OCORRÊNCIA E ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE
Alternaria dauci (Kühn) Groves & Skolko **RESISTENTES**
AO FUNGICIDA IPRODIONE

MARIA ISABEL FANCELLI
Engenheira Agrônoma

Orientador : Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração : Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1987

A meus pais

Rubens e Elizabeth

por toda dedicação, apoio e incentivo,

MEU RECONHECIMENTO

A meus irmãos

Maria do Rosário

Antonio Luiz

Marilene

Maria Lucia

e aos amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, por sua orientação, apoio e estímulo durante todas as fases deste trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos valiosos ensinamentos.

À Agroceres, que gentilmente enviou amostras de sementes de diversas variedades de cenoura.

À Pfizer, Rhodia, Ihara, Hoechst e Bayer, por enviar prestativamente amostras de fungicidas.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração prestada.

Aos colegas Jorge Bleicher e Luiz Eduardo Aranha Camargo, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Engº Agrônomo Natalino Shimoyama, que gentilmente enviou diversas amostras de material com doença.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

página

RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Características gerais do patógeno	3
2.2. Métodos de controle	7
2.3. Resistência de fungos a fungicidas	11
2.4. Resistência de fungos a fungicidas do grupo das dicarboximidas	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Local e época de execução dos experimentos	23
3.2. Obtenção e conservação dos isolados	23
3.3. Preparação de meio de cultura com fungicidas	25
3.4. Obtenção e padronização do inóculo	25
3.5. Experimentos realizados	26
3.5.1. Identificação de linhagens resistentes de <i>Alternaria dauci</i> ao fungicida iprodione	26
3.5.2. Capacidade de crescimento <u>in vitro</u> de quatro isolados de <i>Alternaria dauci</i> a dosagens crescentes do fungicida iprodione	27

3.5.3. Avaliação <u>in vitro</u> da esporulação das linhagens de <i>Alternaria dauci</i>	27
3.5.4. Capacidade de crescimento <u>in vitro</u> de setores de <i>Alternaria dauci</i> na presença do fungicida iprodione.	28
3.5.5. Comparação de inóculos de duas linhagens de <i>Alternaria dauci</i> , em diferentes doses do fungicida iprodione	29
3.5.6. Transferências sucessivas de linhagens de <i>Alternaria dauci</i> resistentes ao iprodione, em meio de cultura isento deste fungicida	29
3.5.7. Sensibilidade <u>in vitro</u> de isolados de <i>Alternaria dauci</i> resistente e sensível ao iprodione, a diferentes fungicidas	30
3.5.8. Comportamento de alguns isolados de <i>Alternaria dauci</i> , quanto à manifestação dos sintomas em plântulas ...	32
3.5.9. Efeito de duas linhagens de <i>Alternaria dauci</i> na manifestação de sintomas em diferentes variedades de cenoura	33

3.5.10. Efeito da concentração de inóculo na manifestação de sintomas em plântulas	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Identificação de linhagens resistentes de Alternaria dauci ao fungicida iprodione .	36
4.2. Capacidade de crescimento <u>in vitro</u> de quatro isolados de Alternaria dauci a do- sagens crescentes do fungicida iprodione.	41
4.3. Avaliação <u>in vitro</u> da esporulação das linhagens de Alternaria dauci	43
4.4. Capacidade de crescimento <u>in vitro</u> de setores de Alternaria dauci , na presença do fungicida iprodione	43
4.5. Comparação de inóculos de duas linhagens de Alternaria dauci em diferentes doses do fungicida iprodione	46
4.6. Transferências sucessivas de linhagens de Alternaria dauci resistentes ao iprodione em meio de cultura isento deste fungicida	50
4.7. Sensibilidade <u>in vitro</u> de isolados de Alternaria dauci resistente e sensível ao iprodione, a diferentes fungicidas	50
4.8. Comportamento de alguns isolados de Alter naria dauci , quanto à manifestação dos sintomas em plântulas	53

4.9. Efeito de duas linhagens de <i>Alternaria dauci</i> na manifestação de sintomas em diferentes variedades de cenoura	55
4.10. Efeito da concentração de inóculo na manifestação de sintomas em plântulas	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	69
7. LITERATURA CITADA	71

OCORRÊNCIA E ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE
Alternaria dauci (Kühn) Groves & Skolko
RESISTENTES AO FUNGICIDA IPRODIONE

Autora: MARIA ISABEL FANCELLI

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Neste trabalho foi detectada a ocorrência de linhagens de Alternaria dauci resistentes ao fungicida iprodione. Em ensaios de laboratório, estas linhagens resistentes foram capazes de crescer a 4000 ppm de iprodione incorporado ao meio de cultura; a produção de esporos foi, de um modo geral, menor do que a dos isolados sensíveis e a característica resistência foi mantida após várias subculturas em meio livre de fungicida.

O aparecimento de setores espontâneos resistentes foi relativamente fácil em linhagens de A. dauci sensíveis ao iprodione, após prolongada incubação de discos de micélio em meio de cultura contendo este fungicida. Setores obtidos de várias linhagens crescendo a diversas concentrações de fungicidas, foram selecionados e examinados quanto à capacidade de crescimento em meio com 1000 ppm de iprodione. Os resultados indicaram uma gran-

de variação de comportamento entre os setores, mesmo entre aqueles originários de um mesmo isolado e concentração.

A linhagem resistente ao iprodione mostrou resistência cruzada aos fungicidas hidrocarbonetos aromáticos dicloran e quintozene e ao dicarboximida procimidone.

Com relação à eficiência dos fungicidas, foi observado que polioxina, iprodione, captafol e hidróxido de trifenil estanho foram os melhores na inibição do crescimento micelial da linhagem sensível. Mas, para a linhagem resistente, os mais eficientes foram captafol e polioxina.

Linhagens resistente e sensível inoculadas em sementes de diversas variedades de cenoura, apresentaram poucas diferenças na patogenicidade, devido à alta concentração de inóculo utilizado (10^3 esporos/ml). As variedades que mostraram menores índices de doença foram Kuronan, Brasília e Kuroda.

A concentração de inóculo foi importante para se detectar diferenças entre linhagens sensível e resistente, inoculadas na semente. Nas concentrações de 10^1 e 10^2 esporos/ml, a linhagem sensível foi mais patogênica que a resistente, mas nas concentrações mais elevadas (10^3 e 10^4 esporos/ml), as diferenças tenderam a desaparecer.

OCCURRENCE AND FITNESS OF IPRODIONE-RESISTANT
STRAINS OF Alternaria dauci (Kühn) Groves & Skolko

Author: MARIA ISABEL FANCELLI

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

Iprodione resistant strains of **Alternaria dauci**, which were able to grow on agar medium with iprodione at 4000 µg/ml, were detected. Conidial production of the resistant strains on agar media was usually smaller when compared to that of the sensitive strains and the resistance characteristic was retained after several subcultures on a fungicide-free medium.

The appearance of spontaneous resistant sectors was relatively easy in **A. dauci** sensitive strains after prolonged incubation of the mycelial discs on the iprodione - containing medium. Sectors obtained from several strains at some fungicide concentrations were selected and examined for the growth capacity on iprodione at 1000 µg/ml. The results showed a great variability among sectors, even with those sectors originated from the same isolate and concentration.

Fungal variant resistant to iprodione

showed cross resistance to the aromatic hydrocarbon fungicides dicloran and quintozone and to the dicarboximide procymidone.

With respect to the fungicide efficiency, it was found that polyoxin, iprodione, captafol and triphenyl tin hydroxide were the best in inhibition of the mycelial growth of sensitive strain. For the resistant strain, however, the more efficient were captafol and polyoxin.

Seed inoculations of several varieties of carrot with resistant and sensitive strains of *A. dauci* showed slight differences in pathogenicity, due to the high spore concentration (10^3 spores/ml) used. The most resistant varieties were Kuronan, Brasilia and Kuroda.

The fungal spore concentration was important for the detection of differences among *A. dauci* strains (sensitive and resistant), through the seed inoculation tests. At the concentration of 10^1 and 10^2 spores/ml, the sensitive strain was more pathogenic than the resistant one, but at the higher concentrations, the differences tended to disappear.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cenoura ocupa um lugar de destaque entre as hortaliças produzidas no centro-sul do país, sendo mais cultivada nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Neste último, as regiões que se sobressaem são as de Piedade, Ibiúna, Mogi das Cruzes e Campos do Jordão (CAMARGO, 1984).

Há vários fatores que concorrem para a redução da produtividade, diminuindo o valor econômico da cultura e entre eles, estão as doenças. Apesar de estarem registradas no Brasil mais de 15 doenças, um número relativamente pequeno é responsável pela maior parte dos danos (REIFSCHNEIDER *et alii*, 1983). Entre as doenças que causam maiores prejuízos, a queima das folhas, provocada por *Alternaria dauci* é a mais comumente observada nas lavouras, sendo caracterizada principalmente por lesões nos bordos das folhas.

O controle desta doença tem sido feita principalmente através do uso de cultivares com diferentes níveis de resistência, assim como pela utilização de fungicidas. Porém, o uso abusivo destes produtos quími-

cos pode trazer alguns inconvenientes. Além das implicações toxicológicas bastante divulgadas atualmente, o uso exclusivo e contínuo de sistêmicos pode possibilitar a ocorrência de uma intensa pressão de seleção, resultando no surgimento de linhagens resistentes, principalmente no caso de fungicidas sistêmicos.

Um produto bastante eficiente para o controle da queima das folhas é o iprodione, mas, atualmente, falhas no controle tem sido observado em vários locais de produção, que pode ser atribuído em muitos casos, ao desenvolvimento de linhagens de *Alternaria dauci* resistentes a este fungicida.

A introdução de produtos químicos cada vez mais específicos, tem propiciado o aumento de relatos que apontam o problema de resistência. Assim, o presente trabalho, visando trazer alguns esclarecimentos sobre alguns aspectos relacionados à resistência de *Alternaria dauci* ao iprodione, tem por objetivos: determinar a ocorrência e o grau de resistência dos isolados de *A. dauci* ao iprodione; comparar isolados sensíveis e resistentes ao iprodione, quanto à patogenicidade, capacidade de crescimento e esporulação in vitro ; observar a estabilidade e a variabilidade dos isolados resistentes e sensíveis in vitro e estudar o comportamento da linhagem resistente ao iprodione frente a alguns fungicidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características gerais do patógeno

O agente causal da queima das folhas da cenoura possui conídios clavados, marrons, 5 a 7 septos, com uma ou duas das células superiores longitudinalmente septadas, medindo 55 a 70 μm de comprimento por 12 a 14 μm de largura e um apêndice (prolongação da célula terminal do conídio) de 80 a 110 μm de comprimento, com 3 ou 4 septos, sem ramificação. Mas, algumas vezes, este apêndice pode atingir até 300 μm de comprimento, com uma ou duas ramificações e septos variando de um a dez. Os conídios formados não são catenulados (MEIER *et alii*, 1922).

Antes de ser denominado *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko, este fungo foi conhecido como *Macrosporium carotae* Ell & Langl. (MEIER *et alii*, 1922), *Alternaria brassicae* var. *dauci* (Kühn) (BARTHELET e VINOT, 1944), *Alternaria porri* (Ell.) Saw f. sp. *dauci* (Kühn) (NEERGAARD, 1945), *Sporidesmium exitiosum* var. *dauci* (Kühn) (GROVES & SKOLKO, 1944), *Alternaria dauci* (Kühn) GROVES & SKOLKO fsp *porri* (Ell.) (NEERGAARD, 1945) e *Alternaria carotae* (Ell. & Langl) Elliott (ELLIOT,

1917).

Os sintomas da doença na folhagem se manifestam como pequenas manchas de coloração marrom escura ou preta, que são circundadas por áreas amareladas (HOOKER, 1944), principalmente ao longo das margens das folhas. Com o decorrer do tempo e em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, as manchas podem aumentar em número e tamanho, podendo resultar no morte da maior parte dos tecidos foliares (REZENDE *et alii*, 1962). Além dos sintomas nas folhas, pode haver formação de lesões alongadas nos pecíolos (HOOKER; 1944), "damping - off", cuja lesão, frequentemente alcança o cotilédone (MAUDE, 1966) e infecção das inflorescências e mericarpos da cenoura (STRANDBERG, 1983), possibilitando a colonização de sementes por este patógeno. Uma vez contaminada, a semente é uma importante fonte de inóculo para iniciar doença em culturas desta Umbelífera (SCOTT & WENHAM, 1972); SOTEROS, 1979a; SOTEROS, 1979b).

No Brasil, os primeiros relatos desta doença são de BITANCOURT (1942) em São Carlos (SP), Verlande em 1943, em Petrópolis (RJ) (citado por REZENDE *et alii*, 1962) e GONÇALVES (1950), no município de Santa Isabel (SP). Atualmente é encontrada em todas as regiões em que se cultiva cenoura, sendo mencionada como a doença economicamente mais importante dessa cultura.

Condições favoráveis para o seu desenvol-

vimento são: folhas maduras ou próximas da maturidade (HOOKER, 1944; GONÇALVES, 1950), plantas semeadas em um espaçamento estreito (MAUDE, 1966), coincidindo com alta umidade (HAWKINS et alii, 1958) e temperatura entre 24 e 28°C (HOOKER; 1944).

