medidas de controle pode-se evidenciar o controle da cochonilha, tratamento térmico e quimioterapia, roguing e a busca de materiais altamente resistente ao vírus (Marelli et al. 2019; Gyamera et al. 2023).

Ainda, outras doenças como murcha de *Verticillium*, Murcha de *Ceratocystis*, e cancro de *Lasiodiplodia* acometem a cultura e ultimamente têm-se observado a emergência de *Lasiodiplodia* spp. como agente patogênico de grande importância para a cultura do cacau, atacando partes da planta como frutos, folhas, raízes, galhos e caule. Tal emergência, segundo Ali et al. 2020 está fortemente atrelado às mudanças climáticas. Fatores como aumento de temperatura e as secas são fatores que podem influenciar as interações entre *L. theobromae* e seus hospedeiros

Lasiodiplodia theobromae

Lasiodiplodia theobromae Griffon & Maubl ,1903 está classificado dentro do filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeriaceae é um cosmopolita polífago, e estima-se que tenham aproximadamente 500 espécies hospedeiras entre dicotiledôneas e monocotiledôneas (Huda-Shakirah et al. 2022). Comumente, são chamados de podridão-carvão, contudo há

uma certa confusão, pois, este sintoma é atribuído a *Phytophthora* (Bailey & Meinhardt 2016; Ali et al. 2017).

Seu crescimento em meio de cultura BDA (Batata-dextrose-água) se caracteriza por uma colônia acinzentada com abundância de micélio aéreo, produzindo picnídios simples ou compostos de cor escura, normalmente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides a elipsoides-oblongos com paráfise de 4 e 55µm de comprimento e largura, sendo este um parâmetro que diferencia o gênero *Lasioidiplodia* spp. De outros estreitamente relacionado (Cavalcante et al. 2014; Huda-Shakirah et al. 2022).

Possui hifas septadas, com formação de conidióforos curtos e simples e a célula conidiogênica, com conídios de formatos variáveis de subovóides a elipsoide ovoide, de forma que quando imaturos, são hialinos e asseptado, tornando-se marrom escuro e com um septo quando maduros (Alvindia & Gallema 2017; Moreira-Morrillo et al. 2021; Huda-Shakirah et al. 2022) Este fungo nos últimos anos, tem afetado culturas importantes tais como mangueira (Wang et al. 2021; Yang et al. 2021), cajueiro (Cardoso et al. 2009), coqueiro (Correia & Costa 2005; Halfeld-Vieira & Nechet 2005), abacateiro (Duarte et al. 2021), citros (Rosane De Santana et al.; Zhang 2014), figo (Al-Mahmooli et al. 2022), mamoeiro ((S.B. Netto et al. 2014), goiabeira (Cardoso et al. 2002) e cacau (Mbenoun et al. 2008; Alvindia & Gallema 2017; Dorothée et al. 2019; Huda-Shakirah et al. 2022) mostrando assim a plasticidade deste fungo às mais diversas regiões do mundo.

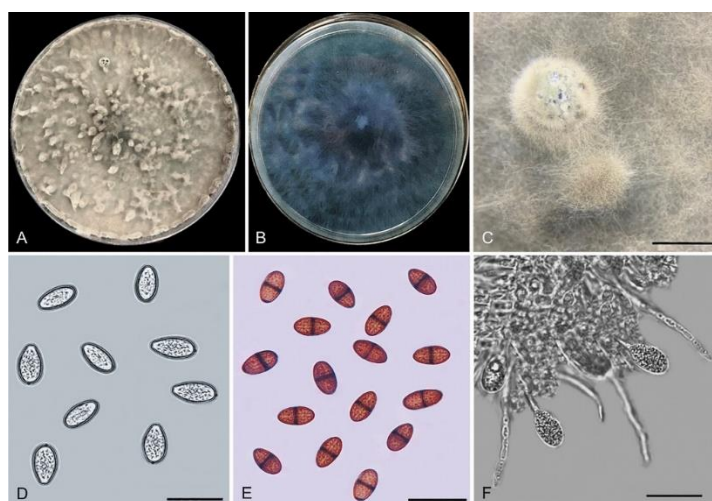


Figura 1. Características morfológicas de *Lasiodiplodia* sp. recuperadas de folhas, caule e vagens doentes de *Theobroma cacao*. (A) Vista superior da aparência da colônia, (B) Vista reversa da aparência da colônia, (C) Conidioma, (D) Conídios imaturos, (E) conídios maduros, (F) células conidiogênicas e paráfises. Adaptado de Huda Shakirah et al.2022.

Este fungo é muito comum em árvores lenhosas de regiões tropicais e subtropicais. Este é dependente de ferimentos para que consiga colonizar o hospedeiro, podendo ser ferimentos de podas, insetos, sendo considerado um patógeno oportunista capaz de causar os mais diversos sintomas: cancro em galhos e troncos, gomose, manchas foliares, queima de folhas, ferrugem foliares, podridões de frutos e raízes e dieback (Yang et al. 2017; Moreira-Morrillo et al. 2021). Foi observado que em Davao, nas Filipinas esses sintomas se assemelhavam a vascular streak disease (VSD) (Alvindia & Gallema 2017)

O fungo pode conviver de forma endófito em tecidos jovens, sem expressar sintomas, no entanto ao atravessar por estresse tais sintomas podem ser visualizados (Moreira-Morrillo et al. 2021). Em condições controladas, os sintomas podem ser

visualizados a partir de 14 dias (Alvindia & Gallema 2017; Dorothée et al. 2019; Huda-Shakirah et al. 2022)

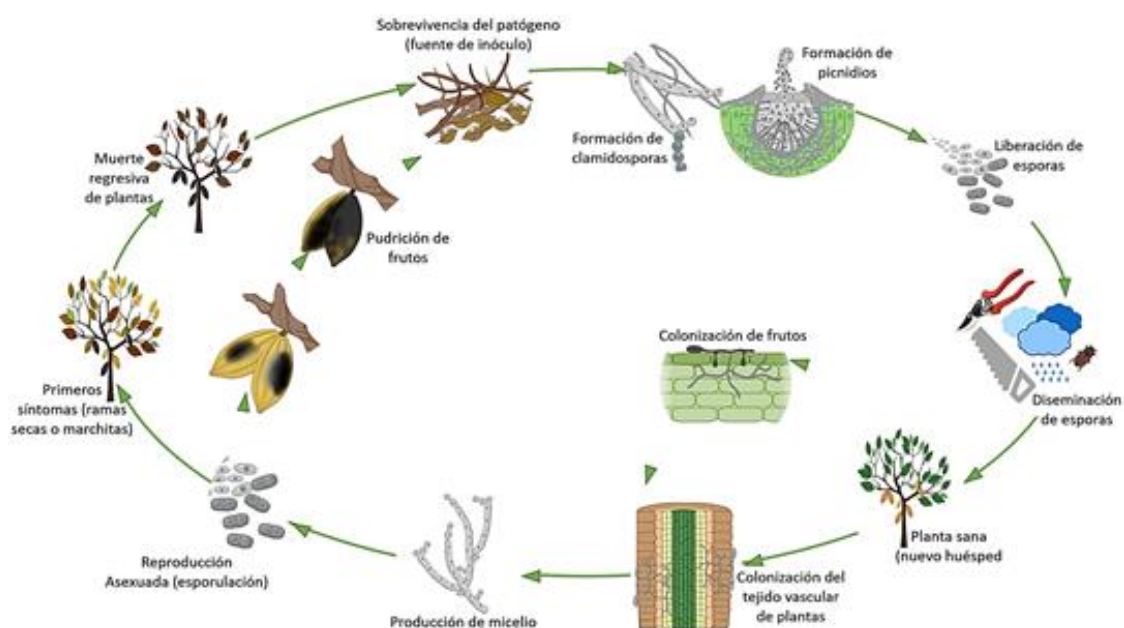


Figura 2.Ciclo de vida de *Lasiodiplodia* spp. (Adaptado de Moreira Morrillo et al.2021)

Atualmente, a cultura do cacau tem sido fortemente afetada por esse patógeno, onde identificou-se sintomas em folhas, podridões no caule e frutos, e ainda cancro, nas lavouras de cacau na Malásia (Huda-Shakirah et al. 2022a) e também no Camarões, causando dieback e tendendo a tornar-se uma doença restritiva para a produção de cacau no país (Mbenoun et al. 2008). Nas Filipinas, árvores de cacau apresentaram sintomas semelhantes a morte de raia vascular com clorose seguida de necrose e abscisão foliar, após análises morfo-moleculares, verificou-se a presença de *L. theobromae* associado a tais sintomas (Alvindia & Gallema 2017).



Figura 3. Sintomas causados por *Lasiodiplodia* spp. em *Theobroma cacao*. [Adaptado de Huda Shakirah et al. 2022 e Santos H, 2023 (Arquivo pessoal)]

As condições adequadas para o desenvolvimento do fungo, ocorrem em uma faixa de temperatura que varia de 4-36 °C, sendo 28°C a temperatura ótima (Eng et al.), enquanto temperaturas próximas de 30 °C favorece maior germinação de conídio e temperaturas abaixo de 40°C inibem a germinação (Cavalcante et al. 2014). Por sua vez, temperaturas entre 35-40 °C favorecem a produção de picnídios. (Khanzada et al. 2005)

Controle

Uma vez que um indivíduo da família Botryosphaeriaceae encontra-se em uma área, o seu controle torna-se um pouco mais complexo, devido principalmente à sua ampla gama de hospedeiros e a sua capacidade de sobreviver em tecidos em decomposição (Moreira-

Morrillo et al. 2021). Para seu controle, deve-se lançar mão de mecanismos diversos. Um dos pontos importantes é a resistência genética; embora o número de clones que apresentem uma certa resistência é escasso.

Em seus estudos, Adu-Acheampong et al. (2012) observaram que em situação de laboratório e casa de vegetação, três clones de cacaueiro apresentaram um certo grau de resistência a um complexo de *L. theobromae* e *Fusarium decemcellulare*, incidindo sobre pontos importantes como o tamanho de lesões necróticas, tempo de colonização e número de plântulas com sintoma.

Estes portanto, são fontes importantes para estudo de patógenos, no que diz respeito a patógenos que causam murcha e morte no cacaueiro. Os fatores atrelados a resistência em cacau são pouco conhecidos, contudo, em seus estudos, no patossistema uva, Zhang et al. (2019), através de estudos moleculares, sugerem uma imunidade inata de modo que a planta da videira faz uso de mecanismos sinalizadores, como fitohormônios, compostos fenilpropanoides dentre outros, formando uma cascata de defesa contra o patógeno.

Uma outra técnica, que visa interferir nas fases de sobrevivência do patógeno e tem sido usada no manejo da doença, diz respeito ao emprego de práticas culturais como a poda de galhos infectados ou a remoção de tecidos afetados e ainda destruir os restos de cultura na área, para evitar a sobrevivência do fungo (Moreira-Morrillo et al. 2021).

O controle biológico, por sua vez, tem despertado resultados promissores no controle deste patógeno. Isolados de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viridae*, aplicados em banana mostraram parasitismo direto sobre as hifas de *L. theobromae* causando deformações nas células deste, bem como a desintegração das paredes das hifas. Quando estes foram associados. *T. asperellum*, também promoveu uma diminuição de *L. theobromae* em cacau (Golam Mortuza & Ilag 1999; Nurlaila et al. 2020; Rusin et al.

2020). O uso de extratos vegetais também tem mostrado algum resultado sobre *L. theobromae* conforme observou Dorothée et al. 2019 em seus estudos onde o extrato etanólico de sementes de *Azadirachta indica* reduziu o crescimento micelial do fungo no cacau. Extratos etanólicos, obtidos a partir de folhas de *Dioscorea dumetorum* e *Moringa oleífera* também inibiram significativamente o crescimento do fungo *in vitro* e *in vivo* (Okey et al. 2015).

Apesar do grande número de produtos registrado para cacaueiro no Brasil, dentre estes, não há registro para *L. theobromae*, contudo, em alguns experimentos verificou-se a eficiência de pesticidas vigentes sobre esse patógeno, conforme observou Rusin et al. (2020), em cultivares de uva Syrah, que o uso de tebuconazol, pyraclostrobin, mancozeb, fosetyl-Al, apresentaram potencial de controle para este, *in vitro*;

Musdalifa et al. (2021), em seus estudos, sobre a morte descendente em cacaueiro causado por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* testando o cinco tipos de fungicidas e um inseticida, fipronil 250 g/L + tiofanato metílico 225 g/L + pyraclostrobina 25 g/L, sulfura 80%, carbendazim 80%, carbendazim 50 g/L + hexaconazol 50 g/L, difenoconazol 125 g/L + azoxystrobina 200 g/L observaram que fipronil 250 g / L + tiofanato metílico 225 g/L + pyraclostrobina 25 g/L, carbendazim 80% carbendazim 50 g/L + hexaconazol 50 g/L reduziram significativamente o crescimento micelial do fungo *in vitro* em 100% seguido por sulfura 80% quem em doses iguais e superiores a 2 mg L⁻¹ também inibiu 100% e difenoconazol 125 g/L + azoxystrobina 200 g/L, obteve inibição total apenas na dose de 10 mg L⁻¹, mostrando assim, resultados promissores para estudos futuros no controle de *Lasiodiplodia* sp. em diversas culturas.