Inicialmente acreditava-se que *Alternaria dauci* atacava somente a cenoura (BITANCOURT, 1942; GONÇALVES, 1950), mas trabalhos sobre o assunto relatam que pode infectar *Daucus maximus*, *Ridolfia segetum* e *Caucalis tenella*, plantas silvestres pertencentes à família Umbeliferae (NETZER & KENNETH, 1969), *Fumaria muralis*, uma planta daninha e *Petroselinum crispum* (SOTEROS, 1979). Segundo CHUPP & SHERF (1960), o fungo infecta moderadamente *Apium graveolens* var. *dulce*, além de outras espécies hortícolas quando inoculado em ferimento profundo.

A sobrevivência deste fungo em restos de cultura depende das condições ambientais, como foi observado em trabalhos realizados por NETZER & KENNETH (1969) e CARVALHO (1975). Estes autores concluíram que a forma conidial e micelial deste fungo, mantidas sob condições de umidade relativa elevada, perdem rapidamente a viabilidade, indicando, assim, o papel importante da água na persistência de *A. dauci*. O fungo permanece viável e consegue reter de maneira mais adequada sua habilidade de esporulação durante períodos secos, ao invés de intermitentes períodos úmidos. O efeito de irrigação artificial em restos de cultura de cenoura pode imitar os efeitos da chuva, cau-

sando um rápido decréscimo na quantidade de inóculo viável (NETZER & KENNETH, 1969).

A esporulação do patógeno é afetada por diversos fatores, sendo um dos principais, a luminosidade. Em espécies do gênero *Alternaria*, o processo de esporulação compreende duas etapas distintas, sendo que a primeira corresponde à formação dos conidióforos, e pode ser estimulada por irradiação com luz ultravioleta curta, injúria do micélio, umidade e remoção da fonte de carbono. Na segunda, ocorre a formação dos conídios nas extremidades dos conidióforos, e pode ser induzida por baixa temperatura ou ausência de luz visível (LUKENS & HORSFALL, 1973). O período escuro necessário para a esporulação de *Alternaria dauci* em folíolos destacados de cenoura, a 24°C, deve ser superior a 4 horas, segundo ZIMMER & McKEEN (1969). Em estudos realizados por estes mesmos autores, o número de conidióforos formados nos folíolos em escuro contínuo foi muito menor do que naqueles irradiados.

Com relação à temperatura e umidade, STRANDBERG (1977) afirmou que umidade relativa de 96 % a 100% ou umidade livre são requeridos para a produção de conidióforos e conídios. Os conídios são produzidos durante a noite a temperaturas que variam de 8 a 28°C. Geralmente, poucos esporos são dispersos à noite, quando as folhas estão úmidas, a umidade relativa é alta e os ventos apresentam velocidade baixa (LANGENBERG et alii, 1977). Segundo STRANDBERG (1977), os conídios são dispersos por

ventos acima de 2 a 3 m/seg., quando diminui a umidade relativa, logo após a luz do dia. Ventos fortes prolongados, períodos de chuva ou persistente umidade foliar e baixas temperaturas durante períodos úmidos resultam em uma atípica periodicidade e pouca liberação de esporos. Limitada quantidade de folhas com sintomas, baixa temperatura e curto período de umidade são os principais fatores que restringem a produção de esporos.

De acordo com CHUPP & SHERF (1960), a infecção ocorre lentamente, necessitando de 8 a 16 dias para a germinação e penetração. Quando ferimentos estão presentes, este tempo é reduzido drasticamente. Sob condições favoráveis, nova safra de conídios é produzida após 14 a 21 dias.

2.2. Métodos de controle

Práticas agronômicas como rotação de cultura, eliminação de restos culturais, plantio em solos bem drenados, espaçamento adequado (pouco denso) são algumas sugestões de BITANCOURT (1942), GONÇALVES (1950), CHUPP & SHERF (1960) e MAUDE (1966) para desfavorecer a incidência da doença. O tratamento de sementes também é uma medida muito importante, uma vez que é uma das vias de transmissão do patógeno (MAUDE, 1966; NEERGARD, 1945; NETZER & KENNETH, 1969). *Alternaria dauci* quando carregado pela semente ataca seedlings da cenoura, matando-os antes ou logo após

a emergência, causando típico sintoma de damping-off. Conídios produzidos em hipocótilo infectado, podem se tornar o inóculo que poderá infectar a folhagem (STRANDBERG, 1977). Um método utilizando suspensão de thiram foi desenvolvido por MAUDE (1966, 1973) para erradicar patógenos de semente, com bons resultados para o controle de *A. dauci*. STRANDBERG (1984) demonstrou que os fungicidas thiram e iprodione proporcionaram um baixo nível de *A. dauci* nas sementes, após tratamento com estes produtos.

A escolha correta do cultivar é um fator muito importante para se obter sucesso na exploração comercial da cenoura. Antes de optar pelo cultivar, é preciso analisar alguns fatores como exigência de mercado, qualidade das raízes, tolerância a temperaturas e resistência às principais doenças. Os cultivares do grupo Nantes são os que mais satisfazem as exigências de mercado, mas são mais exigentes em temperaturas amenas e altamente suscetíveis ao ataque de doenças de folhagem, principalmente a queima das folhas, causada por *Alternaria dauci* (COSTA et alii, 1974; SONNENBERG et alii, 1979; PÁDUA et alii, 1984). Cultivares do grupo Kuroda, bem como outros cultivares nacionais como Brasília e Kuronan, lançados mais recentemente, apresentam maior tolerância a temperaturas mais elevadas e são mais resistentes à *A. dauci* (PÁDUA et alii, 1984; REIFSCHNEIDER, 1984). Em Goiânia, o cultivar Tropical superou em produtividade os cultivares Nantes e Kuroda e apresentou resistência intermediária à *A. dauci*.

(SONNERNBERG et alii, 1975).

O emprego de cultivares do grupo Nantes, ainda é preferido pelos agricultores, apesar do baixo nível de resistência dessa variedade à *A dauci*. Dessa forma, o controle químico torna-se importante no controle da doença.

As pulverizações com fungicidas durante o período vegetativo, muitas vezes tornam-se essenciais, quando o uso de variedades resistentes, rotação de culturas e outras práticas culturais são inadequados para suprimir o patógeno suficientemente.

WEBBER et alii (1954) relatam que pulverizações com maneb e zineb podem aumentar significativamente o rendimento da cultura. STRIDER (1969) observou que os melhores resultados foram obtidos com quatro pulverizações de maneb, a intervalos de 7 a 10 dias. Segundo REZENDE et alii (1962), os melhores resultados obtidos para o controle da queima das folhas da cenoura foram: a mistura manzate + acetato de trifenil estanho (Brestan + Manzate a 0,2%), acetato de trifenil estanho (Brestan a 0,1%), manzate (Manzate a 0,2%) e oxicleto de cobre (Coprantol a 0,25%). Mas, durante a estação seca, o Brestan mostrou-se fitotóxico, o mesmo não ocorrendo durante a estação úmida, quando a chuva removeu os resíduos das folhagens. HIROCE et alii (1961), também relataram que o acetato de trifenil estanho (Brestan a 0,125%) e maneb (Dithane M-22 a 0,20%) foram os melhores para o controle da queima das folhas.

RIBEIRO *et alii* (1966) concluíram que os produtos comerciais Duter (Hidr^oxido de trifenil estanho) e Batasan (Acetato de trifenil estanho) e as combinações Duter + Manzate D e Batasan + Manzate D controlaram eficientemente a doença. Mas, efeitos fitot^oxicos apareceram nos tratamentos com Duter e Batasan na concentração de 0,1%, causando redução no desenvolvimento das plantas, clorose e encrespamento das brotações. No caso específico de Batasan, esses efeitos influenciaram negativamente na produção de raízes. SONNENBERG & CARVALHO (1974) destacaram o captafol e o fen^otin acetato como os mais eficientes para controlar a queima das folhas. CAMPACI (1975) observou que para o controle da infecção, os melhores fungicidas foram a polioxina, o oxicleto de cobre + chlorothalonil, o chlorothalonil e o tiofanato metílico + chlorothalonil. Quanto à produção, ou seja, quantidade e qualidade de cenoura, os melhores tratamentos foram com a polioxina e o oxicleto de cobre + chlorothalonil. AGUILAR *et alii* (1984), relataram que os produtos mais eficientes foram captafol, iprodione e procimidone.

Assim, há vários fungicidas que realizam um bom controle da queima das folhas, mas entre eles, um produto mais recente e com bastante eficiência que está sendo usado cada vez mais pelos agricultores, é o iprodione. Este fungicida, apesar de ter sido relatado inicialmente como não sistêmico (BURGAUD *et alii*, 1975), e mais tarde demonstrado translocar em batata (CAYLEY & HIDE,

1980), apresenta uma característica dos fungicidas sistêmicos que é a especificidade, isto é, são seletivamente tóxicos para processos únicos do fungo. Esta seletividade é tão específica que entre diferentes fungos atacando uma planta, só certos grupos taxonômicos são sensíveis a cada fungicida sistêmico particular (EDGINGTON *et alii*, 1980).

Assim, o uso contínuo deste produto pode gerar o aparecimento de um problema muito polêmico nos dias atuais, que é a resistência de fungos a fungicidas.

2.3. Resistência de fungos a fungicidas

O início da aplicação em larga escala de fungicidas para combater doenças é marcada pela descoberta da calda bordalesa, em 1882. Esta preparação, uma mistura de sulfato de cobre e cal, permaneceu como o mais usado fungicida por mais de 50 anos. Praticamente nenhum problema com resistência a este fungicida foi relatado na prática. A uma certa extensão, isto também é verdadeiro para compostos mercuriais orgânicos, introduzidos por volta de 1914; os ditiocarbamatos, introduzidos na década de 30 e vários outros fungicidas orgânicos desenvolvidos mais tarde. Todos estes compostos tinham em comum a ação de proteger a superfície da planta. Após a 2ª Guerra Mundial, iniciaram as pesquisas com fungicidas que pudessem penetrar na planta, e assim erradicar patógenos mesmo após a infecção, ou proteger partes de plantas que não estavam

em contato direto com o fungicida (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982).

Mas, antes destes fungicidas serem usados comercialmente, experimentos de laboratório detectaram linhagens resistentes de fungos a antimicina (LEBEN *et alii*, 1955) e cicloheximide (HSU, 1963) antecipando o fato de que estes fungicidas poderiam encontrar problemas de resistência, na medida em que fossem alcançando maior especificidade.

Realmente, isto ocorreu logo após a introdução de fungicidas sistêmicos dentro da agricultura prática. Casos notáveis de resistência ocorreram com benzimidazóis (WICKS, 1974, 1977; WILD & RIPPON, 1975; KURAMOTO, 1976; DEKKER, 1977; PEPIN & MACPHERSON, 1982), tiofanatos (KURAMOTO, 1976; DEKKER, 1977), dimetirimol, kasugamicina (DEKKER, 1977), polioxina (MISATO *et alii*, 1977; DEKKER, 1977) e metalaxyl (GEORGOPOULOS & GRIGORIU, 1981).

A causa desta vulnerabilidade está associada à seletividade, que permite um fungicida atuar sistemicamente, aumentando a sua eficiência. Através de mutações, os fungos podem tornar-se resistentes a fungicidas específicos, que atuam em um ou poucos processos metabólicos vitais. Até 1970, os casos de resistência relatados no campo limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos, aumentando para aproximadamente 35 gêneros em 1980 (DELP, 1980).

A resistência a fungicidas pode ser detectada e medida de várias maneiras, dependendo da combinação fungo-fungicida. Semelhante aos outros organismos, o reconhecimento de linhagens resistentes do fungo deve ser feito por comparação com os dados obtidos com linhagens sensíveis. Estudos realizados com benzimidazóis, carboxamidas e acilalaninas revelam que há grandes diferenças na sensibilidade entre linhagens selvagens e resistentes. Em tais casos, a detecção e medidas de resistência é razoavelmente fácil. Com alguns outros fungicidas, como dodine e membros do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, as diferenças são pequenas e detecção e medidas requerem testes cuidadosos (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982).

A resistência a fungicidas pode emergir como consequência de mudanças genéticas na célula do fungo. A tolerância, ou seja, a adaptação do fungo após longa exposição ao fungicida sob condições favoráveis ao organismo, também tem sido observada (PARTRIDGE & RICH, 1962; WEBSTER *et alii*, 1970). Esta resistência fenotípica é geralmente muito fácil de ser perdida, após transferência a um meio livre do produto tóxico (DEKKER, 1972). Ainda não se sabe se a adaptação fenotípica a fungicidas é possível sob condição de campo. A instabilidade da resistência de isolados de campo pode indicar adaptação fenotípica, mas não deve ser confundida com regressão da resistência no campo, que pode ser também devido à reduzida adaptabilidade de mutantes genéticos (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982). Segundo GEORGOPOULOS (1977), os fun-

gos também possuem DNA mitocondrial com um papel definido na hereditariedade e em alguns casos, a resistência a tóxicos pode ser encontrada como o resultado de mutações de genes mitocondriais. No entanto, a maioria dos estudos genéticos de resistência a fungicidas revelou o envolvimento de genes cromossômicos.