Fungicidas em cacaueiro

A cultura do cacau, apesar de robusta, é assolada por diversas pragas, fazendo necessário o uso de pesticidas para garantir a qualidade final do produto (Bateman &

Crozier,2023). Dessa forma, os fungicidas desempenham um papel importante, sendo essenciais para manter a sanidade, confiabilidade e alta qualidade dos produtos agrícolas, sendo por sua vez ferramentas imprescindíveis no manejo integrado de doenças (Brent & Hollomon 2007; Adejori & Akinagbe 2022).

Atualmente há uma ampla gama de fungicidas com formulações mais simples a base de cobre e enxofre usados de forma eficaz (Zambolim et al. 2007) e outras moléculas mais complexas usadas no manejo de doenças. Durante muitos anos, foi feito o uso de moléculas como ditiocarbamatos, clorofenóis dentre outras com ação multissítio, inibindo várias enzimas simultaneamente e estruturas celulares, permitindo uma prevenção de doenças (Brent & Hollomon 2007).

Nas décadas de 1960 e 1970, houve a introdução de muitas moléculas potentes com uma nova estrutura com uma atividade sistêmica, inédita nos produtos anteriores. Incluindo produtos como benzimidazóis, dicarboxamidas, fenilamidas e inibidores da demetilação de esteróis (Brent & Hollomon 2007). Esses fungicidas de ação sistêmica, após aplicação são absorvidos pelas plantas e redistribuídos pelos vasos condutores para partes das plantas as quais não foram atingidas durante as pulverizações (Ghini & Kimati 2002; Zambolim et al. 2007).

Os fungicidas que agem em sítio específico, estes podem atuar inibindo diversas vias biossintéticas dos patógenos como divisão celular, síntese de ácidos nucleicos, respiração celular, biossíntese de esteróis na membrana, biossíntese de parede celular dentre outros (Frac,2023).

Dentre os produtos com atividade sistêmica, pode-se destacar os pertencentes ao grupo dos Inibidores da síntese de ergosterol (DMI's), introduzidos por volta de 1970 possuindo amplo espectro e com alta eficiência contra diversos fungos como míldios, oídios, ferrugens dentre outros patógenos foliares (Brent & Hollomon 2007). Geralmente

estes não inibem a germinação de esporos e são mais eficazes nos estágios iniciais do crescimento fúngico, quando o há um crescimento rápido destes exigindo um suprimento constante de ergosterol.

Sabe-se que os DMI's, atuam sobre o lanosterol, precursor do ergosterol, impedindo que este seja convertido no composto intermediário 4,4-dimetil-colesta-8,14,24 trienol (FRAC). Quando há a presença desses compostos na reação estes impedem que haja a demetilação do C-14 pelo citocromo P450, no entanto, esse processo de síntese de ergosteróis continua acontecendo dando origem a compostos metilados, que são importantes para algumas funções na membrana, mas não em outras, resultando em inibição de fosfolipídios e acúmulo de ácidos graxos resultando na morte do fungo (Zambolim et al. 2007)

Os DMI's apresentam atividade fúngica contra Ascomycetes, Basidiomycetes no entanto, não exibe nenhuma atividade contra Oomycetes (Brent & Hollomon 2007) Os principais representantes pertencentes a esse grupo são Ciproconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol, flutriafol, propiconazol, hexaconazol dentre outros (Zambolim et al. 2007) sendo utilizados no controle de doenças em várias culturas.

Para a cultura do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) no Brasil, são utilizados os fungicidas pertencentes a classe dos triazóis para o controle de doenças como a vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), Monilíase (*Moniliophthora roreri*) e *Colletotrichum acutatum*, de modo que nenhum princípio destes ou de outro caráter, possui registro para o controle de *Lasioidiplodia theobromae*. No entanto, para o controle de *C. acutatum* há registro de difenoconazol, flutriafol, mefentrifluconazole, enquanto para *M. perniciosa* usa-se o tebuconazol e epoxiconazol e por fim, para o controle de *M. roreri* é recomendado flutriafol e difenoconazol, sendo o difenoconazol amplamente usado no controle de doenças diversas na cultura . (Agrofit 2024).

Difenoconazol

O difenoconazol, quimicamente é 1-((2-(2-cloro-4-(4-clorofenoxy) fenil) -4-metil-1,3-dioxolan-2-il) metil) -1H-1,2,4-triazol, membro da classe dos dioxolanos, além de ser um éter cíclico, um membro do grupo dos triazóis, um cetel cíclico, e um fungicida triazol. Comparado com outros fungicidas triazólicos, o difenoconazol possui toxicidade alta uma gama de organismos aquáticos, sendo fruto de preocupação ambiental (Dong et al. 2013)

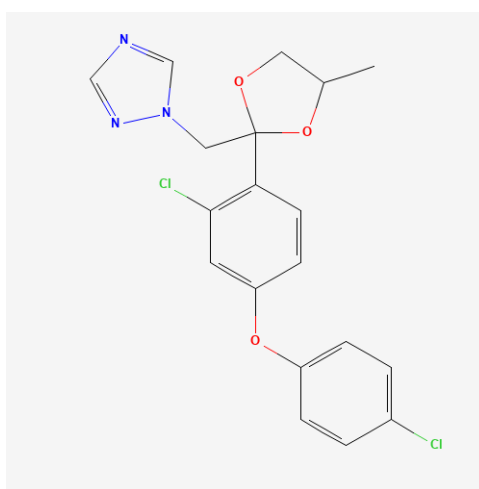


Figura 4.Estrutura da molécula de Difenoconazol

Este possui dois centros quirais podendo existir em quatro formas estereoisoméricas, podendo assim estereoisômeros quirais de pesticidas, devido a essas configurações diferir na ligação a substâncias sensíveis à estrutura. Esse fungicida tem sido usado no controle de diferentes doenças em diversas culturas como antracnose do cacaueiro, septoriose em alface, mancha de ramularia no algodoeiro, sigatoka negra e sigatoka amarela na bananeira, pinta preta em batata, dentre outras culturas.

O Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas FRAC 2020 afirma que existe um risco médio de resistência de fungos ao fungicida difenoconazol e a outros DMI's. É relatado que vários mecanismos de resistência são conhecidos, incluindo mutações no

gene alvo cyp51. Também é prudente aceitar que a resistência cruzada entre fungicidas DMI's está presente contra os mesmos fungos, não demonstra resistência cruzada a nenhuma outra classe dos SBC.

Resistência a fungicidas

Ambientalmente, sabemos que há uma competição acirrada de patógenos, por recursos disponibilizados por um determinado hospedeiro e em laboratório tenta-se simular essa competição, com o intuito de compreender as interações que ocorrem nas comunidades fúngicas (Shearer 1995; Young et al. 2018). Tais mecanismos competitivos podem refletir na história evolutiva das espécies, fazendo necessário uma compreensão adequada destas estratégias competitivas, para um melhor manejo do patógeno em estudo (Shearer 1995).

A competição é a chave da emergência de patógenos; dentro do hospedeiro, esse pode ser colonizado por diferentes genótipos de um mesmo patógeno, comum nos sistemas agrícolas. Logo, para que haja a disseminação de várias cepas, é preciso que estas, superem cepas pré-existentes, sendo assim capaz, de substituí-las rapidamente. Mediante esse contexto, o uso de fungicidas, exerce uma pressão de seleção, favorecendo o aparecimento de genótipos resistentes resultando em uma variação genética permanente, podendo ainda, resultar em uma resistência efetivamente total com uma única mutação ou uma mudança contínua, conforme as mutações se acumulam (Brent & Hollomon 2007).

O uso de fungicidas na agricultura, remontam de pelo menos 200 anos, com o intuito de proteger as culturas do ataque de fungos, e durante muito tempo, até os dias atuais, formulações a base de cobre e enxofre, são usadas de forma eficaz, sendo a calda

bordalesa, o primeiro fungicida descoberto pelo homem e marcou o início da aplicação de fungicidas em larga escala (Brent & Hollomon 2007).

A partir destes, novas moléculas foram introduzidas no mercado permanecendo por pelo menos três décadas, contudo, em meados da década de 60 -70, novas moléculas com atividade sistêmica e por consequência mais potentes, foram introduzidas na agricultura. Dentre essas, pode-se destacar, os benzimidazóis, dicarboximidas, bem como os inibidores da desmetilação de esteróis (DMIs), dentre outros. Contudo, os sistêmicos, apesar de altamente eficientes, sua alta seletividade, atrelada a atuação em sítios específicos favoreceu o aumento do surgimento de populações resistentes (Dong et al. 2022). A resistência a fungicidas é caracterizada por uma adaptação estável e herdável de um fungo a uma determinada dose de fungicida, resultando em perda da sensibilidade (Zambolim et al. 2007). Na província de Hainam, detectou-se isolados resistentes, bem como a resistência cruzada, entre piraclostrobina e azoxistrobina, para isolados de *Lasiodiplodia theobromae* em cultivos de manga (Dong et al. 2022), a resistência a benzimidazóis foi observada, por Al-Jabri et al. (2017), também em cultivos de manga, em Oman, com ênfase no tiofanato-metílico.

No Brasil, recentemente, detectou-se nos cultivos de mamão, populações resistentes de *L. theobromae* ao difenoconazol, e observou-se também, que essa população apresentou resistência cruzada entre o difenoconazol e ao propiconazol (Li et al. 2020), essa condição também foi observada por Wang et al. (2021), em seus trabalhos, onde difenoconazol apresentou resistência cruzada ao tebuconazol.

Os mecanismos envolvidos no surgimento dessa resistência ao difenoconazol, são bem caracterizados e em lavouras de manga na província de Hainam e está atrelada a mutações no gene *LtCYP51*, onde constatou-se a substituição de dois aminoácidos na proteína desse gene, sem alterar a região promotora enquanto nas lavouras de mamão no

nordeste brasileiro foi constatado uma superexpressão constitutiva do gene *LtCYP51* (Li et al. 2020; Wang et al. 2021; Dong et al. 2022)

Os termos que dizem respeito a resistência e sensibilidade ainda são confusos, apesar de que ambas, são faces da mesma moeda. Atualmente, a técnica mais precisa para identificar se indivíduos de uma população são sensíveis ou resistentes, é a CE₅₀, ou seja, a concentração de um determinado fungicida requerido para inibir o crescimento de 50% do nível alcançado em ausência deste. Para outros propósitos, também podem ser estimados a EC₁₀, EC₇₅ e EC₉₀. Por fim, os valores adquiridos com a CE₅₀, são aplicáveis a uma cepa e não a espécie como um todo.

Esses dados fornecem uma base importante para teste de fungicidas e são usados para avaliar o comportamento de uma população dentro de um patossistema, bem como para estudos que antecedem a introdução de um fungicida em novas regiões (Zambolim et al. 2007; Oliver & Hewitt 2014; Shao et al. 2015; Dong et al. 2022)

A resistência de fungos a fungicidas, pode ser caracterizada como resistência quantitativa, qualitativa, cruzada e múltipla (Zambolim et al., 2007). A resistência qualitativa, é baseada em mutações, podendo estas, serem induzidas por radiação, adquirindo importância em fungos de conídios não pigmentados dissipados pelo vento, como os oídios, de modo que se um gene que codifica uma proteína-alvo, sofre mutação mudando a sequência de aminoácidos necessário para a ligação da molécula de fungicida, não há a inibição desta proteína, tornando o controle químico ineficaz. Esta é conferida por um ou poucos genes resistentes de modo que esta pode ser suplantada de forma abrupta, mediante o uso de fungicidas de sítio específico no manejo de doenças em campo e quando há o aumento da dose recomendada, a população resistente não é afetada.

A resistência quantitativa, por sua vez, é caracterizada pela presença de um conjunto de genes, os quais, individualmente sofre mutação, logo, a suplantação da

resistência ocorre de maneira gradual, de populações sensíveis para resistentes e altamente resistentes. Isso pode ser explicado pelo fato dessas mutações serem aditivas, aumentando o fator de resistência e por consequência a diminuição da eficiência de moléculas ao longo do tempo. Ambas as resistências podem ocorrer em uma única espécie de fungo que responde a fungicidas com modos de ação distintos (Brent & Hollomon 2007; Deising et al. 2008; Shao et al. 2015; Vielba-Fernández et al. 2020; Lu et al. 2022).