Onde a resistência a fungicidas é constatada, é essencial escolher uma alternativa para evitar o risco de resistência cruzada, na qual a mudança de um fator genético, resulta na resistência a diferentes fungicidas. A resistência cruzada geralmente ocorre entre estruturas relacionadas quimicamente ou entre aquelas com semelhantes modos de ação (WADE, 1982). Como exemplo, ocorre resistência cruzada entre todos os membros do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos (GEORGOPOULOS & ZARACOVITIS, 1967; TILLMAN & SISLER, 1973), entre thiabendazóis e benzimidazóis (DAVIDSE & FLACH, 1977, 1978), entre hidrocarbonetos aromáticos e dicarboximidas (LEROUX *et alii*, 1977; SZTEJNBERG & JONES, 1978) e entre fungicidas inibidores da biossíntese de esterol (SHERALD *et alii*, 1973; FUCHS *et alii*, 1977). A sensibilidade colateral, ou seja, a mudança do fator genético resultando na sensibilidade a outros fungicidas, não demonstrado por linhagens selvagens, também pode ocorrer, como foi observado por LAMBERT & WUEST (1965) em linhagens de *Verticillium malthousei* resistentes a benomil, que se tornaram mais sensíveis a zineb, do que as linhagens selvagens. Assim, o conhecimento destes fenôme-

nos é primordial para que seja feito um manejo correto entre fungicidas, para que estes tenham um maior período de uso entre os agricultores (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982).

A emergência in vitro de mutantes resistentes a um determinado fungicida, não implica que o uso deste composto no campo também levará a falhas no controle da doença. Isto acontecerá somente após uma considerável proporção da população do patógeno se tornar resistente (DEKKER, 1982). Segundo DELP (1980), os mutantes podem aparecer naturalmente, mas a uma frequência muito baixa, provavelmente menos do que 1 propágulo em 10^8 , e como as formas resistentes raramente são tão adaptadas quanto as selvagens, elas não tem chances de se desenvolverem a ponto de atingirem números detectáveis, a menos que um determinado composto reduza ou elimine seletivamente as populações sensíveis, favorecendo o aumento de formas que tenham uma razoável adaptabilidade e patogenicidade.

O desenvolvimento da resistência dentro de uma população depende de vários fatores, entre eles a adaptabilidade de mutantes resistentes, em relação ao selvagem, o tipo de fungicida e doença, a persistência e o método usual do fungicida, e as condições ambientais (DEKKER, 1977).

Linhagens com mais alto grau de adaptabilidade são mais competitivas. Adaptabilidade é um conceito comparativo: uma linhagem é mais ou menos adaptada que

outra sob condições in vitro , na casa de vegetação ou no campo. Parâmetros de adaptabilidade "in vitro" são: germinação de esporos, crescimento micelial em agar ou em meio líquido e esporulação em meio de agar. Parâmetros importantes de adaptabilidade na planta hospedeira são: a capacidade de infecção, a velocidade de colonização do tecido hospedeiro e o grau de esporulação. Se a diferença na adaptabilidade entre o patógeno sensível e resistente se tornar muito grande, o desenvolvimento da população de patógenos resistentes será seriamente dificultado ou não ocorrerá, dependendo da pressão de seleção do fungicida (DEKKER, 1982; WOLFE, 1982). Mas testes de laboratório e casa de vegetação não podem fornecer todas as informações sobre a adaptabilidade da linhagem sob condições de campo. Assim, para obter respostas detalhadas, observações de campo podem ser necessárias, especialmente se diferenças na adaptabilidade são tão pequenas, que não possam ser detectadas na casa de vegetação (DEKKER, 1982).

Em alguns casos, o surgimento de resistência a um fungicida pode implicar em uma reduzida adaptabilidade da linhagem resistente em relação à selvagem. HUNTER & BEEVER (1982) inocularam uma mistura (50:50) de esporos sensíveis e resistentes a dicarboximidas de *Botrytis cinerea* em morangos, sendo que após um ano, o isolado altamente resistente não foi recuperado. No entanto, algumas vezes, o desenvolvimento de resistência nem sempre está associado à redução na adaptabilidade da linhagem resistente, em relação à sensível. LEROUX et alii (1977),

estudando isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a dicarboximidas, não encontraram nenhuma diferença entre a linhagem resistente e a sensível, com relação à taxa de crescimento e patogenicidade.

Assim, o surgimento de problemas de resistência a fungicidas no campo depende em grande parte da pressão de seleção exercida pela inadequada aplicação destes produtos. Mesmo um fungicida pouco vulnerável corre o risco de aumentar as possibilidades de mutações e originar variantes resistentes, sob condições de alta pressão de seleção (DEKKER, 1981, 1982).

2.4. Resistência de fungos a fungicidas do grupo das dicarboximidas

Fungicidas do grupo das dicarboximidas (iprodione, procimidone e vinclozolin) vem sendo amplamente utilizados no controle de fungos dos gêneros *Sclerotinia*, *Monilinia* e *Botrytis* e já existem relatos da ocorrência de mutantes resistentes de *B. cinerea* e *M. fructicola* em condições de campo (BEEVER & BYRDE, 1982).

Estudos em laboratório tem sido feitos para avaliar a probabilidade do desenvolvimento de resistência no campo e assim, vários mutantes resistentes já foram relatados in vitro : *Alternaria alternata* (McPHEE, 1980), *Botrytis cinerea* (LEROUX et alii, 1977; DAVIS &

DENNIS, 1981); *Botrytis tulipae* (CHASTAGNER & VASSEY, 1979), *Monilinia fructicola* (SZTEJNBERG & JONES, 1978); *Penicillium expansum* (LEROUX et alii, 1978; ROSENBERGER et alii, 1979); *Ustilago maydis* (LEROUX et alii, 1978).

Fungos resistentes ao grupo das dicarboximidas apresentam geralmente resistência cruzada aos fungicidas hidrocarbonetos aromáticos. Tal fenômeno pode ser explicado pela presença de resíduos de benzeno clorado em fungicidas dicarboximidas (GEORGOPOULOS & ZARACOVITIS, 1967).

O modo de ação das dicarboximidas permanece ainda desconhecido. Até agora, nenhuma etapa metabólica ligada ao sítio de ação dos fungicidas deste grupo foi identificada. Da mesma forma, também não foi encontrada nenhuma etapa metabólica que seja interferida pelos hidrocarbonetos aromáticos (TILLMAN & SISLER, 1973; THRELFALL, 1968).

Embora pouco seja conhecido sobre a base genética da resistência a dicarboximidas, alguma atenção tem sido dada à estabilidade destes variantes. MacPHEE (1980) observou que isolados resistentes ao iprodione de *Alternaria alternata* retiveram esta característica após várias transferências sucessivas in vitro. A maioria dos pesquisadores tem observado que em *Botrytis cinerea*, os variantes resistentes retêm esta característica após repicagem em um meio livre de fungicida (LEROUX et alii, 1977 e GARIBALDI & GULLINO; 1979). No entanto, DAVIS &

DENNIS (1979) relatam que a resistência foi algumas vezes perdida, quando os isolados resistentes não foram repicados inicialmente em um meio contendo fungicida.

Foi constatado que há um aumento na proporção de conídios resistentes, quando mutantes resistentes crescem em meio com fungicida (GULLINO & GARIBALDI, 1979, 1980). Em um ensaio com *Botrytis cinerea*, em um meio livre de fungicidas, menos de 50% dos conídios de um isolado resistente deram colônias resistentes. Mas, após cinco gerações de isolados monospóricos, em meio contendo fungicida, a maioria ou todos produziram colônias resistentes (GARIBALDI & GULLINO, 1979). Geralmente, nas primeiras gerações de uma linhagem resistente recém-isolada, ocorre uma mistura de colônias sensíveis e resistentes. Tal instabilidade pode ser explicada pelo conhecimento de que conídios de *Botrytis cinerea* são multinucleados (EPTON & RICHMOND, 1980) e provavelmente a resistência seja cromossômica e dominante em heterocarion (BEEVER & BYRDE, 1982). Isolados novos de variantes resistentes são possivelmente heterocarióticos; o crescimento na presença de fungicidas deve aumentar a proporção do núcleo resistente no conídio produzido (KATO *et alii*, 1983). No entanto, em alguns exemplos, linhagens resistentes podem ser homocarióticas para o núcleo resistente (WEBSTER *et alii*, 1970).

A persistência da característica resistência difere quando mistura de conídios de isolados sensí-

veis e resistentes são inoculados em um meio livre de fungicida. GULLINO & GARIBALDI (1981), ao avaliar a habilidade competitiva de linhagens de *B. cinerea* sensíveis e resistentes a dicarboximidas in vitro, constataram que de uma forma geral, houve o desaparecimento dos mutantes resistentes, e em apenas um caso, a linhagem resistente foi tão competitiva quanto a sensível. Maraite et alii (1980) citado por BEEVER & BYRDE (1982) mostraram que embora a resistência seja rapidamente perdida em algumas combinações, em outras, uma alta proporção de conídios retiveram a resistência. Estes comportamentos podem em parte refletir diferenças na esporulação dos vários isolados, ou diferenças na extensão da formação do heterocário entre os diversos pares.

Para muitos sistemas onde o fungo é resistente a um determinado fungicida, resultados de campo podem indicar a ocorrência da menor adaptabilidade das linhagens resistentes em relação às sensíveis, mas no caso dos fungicidas dicarboximidas, há poucos dados quanto a este assunto (BEEVER & BYRDE, 1982). O fungo *Botrytis cinerea* tem sido muito estudado sob vários aspectos quanto à resistência às dicarboximidas, mas a interpretação dos dados para esta espécie é complicada, por sua conhecida variabilidade (LORBEER, 1980). Muitas linhagens selvagens são naturalmente heterocarióticas e isolados monoconidiais destas, frequentemente são muito diferentes de seus pais. Assim, muitas das variações mostradas por isolados resis-

tentes podem ser melhor explicadas como um reflexo de sua variabilidade, ao invés da presença de um particular gen de resistência (BEEVER & BYRDE, 1982).

De um modo geral, os variantes resistentes são menos virulentos que as linhagens selvagens, mas podem ocorrer variações (BEEVER & BYRDE, 1982). GULLINO & GARBALDI (1979) constataram em seu trabalho que as linhagens sensíveis de *Botrytis cinerea* proporcionaram maior perda de peso em uvas do que os mutantes resistentes, exceto em um caso onde o isolado sensível não foi muito virulento. Medindo o grau de colonização de pedaço de frutos de pepino, LEROUX *et alii* (1977) observaram que embora muitos mutantes resistentes tivessem baixa virulência, outros foram tão virulentos como seus pais. Maraite *et alii* (1980), citado por BEEVER & BYRDE (1982) relataram que a taxa de colonização das linhagens resistentes foi geralmente reduzida, mas algumas delas (isoladas do campo) apresentaram uma colonização rápida.

Há muitas dificuldades em extrapolar testes de laboratório para o campo, mas poucos pesquisadores tem realizado experimentos de campo. Pulverizando flores de morango com suspensão conidial de *Botrytis cinerea*, DAVIS & DENNIS (1981) mostraram que linhagens resistentes puderam causar doença no fruto e o tratamento com dicarboxímidas aumentou a proporção da podridão que continha linhagens resistentes. Estes mutantes também puderam persistir

por muitos meses, em restos de folhas de morangos no campo (DAVIS & DENNIS, 1981; MARAITE *et alii*, 1981).

Assim, devido à possibilidade de ocorrer mutantes resistentes a dicarboximidas, com uma certa adaptabilidade e capazes de provocar doença, especialmente na presença destes fungicidas seletivos, torna-se essencial adotar estratégias que evitem o desenvolvimento da resistência (BEEVER & BYRDE, 1982; DAVIS & DENNIS, 1981).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e época de execução dos experimentos

A presente pesquisa foi realizada nos Laboratórios e Casa de Vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", no período de maio de 1986 a março de 1987.

3.2. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de isolamento de material vegetal, exceto um deles, que foi cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo (Tabela 1).

Os isolamentos foram realizados a partir de folhas de cenoura que apresentavam lesões ao longo das margens das folhas, que se manifestavam como pequenas manchas de coloração marrom escura a preta, circundadas por áreas amareladas. Na zona de transição entre tecido doente e sadio, foram cortados pequenos pedaços de folhas, desinfectados superficialmente e colocados em placas de Petri contendo agar-água (20 g de agar e 1.000 ml de água

TABELA 1. Isolados de *Alternaria dauci* utilizados no presente trabalho.