Uma determinada população, pode ainda desenvolver um mecanismo denominado, resistência cruzada, ou seja, o indivíduo, apresentará resistência a dois ou mais fungicidas, com o mesmo mecanismo de ação e similaridade química, conferida pelo mesmo fator genético. Esta, envolve mutações pontuais no gene que codifica o alvo. Normalmente, esta é descrita como positiva quando a cepa resistente supera a cepa selvagem quando submetida a exposição a dois fungicidas e negativa quando as mutações no gene que codifica o sítio alvo, alteram a conformação física deste se ligando com mais força ao um dos fungicidas em relação ao outro, aumentando assim a sensibilidade a este.

Por fim, a resistência múltipla ocorre quando, há a presença de diferentes mecanismos de ação e, portanto, as mutações passam a ocorrer em locais não-alvos, promovidos entre outros mecanismos pela bomba de efluxo, que restringe a concentração intracelular do fungicida (Zambolim et al. 2007; Oliver & Hewitt 2014). De maneira geral, o desenvolvimento da resistência, é dependente do fator de resistência, ou seja, a frequência de isolados sensíveis em relação a de isolados resistentes podendo estes serem divididos em baixo (<5), moderado ($5-20$) e alto (>20) (Oliver & Hewitt 2014).

Fatores diversos podem contribuir para o desenvolvimento da resistência, dentre os quais se pode ressaltar: produto aplicado, modo de ação, intensidade de aplicações e características intrínsecas do organismo (Zambolim et al. 2007). As aplicações de

fungicidas podem manipuladas dentro de um programa de estratégias anti resistência, baseando-se no princípio de que, quanto mais aplicação de fungicidas, maior a pressão de seleção de indivíduos resistentes dentro de uma população (Ghini & Kimati 2002).

Portanto, quanto maior a população no momento da aplicação, há um risco maior de selecionar indivíduos resistentes e ainda nesse contexto, fungos com capacidade de produzir grande quantidade de esporos e que se reproduzem sexuadamente e assexuadamente, possui grande capacidade de desenvolver resistência e por consequência, aumentam sua capacidade de adaptabilidade exercendo assim uma pressão de seleção sobre a população sensível (Zambolim et al. 2007; Shao et al. 2015; Dong et al. 2022).

Portanto devido ao uso do difenoconazol em aplicações contínuas para o controle de doenças do cacau, e visto que ainda não há trabalhos desenvolvidos quanto a resistência de *Lasiodiplodia* spp. causando cancro em cacaueiro, tem-se o objetivo de conhecer a sensibilidade de *Lasiodiplodia* spp. ao difenoconazol, tendo em vista a importância da cultura para o país.

REFERÊNCIAS

- Abicab (2021) Balança Comercial - Chocolate Dados em US \$ Milhões FoB. 2021
- Adejori AA, Akinnagbe OM (2022) Assessment of farmers' utilization of approved pesticides in cocoa farms in Ondo state, Nigeria. *Heliyon* 8: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10678>
- Adriano Venturieri, Ana Laura Lima (2022) Venturieri. In: Estudo mostra expansão sustentável do cacau na Amazônia. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/71719295/study-shows-sustainable-cocoa-expansion-in-the-amazon-region>. Accessed 14 Aug 2024
- Adu-Acheampong R, Archer S, Leather S (2012) Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* & *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Exp Agric* 48:85–98. <https://doi.org/10.1017/S0014479711000883>
- Agrofit (2023) Consultas. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 2 Jul 2023
- Ali SS, Asman A, Shao J, et al (2020) Genome & transcriptome analysis of the latent pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, an emerging threat to the cacao industry. *Genome* 63:37–52. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0112>
- Al-Mahmooli IH, Al-Maqbaly YM, Al-Sadi AM, et al (2022) First report of dieback on fig caused by *lasiodiplodia theobromae* in north Al Batinah governorate of Oman.pdf
- Alvindia DG, Gallema FLM (2017) *Lasiodiplodia theobromae* causes vascular streak dieback (VSD)–like symptoms of cacao in Davao Region, Philippines. *Australas Plant Dis Notes* 12:10–13. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0279-9>
- Bateman R, Crozier J PESTICIDE USE IN COCOA Practical Manual-Fourth Edition, 2023
- Bhattacharjee R (2018) Achieving sustainable cultivation of cocoa Edited by Professor Pathmanathan Umaharan. Burleigh Dodds Science 1–18
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide Resistance in Plant Management: How can it be managed?
- Cardoso J, Maia C, Pessoa M (2002) Podridão No Caule Da Goiabeira No Ceará. *Fitopatol Bras* 27:320

- Cardoso JE, Bezerra MA, Viana FMP, et al (2009) Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. *Summa Phytopathol* 35:262–266. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052009000400002>
- Cavalcante RD, Lima WG, Martins RB, et al (2014) Thiophanate-methyl sensitivity & fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 140:251–259. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0459-9>
- Ceplac (2022) Novo foco de praga que atinge cultivo de cacau e cupuaçu é detectado no Amazonas. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/novo-foco-de-praga-que-atinge-cultivo-de-cacau-e-cupuacu-e-detectado-no-amazonas>
- Colli-Silva M, Richardson JE, Bossa-Castro AM, Pirani JR (2024) Phylogenetic evidence reshapes the taxonomy of Cacao & its allies (*Theobroma* & *Herrania*; Malvaceae, Byttnerioideae). *Brittonia* 76:53–61. <https://doi.org/10.1007/s12228-024-09783-1>
- Conab (2017) Cacau (Amêndoa). In: *Análise mensal*. https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-cacau/item/download/15208_ef2a525abb9f4609fce9d2ac861a8d01#:~:text=A%20colheita%20ocorre%20duas%20vezes,%C3%A9%20uma%20%C3%A1rvore%20extremamente%20generosa. Accessed 17 Aug 2024
- Correia MS, Costa JL da S (2005) Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. *Fitopatol Bras* 30:150–154. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582005000200008>
- Deising HB, Reimann S, Pascholati SF (2008) Mechanisms & significance of fungicide resistance. *Brazilian J Microbiol* 39:286–295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Dong G, Zhang Y, Liang X, et al (2022) Resistance characterization of the natural population & resistance mechanism to pyraclostrobin in *Lasiodiplodia theobromae*. *Pestic Biochem Physiol* 188:105232. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105232>
- Dorothee MN, François ME, Nourou KNA, et al (2019) Pathogenicity & in vitro control of *Lasiodiplodia theobromae* & *Fusarium* sp., pathogens associated with cocoa dieback in Cameroon. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 6:1–13. <https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2019.607.001>
- Duarte JLP, Vélez-Olmedo JB, Bomfim BSA, et al (2021) Fungos-cancro-abacate-2021.pdf

- Eng F, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E, Eng Sánchez F Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1
- Ferrão-Gonzales AD, Vital AVD, Lima JM, Rodrigues MBS (2013) Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. *Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente* 1:41–52. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2013v1n2p41-52>
- FRAC (2020) FRAC classification of fungicides. FRAC Poster ® 2019 1
- George & rade Sodré (2017) Cultivo do cacauzeiro no estado da Bahia, 1ª. Ilhéus, Ba
- Ghini R, Kimati H (2002) Resistência de fungos a fungicidas. *Embrapa Meio Ambiente* 1:78
- Golam Mortuza M, Ilag LL (1999) Potential for biocontrol of *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control* 15:235–240. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0716>
- Gramacho KP, Albuquerque P, Novais CB (2018) *Moniliophthora roreri* (Cif & Par.) (Agaricales: Marasmiaceae). Priorização de pragas quarentenárias ausentes no Brasil 259–273
- Gyamera EA, Domfeh O, Ameyaw GA (2023) Cacao Swollen Shoot Viruses in Ghana. *Plant Disease* 107:1261–1278. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-22-2412-FE>
- Halfeld-Vieira BA, Nechet K de L (2005) Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasioidiplodia theobromae* em Roraima. *Fitopatologia Brasileira* 30:203–203. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582005000200022>
- Huda-Shakirah AR, Nor NMIM, Zakaria L, et al (2022) LT as a causal pathogen of leaf blight stem canker and pod rot of T cacao in Malaysia.pdf. 8966
- Khanzada MA, Lodhi AM, Shahzad S (2005) Chemical control of *Lasioidiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pak J Bot* 37:1023–1030
- Li Y, Tsuji SS, Hu M, et al (2020) Characterization of difenoconazole resistance in *Lasioidiplodia theobromae* from papaya in Brazil. *Pest Manag Sci* 76:1344–1352. <https://doi.org/10.1002/ps.5645>
- Lu Q, Sa D, Wang Z, et al (2022) Differential Physiological Characteristics and Fungal Composition of Alfalfa under Salt Stress in Degraded Grasslands. *Agric* 12: <https://doi.org/10.3390/agriculture12101636>
- Marelli JP, Guest DI, Bailey BA, et al (2019) Chocolate under threat from old and new cacao diseases. *Phytopathology* 109:1331–1343

- Mbenoun M, Momo Zeutsa EH, Samuels G, et al (2008) Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathol* 57:381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01755.x>
- McMahon P, Purwantara A (2016) Vascular streak dieback (*ceratobasidium theobromae*): History and biology. In: *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, pp 307–335
- Ministry of Agriculture and Livestock (2023) *Brazilian Cocoa*. 1–75
- Morato LDD, González ASÁ, Cardona MBB (2023) Induction of systemic resistance in *Theobroma cacao* L. for the management of “witches’ broom” caused by *Moniliophthora perniciosa*. *Trop Plant Pathol* 48:463–468. <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00581-w>
- Moreira-Morrillo AA, Cedeño-Moreira Á V., Canchignia-Martínez F, Garcés-Fiallos FR (2021) *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria* 12:653–662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, et al (2002) Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity (Edinb)* 89:380–386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Musdalifa, Asman A, Rosmana A (2021) The response of different fungicides against *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing dieback disease of cocoa through in vitro test. *IOP Conf Ser Earth Environ Science* 807:. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022091>
- Nurlaila N, Rosmana A, Dewi VS (2020) The capability of *Trichoderma asperellum* in suppressing vascular streak diseases on five different cocoa clones. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 486: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/486/1/012158>
- Okey EN, Akwaji PI, Umana EJ, Omini JU (2015) Phytochemical screening and control of fungal diseases of cocoa (*Theobromae cacao* L .) pod using extracts of plant origin. 1:20–27
- Oliver RP, Hewitt HG (2014) *Fungicides in crop protection*. School of Plant Sciences, University of Reading, UK
- Parawansa AK, Bryceson S, Vandermark E, et al (2022) Severity and changed symptoms of vascular streak dieback caused by *Ceratobasidium theobromae* in several cocoa

- (*Theobroma cacao*) clones in Sulawesi, Indonesia. *Trop Plant Pathol* 47:754–769.
<https://doi.org/10.1007/s40858-022-00526-9>
- Reyes CS (2012) Cultivo y producción del cacao. Lima, Peru
- Rosane De Santana¹ L, Peixoto H, Filho S, et al Diversidade genética da população do fungo *Lasioidiplodia theobromae* associada espécies e híbridos de citros
- Rusin C, Cavalcanti FR, de Lima PCG, et al (2020) Control of the fungi *lasioidiplodia theobromae*, the causal agent of dieback, in cv. Syrah grapevines. *Acta Sci Agron* 43:1–9. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.44785>
- Santana AS De, Soares NS (2020) O cacau no brasil. 1–7
- S.B.Netto M, Assunção IP, Lima GSA, et al (2014) species of *lasioidiplodia* associated with papaya stem end rot in Brazil.pdf. 127–141
- Shao W, Ren W, Zhang Y, et al (2015) Baseline sensitivity of natural populations and characterization of resistant strains of *Botrytis cinerea* to fluazinam. *Australas Plant Pathol* 44:375–383. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0358-3>
- Shearer CA (1995) C.A. Shearer Fungal competition. *Can J Bot* 73:1259–1264
- Sousa Filho HR, de Jesus RM, Bezerra MA, et al (2021) History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches’ broom. *Plant Pathol* 70:1971–1978.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13457>
- Toala VA, Ventura RB, Huamán LA, et al (2019) Cultural, biological & chemical control of *Moniliophthora roreri* & *Phytophthora* spp in *Theobroma cacao* ‘CCN-51.’ *Scientia Agropecuaria* 10:511–520.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Vielba-Fernández A, Polonio Á, Ruiz-Jiménez L, et al (2020) Fungicide resistance in powdery mildew fungi. *Microorganisms* 8:1–34.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091431>
- Wang C, Xu L, Liang X, et al (2021) Molecular characterization and overexpression of the difenoconazole resistance gene CYP51 in *Lasioidiplodia theobromae* field isolates. *Sci Rep* 11:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03601-4>
- Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, et al (2017) Families, genera, and species of *Botryosphaerales*. *Fungal Biol* 121:322–346.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>
- Yang Y, Dong G, Wang M, et al (2021) Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasioidiplodia theobromae* from mango fields. *Crop Protection* 145:
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105611>

- Young GK, Cooke LR, Watson S, et al (2018) The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol* 67:1539–1551. <https://doi.org/10.1111/ppa.12856>
- Zambolim L, Venâncio WS, Oliveira SHF de (2007) Manejo da resistência de fungos a fungicidas. Viçosa, Minas Gerais
- Zhang J (2014) *Lasioidiplodia theobromae* in Citrus Fruit (Diplodia Stem-End Rot). In: *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier Inc., pp 309–335
- Zhang W, Yan J, Li X, et al (2019) Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasioidiplodia theobromae*. *Sci Rep* 9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41796-9>

1. INTRODUÇÃO

A cultura do cacau (*Theobroma cacao*) é responsável por movimentar bilhões de dólares na economia mundial. De acordo com a ICCO – International Cocoa Organization, os países africanos lideram a produção mundial de cacau, e sua produção corresponde a pelo menos 74% desta, seguido pelas Américas, Ásia e Oceania. O Brasil ocupa o sexto lugar na produção mundial, com uma produção de aproximadamente 270.000 toneladas de amêndoas.