Isolados	Variedades	Procedência	Ano do Isolamento	Histórico
NT-1	Nantes	Piracicaba - SP	1986	Sem uso de fungicidas
NT-2	Nantes	Piracicaba - SP	1986	Sem uso de fungicidas
NT-3	Nantes	Piracicaba - SP	1986	Sem uso de fungicidas
AM-1	Nantes	Piedade - SP	1986	4 aplicações de Brestan + Manzanate e 1 aplicação de Rovral
AM-2	Nantes	Piedade - SP	1986	1 aplicação de Difolatan e 6 aplicações de Manzate
AM-3	Vilmorin	Piedade - SP	1986	1 aplicação de Difolatan e 5 aplicações de Manzate
CH-1	Nantes	Piracicaba - SP	1986	Sem uso de fungicidas
AT-1	Nantes	Mogi das Cruzes-SP	1985	Pulverização com Rovral*
257	-	Inst. Biológico-SP	-	-

* Informações detalhadas como outras aplicações de fungicidas e mesmo o número de aplicações de Rovral não puderam ser obtidas.

destilada), incubando-se à temperatura de 25°C. Após cinco dias, as colônias que se desenvolveram foram repicadas para placas de Petri contendo BDA (água de cozimento de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 18 g de agar e água destilada até completar 1.000 ml), incubados no escuro durante cinco dias, seguido de 12 horas de luz e finalmente mais um dia no escuro, à temperatura de 25°C, com a finalidade de se obter esporos, para a identificação da espécie.

Os isolados assim obtidos foram conservados de acordo com o método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

3.3. Preparação de meio de cultura com fungicida

A técnica utilizada consistiu em dissolver quantidade adequada do fungicida em uma solução de 90 ml de água destilada estéril e 10 ml de álcool. Desta suspensão esto que, foram feitas diluições em série, obtendo-se as concentrações desejadas, adicionando-se 1 ml de cada suspensão em 99 ml de meio de cultura (BDA) a uma temperatura de 45°C a 50°C.

3.4. Obtenção e padronização do inóculo

A obtenção do inóculo foi feita a partir de discos de micélio de 5 mm de diâmetro, colocados no centro de placas de Petri contendo BDA, incubadas durante

cinco dias a 25°C no escuro e após este período, para estimular a esporulação, foram colocadas em luz contínua durante 24 horas, a uma temperatura de 25°C e em seguida, novamente colocadas no escuro por mais um dia. Depois, foram adicionados 10 ml de água destilada sobre a colônia esporulada, removendo-se os esporos com um pincel macio e obtendo-se assim, a suspensão, calibrada em hemocitômetro. A seguir, por meio de diluição, determinou-se a concentração desejada de conídios.

3.5. Experimentos realizados

3.5.1. Identificação de linhagens resistentes de *Alternaria dauci* ao fungicida iprodione

Neste ensaio, todos os isolados (Tabela 1) foram cultivados em meio de BDA contendo fungicida nas dosagens de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm de iprodione, conforme metodologia descrita no item 3.3., e incubados a 25°C durante oito dias. O inóculo utilizado consistiu de um disco de micélio, medindo 5 mm de diâmetro, obtido da periferia de colônia com cinco dias de idade, incubada a 25°C. O experimento contou com 4 repetições (placas) para cada tratamento.

Quatro avaliações foram realizadas, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si, no 2º, 4º, 6º e 8º dias após a colocação do inóculo nas placas.

3.5.2. Capacidade de crescimento in vitro de quatro isolados de *Alternaria dauci* a dosagens crescentes do fungicida iprodione

Dois isolados que se mostraram resistentes (AT-1 e AM-1) e dois isolados sensíveis (CH-1 e 257) foram cultivados em meio de BDA contendo o fungicida iprodione nas dosagens de 0; 1000; 2000; 3000 e 4000 ppm. Tais concentrações foram obtidas colocando-se determinadas quantidades do produto diretamente em BDA fundente (45 a 50°C) e homogeneizando adequadamente. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro obtidos conforme descrito no item anterior, foram utilizados como inóculo. Foram realizadas 4 repetições para cada tratamento.

A avaliação foi feita 7 dias após a instalação do experimento, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si.

3.5.3. Avaliação in vitro da esporulação das linhagens de *Alternaria dauci*

Para se comparar a capacidade de esporulação das linhagens de *A. dauci* (Tabela 1), todos os isolados foram cultivados em BDA durante sete dias, a 25°C no escuro, seguido de 24 horas de luz e depois mais dois dias no escuro. Após este período, procedeu-se o preparo da suspensão de esporos, adicionando-se 10 ml de água desti-

lada estéril às culturas e raspando-se a superfície das colônias com um pincel e posterior contagem de conídios em hemocitômetro.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

3.5.4. Capacidade de crescimento in vitro de setores de *Alternaria dauci*, na presença do fungicida iprodione.

Com a finalidade de se observar o grau de variabilidade do fungo *A. dauci*, foram isolados diversos setores (Tabela 9) e testados quanto à capacidade de crescimento em meio de cultura a 0 e 1000 ppm do iprodione. O inóculo consistiu de discos de micélio, obtidos conforme item 3.5.1. O preparo do meio com fungicida foi realizado da maneira descrita no item 3.3.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições.

A avaliação foi feita 8 dias após a instalação do experimento, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si.

3.5.5. Comparação de inóculos de duas linhagens de *Alternaria dauci*, em diferentes doses do fungicida iprodione

Este ensaio foi realizado com o intuito de observar as diferenças entre dois tipos de inóculos: disco de micélio e esporo. Para isso, foram utilizadas duas linhagens de *A. dauci*: AM-2 (sensível ao iprodione) e AT-1 (resistente ao iprodione). Os inóculos foram obtidos de colônias de sete dias de idade, submetidas a cinco dias de escuro, um dia de luz contínua e mais um dia de escuro. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro e esporos individuais foram coletados das mesmas, sob uma binocular, e colocados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura (BDA) nas concentrações de 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de iprodione, preparado conforme metodologia descrita no item 3.3.

O experimento contou com 3 repetições por tratamento e as avaliações foram realizadas tomando-se como parâmetro o diâmetro das colônias, aos 5 e 8 dias após o início do experimento.

3.5.6. Transferências sucessivas de linhagens de *Alternaria dauci* resistentes ao iprodione, em meio de cultura isento deste fungicida

Para determinar o período da permanência da característica resistência, três isolados que se mos-

traram resistentes: AT-1, AM-1 e NT-2 foram transferidos sucessivamente em meio de BDA, sob as formas de esporos e discos de micélio, obtidos conforme item anterior e colocados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura.

Foram realizadas dez transferências durante cinco meses e juntamente com a 4ª, 7ª e 10ª transferências, observou-se também o crescimento de colônias a partir de esporos e discos de micélio em meio de cultura contendo 1000 ppm de iprodione.

O experimento contou com 3 repetições por tratamento e as avaliações foram realizadas no 6º dia após a colocação do inóculo nas placas de Petri com meio de cultura, medindo-se o crescimento diametral das colônias.

3.5.7. Sensibilidade in vitro de isolados de *Alternaria dauci* resistente e sensível ao iprodione, a diferentes fungicidas

Para observar a ocorrência de sensibilidade colateral ou de resistência cruzada, dois isolados de *A. dauci*: AT-1 (resistente ao iprodione) e AM-2 (sensível ao iprodione) foram comparados in vitro frente aos fungicidas apresentados na Tabela 2, nas concentrações de 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm, preparados conforme metodologia

TABELA 2. Fungicidas utilizados nos experimentos.

Nome técnico	Nome comercial	Formulação	Quantidade de i.a.
Acetato de tri fenil estanho	Brestan	PM	200 g/kg
Captafol	Difolatan	SC	480 g/l
Captan	Captan	PM	500 g/kg
Chlorothalonil	Daconil	PM	750 g/kg
Dicloran	Allisan	PM	500 g/kg
Hidróxido de trifenil estanho	Mertin	SC	400 g/l
Iprodione	Rovral	PM	500 g/kg
Mancozeb	Dithane M-45	PM	800 g/kg
Polioxina	Polyoxin AL	PM	100 g/kg
Procimidone	Sumilex	PM	500 g/kg
Propineb	Antracol	PM	700 g/kg
Quintozene	Plantacol	PM	750 g/kg

descrita no ítem 3.3. O inóculo (discos de micélio) foram obtidos de maneira idêntica àquela descrita no ítem 3.5.1.

As avaliações foram realizadas sete dias após o início do experimento, tomando-se como parâmetro o diâmetro das colônias.

3.5.8. Comportamento de alguns isolados de *Alternaria dauci*, quanto à manifestação dos sintomas em plântulas

Neste ensaio, os isolados NT-1, NT-2, NT-3, AM-1, AM-2, AT-2 e 257 foram preparados conforme metodologia 3.4 e calibrados em 10^3 esporos/ml. Em seguida, sementes da variedade Nantes foram imersas nesta suspensão por 15 minutos. Após este período, foram semeadas em vasos de alumínio contendo terra esterilizada, composta da mistura: solo argiloso, areia e esterco de curral, na proporção de 3:1:1,5. Cada tratamento constou de 3 repetições e em cada vaso foram plantadas 100 sementes.

Os vasos foram distribuídos inteiramente ao acaso no interior da casa-de-vegetação, onde a temperatura variou de 25 a 35°C, com umidade relativa elevada, sendo as plantas irrigadas diariamente.

Duas avaliações foram realizadas, nos vigésimo e no quadragésimo dias após o plantio. Em cada ava-

liação contou-se o número de plantas sadias, excluindo-se as plantas tombadas e as que apresentavam lesões escuras e deprimidas na região do colo.

Para assegurar que se tratavam de lesões provocadas por *A. dauci*, várias plantas de cada vaso foram coletadas e as partes necrosadas colocadas em ágar-água, para o reisolamento do fungo.

3.5.9. Efeito de duas linhagens de *Alternaria dauci* na manifestação de sintomas em diferentes variedades de cenoura

Para observar o efeito da linhagem AT-1 (resistente ao iprodione) e AM-2 (sensível ao iprodione) na manifestação de sintomas de 6 variedades de cenoura: Brasília, Forto RS, Harumaki kinko, Kuroda Nacional, Kuro_unan e Nantes, no estágio de plântula, foi preparado inóculo conforme metodologia descrita no item 3.4 e calibrado a uma concentração de 10^3 esporos/ml. Em seguida, sementes das variedades indicadas acima foram imersas nestas suspensões durante 15 minutos, e posteriormente semeadas em copos plásticos contendo terra esterilizada, num total de 50 sementes por copo.

Os copos plásticos foram distribuídos ao acaso em casa-de-vegetação, com condições semelhantes ao descrito no item anterior.

Foram realizadas 4 avaliações num período de 40 dias. Em cada avaliação contou-se o número de plantas que apresentaram tombamento e lesões escuras e deprimidas na região do colo.

O delineamento experimental foi fatorial 4 x 2 x 6 inteiramente casualizado, com 3 repetições.

3.5.10. Efeito da concentração de inóculo na manifestação de sintomas em plântulas

Para determinar o efeito de diferentes concentrações de inóculo na manifestação de sintomas em plântulas de cenoura da variedade Nantes (suscetível à *A. dauci*) e da variedade Kuroda (resistente à *A. dauci*), foram utilizados dois isolados: AM-2, determinado como sensível ao iprodione e AT-1, resistente ao iprodione.

O inóculo foi obtido conforme metodologia descrita no item 3.4 e calibrados inicialmente a uma concentração de 10^4 esporos/ml e por meio de diluição, foram obtidas as concentrações de 10^3 , 10^2 e 10^1 esporos/ml. Em seguida, sementes das variedades Nantes e Kuroda foram imersas nestas suspensões durante 15 minutos e depois semeadas em copos plásticos contendo terra esterilizada, num total de 50 sementes por copo.

Os copos plásticos foram distribuídos ao acaso no interior da casa-de-vegetação, com temperatura

variando de 25 a 35°C e umidade relativa elevada.

A primeira avaliação foi realizada 15 dias após o plantio e a seguir foram feitas a cada 4 dias, durante aproximadamente um mês. Em cada avaliação contou-se o número de plantas com sintomas e mortas.

O delineamento experimental foi fatorial 4 x 2 x 2, inteiramente ao acaso, com 3 repetições.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de linhagens resistentes de *Alternaria dauci* ao fungicida iprodione

Dois dias após o início do experimento, foi observado que os isolados NT-1, NT-3, AM-2, AM-3, CH-1 e 257 não apresentaram desenvolvimento micelial quando submetidos às dosagens de 10, 100 e 1000 ppm do iprodione. No entanto, os isolados NT-2, AM-1 e AT-1 se desenvolveram até na concentração de 1000 ppm do fungicida (Tabela 3).

Na segunda avaliação (tabela 4), os isolados NT-2, AM-1 e AT-1 continuaram a crescer normalmente, em todas as dosagens testadas. Mas, com relação aos outros isolados, houve o aparecimento de setores em uma ou duas placas de alguns tratamentos onde o crescimento micelial do fungo foi completamente inibido na primeira avaliação, aumentando assim, a média geral destes tratamentos, devido à grande capacidade de desenvolvimento destes setores em meio contendo este fungicida.

Nas duas últimas avaliações (Tabelas 5 e 6), foi observado um aumento no aparecimento de setores

TABELA 3. Efeito de várias dosagens do iprodione no aumento do diâmetro de colônias de diferentes isolados de *Alternaria dauci*, no 2º dia após a inoculação.

Dosagem do iprodione (µg/ml)	Crescimento diametral das colônias (cm)* dos isolados								Médias
	NT-1	NT-2	NT-3	AM-1	AM-2	AM-3	CH-1	AT-1	257
0	1,13	1,04	0,94	1,20	1,34	1,58	1,33	0,99	1,61
1	0,38	1,14	0,39	1,33	0,40	0,59	0,55	0,79	0,36
10	0,00	1,15	0,00	1,36	0,00	0,00	0,00	1,01	0,00
100	0,00	1,05	0,00	1,09	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00
1000	0,00	0,98	0,00	1,04	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00
Médias	0,30	1,07	0,27	1,20	0,35	0,43	0,38	0,86	0,39

* Média de 4 repetições.