A Bahia e o Pará são os principais estados produtores, e apesar do Pará apresentar uma área de cultivo menor, é responsável por 96% da produção regional. (Reyes, 2012; Abicab, 2021; International Cocoa Organization, 2022). No Equador, o cacau representa 9% do PIB agrícola e 1% do PIB total, ocupando o terceiro lugar em importância na cadeia produtiva, sendo o cultivo realizado principalmente por pequenos agricultores (Avadí *et al.*, 2021).

De maneira geral, a produção cacaueira é oriunda da agricultura familiar conduzida em sistemas agroflorestais ou ainda cabruca, tanto no Brasil quanto no Equador, onde são empregados tratamentos culturais aliados a resistência genética para controle das principais doenças (Acebo-Guerrero *et al.*, 2012; Reyes, 2012). No entanto, diferente do Equador, o Brasil, além de empregar todas as técnicas acima, promove o uso racional de fungicidas dentro dos programas de manejo (Cassano *et al.*, 2009; Fernandes Nogueira *et al.*, 2019; Acuña, 2020; Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2022).

A cultura do cacau é afetado por doenças altamente destrutivas, sendo uma das principais limitações para a cultura do cacau responsáveis por depreciar a qualidade de frutos e castanhas, em como causar morte de árvores resultando em grandes (Marelli *et al.* 2022). As mudanças climáticas, aliadas ao manejo incorreto têm favorecido a emergência de patógenos que antes não eram nocivos para a cultura, pois modificam suas

interações com o hospedeiro, como por exemplo *Lasiodiplodia* spp., que tem se tornado um problema fitossanitário importante para a cultura (Ali *et al.*, 2020), responsável principalmente pela morte descendente do cacaueiro.

Atualmente, as doenças estabelecidas que causam maiores perdas são vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e podridões de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.). Contudo, esse patossistema, engloba ainda doenças com focos isolados no Brasil como a monilíase (*Moniliophthora roreri*), viroses como a doença do broto inchado (*Cacao Swollen shoot vírus*) e patógenos nos quais a sua biologia não é completamente elucidada como *Ceratobasidium theobromae*, e mais recentemente, o patógeno emergente *Lasiodiplodia theobromae* causando a morte descendente do cacaueiro.

A morte descendente do cacaueiro, é uma doença que afeta os vasos condutores das plantas, causada pelo agente patogênico *Lasiodiplodia theobromae* pertencente ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeriaceae. É um patógeno emergente e de ampla importância para a cultura, (Alvindia e galema; moreira morrilo), em partes pela ampla gama de hospedeiros, com ~500 espécies de plantas documentadas afetadas distribuídos no trópico e sub-tropico, incluindo culturas agrônômicas importantes como uva, caju, goiaba, citrus dentre outros (yang *et al.*, 2017). Em cacau (*Theobroma cacao*). *L.theobromae*, é o agente causal da morte descendente. Este patógeno sobrevive em restos de cultura e é disseminado, por equipamentos contaminados, ventos, chuvas e insetos.

O fungo pode colonizar tecidos sãos sem que estes exibam sintomas, comportando-se como um endófito. Quando o hospedeiro passa por um período de estresse, esses sintomas são exibidos em diversas partes da planta, incluindo ramos jovens, sem afetar os demais, folhas, troncos e frutos. *Lasiodiplodia* spp. afeta os vasos condutores, interrompendo o transporte de água, o que por sua vez ocasiona em murcha das folhas,

levando-as à clorose e queima e ocasionalmente a morte do ramo ou da planta caracterizando como uma doença limitante para países produtores como o Camarões (Mbenoun et al., 2008; Dorothee *et al.*, 2019; Moreira-Morrillo ., 2021).

O controle deste patógeno dentro do patossistema é complexo, devido a sua ampla gama de hospedeiro e sua capacidade de sobreviver em tecidos afetados em decomposição. Atualmente, o emprego de métodos diversos tem contribuído para o sucesso no controle desse patógeno, os quais vale destacar: controle genético, controle físico, controle cultural, controle biológico e controle químico (Moreira-Morrillo ., 2021). No entanto, para a cultura do cacau, não há registro de produtos químicos para o controle desta doença, no Brasil (Agrofit,2024), contudo, em muitos casos observa-se que o controle de outras doenças , resulta na seleção direcionada de indivíduos resistentes.

Os fungicidas são utilizados com o intuito de proteger as plantas contra fungos. Após a segunda guerra mundial houve um aumento exponencial do uso dessas moléculas químicas (Ghini & Kimati 2002; Russell 2005; Brent & Hollomon 2007). No Brasil, durante muito tempo, o uso de DMI's, foi amplamente preconizado para o controle das doenças mais importantes do cacau (Oliveira & Luz, 2005), devido ao risco médio de desenvolvimento de resistência (FRAC, 2020), e também ao seu modo de ação específico e amplo espectro antifúngico (Yang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Neste contexto, os inibidores de desmetilação (DMIs) foram introduzidos principalmente como reguladores de crescimento de plantas, fungicidas na agricultura e na medicina (Johansen *et al.*, 2007). Seu alvo é a enzima 14 α -desmetilase (CYP51) na via biossintética do ergosterol de agentes fúngicos de plantas e humanos (Price *et al.*, 2015). Com a instalação de importantes doenças para a cultura do cacaueiro, como a monilíase e a vassoura-de-bruxa, o uso de moléculas pertencentes a esse grupo, faz-se presente até os dias atuais (Agrofit, 2023). Contudo apesar dos DMIs serem usados

frequentemente na cultura do cacau, há falta de informação no que diz respeito a resistência de *Lasiodiplodia* spp. Todavia em outras culturas como manga e mamão estas são bem caracterizadas.

Um dos fatores mais importantes que influenciam a evolução da resistência é a aptidão e seus custos para o indivíduo (Pringle & Taylor, 2002; Li *et al.*, 2020; Dorigan *et al.*, 2023). Esta pode ser caracterizada como a sobrevivência e o sucesso reprodutivo em que um indivíduo ou grupo de indivíduos com uma característica específica de resistência a fungicidas, consiga expressar sua contribuição para a próxima geração (Dorigan *et al.*, 2023).

A resistência a fungicidas pode interferir nos componentes adaptativos, resultando em alterações importantes em processos fisiológicos e bioquímicos, o que implica em sua maioria na diminuição da capacidade de competição de isolados resistentes em relação a sensíveis (Mikaberidze & McDonald, 2015; Wang *et al.*, 2021a). Essa perda de fitness pode ser atribuída a diversos fatores, como: restrições funcionais, como por exemplo mutações na codificadora de um gene envolvido na ligação ao fungicida; custos de alocação de recursos, estresse ambiental, interações epistáticas e também alterações em vias metabólicas.

Tais penalidades adaptativas podem impactar a persistência ou declínio da resistência quando submetidos a diversos tratamentos, podendo reduzir a vantagem seletiva global da resistência sob tratamento com fungicida, retardando o aparecimento de indivíduos resistentes ou ainda implicar na reversão na evolução da resistência.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo detectar a sensibilidade de isolados de *Lasiodiplodia* sp. associados à morte descendente do cacaueiro no Brasil e no Equador, por serem países importantes na produção cacaueira, ao difenoconazol, e avaliar os

componentes de adaptabilidade entre isolados sensíveis e não sensíveis ao referido princípio ativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e isolamento

Os isolados de *Lasiodiplodia* sp. usados neste estudo foram isolados de lavouras de cacau sintomáticas, situadas no Brasil e no Equador (Tabela 1). O isolamento foi feito a partir de frutos e caules exibindo sintomas. Fragmentos de aproximadamente 5mm x 5mm foram retirados das partes sintomáticas e posteriormente foi feito a desinfestação em solução de hipoclorito a 1% e álcool 70% por 60 segundos cada (Alfenas & Mafia 2016).

Posteriormente, esses fragmentos foram lavados em água estéril e secos em papel Germitest previamente autoclavado. Os fragmentos foram depositados em meio de cultura BDA e após seu crescimento foi realizada a caracterização morfológica com culturas fúngicas de 7 dias de idade cultivadas em meio PDA incubado a 28°C sob condições escuras foram examinadas características como cor da colônia, pigmentação, textura e crescimento foram observadas. Também foi feito a caracterização molecular destes isolados.

2.2.Extração de DNA

Os isolados de *Lasiodiplodia* spp, foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA. O crescimento micelial foi coletado com palito estéril e depositado em tubos de 1,5 ml contendo 50 µL de tampão Tris-EDTA (TE), quatro esferas de metal (2,8 mm) e 600 µL de solução de lise de núcleos. A extração de DNA total foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico Wizard (Promega R[©]), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1% corado com

GelRed e visualizado sob a luz UV. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C para uso posterior (Decloquement et al., 2021).

2.3.Realização de PCR

A Pcr (polymerase reaction chain) foi realizada utilizando as regiões ITS/ITS 1 e ITS 4 (internal transcribed spacer), *tub2* (β -tubulina) /Bt2a e Bt2b e *tef1- α* /EF1Fbot e EF2Rbot(elongation translation factor 1-alpha) e após foram sequenciadas foram depositadas no Genbank NCBI(National Center for Biotechnology Information). A análise filogenética foi realizada usando análises bayesianas de sequências concatenadas. Após alinhar as sequencias concatenadas no MUSCLE obteve-se os melhores modelos de substituição de nucleotídeo com auxílio do MrModeltest (K80 + I + G para rDNA-ITS, o GTR + G para β -TUB e o HKY + I + G para TEF- α) para cada sequência. MrBayes V3.2.1 implementado no CIPRES portal, foi usado para a construção das árvores e estas foram visualizadas através do FigTree v1.4 (Vélez-Zambrano et al., 2023)

Tabela 1.Código CCUB, hospedeiro e local de coletados isolados de *Lasiodiplodia* spp. usados no experimento de sensibilidade in vitro e na avaliação de componentes adaptativos.

CCUB	PAIS	GÊNERO	HOSPEDEIRO	LOCAL DE COLETA
4925	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
4926	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
4927	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
764	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
765	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
766	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
767	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
768	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
772	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
773	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
774	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
775	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
858	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
928	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
929	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
930	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
931	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
932	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
933	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
983	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
984	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
985	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1232	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia

1244	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1252	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1456	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1528	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1529	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1530	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
1554	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
2052	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2053	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2054	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2056	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2057	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2058	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2061	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2062	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Lembrance, Barro Preto, Bahia
2104	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2106	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2107	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2110	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2112	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2113	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2114	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2115	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2116	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2117	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2119	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2121	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2126	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Fazenda Sucupira, Bahia
2175	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia

3100	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
3106	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
3107	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Bahia
2637	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2638	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2638	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2639	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2643	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2645	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2649	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2653	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2654	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2655	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2657	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2658	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2659	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
2925	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2926	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2929	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2933	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2935	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2940	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2944	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2945	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2947	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2948	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2952	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2956	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2958	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Los Ríos

2959	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
2960	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Equador
2962	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Los Ríos
2963	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Los Ríos
2983	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Santo Domingo de los Tsáchilas
2984	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Santo Domingo de los Tsáchilas
2985	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Santo Domingo de los Tsáchilas
2986	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Santo Domingo de los Tsáchilas
2993	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Equador
2996	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3000	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Guayas
3002	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Equador
3020	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3033	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3034	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3038	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3040	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3041	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3046	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3052	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3054	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3056	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3083	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3084	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3087	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Guayas
3088	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3091	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas
3092	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí
3112	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Manabí

3115	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Morona Santiago
3119	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Esmeraldas

2.4. Sensibilidade *in vitro* de *Lasiodiplodia* spp. ao difenoconazol

O princípio ativo difenoconazol (Score EC, 250 g l⁻¹ a.i., Syngenta, São Paulo, Brazil) foi utilizado para o teste de sensibilidade *in vitro*. Os isolados foram cultivados em meio Batata Dextrose e Ágar (Kasvi®), contendo diferentes concentrações do i.a, obtidas a partir de uma solução estoque de 100 g/l. Cada isolado foi cultivado em cinco concentrações: 0 (testemunha, sem adição de fungicida); 0,016; 0,08; 0,4; 2 e 10 µg/ml. Os discos miceliais foram removidos das margens de colônias com 5 dias de idade e transferidas para o centro das placas de BDA corrigidas com as diversas concentrações de fungicida. Placas de Petri contendo BDA puro sem fungicida foram utilizadas como controle. Três réplicas de cada isolado foram usadas para testar a concentração e controle do fungicida.