TABELA 4. Efeito de várias dosagens do iprodione no aumento do diâmetro de colônias de diferentes isolados de *Alternaria dauci*, no quarto dia após a inoculação.

Dosagem do iprodione (µg/ml)	Crescimento diametral das colônias (cm)* dos isolados									Médias
	NT-1	NT-2	NT-3	AM-1	AM-2	AM-3	CH-1	AT-1	257	
0	2,48	2,41	2,46	2,66	2,88	3,20	3,14	2,30	3,66	2,80
1	1,19	2,46	1,28	2,59	1,03	1,23	1,45	2,14	1,10	1,89
10	0,06**	2,44	0,08**	2,68	0,00	0,20**	0,14**	2,64	0,00	0,91
100	0,00	2,31	0,04**	2,35	0,00	0,00	0,04**	2,09	0,00	0,76
1000	0,00	2,21	0,04**	2,31	0,03**	0,00	0,06**	2,06	0,00	0,75
Médias	0,75	2,37	0,78	2,52	0,79	0,93	0,97	2,25	0,95	

* Média de 4 repetições

** Tratamentos que apresentaram 1 ou 2 placas com setores que cresciam em meio contendo as respectivas dosagens do fungicida.

TABELA 5. Efeito de diversas dosagens do iprodione no aumento do diâmetro de colônias de diferentes isolados de *Alternaria dauci*, no 6º dia após a inoculação.

Dosagem do iprodione (µg/ml)	Crescimento diametral das colônias (cm)* dos isolados								Médias
	NT-1	NT-2	NT-3	AM-1	AM-2	AM-3	CH-1	AT-1	257
0	3,64	4,04	3,73	3,96	4,45	4,90	4,83	3,83	5,88
1	2,20	4,19	2,31	4,60	2,18	2,06	2,48	3,79	2,28
10	0,26**	3,94	0,60**	4,19	0,16**	0,81**	0,56**	4,26	0,50**
100	0,00	3,59	0,36**	3,68	0,35**	0,28**	0,24**	3,49	0,24**
1000	0,00	3,55	0,73**	3,76	0,24**	0,20**	0,59**	3,49	0,00
Médias	1,22	3,86	1,43	4,04	1,48	1,65	1,74	3,77	1,78

* Média de 4 repetições

** Tratamentos que apresentaram 1 ou 2 placas com setores que cresciam em meio contendo as respectivas dosagens do fungicida.

TABELA 6. Efeito de diversas dosagens do iprodione no aumento do diâmetro de colônias de diferentes isolados de *Alternaria dauci*, no 8º dia após a inoculação.

Dosagem do iprodione (µg/ml)	Crescimento diametral das colônias (cm)* dos isolados								Médias	
	NT-1	NT-2	NT-3	AM-1	AM-2	AM-3	CH-1	AT-1		257
0	4,63	5,63	5,20	5,68	5,49	7,62	7,08	5,22	7,89	6,05
1	3,15	5,90	3,24	6,29	3,19	3,26**	3,40	5,61	3,70	4,19
10	0,44**	5,20	1,28**	5,50	0,31**	1,28**	0,91**	6,00	0,68**	2,40
100	0,00	4,81	0,65**	4,86	0,76**	1,23**	0,49**	4,68	0,34**	1,98
1000	0,00	4,75	1,18**	5,04	0,39**	0,45**	1,14**	4,69	0,00	1,96
Médias	1,64	5,26	2,31	5,47	2,03	2,77	2,60	5,24	2,52	

* Média de 4 repetições

** Tratamentos que apresentaram 1 ou 2 placas com setores que cresciam em meio contendo as respectivas dosagens do fungicida.

nos isolados sensíveis submetidos às dosagens mais elevadas do iprodione, comprovando que períodos prolongados de incubação de discos de micélio em meio contendo fungicida, possibilitam o aparecimento de colônias capazes de crescer em meio com iprodione.

4.2. Capacidade de crescimento in vitro de quatro isolados de *Alternaria dauci* a dosagens crescentes do fungicida iprodione

Neste ensaio, houve uma diferença marcante entre os isolados considerados resistentes (AT-1 e AM-1) e os sensíveis (CH-1 e 257). Os resultados apresentados na Tabela 7, em porcentagem de crescimento em relação à testemunha, mostram que os isolados resistentes foram capazes de crescer em todas as concentrações testadas, mas apresentando uma redução no desenvolvimento micelial, com o aumento das dosagens do fungicida. Foi observada diferença estatística somente nas dosagens de 1.000 e 4.000 ppm, ao nível de 5% de probabilidade.

Os isolados CH-1 e 257 não apresentaram nenhum crescimento nestas altas concentrações. Porém, o isolado CH-1, na dose de 1.000 ppm apresentou a formação de um setor em uma das placas que compunha a repetição.

TABELA 7. Capacidade de crescimento de quatro isolados de *A. daucí* a doses crescentes do fungicida iprodione.

Dosagem do iprodione (μ /ml)	Crescimento dos isolados (%)*							
	AT-1				AM-1			
	x	arc sen $\sqrt{\%}$ **	x	arc sen $\sqrt{\%}$ **	x	arc sen $\sqrt{\%}$ **	x	arc sen $\sqrt{\%}$ **
1.000	88,12	70,03 a	82,85	65,12 a	0***	0	0	0
2.000	84,01	66,64 ab	78,57	62,45 ab	0	0	0	0
3.000	67,58	55,64 ab	71,42	57,69 ab	0	0	0	0
4.000	58,90	50,14 b	52,37	44,72 b	0	0	0	0

* % de crescimento diametral em relação à testemunha; média de 4 repetições; avaliação feita aos 7 dias de incubação.

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (D.M.S. = 19,13; C.V. = 17,10%)

*** Aparecimento de setor (não considerado na avaliação).

4.3. Avaliação in vitro da esporulação das linhagens de *Alternaria dauci*

De um modo geral, os isolados sensíveis ao iprodione mostraram maior índice de esporulação do que os resistentes, em meio de BDA. O isolado sensível CH-1 apresentou maior capacidade de esporulação, diferindo estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, de todos os isolados resistentes e dos sensíveis 257, NT-1 e NT-3. Por outro lado, o isolado resistente AM-1 apresentou o menor índice de esporulação, diferindo de todos os isolados sensíveis e do resistente AT-1. Excetuando-se estes dois extremos, os demais isolados não diferiram entre si, de acordo com a análise estatística, mas a tendência para maior esporulação ficou para as linhagens sensíveis ao iprodione, conforme resultados apresentados na Tabela 8.

4.4. Capacidade de crescimento in vitro de setores de *Alternaria dauci*, na presença do fungicida iprodione

Os crescimentos diametrais dos diversos setores, medidos como porcentagem de desenvolvimento a 1.000 ppm de iprodione em relação à testemunha, apresentaram resultados bastante variados. Os setores de números 17, 15, 14, 21 e 16, obtidos a partir do isolado resistente AT-1 (armazenado em meio isento de fungicida), apresentaram resultados que não diferiram estatisticamen-

TABELA 8. Capacidade de esporulação dos isolados de *Al-ternaria dauci* em meio de BDA

Isolados	Designação*	Produção média de esporos ($\times 10^4$)**/placa em BDA	
		x	$\sqrt{x + 0,5}$ ***
CH-1	S	4,84	2,37 a
AM-3	S	3,43	1,96 ab
AM-2	S	3,13	1,88 ab
257	S	2,80	1,76 bc
NT-1	S	2,68	1,74 bc
AT-1	R	1,90	1,52 bc
NT-3	S	1,84	1,46 bc
NT-2	R	1,15	1,27 bcd
AM-1	R	0,29	0,88 d

* R : isolado resistente ao iprodione

S : isolado sensível ao iprodione

** Média de 4 repetições. Culturas com dez dias de idade.

*** Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (DMS = 0,57; CV = 21,51%).

te entre si, ao nível de 5% de probabilidade. Mas, os de números 20 e 26, provenientes do mesmo isolado, nas mesmas condições, apresentaram resultados bastante inferiores àqueles primeiros. O mesmo ocorreu com os dois setores obtidos a 100 ppm de iprodione, a partir do isolado AT-1 armazenado em BDA: um deles (nº 8) apresentou crescimento bem superior ao outro (nº 11). Mas, aqueles obtidos da linhagem AT-1 a 1000 ppm de iprodione (nº 18), 100 ppm (nº 9), 10 ppm (nº 6) e 1 ppm (nºs. 3 e 4), não diferiram entre si, apresentando bom crescimento a 1000 ppm do fungicida testado.

Os setores provenientes do isolado sensível AM-2 a 1000 ppm, também apresentaram grandes variações no crescimento. Os de números 12 e 13, apresentaram um bom desenvolvimento a 1000 ppm de iprodione, não diferindo do nº 10, obtido a 100 ppm. No entanto, o setor 19, diferiu destes primeiros, apresentando menor taxa de desenvolvimento. Setores provenientes dos isolados sensíveis NT-3 (nº 25) e NT-1 (nº 24) também apresentaram menor capacidade de crescimento.

Entre os setores que apresentaram melhores níveis de desenvolvimento e que não diferiram entre si ao nível de 5%, estão os de números 17, 15, 14, 21, 16 (obtidos a 1000 ppm do isolado AT-1 que foi armazenado em meio isento de fungicida), 18 (do isolado AT-1 a 1000 ppm), 6,9 (do isolado AT-1 a 100 ppm), 3,4 (do isolado AT-1 a

1 ppm), 12, 13 (do isolado AM-2 a 1.000 ppm) e 10 (do isolado AM-2 a 100 ppm).

De maneira idêntica, de acordo com a tabela 9, os setores que apresentaram os piores níveis de crescimento, foram provenientes de diferentes isolados, cultivados a várias concentrações fungicidas.

4.5. Comparação de inóculos de duas linhagens de *Alternaria dauci* em diferentes doses do fungicida iprodione

A avaliação realizada no quinto dia de incubação, mostrou que os inóculos monoconidiais e discos de micélio do isolado AT-1 (resistente ao iprodione) se desenvolveram em todas as dosagens testadas do fungicida. Porém, o isolado AM-2 (sensível ao iprodione) apresentou crescimento diametral das colônias apenas na testemunha e na concentração mais baixa do iprodione (Tabela 10). No entanto, três dias após (Tabela 11), em algumas placas onde haviam inóculos de discos de micélio, começaram a surgir setores, a partir do isolado AM-2, quando submetido a concentração de 10 e 100 ppm do fungicida. Tal fato não ocorreu quando se utilizou inóculo monoconidial. Neste último, houve desenvolvimento de colônias apenas nos tratamentos a 0 e a 1 ppm do iprodione. Assim, há maior possibilidade de aparecimento de setores, quanto maior o inóculo empregado.

TABELA 9. Capacidade de crescimento de setores - % de crescimento diametral a 1000 ppm em relação ao meio isento de fungicida.

Setores	Origem		% de crescimento**		
	Isolado	Conc. do fungicida (µg/ml)	x	arc sen√%	***
17	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	92,41	74,01	a
15	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	89,53	71,12	a
9	AT-1 (IPRO R)	IPRO (1000)	88,34	70,04	ab
14	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	84,89	67,13	abc
18	AT-1 (IPRO R)	IPRO (1000)	81,81	64,75	abc
3	AT-1 (IPRO R)	IPRO (1)	80,63	63,89	abc
12	AM-2 (IPRO S)	IPRO (1000)	80,36	63,69	abc
6	AT-1 (IPRO R)	IPRO (10)	79,22	62,88	abc
21	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	78,31	62,25	abcd
13	AM-2 (IPRO S)	IPRO (1000)	77,84	61,92	abcd
4	AT-1 (IPRO R)	IPRO (1)	76,94	61,30	abcd
16	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	76,62	61,09	abcd
10	AM-2 (IPRO S)	IPRO (100)	75,00	60,00	abcd
8	AT-1* (IPRO R)	IPRO (100)	67,34	55,14	bcd
7	AT-1* (IPRO R)	IPRO (10)	66,44	54,59	cd
19	AM-2 (IPRO S)	IPRO (1000)	54,07	47,34	d
25	NT-3 (IPRO S)	IPRO (1000)	19,24	26,02	e
23	AM-2 (IPRO S)	DCNA (1000)	18,55	25,51	e
24	NT-1 (IPRO S)	IPRO (1000)	18,23	25,27	e
20	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	17,73	24,90	e
26	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1000)	17,04	24,38	e
11	AT-1* (IPRO R)	IPRO (100)	16,55	24,00	e
2	AT-1* (IPRO R)	IPRO (1)	16,35	23,85	e
22	AM-2 (IPRO S)	HTE (1000)	9,08	17,54	e
5	AM-2 (IPRO S)	IPRO (10)	4,15	11,75	e

* Linhagem resistente ao iprodione, armazenada por três meses em meio isento de fungicida.