As placas foram acondicionadas a 30 °C no escuro e após um período de 36 horas, o diâmetro de cada colônia foi mensurado em duas direções perpendiculares (Figura1).

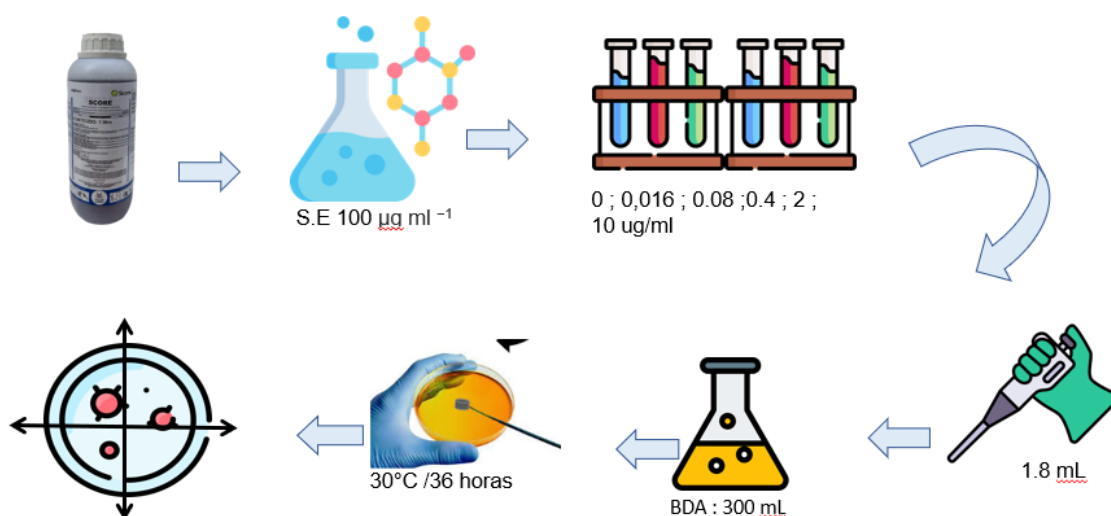


Figura 5: Etapas de montagem do teste de sensibilidade de *Lasiodiplodia* spp. ao difenoconazol (Elaborado pela autora Joselene Viana da Silva, em setembro 2024)

A porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao controle foi calculada para todas as concentrações de fungicida pela fórmula: $PIC = (C - F) / 100 * C$, onde F corresponde ao crescimento fúngico na presença do fungicida e C o crescimento do fungo nas placas em ausência do fungicida. A concentração efetiva de fungicida ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) para inibir 50% do crescimento micelial (CE_{50}) foi calculada individualmente para cada isolado por regressões lineares das inibições do crescimento micelial versus a transformação $\log_{10}$ das concentrações de fungicida (Vieira et al. 2017). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

2.5. Análises de componentes de aptidão

Foram determinados os seguintes componentes de aptidão para isolados não sensíveis de *Lasiodiplodia* spp.: taxa de crescimento micelial, sensibilidade osmótica e virulência. Todos os testes de aptidão foram feitos com três repetições (Cavalcante et al., 2014).

2.6. Teste de virulência

Onze isolados provenientes do Brasil e Equador foram escolhidos aleatoriamente (CCUB 930, CCUB 933, CCUB 2631, CCUB 3106, CCUB 3046, CCUB 2925, CCUB 2052, CCUB 2058, CCUB 2944, CCUB 2948, CCUB 2929), com CE₅₀ inferior e superior a 1 g/l para testar os componentes de aptidão: virulência, sensibilidade osmótica e taxa de crescimento micelial (Cavalcante et al. 2014; Vieira et al. 2017), conforme a Tabela 2. Os testes foram conduzidos em caules destacados. Foram usados 36 caules saudáveis para inocular os 11 isolados. As hastes destacadas de cacaueiro foram previamente esterilizadas e foi feito um pequeno ferimento no qual foi removido um pequeno pedaço da casca com auxílio de um bisturi estéril. Para cada teste de patogenicidade foram usadas três hastes feridas para inocular cada isolado fúngico. O controle foi tratado com um disco de BDA puro.

Tabela 2. Código CCUB dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. usados para os testes de aptidão

Sensíveis < 1 ug ml		Não sensíveis > 1 ug ml	
Brasil	Equador	Brasil	Equador
933	2631	2052	2929
930	2925	2058	2944
3106	3046		2948

Com auxílio de um bisturi os discos do tratamento e do controle foram colocados nas superfícies com ferimentos, com o micélio posicionado em direção ao câmbio. A umidade dos tampões de micélio foi mantida, envolvendo-os com algodão estéril e selando com

parafilme. Para conservar a umidade das hastes, estas foram dispostas em bandejas de plástico, devidamente umedecidas e posteriormente acondicionadas a 30°C, por 14 dias. O comprimento das lesões foi medido com auxílio de um paquímetro e estimou-se o comprimento da lesão. Os valores de comprimento foram expressos em mm (Adaptado de Huda-Shakirah et al., 2022).

2.7. Taxa de crescimento micelial

Para medir a taxa de crescimento micelial, os discos miceliais (5 mm) foram retirados das bordas das culturas de 5 dias de cada isolado selecionado e transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA livre de fungicida. As placas foram incubadas no escuro a 30°C. Foram utilizadas três repetições por isolado, e duas medições radiais foram feitas em duas direções perpendiculares, às 24 e 30 horas, resultando assim em duas medições por tratamento usadas para calcular a taxa de crescimento micelial (mm/dia) (Cavalcante et al., 2014; Vieira et al., 2017).

2.8. Sensibilidade osmótica

Discos miceliais (5mm) foram retirados das extremidades de colônias com 5 dias de idade de cada isolado. Em seguida, foram transferidos para o centro de uma placa com BDA corrigida com 1, 2, 4, 6 e 8% (p/v) de NaCl e incubados a 30° C no escuro por 36 horas. Após esse período as colônias foram medidas em duas direções perpendiculares e a porcentagem de inibição do crescimento micelial foi estimada em relação ao controle para todas as concentrações. A concentração que inibiu em 50% o crescimento fúngico (CE₅₀ N) foi estimada individualmente para cada isolado (Cavalcante et al., 2014; Vieira et al., 2017).

Devido à falta de referências na literatura, referentes a sensibilidade de *Lasiodiplodia* spp. na cultura do cacaueiro, o presente trabalho considerou que isolados com CE₅₀

inferiores a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ são sensíveis, enquanto os isolados que apresentaram CE_{50} superiores a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ foram considerados não-sensíveis.

Para cada variável dos componentes de aptidão analisados, as diferenças entre isolados sensíveis e não sensíveis ao difenoconazol, foram determinadas pelo teste t-Student ($p=5\%$). Os dados de média de CE_{50} foram comparados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas com o programa STATISTIX v.9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). O experimento foi repetido duas vezes.

3. RESULTADOS

Não se observou diferenças significativas entre os dois experimentos. Foi observada diferença significativa da CE_{50} , na população brasileira entre isolados sensíveis e não-sensíveis, no entanto, tal diferença foi significativa, para o IVCm - índice de velocidade de crescimento (mm/dia) e não significativa para o PIC – percentual de inibição de crescimento (mm). A população equatoriana por sua vez, apresentou diferença significativa para CE_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$), IVCm (mm/dia) e PIC (mm).

Tabela 3. Comparação da CE50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$), IVCm (mm/dia) e Pic (mm) entre isolados sensíveis e não-sensíveis de *Lasiodiplodia* spp. oriundos do Brasil e do Equador.

Brasil			
Fenótipo	CE50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	IVCM (mm/dia)	PIC (mm)
S	85,9	182,2	54,5 (± 0.87)
NS	160,1	198	41,3(± 3.03)
Valor p	0,00001	0,00001	0,3626
Equador			
Fenótipo	CE50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	IVCM (mm/dia)	PIC (mm)
S	169,1	183,4	58,4 (± 2.34)
NS	327,8	184,1	39,7(± 1.04)
Valor p	0,00001	0,00001	0,0002

¹Os dados de CE50 diferiram significativamente de acordo com o teste de Wilcoxon, assim como os dados de IVCm, cujos valores foram transformados em raiz quadrada ($\text{Rivcm} = \sqrt{\text{ivcm} + 0,5}$)

²Os dados de PIC (mm), da população brasileira, não diferiram significativamente, no entanto, foram significativos para a população equatoriana.

Não houve diferença nos parâmetros IVCm e PIC entre a população brasileira e equatoriana, conforme evidenciados na tabela abaixo.

Tabela 4. Comparação do IVCN e PIC entre as populações de *Lasiodiplodia* spp. oriundas do Brasil e Equador.

País	IVCM	PIC
Brasil	1,29(±0,02)	44,9 (±1,5)
Equador	1,24(±0,02)	45,9(±1,6)
Valor p	0,27	0,31

¹Os dados entre países não diferiram significativamente de acordo com o teste *t* Student ($p=0,05$). Os dados de IVCN foram transformados em raiz quadrada ($Xvar=\sqrt{Xvar+0.5}$)

Ao analisarmos a distribuição das médias referentes ao PIC, observamos que a população equatoriana apresentou um maior percentual de inibição em relação ao Brasil, com valores médios de 46%, no entanto, quando observamos o IVCN, as maiores médias de crescimento foram constatados na população brasileira (Figura 5).

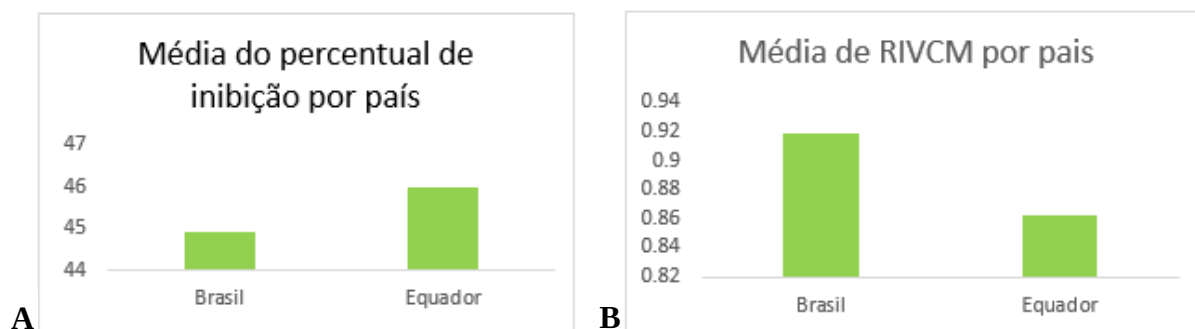


Figura 5. Distribuição das médias referentes ao PIC (**A**) e ao IVCN (**B**) de duas populações de *Lasiodiplodia* spp. do Brasil e do Equador.

Os isolados de *Lasiodiplodia* spp. apresentaram diferença na sensibilidade ao fungicida difenoconazol (Figura 1). Os valores de CE_{50} variaram de 0,016 a 4,36 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para a maioria dos isolados, com média de 0,41 $\mu\text{g ml}^{-1}$ sendo estes caracterizados como sensíveis (S). Dos 122 isolados, 108 (88,52%) foram classificados como sensíveis. Os 14 isolados restantes (11,47%) foram considerados não-sensíveis.

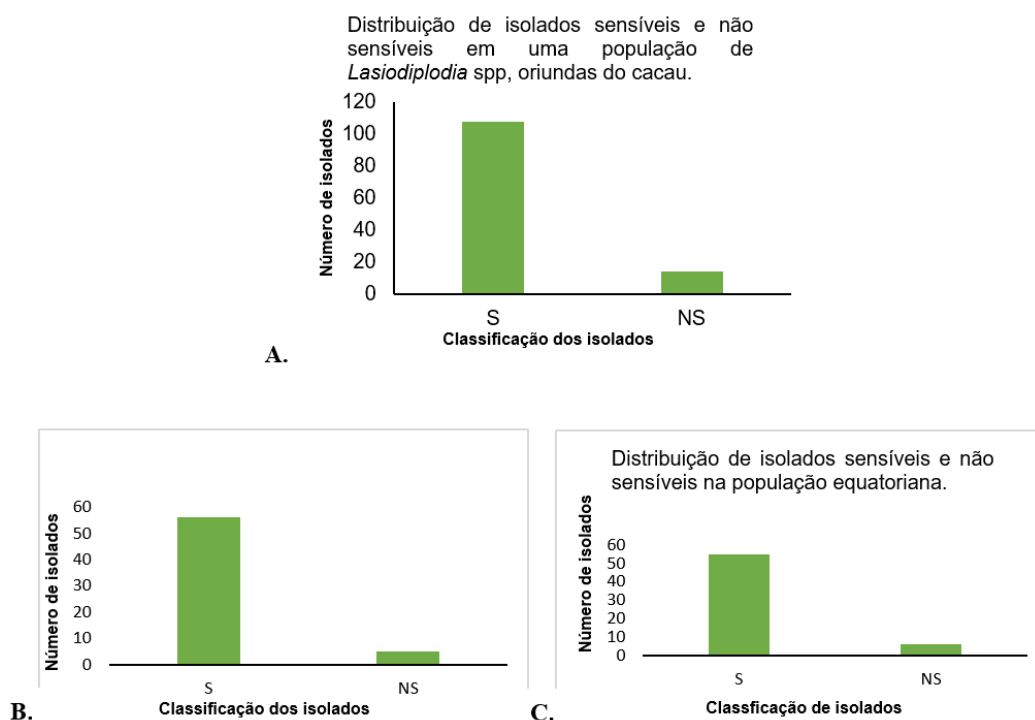


Figura 6. **A.** Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 122 isolados. S = sensível; NS = Não sensível. **B.** Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 61 isolados. S = sensível; NS = Não sensível da população brasileira. **C.** Distribuição da frequência de concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) efetivas de difenoconazol para inibir 50% do crescimento micelial (CE50) para 61 isolados. S = sensível; NS = Não sensível da população equatoriana.

3.1. Análise dos componentes de aptidão

Não foi observada diferença estatística significativa entre os isolados sensíveis e não sensíveis ao difenoconazol para virulência ($p=0.47$) e taxa de crescimento micelial ($p=0.2$) no entanto, foi significativo para a sensibilidade osmótica ($p=0,0015$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Comparação da taxa de crescimento micelial TCM, sensibilidade osmótica CE50 N e Virulência entre isolados sensíveis e não-sensíveis de *Lasiodiplodia* spp.

Fenótipo	TCM (mm/dia)	CE50 N (% NaCl)	Virulência (mm)
Sensível	6,1(±0,14)	1,84 (±0,10)	2,5 (±0,08)
Não sensível	6,39(±0,19)	1,61(±0,04)	2,73 (±0,12)
Valor p	0,2	0,0015	0,47

¹O fenótipo sensibilidade osmótica diferiu significativamente de acordo com o teste *t* Student (p=0,05). Os dados foram transformados em raiz quadrada ($Xvar = \sqrt{Xvar + 0.5}$).

Através da análise molecular detectou-se que havia diversas espécies associadas a morte descendente do cacaueiro no Brasil e no Equador, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Identificação molecular dos isolados de *Lasiodiplodia* spp. associadas ao cacauero

cDNA	CCUB	PAIS	GÊNERO	ESPÉCIE
*	4925	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
*	4926	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
*	4927	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
1386	764	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1437	765	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1384	766	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1385	767	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1438	768	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1440	772	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1441	773	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
1442	774	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1671	775	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1672	858	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	
*	928	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1127	929	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
2219	930	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1725	931	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1105	932	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1110	933	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1733	983	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
1734	984	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1735	985	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*

2112	1232	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2113	1244	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
2116	1252	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1112	1456	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
*	1528	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pontae</i>
1113	1529	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
1118	1530	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
1722	1554	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
2941	2052	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2942	2053	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2943	2054	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2945	2056	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
2946	2057	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2947	2058	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
2950	2061	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
2951	2062	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2954	2104	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
2956	2106	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
2957	2107	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2960	2110	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
2962	2112	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
2963	2113	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
2964	2114	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2965	2115	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
2967	2116	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>

2967	2117	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
2969	2119	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3028	2121	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
3033	2126	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3036	2175	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	*
4073	3100	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliense</i>
4079	3106	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4080	3107	BRASIL	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3503	2626	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3504	2627	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3506	2629	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3507	2630	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3508	2631	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3509	2632	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3510	2633	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3512	2635	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3513	2636	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3514	2637	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3515	2638	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3516	2639	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3520	2643	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
3522	2645	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3526	2649	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3530	2653	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3531	2654	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>

3531	2655	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3534	2657	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3535	2658	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3536	2659	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3840	2925	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3841	2926	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3844	2929	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3848	2933	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3850	2935	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3855	2940	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3859	2944	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3860	2945	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>laeliocattleya</i>
3862	2947	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3863	2948	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3867	2952	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3871	2956	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
3875	2958	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3876	2959	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3877	2960	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	*
3879	2962	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3880	2963	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3900	2983	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3901	2984	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3902	2985	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
3903	2986	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>

3996	2993	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	*
3999	2996	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4003	3000	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4005	3002	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	*
4023	3020	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4030	3033	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4031	3034	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4035	3038	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4037	3040	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4038	3041	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4043	3046	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4049	3052	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4051	3054	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4053	3056	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4056	3083	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4057	3084	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4060	3087	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>laeliocattleya</i>
4061	3088	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>brasiliensis</i>
4064	3091	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>pseudotheobromae</i>
4065	3092	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4108	3112	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4111	3115	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>
4115	3119	EQUADOR	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>

Ao observarmos a curva da CE_{50} de um modo geral (Figura 7, A), observamos que a maioria dos isolados exibem caráter sensível, de modo que a CE_{50} destes exibiram valores entre $0.01-1 \text{ ug ml}^{-1}$. Podemos constatar que houve onze isolados que apresentaram a característica de não sensibilidade ao difenoconazol com valores de modo que cinco isolados brasileiros apresentaram CE_{50} com valores entre $1.06-1,29 \text{ ug ml}^{-1}$ e na população equatoriana seis isolados apresentaram valores ente $1.03-4.67 \text{ ug ml}^{-1}$. De um modo isolado, observamos na figura 6 que na população equatoriana os valores de CE_{50} se aproximaram de valores próximos de 0 até valores próximos de 5 ug ml^{-1} de modo que a maioria das médias se concentraram em 0.10 ug ml^{-1} enquanto que a maioria das médias da população brasileira os valores CE_{50} ficaram próximos a 0.2 ug ml^{-1} (Figura 7, B).

Ao detalharmos os locais de coleta referentes aos isolados no Brasil, notamos uma distribuição suave em isolados oriundos da nos isolados da Bahia, cujas médias se concentraram bem próximas a 0.10 ug ml^{-1} , assim como a Fazenda Lembrance e a Fazenda Sucupira que por sua vez, tiveram também grupos de isolados cujo valor médio de CE_{50} se concentraram em 1 ug ml^{-1} .

Os isolados equatorianos, também apresentaram distribuição suave, com médias agrupadas nos valores de 0.4 e 1 ug ml^{-1} , no entanto , observa-se que o povoado de Guayas, todos os isolados, apresentaram valores inferiores a dose mínima testada de $0,016 \text{ ug ml}^{-1}$, as médias de CE_{50} de Esmeraldas, teve suas médias concentrada em 0.1 e 1.0 ug ml^{-1} , Manabí 0.4 ug ml^{-1} , Los Ríos concentrou suas médias em valores próximos de 0.08 ug ml^{-1} , Morona concentrou suas médias de CE_{50} , nos valores de $0.01;0.08$ e 0.8 ug ml^{-1} assim como São Domingos de los Tsáchilas com valores médios de $0.01;0.07$ e 0.7 (Figura 7,C)

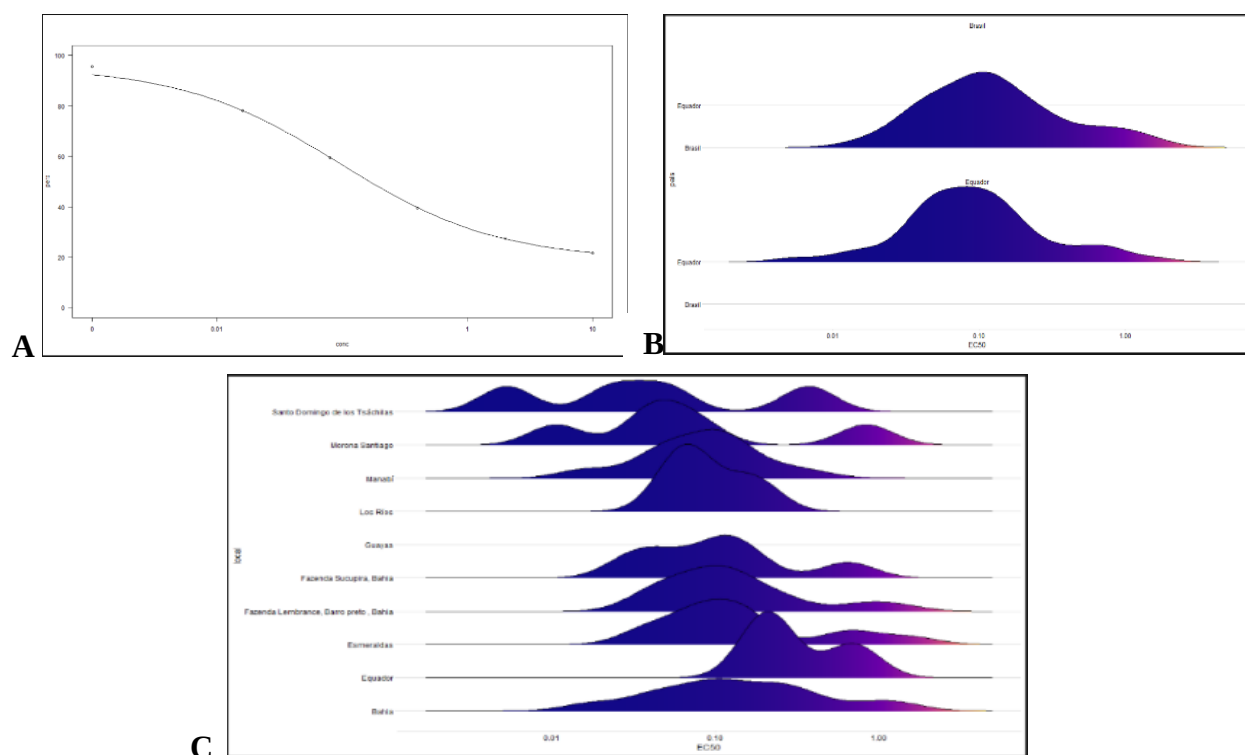


Figura 7. A. Curva da CE50 para isolados oriundos do Brasil e do Equador B. Distribuição de CE50 separadas por país C. Distribuição da CE50 por local de coleta de isolados de *Lasiodiplodia* spp. no Brasil e no Equador.

4. DISCUSSÃO

Embora o fungicida sistêmico difenoconazol não seja registrado no Brasil para o controle de *Lasiodiplodia theobromae* na cultura do cacau, este é indicado para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e de uma forma geral, os triazóis, durante muito tempo tem sido utilizado nos pomares de cacau com o intuito de controlar *M. pernicioso* (Agrofit, 2023). Além da ausência do registro do difenoconazol, no Brasil para o controle de *Lasiodiplodia theobromae* na cultura do cacau, também não há informações disponíveis sobre a sensibilidade de *L. theobromae* nessa cultura a esse princípio ativo.

O presente estudo incluiu a detecção de isolados de *Lasiodiplodia* sp. associados à morte descendente do cacaueiro no Brasil e no Equador, quanto à sensibilidade ao difenoconazol e

os componentes de adaptabilidade entre os isolados sensíveis e não sensíveis. Como resultado, este estudo destaca-se por apresentar o primeiro relato de detecção da sensibilidade de *L. theobromae* em cacauero e descreve a influência do difenoconazol nos componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e não-sensíveis. Essas informações contribuem para otimizar estratégias de controle eficazes em áreas de cultivo de cacau onde há ocorrência da presença do patógeno, permitindo uma visão da eficiência do difenoconazol para as populações de *Lasiodiplodia* spp. além de este estudo servir de base para futuros ensaios de monitoramento da evolução da sensibilidade no tempo.