IPRO R : linhagem resistente a 4000 ppm de iprodione

IPRO S : linhagem sensível ao iprodione

IPRO : iprodione; DCNA: dicloran; HTE; hidróxido de trifetil estanho

** Média de 3 repetições; culturas com oito dias de idade

*** Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS = 17,69; CV = 10,04%).

OBS.: O crescimento diametral do isolado AM-2 foi nulo a 1.000 ppm.

TABELA 10. Capacidade de crescimento in vitro de duas linhagens de *A. dauci* a partir de discos de micélio (DM) e esporos (E), após 5 dias de incubação.

Dosagens do Iprodione (µg/ml)	Crescimento das colônias (cm)* dos isolados			
	AT-1 (R) **		AM-2 (S) ***	
	DM	E	DM	E
0	2,35	3,17	2,50	2,85
1	2,08	3,23	1,47	0,47
10	2,22	2,27	0,00	0,00
100	2,25	2,47	0,00	0,00
1000	1,82	1,65	0,00	0,00

* Média de 3 repetições, crescimento diametral.

** R : isolado resistente ao iprodione

*** S : isolado sensível ao iprodione

TABELA 11. Capacidade de crescimento in vitro de duas linhagens de *A. dauci* a partir de discos de micélio (DM) e esporos (E), após 8 dias de incubação.

Dosagem do Iprodione ($\mu\text{g/ml}$)	Crescimento das colônias (cm)* dos isolados			
	AT-1 (R) **		AM-2 (S) ***	
	DM	E	DM	E
0	4,58	5,75	5,05	5,30
1	3,93	5,37	3,00	1,65
10	4,40	4,60	0,10****	0,00
100	4,25	4,42	0,73****	0,00
1000	3,67	3,40	0,00	0,00

* Média de 3 repetições, crescimento diametral.

** R : isolado resistente ao iprodione

*** S : isolado sensível ao iprodione

**** Aparecimento de setores

4.6. Transferências sucessivas de linhagens de *Alternaria dauci* resistentes ao iprodione, em meio de cultura isento de fungicida

As linhagens resistentes ao iprodione AT-1, AM-1 e NT-2 mantiveram o alto grau de resistência, mesmo após várias transferências consecutivas em meio de cultura (BDA) isento de fungicida. Os resultados após 4, 7 e 10 transferências sucessivas em BDA, quanto ao crescimento diametral de colônias destes isolados em meio de cultura com 1000 ppm de iprodione, podem ser vistos na Tabela 12.

4.7. Sensibilidade in vitro de isolados de *A. dauci* resistente e sensível ao iprodione, a diferentes fungicidas

Em algumas tratamentos, o isolado AM-2 diferiu bastante do isolado AT-1. De acordo com a Tabela 13, os tratamentos com dicloran, procimidone, quintozene e iprodione mostram diferenças marcantes entre estes isolados. Nestes fungicidas, a linhagem AM-2 sofreu maior inibição do crescimento, apresentando valores de ED_{50} baixos (< 1 até 10 ppm), contrariamente ao isolado AT-1, que apresentou $ED_{50} > 1000$ ppm para todos estes produtos. Outros fungicidas como mancozeb, propineb, hidróxido de trifênil estanho e polioxina também permitiram um maior desenvolvimento do isolado AT-1, mas os valores de ED_{50} não

TABELA 12. Crescimento de 3 linhagens de *A. dauci* resistentes ao iprodione, em BDA + 1000 ppm deste fungicida, após transferências sucessivas em meio de cultura isento deste produto.

Isolados	Inóculos*	Crescimento das colônias** após o nº de repicagens indicadas		
		4	7	10
AT-1	DM	2,70	2,68	2,72
	E	2,60	2,57	2,52
AM-1	DM	2,45	2,50	2,45
	E	2,62	2,70	2,66
NT-2	DM	2,45	2,40	2,55
	E	2,28	2,18	1,98

* DM : disco de micélio

E : isolado monoconidial

** Média de 3 repetições; avaliação feita aos 6 dias de incubação.

TABELA 13. Capacidade de crescimento "in vitro" de 2 isolados de *A. damet*, em diferentes concentrações de 12 fungicidas.

Fungicidas	% média de crescimento*																					
	Isolado AH-2 (sensível ao Iprodione)						Isolado AT-1 (resistente ao Iprodione)															
	1 µg/ml		10 µg/ml		100 µg/ml		1000 µg/ml		Média arc sen%**		ED ₅₀ (ppm)	1 µg/ml		10 µg/ml		100 µg/ml		1000 µg/ml		Média arc sen%**		ED ₅₀ (ppm)
	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc gen %	x	arc sen%**
Mancozeb	83,98	66,48	61,04	51,35	54,97	47,83	33,12	35,07	50,18	aa	100-1000	96,00	78,94	90,00	71,60	79,50	63,11	54,00	47,40	65,23	ab	> 1000
Captan	98,05	82,51	70,45	57,23	12,80	20,89	8,16	16,52	44,28	aba	10-100	94,66	77,51	68,59	55,87	7,94	16,45	0,00	0,00	37,45	ba	10-100
Dicloran	85,82	67,83	37,05	37,47	14,92	22,68	5,06	12,82	35,20	bA	1-10	96,28	78,57	96,56	84,13	81,36	64,47	51,52	45,84	68,25	ab	> 1000
Proclinaldone	96,31	79,58	21,66	27,68	8,52	16,91	8,29	16,67	35,21	ba	1-10	107,42	88,56	101,23	86,07	88,34	70,05	53,70	47,18	72,97	ab	> 1000
Chlorothalonil	46,20	42,80	31,40	34,02	29,62	32,96	26,26	30,77	35,13	ba	< 1	47,44	43,48	43,46	41,20	42,04	40,35	43,18	41,03	41,51	ba	< 1
Quintozene	59,53	50,46	25,98	30,60	22,29	28,09	15,34	23,05	33,05	ba	1-10	95,83	82,04	86,66	68,87	78,74	62,95	79,58	64,03	69,47	ab	> 1000
Propineb	94,64	77,03	53,25	46,85	0,00	0,00	0,00	0,00	30,97	bca	10-100	92,66	75,44	78,66	62,48	25,58	30,31	0,00	0,00	42,05	bb	10-100
Acetato de trifenil estanho	45,86	42,58	30,57	33,52	14,61	22,32	11,46	19,69	24,52	bca	< 1	44,30	41,68	36,38	37,07	25,98	30,44	9,90	18,24	31,85	bca	< 1
Hidróxido de trifenil estanho	48,12	43,91	39,68	39,20	0,00	0,00	0,00	0,00	20,77	ca	< 1	69,31	56,34	45,83	42,57	33,33	35,24	28,02	31,93	41,52	bb	1-10
Captafol	50,1	45,02	28,55	32,28	0,00	0,00	0,00	0,00	19,32	ca	1	41,85	40,22	22,09	29,97	0,00	0,00	0,00	0,00	17,54	da	< 1
Iprodione	49,91	4,92	11,95	20,18	0,00	0,00	0,00	0,00	16,27	ca	< 1	95,62	81,37	88,27	70,46	79,67	63,37	65,92	54,26	67,36	ab	> 1000
Polluxina	25,91	30,88	6,78	15,02	0,00	0,00	0,00	0,00	11,47	ca	< 1	57,19	49,12	33,71	35,42	0,00	0,00	0,00	0,00	21,13	cds	1-10

* % de crescimento diametral em relação à testemunha; média de 4 repetições; avaliação feita aos 7 dias de incubação.

** Médias seguidas pela mesma letra (mínuscula nas colunas e maiúsculas nas linhas), não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS entre fungicidas = 11,72; DMS entre isolados = 7,02; CV = 60,04%).

aumentaram tanto como relatado no caso anterior.

Em meio de cultura com os fungicidas captan, chlorothalonil, acetato de trifenil estanho e captafol, os dois isolados não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade. Ainda para estas duas linhagens, o chlorothalonil e o acetato de trifenil estanho apresentaram $ED_{50} < 1$ ppm, mas o fungo foi capaz de crescer até a 1000 ppm destes produtos.

Quanto à eficiência dos fungicidas, os melhores para o isolado AM-2 foram a polioxina, iprodione, captafol e hidróxido de trifenil estanho, que permitiram a completa inibição do fungo a 100 ppm.

Para o isolado AT-1, os mais eficientes foram o captafol e a polioxina.

4.8. Comportamento de alguns isolados de *Alternaria dauci*, quanto a manifestação dos sintomas em plantas

Na primeira avaliação, vinte dias após o plantio, os isolados sensíveis e os resistentes, de um modo geral, não diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade. Apenas a linhagem AM-2 apresentou maior índice de patogenicidade, mas que não diferiu do isolado AM-1 (Tabela 14). Vinte dias após, houve uma maior uniformização dos resultados entre os isolados, sendo que somente

TABELA 14. Plantas sobreviventes, após inoculação de sementes da variedade de cenoura Nantes, com vários isolados de *Alternaria dauci*.

Tratamentos	Designação***	Plantas sobreviventes*			
		aos 20 dias		aos 40 dias	
		x	$\sqrt{x+0,5}$ **	x	$\sqrt{x+0,5}$ **
Testemunha		63,67	8,00 a	66,00	8,15 a
NT-3	S	25,67	5,11 b	5,00	2,28 bc
257	S	24,00	4,94 b	6,67	2,62 b
AT-1	R	23,00	4,84 b	4,33	2,18 bc
NT-1	S	23,00	4,84 b	4,33	2,19 bc
NT-2	R	23,00	4,84 b	5,00	2,30 bc
AM-1	R	20,33	4,56 bc	2,00	1,55 bc
AM-2	S	16,00	4,04 c	0,67	1,05 c

* Média de 3 repetições (vasos); plantio de 100 sementes por vaso.

** Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (aos 20 dias, DMS = 0,72 e CV = 4,94%; aos 40 dias, DMS = 1,27 e CV = 16,11%)

***S : sensível ao fungicida iprodione; R : resistente ao fungicida iprodione.

o isolado 257 diferiu do AM-2.

Plântulas com sintomas apresentavam uma le são na região do colo, tendo um aspecto encharcado no início, mas logo depois adquiriam coloração escura, como resultado da degeneração dos tecidos, que acabava provocando o tombamento das plântulas e consequentemente a mor te das mesmas.

No final do experimento, várias plântulas de cada vaso foram retiradas, para o reisolamento de *A. dauci*. Após conseguir colônias puras deste fungo, os iso lados resistentes foram plaqueados em BDA + 1000 ppm de iprodione, constatando-se que eles retiveram sua resistên cia.

4.9. Efeito de duas linhagens de *Alternaria dauci* na manifestação de sintomas em diferentes variedades de cenoura

De um modo geral, não houve diferenças mar cantes entre os isolados, quando estes foram inoculados em sementes de diversas variedades de cenoura. Apenas na variedade Nantes, o isolado AM-2 mostrou-se mais patogê nico do que o isolado AT-1. Mas, quando analisada a va riedade Kuroda, houve uma inversão dos resultados entre os isolados, sendo que a linhagem AT-1 mostrou maior pa togenicidade (Tabela 15).

TABELA 15. Patogenicidade de 2 isolados de *A. diuici* em diferentes variedades de cenoura.

Variedades	% de plantas mortas nas avaliações dos isolados nos dias (após emergência)*																			
	Isolado AM-2 (sensível ao Iprodione)						Isolado AI-1 (resistente ao Iprodione)													
	17			24			31			Médias										
	x	arc sen √n	x	arc sen √n	x	arc sen √n	x	arc sen √n	x	arc sen √n	x	arc sen √n								
Harumaki kinoko	64,04	53,52	83,51	69,34	87,72	69,97	88,59	70,65	65,82	aa	63,22	52,69	78,07	62,88	79,83	63,53	88,59	68,05	61,78	aa
Nantes	50,53	45,24	83,06	67,09	86,47	69,93	90,72	73,01	63,81	aba	15,05	18,86	68,57	56,68	79,05	63,97	82,86	66,32	51,45	ba
Forto RS	42,73	40,78	69,05	56,53	79,76	63,12	85,71	68,19	57,15	bca	36,75	37,07	76,19	60,95	83,33	66,19	91,27	75,86	60,01	aa
Kuroda	52,09	46,16	64,39	53,35	66,44	54,71	74,24	59,62	53,46	cb	61,80	51,81	81,82	65,06	85,60	68,17	87,87	70,21	63,81	aa
Brasília	5,71	7,63	13,16	19,68	32,43	35,90	73,59	62,98	31,53	da	18,02	24,16	28,07	31,58	39,47	38,55	54,38	47,38	35,41	ca
Kuronan	5,41	10,87	7,14	12,38	8,57	13,79	29,52	32,84	17,47	ea	4,50	9,55	12,86	20,84	19,05	25,85	28,57	32,19	22,10	da

* Média de 3 repetições

** Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula entre linhas e minúscula entre colunas), não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS entre isolados = 5,70; DMS entre variedades = 8,36; CV = 6,35%).

As variedades Brasília e Kuronan mostraram menores índices de plantas mortas, assim como baixa taxa de desenvolvimento da doença (Tabela 16). A variedade Kuroda também apresentou baixa taxa de desenvolvimento da doença, mas apenas quando foi inoculada com o isolado AM-2.

4.10. Efeito da concentração de inóculo na manifestação de sintomas em plântulas

O nível de concentração de inóculo foi importante para se detectar diferenças entre isolados utilizados no ensaio, como pode ser observado nas tabelas 17 e 18.