Os resultados deste estudo demonstraram *in vitro* a eficiência de difenoconazol no controle de *L. theobromae* em cacauero, levando em consideração a alta frequência de isolados classificados como sensíveis (91,2%) a uma concentração de 10 µg ml⁻¹ quando comparados com a baixa frequência (9%) de isolados considerados não sensíveis (NS), no entanto, não se pode determinar com plena certeza se há surgimento de resistência, devido à ausência da caracterização molecular. Assim, tal dado permite uma interpretação limitada ao fato de que o *C. gloeosporioides* não se caracteriza como uma doença altamente importante para a cultura do cacau, logo, por consequência a intensidade das aplicações é baixo e pouco regular.

Todavia, cabe ressaltar que a resistência a fungicidas é incomum em áreas que não são submetidas frequentemente à aplicação de fungicidas, pois os alelos que conferem essa característica são ausentes ou raros. Na presença do fungicida estes alelos aumentam, dependendo da frequência e da força da seleção (Brent & Hollomon 2007). .

A resistência a fungicidas, no entanto, pode ter diversos mecanismos envolvidos na aquisição de resistência. A alteração da proteína alvo devido a mutações no gene codificador, confirmada para muitos fungicidas de sítio único , incluindo MBCs, azoles, QoIs e SDHIs (Lucas et al,2015), mutações genéticas que causam mudanças na conformação do sítio de ação (Fisher et al. 2018; Yin et al.,2023), superexpressão do gene alvo do fungicida , podendo levar

ao aumento da produção da proteína alvo (Wang et al., 2022; Yin et al.,2023), alteração do local alvo, impedindo que o fungicida se ligue ao local alvo e exerça seu efeito (Fisher et al.,2018; Pereira et al.,2020;Fisher et al.2022) efluxo ativo ou absorção reduzida de fungicida, podendo reduzir o acúmulo intracelular do fungicida (Fisher et al.,2018; Pereira et al.,2020;Fisher et al.2022) .

As análises dos dados permitiram também observar que houve diferença na CE50 entre os isolados de cada país, levando-nos assim a considerar que isolados oriundos do cacau apresentaram mais variação do que se supõe, o que é evidenciado pela diferença no índice de velocidade de crescimento entre as populações sensíveis e não sensíveis. Observou-se também em presença do difenoconazol, a capacidade de crescimento micelial foi reduzida, resultados similares foram observados para *Altenaria alternata* (Amrate et al. 2020), *Calonectria pseudonaviculata* (Maurer et al. 2017), *Microdochium nivale* (Tvaruzek et al. 2000) , *Corynespora cassicola* (Avozani et al. 2014) *Lasiodiplodia theobromae* (Rehman et al. 2015), *Cylindrocarpon destructan* (Shin et al.) ressaltando a eficiência do difenoconazol sobre diversos patógenos e corroborando com os dados evidenciados nesse trabalho para *Lasiodiplodia* spp. seja em termos de inibição de crescimento ou valores de CE₅₀.

Essa diferença de comportamento em relação aos parâmetros avaliados, podem estar relacionadas a características intrínsecas do fungo, bem como a sua relação com o ecossistema de origem. Estudos anteriores, os quais avaliaram a relação da microbiota do solo e a mudança de plantas acima da superfície constataram em uma superfície declivosa houve mudança na população fúngica, concluindo assim que a riqueza da comunidade fúngica está fortemente ligada com a produtividade de plantas acima da superfície (He et al. 2023). Outro fator que pode estar fortemente ligado a esse comportamento em meio de cultura é o tipo de cultivo em meio de cultura, pois cada fungo tem uma exigência específica de temperatura e umidade

relativa, conforme foi observado para *Rhizoctonia solani* e *Coniophora puteana* (De Ligne et al. 2019).

A resistência de *L. theobromae* ao difenoconazol já havia sido relatada em lavouras de manga e mamão, situadas na China e no Nordeste brasileiro, respectivamente (Li et al.; Wang et al. 2021). Ao analisar a sensibilidade de *Lasiodiplodia* spp. presente nessas lavouras, a elevada pressão seletiva foi constatada.

Demonstramos aqui que a maioria dos isolados de *Lasiodiplodia* spp são sensíveis ao difenoconazol e apenas 11 cresceram com $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, os quais foram considerados não sensíveis. Trabalhos anteriores desenvolvidos para determinar a CE_{50} de populações submetidas a aplicações de difenoconazol, obtiveram resultados similares aos descritos aqui para *Colletotrichum acutatum* (Baggio et al. 2018; Gama et al. 2020), *Pennicillium* spp. (Jurick et al. 2019) *Didymella bryoniae* (Thomas et al. 2012) e *Venturia inaequalis* (Villani et al. 2015). Mediante tais resultados, somos levados a supor que esses resultados se devem ao fato de ter usado espécies diversas de *Lasiodiplodia* spp. em nossos estudos, no entanto Thomas et al. (2012), usou uma única espécie de *Didymella bryoniae* limitando assim a variabilidade genética abundante entre isolados e obteve também valores de CE_{50} baixos que variaram de $0.008\text{-}0.094 \mu\text{g ml}^{-1}$, o que foi justificado pela recomendação recente do produto a época para o controle de gomose do caule da melancia na Georgia, logo havia ainda uma baixa pressão seletiva direcionada .

Portanto, a baixa frequência de isolados com sensibilidade reduzida ao difenoconazol na nossa população de estudo pode ter implicações no desenvolvimento da resistência ao difenoconazol. Assim, dentro de uma determinada população, os isolados com valores de CE_{50} acima da média da população, deverão ter uma maior probabilidade de sobreviver sob aplicações de difenoconazol, em comparação com os isolados mais sensíveis. Na presença do difenoconazol, a seleção dos isolados considerados não sensíveis poderia, em último caso, levar

à resistência ao longo do tempo. Assim, a escassez de isolados não sensíveis ao difenoconazol em nossa população tanto brasileira quanto equatoriana pode favorecer um início tardio de resistência ao difenoconazol.

Os estudos sobre a evolução da resistência ainda são considerados limitados. As interações planta-patógeno, enzima alvo ou ainda as vias metabólicas envolvidas têm sido mais estudadas (Dorigan et al. 2023). A resistência a fungicidas pode proporcionar vantagens adaptativas para isolados resistentes, como por exemplo aumento de virulência em relação a isolados selvagens (Hawkins & Fraaije 2018). Contudo, essas vantagens ao longo do tempo podem prejudicar essa população conforme constatou Karaoglanidis et al. (2001), onde isolados de *Cercospora beticola* resistentes a DMI's sofreram uma ligeira diminuição, mas de forma significativa durante uma epidemia em competição com a população sensível ao DMI, após 4 ciclos da doença. Portanto, é essencial investigar se esses benefícios adaptativos compensam os custos em ausência do fungicida. Resultados similares quanto a virulência foram observados também por Kong et al. (2023), em *Stagonosporopsis citrulli* associado a melancia e melão.

Para avaliar os componentes de adaptabilidade entre a coleção de *Lasiodiplodia* spp. onze isolados representativos foram selecionados com base em seus diferentes níveis de sensibilidade. Foi constatado que ao analisar os componentes de adaptabilidade houve diferença significativa entre isolados sensíveis e não sensíveis oriundos de lavouras de cacau, para sensibilidade osmótica, no qual os isolados sensíveis apresentaram valores superiores aos não sensíveis diferente dos resultados obtidos por Delmas et al. (2016). Nossos dados, podem refletir uma ausência parcial de custos, no entanto, pode resultar também de falhas na detecção destes custos de adaptabilidade nas condições experimentais utilizadas. Estes custos de adaptabilidade podem ser mensurados mediante um conjunto de condições ambientais propícias, as quais não foram consideradas neste trabalho.

Os estudos referente aos componentes adaptativos são de extrema importância para os fungos estando diretamente ligados à sua sobrevivência e sucesso reprodutivo em ambientes sob estresse, sendo ainda importantes para entender como a seleção natural opera nesses indivíduos (Pringle & Taylor 2002). Por fim, estes são uma ferramenta essencial para estudos acerca da resistência a fungicidas e a virulência em patógenos fúngicos (Pringle & Taylor 2002; Hawkins and & Fraaije 2018).

Diversos trabalhos, que avaliaram resistência aos DMI's constataram que patógenos com resistência previamente caracterizada: *Alternaria alternata* (Sun et al. 2021), *Botrytis cinerea* (Harper et al. 2022), *Villosiclava virens* (Wang et al. 2015) e *Zymoseptoria tritici* (Lendenmann et al. 2015), não sofreram custos adaptativos com a presença de mutações que lhe conferiam resistência, contrários aos resultados observados por Dorigan et al. 2022, que estudando *Pyricularia oryzae* constatou que cepas resistentes a QoIs apresentaram maior aptidão em comparação com cepas sensíveis, de modo que a produção *in vivo* de conídios em folhas de trigo e a maior severidade de doenças nas folhas foram detectadas quando as cepas resistentes predominaram nas misturas dos isolados.

Por sua vez, a sensibilidade osmótica como componente adaptativo, está relacionada diretamente a sobrevivência e adaptação a mudanças no ambiente osmótico, podendo esta ser influenciada por muitos fatores, incluindo a regulação do equilíbrio osmótico interno, capacidade de tolerância a variação na pressão osmótica e a resposta a condições de estresse osmótico. Esse componente vai afetar diretamente a capacidade de crescimento, reprodução e sobrevivência em ambientes diversos (Pringle & Taylor 2002).

Em seus trabalhos com *Neurospora crassa* Ochiai et al. (2001), constatou que fungos com alta resistência ao fludioxonil e com mutações que criavam códons de paradas ou frameshifts a montante do domínio catalítico Os1p eram moderadamente sensíveis ao estresse osmótico

em comparação ao segundo grupo com alterações de um único aminoácido no gene *os-1*, que eram resistentes a baixas doses, mas resistentes a altas doses e que, portanto, foram mais sensíveis ao estresse osmótico.

Gong et al. (2022) observaram em seus estudos de sensibilidade ao tebuconazol que tanto isolados sensíveis quanto resistentes tiveram o crescimento melhorado conforme aumentou-se a concentração de NaCl, no entanto em concentrações na faixa de 1,25-5 g/L, houve uma diminuição no crescimento de isolados sensíveis e aumento para isolados resistentes, seguido de uma diminuição para ambos quando a concentração foi superior a 40 g/l. Usman et al. 2022, observaram que isolados de *Colletotrichum nymphaeae*, apresentaram diferença significativa para a sensibilidade osmótica, corroborando com os dados deste trabalho.

Portanto, a compreensão da sensibilidade osmótica em fungos filamentosos é importante não apenas para a compreensão de aspectos biológicos destes organismos, mas também para aplicações práticas, como estratégias de controle de fungos patogênicos em ambientes com variações osmóticas.

Podemos concluir que ambos os grupos de fungos mantêm caráter virulento e capacidade de crescimento permitindo uma sobrevivência sem custos aparentes. Essas informações acerca dos componentes de adaptabilidade de isolados sensíveis e não sensíveis contribuem para facilitar os estudos evolutivos e são ferramentas úteis para desenvolver estratégias adequadas ao manejo de doenças (McDonald & Linde 2002; Pringle & Taylor 2002; Mikaberidze et al. 2017),.

Os isolados de *Lasiodiplodia* sp. não sensíveis ao difenoconazol foram coletados nas principais regiões produtora de cacau do Brasil e do Equador. Os resultados mostram uma alta sensibilidade dos isolados ao difenoconazol, no entanto, os isolados considerados não sensíveis não apresentaram custos adaptativos.

5. CONCLUSÃO

Não houve detecção de isolados com valores de CE50, que fossem considerados resistentes, de acordo com dados disponíveis na literatura.

Os isolados de ambos os países não tiveram custos adaptativos em relação a virulência e taxa de crescimento micelial.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, é necessário um monitoramento constante em regiões que começam se despontar como promissoras na produção cacaueira, assim como as regiões que já são reconhecidas como produtoras, quantificando o número de aplicações nessas áreas, para uma estimativa mais precisa e acompanhamento da sensibilidade no tempo, o que por sua vez, exigirá o desenvolvimento de ferramentas moleculares para resultados mais precisos como marcadores para o gene *LtCYP51* e também SNPs.