Nas concentrações de 10^1 e 10^2 esporos/ml, os isolados AM-2 e AT-1 diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade, indicando maior patogenicidade para o isolado sensível ao iprodione (AM-2). Nas dosagens mais elevadas (10^3 e 10^4 esporos/ml), as diferenças tenderam a desaparecer, mas em alguns casos, ocorreu inversão da patogenicidade dos isolados, com valores maiores para o isolado resistente AT-1.

Com relação à concentração de inóculo, a linhagem AM-2 apresentou maior nível de doença na concentração de 10^2 esporos/ml. A linhagem resistente AT-1 promoveu maiores níveis de doença, nas concentrações de

TABELA 16. Taxas de desenvolvimento da doença (r) de diversos cultivares de cenoura, inoculados com linhagens de *Alternaria dauci* sensível (AM-2) e resistente (AT-1) ao iprodione.

Cultivares	Taxas de desenvolvimento da doença (r) em plantas inoculadas com					
	AM-2			AT-1		
	r	R*	R ²	r	R*	R ²
Brasília	0,034	0,961	0,925	0,027	0,984	0,969
Forto RS	0,065	0,992	0,984	0,089	0,983	0,966
Harumaki Kinko	0,053	0,917	0,841	0,042	0,966	0,934
Kuroda	0,027	0,976	0,953	0,052	0,937	0,878
Kuronan	0,012	0,832	0,692	0,013	0,994	0,988
Nantes	0,074	0,939	0,883	0,076	0,953	0,909

r = taxa de desenvolvimento da doença

R = coeficiente de correlação

R² = coeficiente de determinação

* = valores de R acima de 0,950, apresentam um nível de 95% de probabilidade de que o valor do r obtido represente a reta, de acordo com o teste t (Student).

TABELA 17. Influência da concentração de inóculo na patogenicidade de isolados de *A. dauci* resistente e sensível ao iprodione, em duas variedades de cenoura, 40 dias após o plantio.

Cultivar	Isolado***	% de plantas mortas* nas concentrações (esporos/ml)					
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴		
		x arc sen√g**	x arc sen√g**	x arc sen√g**	x arc sen√g**	x arc sen√g**	
Nantes	AM-2	82,36 66,09 aA	96,57 81,21 aA	90,75 73,40 bA	93,28 74,98 bA		
	AT-1	18,64 24,95 bA	71,18 57,67 bB	98,30 85,65 aC	98,80 85,65 aC		
Kuroda	AM-2	55,88 48,41 aA	89,71 74,94 aB	95,29 68,02 aB	75,68 54,27 bAB		
	AT-1	39,37 38,58 bA	44,96 41,18 bA	89,15 71,39 aB	99,22 87,03 aB		

* Em relação à testemunha; média de 3 repetições.

** Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula entre linhas e minúscula entre colunas, para cada cultivar), não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS entre concentrações = 17,20; DMS entre isolados = 7,70; CV = 30,10%)

***AM-2 : isolado sensível ao fungicida iprodione

AT-1 : isolado resistente ao fungicida iprodione

TABELA 18. Taxas de desenvolvimento da doença (r) em duas variedades de cenoura, inoculadas com linhagens de *A. dauci* resistente e sensível ao fungicida iprodione, a diversas concentrações de inóculo.

Cultivar	Isolado	Taxas de desenvolvimento da doença (r) nas concentrações (esporos/ml)											
		10 ¹			10 ²			10 ³			10 ⁴		
		r	R*	R ²	r	R*	R ²	r	R*	R ²	r	R*	R ²
Nantes	AM-2	0,058	0,970	0,941	0,089	0,957	0,917	0,069	0,946	0,895	0,096	0,975	0,950
	AT-1	0,006	0,944	0,891	0,031	0,990	0,981	0,099	0,923	0,869	0,072	0,923	0,852
Kuroda	AM-2	0,033	0,972	0,944	0,089	0,986	0,972	0,080	0,977	0,956	0,036	0,967	0,936
	AT-1	0,015	0,942	0,889	0,020	0,955	0,912	0,065	0,921	0,849	0,087	0,866	0,750

r = taxa de desenvolvimento da doença

R = coeficiente de correlação

R² = coeficiente de determinação

* Valores de R acima de 0,707, apresentam um nível de 95% de probabilidade de que o r obtido represente a real, de acordo com o teste t (Student).

inóculo mais elevadas (10^3 e 10^4 esporos/ml).

As taxas de desenvolvimento da doença referentes ao isolado AT-1, nas diferentes concentrações, apresentaram, de um modo geral, valores mais baixos do que aqueles do isolado AM-2, confirmando, assim a maior patogenicidade do isolado sensível ao iprodione.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho é relatada, pela primeira vez, a ocorrência de resistência ao iprodione em isolados de *Alternaria dauci* provenientes de culturas de cenoura. Isto era esperado, uma vez que iprodione, fungicida do grupo das dicarboximidas com características sistêmicas (BEEVER & BYRDE, 1982), está sendo utilizado há alguns anos no controle da queima das folhas da cenoura. E fungicidas sistêmicos devido a sua especificidade, estão sujeitos a riscos de surgimento de mutantes resistentes, dependendo da magnitude dos riscos da adaptabilidade dos mutantes e da pressão de seleção (DEKKER, 1982a). Com relação à pressão de seleção, os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura, porque dos nove isolados de *A. dauci* testados, dois resistentes foram obtidos de culturas com iprodione e seis sensíveis de campos não tratados. A exceção, linhagem resistente NT-2, obtida de campo não tratado com iprodione, pode ser conjecturada como originária de semente produzida em campo eventualmente pulverizado com fungicidas do grupo das dicarboximidas.

O crescimento de isolados de *A. dauci* re-

sistentes a altas concentrações do iprodione (> 1.000 ppm) observado no presente trabalho, é uma característica compartilhada por outros fungos que se tornaram resistentes a esse fungicida, se bem que nem sempre cresçam nestas concentrações tão elevadas (McPHEE, 1980).

O surgimento de linhagens de fungos resistentes a fungicidas sistêmicos em geral (DEKKER, 1982a) e a dicarboximidas em particular (BEEVER e BYRDE, 1982) tem sido explicado pela mutação. A facilidade com que setores de *A. dauci* resistentes surgem a partir de linhagens sensíveis ao iprodione (Tabelas 4, 5, 6, 7 e 11) pode ser também interpretada do mesmo modo. Em *Botrytis cinerea*, experimentos semelhantes, feitos com discos de micélio de 5 mm de diâmetro incubados em BDA contendo 500 ppm de procimidone, mostraram alta frequência de setores resistentes (0-9 discos que desenvolveram setores/20 discos miceliais inoculados) (KATO et alii, 1983). Esses números, semelhantes aos obtidos no presente trabalho, poderiam ser supostos muito elevados para serem interpretados como mutação espontânea. Porém, em experimentos paralelos, com suspensões de esporos, KATO et alii (1983) mostraram que a frequência de resistentes é da ordem de $1-2 \times 10^{-6}$. Assim, supondo que o número de núcleos em discos de micélio seja da ordem de 10^6 /disco de 5 mm, possivelmente, tenha acontecido o mesmo no presente trabalho.

A adaptabilidade de linhagens de fungos

resistentes a fungicidas, comparada com a de linhagens sensíveis do tipo selvagem, é de importância fundamental para o surgimento de uma população resistente do patógeno (DEKKER, 1982). Dentre os vários parâmetros que medem essa adaptabilidade estão: a esporulação, a sobrevivência, o limiar de infecção e a sensibilidade colateral (DEKKER, 1982, 1982a ; GEORGOPOULOS, 1982a).

Com relação à esporulação, pode-se observar de modo geral, que isolados resistentes ao iprodione esporulam menos que os sensíveis (Tabela 8) o que pode refletir em menor adaptabilidade. Em estudos semelhantes feitos com linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a dicarboximidas, GULLINO & GARIBALDI (1979), chegaram a conclusões semelhantes, mas MARAITE **et alii** (1981), observaram variações, dependendo dos isolados.

Transferências sucessivas de linhagens resistentes em meio de BDA sem fungicida, mostram a grande estabilidade dos mutantes (Tabela 12), pois após 10 transferências, mesmo de esporos individuais, não se conseguiu obter nenhuma linhagem sensível.

Essa grande estabilidade pode ser uma característica inerente dos núcleos resistentes bem como pode indicar dificuldades de dissociação nuclear, pois sabe-se que *A. dauci* é multinucleado e capaz de formar heterocarion (WETZER & KENNETH, 1969). Experimentos semelhantes com *Alternaria alternata* (McPHEE, 1980) e com

Botrytis cinerea (LEROUX **et alii**, 1977 e GARIBALDI & GULLINO, 1979) mostraram que mutantes resistentes a dicarboximidas eram estáveis, como no presente estudo.

A grande diferença de comportamento entre linhagens resistentes e sensíveis ao iprodione, observada quanto ao crescimento em meio de cultura contendo dicloran, quintozene e procimidone, pode ser explicada pela ocorrência de resistência cruzada. O procimidone pertence ao mesmo grupo químico do iprodione. Portanto, já se esperava a ocorrência deste fenômeno. Com relação aos outros dois fungicidas, que pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, também foi observada a ocorrência de resistência cruzada por LEROUX **et alii** (1977), SZTEJNBERG & JONES (1978), McPHEE (1980) e KATO **et alii** (1983). De acordo com GEORGOPOULOS **et alii** (1979), há muitas semelhanças no mecanismo de ação entre dicarboximidas e hidrocarbonetos aromáticos porque além da resistência cruzada, os membros destes grupos tem em comum a habilidade de aumentar a frequência de segregação mitótica (setores) em linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans*. A ação de genes de resistência aos hidrocarbonetos aromáticos não foi ainda adequadamente explicada, mas um sítio altamente sensível dentro do núcleo do fungo parece ser comum aos dois grupos de fungicidas.

Entre os fungicidas testados, não houve nenhum caso de sensibilidade colateral. Além disso, fungicidas protetores relatados como eficientes no campo co-

mo o acetato de trifenil estanho (REZENDE **et alii**, 1962; HIROCE **et alii**, 1961), hidróxido de trifenil estanho (RIBEIRO **et alii**, 1966), chlorothalonil (CAMPACCI, 1975) e captafol (SONNENBERG & CARVALHO, 1974; AGUILAR **et alii**, 1984) e o sistêmico polioxina (CAMPACCI, 1975), permaneram eficientes na inibição do crescimento micelial "in vitro" de linhagens resistente e sensível ao iprodione.

O surgimento de resistência a um fungicida pode implicar em redução na patogenicidade; mas, de um modo geral, não pode ser concluído que a resistência a dicarboximidas esteja ligada a um decréscimo da patogenicidade (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982).

No primeiro teste de patogenicidade em plântulas de cenoura, utilizando-se diversos isolados sensíveis e resistentes, não ocorreram diferenças marcantes entre eles, mas por sua vez, diferiram bastante da testemunha, que não apresentou nenhuma planta com sintomas durante o período de avaliação, apesar do baixo índice de germinação. Essa baixa germinação foi explicada por LIBERAL (1976) como ausência de embrião ou embrião rudimentar nas sementes (sendo este último bastante comum em cenoura). No entanto, foi observado em ensaio posterior (Tabela 17) que esta ausência de diferença entre isolados sensíveis e resistentes ao iprodione, foi devido à utilização de uma concentração de inóculo elevada (10^3 esporos/ml).

No teste de concentração de inóculo, com-

parando-se uma linhagem sensível e outra resistente, quanto à manifestação de doença, observou-se, nas concentrações mais baixas (10^1 e 10^2 esporos/ml), uma melhor visualização das diferenças de patogenicidade entre o isolado resistente e o sensível, sendo que este último também apresentou maior taxa de desenvolvimento da doença nestas concentrações. No entanto, nas doses mais elevadas, as leituras foram prejudicadas devido à alta concentração de inóculo, não sendo possível distinguir muitas diferenças entre os dois isolados utilizados. Com relação à taxa de desenvolvimento da doença, os níveis relativamente baixos dos coeficientes de determinação em alguns casos, denotam que nestas altas concentrações, o modelo não consegue avaliar a velocidade de desenvolvimento da doença, de forma adequada. Portanto, nestas duas concentrações, os resultados foram prejudicados.

Do mesmo modo, devido à alta concentração de inóculo, não foram observadas diferenças entre o isolado resistente e o sensível, quando inoculados em diversas variedades de cenoura. Apenas na variedade Nantes, o isolado sensível foi mais patogênico que o resistente. Mas na variedade Kuroda, houve inversão de comportamento entre isolados, sendo o resistente mais patogênico. No entanto esta anomalia pode ser explicada pela alta concentração de inóculo, como citado anteriormente, tendo como consequência uma menor acuracidade dos resultados, pois neste caso, o valor do coeficiente de correlação, es-

tã abaixo daquele onde há 95% de probabilidade de que o valor do ângulo da taxa de desenvolvimento da doença obtido, represente a reta e além disso, o coeficiente de determinação está entre os mais baixos, indicando um menor nível de coincidência de pontos com a reta obtida.