7. REFERÊNCIAS

- Abicab 2021 Balança Comercial - Chocolate Dados em US \$ Milhões FoB. 2021
- Acebo-Guerrero Y, Hernández-Rodriguez A, Heydrich-Pérez M, et al 2012 Management of black pod rot in cacao *Theobroma cacao* L.: A review. *Fruits* 67:41–48.
<https://doi.org/10.1051/fruits/2011065>
- Acuña C 2020 El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. *Estud la Gestión Rev Int Adm* 7:59–83.
<https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
- Agrofit 2023 Consultas. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 3 Jul 2023
- Alfenas AC, Mafia RG 2016 No Title, 2nd edn. Viçosa, Minas Gerais
- Alvindia DG, Gallema FLM 2017 Lasiodiplodia theobromae causes vascular streak dieback VSD-like symptoms of cacao in Davao Region, Philippines. *Australas Plant Dis Notes* 12:10–13. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0279-9>
- Amrate PK, Nehru J, Vishwavidyalaya K 2020 In vitro evaluation of fungicides , plant extracts & oils against *Alternaria alternata* Fr . keissler causing leaf spot of *Aloe barbadensis* Miller IN VITRO EVALUATION OF FUNGICIDES , PLANT EXTRACTS & OILS AGAINST *ALTERNARIA ALTERNATA* FR . KEI
- Avadí A, Blockeel J, Temple L, Salgado V 2021 Análisis de la cadena de valor del cacao en Ecuador. 171
- Avozani A, Reis EM, Tonin RB 2014 Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola* , isolated from soybean , to the fungicide carbendazim. 273–276
- Baggio JS, Wang NY, Peres NA, Amorim L 2018 Baseline sensitivity of *Colletotrichum*

- acutatum isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, & thiophanate-methyl. *Trop Plant Pathol* 43:533–542. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0232-2>
- Brent KJ, Hollomon DW 2007 Fungicide Resistance in Plant Management: How can it be managed?
- Cardoso JE, Bezerra MA, Viana FMP, et al 2009a Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Genet Resour Crop Evol* 35:18937–18940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01755.x>
- Cardoso JE, Bezerra MA, Viana FMP, et al 2009b Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. *Summa Phytopathol* 35:262–266. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052009000400002>
- Cassano CR, Schroth G, Faria D, et al 2009 Landscape & farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of southern Bahia, Brazil. *Biodivers Conserv* 18:577–603. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9526-x>
- Cavalcante RD, Lima WG, Martins RB, et al 2014 Thiophanate-methyl sensitivity & fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 140:251–259. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0459-9>
- Pereira et al 2020 The genetic architecture of emerging fungicide resistance in populations of a global wheat pathogen. *Genome Bio.Evol* 12(12): 2232- 2244
- Decloquement J et al. 2021. *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A new species causing black pod disease on cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*: 12
- De Ligne L, Vidal-Diez de Ulzurrun G, Baetens JM, et al 2019 Analysis of spatio-temporal fungal growth dynamics under different environmental conditions. *IMA Fungus* 10:1–13. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0009-3>
- Delmas CEL, Dussert Y, Delière L, et al 2016 Soft selective sweeps in fungicide resistance

- adaptation: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. *Mol Ecol* 26:1936–1951. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Dorigan AF, Moreira SI, Ceresini PC, et al 2022 Higher fitness & competitive advantage of *Pyricularia oryzae* Triticum lineage resistant to QoI fungicides. *Pest Manag Sci* 78:5251–5258. <https://doi.org/10.1002/ps.7144>
- Dorigan AF, Moreira SI, da Silva Costa Guimarães S, et al 2023 Target & non-target site mechanisms of fungicide resistance & their implications for the management of crop pathogens. *Pest Manag Sci*. <https://doi.org/10.1002/ps.7726>
- Dorothée MN, François ME, Nourou KNA, et al 2019 Pathogenicity & in vitro control of *Lasiodiplodia theobromae* & *Fusarium* sp., pathogens associated with cocoa dieback in Cameroon. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 6:1–13. <https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2019.607.001>
- Fern&es Nogueira R, Roitman I, Alvim Carvalho F, et al 2019 Challenges for agroecological & organic management of Cabruca cocoa agroecosystems in three rural settlements in south Bahia, Brazil: perceptions from local actors. *Agrofor Syst* 93:1961–1972. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0303-x>
- Fisher MC et al. 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health & food security. *Science* 360, 739–742.
- Fisher MC et al. 2022. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology* 20, 557–571.
- FRAC 2020 FRAC classification of fungicides. FRAC Poster ® 2019 1
- Gama AB, Baggio JS, Rebello CS, et al 2020 Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* Isolates from Citrus to Carbendazim, Difenoconazole, Tebuconazole, & Trifloxystrobin. *Plant Dis* 104:1621–1628. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2195-RE>
- Gebhardt C 2001 Disease Resistance in the Potato Genome. 79–102

- Ghini R, Kimati H 2002 Resistência de fungos a fungicidas. Embrapa Meio Ambient 1:78
- Gong C, Liu M, Liu D, et al 2022 Status of Fungicide Resistance & Physiological Characterization of Tebuconazole Resistance in *Rhizocotonia solani* in Sichuan Province, China. *Curr Issues Mol Biol* 44:4859–4876.
<https://doi.org/10.3390/cimb44100330>
- Harper LA, Paton S, Hall B, et al 2022 Fungicide resistance characterized across seven modes of action in *Botrytis cinerea* isolated from Australian vineyards. *Pest Manag Sci* 78:1326–1340. <https://doi.org/10.1002/ps.6749>
- Hawkins NJ, Fraaije BA 2018 Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. *Annu Rev Phytopathol* 56:339–360. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050012>
- He L, Ma S, Zhu B, Ji C 2023 Soil Bacteria & Soil Fungi Respond Differently to the Changes in Aboveground Plants along Slope Aspect in a Subalpine Coniferous Forest. *Forests* 14:. <https://doi.org/10.3390/f14071389>
- Huda-Shakirah AR, Mohamed Nor NMI, Zakaria L, et al 2022a *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, & pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Sci Rep* 12:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>
- Huda-Shakirah AR, Nor NMIM, Zakaria L, et al 2022b LT as a causal pathogen of leaf blight stem canker & pod rot of T cacao in Malaysia.pdf. 8966
- International Cocoa Organization 2022 Production of cocoa beans
- Johansen NS, Moen LH, Egaas E 2007 Sterol demethylation inhibitor fungicides as disruptors of insect development & inducers of glutathione S-transferase activities in *Mamestra brassicae*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 145:473–483.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.004>
- Jurick WM, Macarisin O, Gaskins VL, et al 2019 Baseline sensitivity of penicillium spp. To difenoconazole. *Plant Dis* 103:331–337. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0860-RE>

- Kannan C, Karthik M, Priya K 2010 *Lasiodiplodia theobromae* causes a damaging dieback of cocoa in India . Plant Pathol 59:410–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02192.x>
- Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC, Ioannidis PM 2001 Fitness of *Cercospora beticola* field isolates - Resistant & - Sensitive to demethylation inhibitor fungicides. Eur J Plant Pathol 107:337–347. <https://doi.org/10.1023/A:1011219514343>
- Kong Z, Zhang Y, Zhuang C, et al 2023 Detection & characterization of difenoconazole resistance in *Stagonosporopsis citrulli* from watermelon & muskmelon in Zhejiang Province of China. Phytopathol Res 5:1–11. <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00156-8>
- Lendenmann MH, Croll D, McDonald BA 2015 QTL mapping of fungicide sensitivity reveals novel genes & pleiotropy with melanization in the pathogen *Zymoseptoria tritici*. Fungal Genet Biol 80:53–67. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.05.001>
- Li Y, Tsuji SS, Hu M, et al 2020 Characterization of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya in Brazil. Pest Manag Sci 76:1344–1352. <https://doi.org/10.1002/ps.5645>
- Li Y, Tsuji SS, Hu M, et al Characterization of difeconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya in Brazil
- Lucas JA et al. 2015. The evolution of fungicide resistance In: Advances in Applied Microbiology, vol. 90. ISSN 0065-2164 <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Maurer K, Cowles RS, Lamondia JA 2017 Sensitivity of *Calonectria pseudonaviculata* , the Pathogen of Boxwood Blight , to Strobilurin & Demethylation Inhibitor Fungicides in Connecticut 1
- Mbenoun M, Momo Zeutsa EH, Samuels G, et al 2008 Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. Plant Pathol 57:381.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01755.x>

McDonald BA, Linde C 2002 The population genetics of plant pathogens & breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163–180.

<https://doi.org/10.1023/A:1015678432355>

McQUILKEN MP, SUPRIADI, RUDGARD SA 1988 Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazole fungicides in vitro & their effect on development of the fungus in cocoa.

Plant Pathol 37:499–506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02107.x>

Mikaberidze A, McDonald BA 2015 Fungicide Resistance in Plant Pathogens. *Fungic Resist Plant Pathog*. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8>

Mikaberidze A, Paveley N, Bonhoeffer S, Van Den Bosch F 2017 Emergence of resistance to fungicides: The role of fungicide dose. *Phytopathology* 107:545–560

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2022 Ceplac e Senar-BA testam novos fungicidas contra a vassoura de bruxa do cacaueteiro

Moreira-Morrillo AA, Cedeño-Moreira Á V., Canchignia-Martínez F, Garcés-Fiallos FR 2021 *Lasiodyplodia theobromae* Pat. Griffon & Maubl [syn. *Botryodyplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, & strategies management. *Sci Agropecu* 12:653–662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>

Musdalifa, Asman A, Rosmana A 2021 The response of different fungicides against *Lasiodyplodia pseudotheobromae* causing dieback disease of cocoa through in vitro test. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 807:. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022091>

Ochiai N, Fujimura M, Motoyama T, et al 2001 Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance & osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci* 57:437–442. <https://doi.org/10.1002/ps.302>

Oliveira ML de, Luz EDMN 2005 Identificação e manejo das principais doenças do

- cacaueiro no Brasil. Ilhéus, Ba
- Papacostas LJ, Henderson A, Choong K, Sowden D 2015 An unusual skin lesion caused by *Lasioidiplodia theobromae*. *Med Mycol Case Rep* 8:44–46.
<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.03.002>
- Price CL, Parker JE, Warrilow AG, et al 2015 Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci* 71:1054–1058.
<https://doi.org/10.1002/ps.4029>
- Pringle A, Taylor JW 2002 The fitness of filamentous fungi. *Trends Microbiol* 10:474–481.
<https://doi.org/10.1016/S0966-842X0202447-2>
- Rehman A ur, Umar U ud din, Naqvi SAH, et al 2015 *Lasioidiplodia*-fungicide-2020.pdf. 241–249
- Reyes CS 2012 Cultivo y producción del cacao. Lima, Peru
- Russell PE 2005 A century of fungicide evolution. *J Agric Sci* 143:11–25.
<https://doi.org/10.1017/S0021859605004971>
- Shin J, Fu T, Park KH, Kim KS Mycobiology The Effect of Fungicides on Mycelial Growth & Conidial Germination of the Ginseng Root Rot Fungus , *Cylindrocarpon destructans*. 220–225
- Sun C, Li F, Wei M, et al 2021 Detection & biological characteristics of *alternaria alternata* resistant to difenoconazole from *paris polyphylla* var. *chinensis*, an indigenous medical herb. *Plant Dis* 105:1546–1554. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2699-RE>
- Thomas A, Langston DB, Stevenson KL 2012 Baseline sensitivity & cross-resistance to succinate-dehydrogenase-inhibiting & demethylation-inhibiting fungicides in *didymella bryoniae*. *Plant Dis* 96:979–984. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0744-RE>
- Tvaruzek L, Kraus P, Hrabalova H 2000 www_pps-200001-0002.pdf. 7–10
- Usman HM, Tan Q, Fan F, et al 2022 Sensitivity of *Colletotrichum nymphaeae* to Six

- Fungicides & Characterization of Fludioxonil-Resistant Isolates in China. *Plant Dis* 106:165–173. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0993-RE>
- Vélez-Zambrano S M et al. 2023. Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing stem canker on Teak (*Tectona gr&is* L.) in Ecuador. *Forest Pathology*. DOI: 10.1111/efp.12830
- Vieira WA dos S, Lima WG, Nascimento ES, et al 2017 Thiophanate-methyl resistance & fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. *Plant Dis* 101:1659–1665. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1594-RE>
- Villani SM, Biggs AR, Cooley DR, et al 2015 Prevalence of myclobutanil resistance & difenoconazole insensitivity in populations of *venturia inaequalis*. *Plant Dis* 99:1526–1536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0002-RE>
- Wang C, Xu L, Liang X, et al 2021 Molecular characterization & overexpression of the difenoconazole resistance gene CYP51 in *Lasiodiplodia theobromae* field isolates. *Sci. Rep.* 11
- Wang F, Lin Y, Yin WX, et al 2015 The Y137H mutation of VvCYP51 gene confers the reduced sensitivity to tebuconazole in *Villosiclava virens*. *Sci Rep* 5:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep17575>
- Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, et al 2017 Families, genera, & species of Botryosphaerales. *Fungal Biol* 121:322–346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>
- Yang Y, Dong G, Wang M, et al 2021 Multifungicide resistance profiles & biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields. *Crop Prot* 145:. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105611>
- Yin et al 2023 Fungicide resistance: Progress in underst&ing mechanism, monitoring & management. *Phytopatology* 113:707-718 .

Zhang H, Song J, Zhang Z, et al 2021 Exposure to fungicide difenoconazole reduces the soil bacterial community diversity & the co-occurrence network complexity. J Hazard Mater 405:124208. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124208>