Com relação à diferença entre variedades, Brasília, Kuronan e Kuroda foram as mais resistentes, apresentando menor índice de plântulas mortas, assim como menor taxa de desenvolvimento da doença.

Para reduzir a emergência da resistência a fungicidas no campo, DEKKER (1972) afirma que o uso de fungicidas sistêmicos deve ser aplicado preferivelmente em variedades hospedeiras que tenha ao menos um grau moderado de resistência. Assim, de acordo com os dados obtidos, as variedades Brasília, Kuronan e Kuroda devem ser utilizadas como uma medida adicional para diminuir a incidência de linhagens resistentes de *A. dauci* ao fungicida iprodione.

O fato de linhagens resistentes de *A. dauci* ao iprodione terem se mostrado menos competitivos do que as sensíveis quanto à esporulação em BDA e menor patogenicidade, não exclui a necessidade de serem adotadas estratégias anti-resistência pois, sob alta pressão de seleção, linhagens cada vez mais aptas poderão ser selecionadas (DEKKER, 1982a).

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Foram constatadas linhagens resistentes de *Alternaria dauci* ao fungicida iprodione, a partir de amostras provenientes de campos de cultivo de cenoura.
2. Os isolados resistentes ao iprodione mostraram alto nível de resistência a este produto, chegando a crescer até a 4.000 ppm.
3. A obtenção de isolados resistentes in vitro é relativamente fácil, dependendo do tempo e tamanho do inóculo, isto é, quanto maior o período de exposição e do inóculo, maior a possibilidade de ocorrer mutantes espontâneos, a partir de isolados sensíveis.
4. Após dez transferências sucessivas em meio de cultura sem o iprodione, os isolados resistentes não perderam esta característica, quando subcultivados monoconidialmente ou em discos de micélio.

5. De um modo geral, os isolados sensíveis mostraram maior vantagem em relação aos resistentes, em termos de esporulação em meio de BDA.
6. O isolado de *A. dauci* AT-1, resistente ao iprodione, mostrou resistência cruzada aos hidrocarbonetos aromáticos quíntozene e dicloran e ao dicarboximida procimidone.
7. Os fungicidas polioxina, iprodione, captafol e hidróxido de trifetil estanho foram os que mais inibiram o crescimento micelial da linhagem sensível, in vitro. Mas, para a linhagem resistente, os mais eficientes foram captafol e polioxina.
8. Em testes de patogenicidade em sementes, os isolados resistentes se mostraram menos patogênicos em concentrações baixas de inóculo, mas nas concentrações mais elevadas, as diferenças entre linhagens resistentes e sensíveis tenderam a desaparecer.
9. Os cultivares que mostraram maior nível de resistência nos testes de patogenicidade foram Kuronan, Brasília e Kuroda.

7. LITERATURA CITADA

- AGUILAR, J.A.E.; F.J.B; REIFSCHNEIDER & P.T. DELLA VECCHIA, 1984. Eficiência de fungicidas no controle de *Alternaria dauci* em cenoura. *Congresso Brasileiro de Olericultura*, Resumos, Jaboticabal, p. 57.
- BARTHELET, J. & M: VINOT, 1944. Notes sur les maladies des cultures méridionales. *Ann. Épiphyt.*, 11-23, Apud: *The Review of Applied Mycology*, 1947, XXVI: 328.
- BEEVER, R.E. & R.J.W. BYRDE, 1982. Resistance to the dicarboximide fungicides. Apud: DEKKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS (Ed.). *Fungicide resistance in crop protection*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, p. 101-117.
- BITANCOURT, A.A., 1942. Queima (*Macrosporium*) da cenoura. *O Biológico*, São Paulo, 10:82.
- BURGAUD, L.; J. CHEVERL; M. GUILLOT; G. MARECHAL & J. THIOLLIÈRE, 1975. The hydantoin 26, 019 RP, a new polyvalent fungicide. *Proceedings of the 8th British Insecticide and Fungicide Conference*. British Crop Protection Council, London, p. 645-652.

- CAMARGO, L.S., 1984. As hortaliças e seu cultivo. 2ª edição. Fundação Cargill, 448 p.
- CAMPACCI, C.A., 1975. Controle químico da mancha da *Alternaria* da cenoura (*Daucus carota* L.) em Itapeçerica da Serra, SP. *Revista de Olericultura*. 15: 255-230.
- CARVALHO, Y., 1975. Aspectos epidemiológicos da queima das folhas da cenoura (*Daucus carota* L.) causada por *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko. Viçosa, Minas Gerais, 56 p. (Tese de Mestrado).
- CAYLEY, G.R. & G.A. HIDE, 1980. Uptake of iprodione and control of diseases on potato stems. *Pesticide Science*, 11: 15-19.
- CHASTAGNER, G.A. & W.E. VASSEY, 1979. Tolerance of *Botrytis tulipae* to glyphosate and vinclozolin. *Phytopathology*, 69: 914.
- CHUPP, C. & A.F. SHERF, 1960. Vegetable diseases and their control. The Ronald Press Co.. p. 186-188.
- COSTA, C.P.; H. HIKUTA; L.R. BAKER & N. SILVA, 1974. Resistência de campo em cenoura (*Daucus carota* L.) à *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko. *Relat. Cient. Inst. Genét. Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 8: 58-60.

- DAVIDSE, L.C. & W. FLACH, 1977. Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 72: 174-193.
- DAVIDSE, L.C. & W. FLACH, 1978. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochimica Biophysica Acta* 543:82-90.
- DAVIS, R.P. & C. DENNIS, 1979. Use of dicarboximide fungicides on strawberries and potential problems of resistance in *Botrytis cinerea*. Proceedings of the 1979 British Crop. Protection Conference, Brighton, England. British Crop. Protection Council, London, p. 193-201.
- DAVIS, R.P. & C. DENNIS, 1981. Studies on the survival and infective ability of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology* 98: 395-402.
- DELP, C.P., 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Disease* 64: 652-657.
- DEKKER, J., 1977. Resistance. Apud: MARSH, R.W., Ed., Systemic Fungicides. 2^a ed. London, Longman, cap.9, p. 176-197.
- DEKKER, J., 1981. Strategies for avoiding resistance to fungicides. Apud: JENKYN, J.F. & R.T. PLUMB, Eds. Strategies for the Control of cereal disease. Oxford, Blackwell Scientific Publication, p. 123-133.

- DEKKER, J., 1982. Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests? Apud: DEKKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS, Eds. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 128-138.
- DEKKER, J., 1982a. Countermeasures for avoiding fungicide resistance. Apud: DEKKER, J.; S.G. GEORGOPOULOS, Eds. Fungicide resistance in crop protection. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen p. 177-186.
- DEKKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS, 1982. Fungicide resistance in crop protection. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 265 p.
- EDGINGTON, L.V.; R.A. MARTIN; G.C. BRUIN & I.M. PARSONS, 1980. Systemic fungicides: a perspective after 10 years. *Plant Disease* 64: 19-23.
- ELLIOTT, J.A., 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany* 4: 439-476.
- EPTON, H.A.S. & D.V. RICHMOND, 1980. Formation, structure and germination of conidia. Apud: COLEY-SMITH, J. R.; K. VERHOEFF & W.R. JARVIS (Eds.). *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, p. 41-83.

- FIGUEIREDO, M.B., 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani, para a conservação de fungos patogênicos de plantas. *O Biológico*, 33: 9-13.
- FUCHS, A.; S.P. RUIG; J.M. TUYL & F.W. VRIES, 1977. Resistance to triforine: a nonexistent problem? *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83: 189-205.
- GARIBALDI, A. & M.L. GULLINO, 1979. Ulteriori osservazioni sulla resistenza di *Botrytis cinerea* Pers, a Vinclozolin. *Phytopathologia Mediterranea* 18: 147-151.
- GEORGOPOULOS, S.G. & C. ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. *Annual Review of Phytopathology* 5: 109-130.
- GEORGOPOULOS, S.G.; A. KAPPAS & A.C. HASTIE, 1975. Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathology*, 66: 217-220.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1977. Development of fungal resistance to fungicides. Apud: M.R. SIEGEL & H.D. SISLER (Eds.). Antifungal Compounds. Vol. 2, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 439-495.
- GEORGOPOULOS, S.G. & A.C. GRIGORIU, 1981. Metalaxyl resistant strains of *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber greenhouses in Southern Greece. *Plant Disease* 65(9): 729-731.

- GEORGOPOULOS, S.G., 1982. Genetical and biochemical background of fungicide resistance. Apud: DEKKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS, (Eds.). Fungicide Resistance in Crop Protection. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, p. 46-52.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1982 a. Cross-resistance. In: DEKKER, J.; S.G. GEORGOPOULOS (Eds.). Fungicide resistance in crop protection. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, p. 53-59.
- GONÇALVES, R.D., 1950. "Queima" das folhas da cenoura e seu combate. *O Biológico*, São Paulo, 16: 44-45.
- GROVES, J.W. & A.J. SKOLKO, 1944. Notes on seed-borne fungi. II. Alternaria. *Canad. J. Res., Sect. C.*, 5: 217-234.
- GULLINO, M.L. & A. GARIBALDI, 1979. Osservazioni sperimentali sulla resistenza di isolamenti Italiani di *Botrytis cinerea* a vinclozolin. *La difesa delle piante* 6: 341-350.
- GULLINO, M.L. & A. GARIBALDI, 1980. Characterization of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. Pers. Proceedings of the fifth congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Hellenic Phytopathological Society, Athens, p. 160-161.

- GULLINO, M.L. & A. GARIBALDI, 1981. Competition in vitro and in vivo between strains of *Botrytis cinerea* Pers. sensitive and resistant to dicarboximides. *Netherlands Journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6): 243.
- HAWKINS, J.H.; IVES, J.V. & J.F. STOREY, 1959. New or uncommon plant diseases and pests. *Alternaria* leaf blight of carrots. *Pl. Path.* 8: 76.
- HIROCE, R. & C.M. DUARTE, 1961. Ensaio comparativo sobre a eficiência de alguns fungicidas no controle da "queima das folhas" (*Alternaria dauci*) (Kühn) Groves & Skolko da cenoura (*Daucus carota* L.). *Olericultura*, Viçosa, 1: 97-103.
- HOOKE, W.J., 1944. Comparative studies of two carrot leaf diseases. *Phytopathology*, 34: 606-612.
- HSU, K.S., 1963. The genetic basis of actidione resistance in *Neurospora*. *Journal General Microbiology*, 32: 341-347.
- HUNTER, T., R.E. BEEVER, 1982. Resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* on strawberries. Seventh Botrytis Symposium. Aberdeen.
- KATO, T.; Y. HISADA & Y. KAWASE, 1983. Nature of procymidone-tolerant *Botrytis cinerea* strains obtained in vitro. Apud: GEORGHIOU, G.P. & SAITO, T. (Ed.). *Pest Resistance to Pesticide*. Plenum Press, New York, p. 505-524.

- KURAMOTO, T., 1976. Resistance to benomyl and thiophanato methyl in strains of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in Japan. *Plant Dis. Repr.*, 60(2): 168-172.
- LAMBERT, D.H. & P.J. WUEST, 1975. Increased sensitivity to zineb for *Verticillium dahliae* strains tolerant to benomyl. *Phytopathology*. 65: 637-638.
- LANGENBERG, W.J., J.C. SUTTON & T.J. GILLESPIE, 1977. Relation of weather variables and periodicities of airborne spores of *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 67: 879-883.
- LEBEN, C.; D.M. BOONE & G.W. KEITT, 1955. *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. IX. Search of mutants resistant to fungicides. *Phytopathology*, 45: 467-472.
- LEROUX, P.; R. FRITZ & M. GREDT, 1977. Etudes en laboratoire de souches de *Botrytis cinerea* Pers. résistantes à la dichlozoline, au dicloran, au quintozone, à la vinchlozoline et au 26019 RP (ou glycophene). *Phytopathologische Zeitschrift* 89: 347-358.
- LEROUX, P. & R. FRITZ, 1978. Les modes d'action et la sélectivité des fongicides. *Phytiatrie-Phytopharmacie*. 27: 163-188.
- LIBERAL, O.H.T., 1976. Legislação versus germinação em sementes de cenoura (*Daucus carota* L.). *R. Olericultura*, Lavras, 16: 104-107.

- LORBEER, J.W., 1980. Variation in Botrytis and Botryotinia. Apud: COLEY-SMITH, J.R., K. VERHOEFF & W.R. JARVIS (Eds.). The biology of Botrytis. Academic Press, London, p. 19-39.
- LUKENS, R.J. & J.G. HORSFALL, 1973. Processes of sporulation in *Alternaria solani* and their response to metabolic inhibitors. *Phytopathology*, 63(1): 176-182.
- MARAITE, H.; G. GILLES; S. MEUNIER; J. WEYNS & E. BAL, 1981. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. et Pers. to dicarboximide fungicides in strawberry fields. *Parasitica*, Vol. 36, 90-101.
- MAUDE, R.B., 1966. Studies on the etiology of black rot, *Stemphylium radicinum* (Meier, Drechsl. & Eddy) Neerg., and leaf blight, *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko, on carrot crops; and on fungicide control of their seedborne infection phases. *Ann. Appl. Biol.*, 57: 83-93.
- MAUDE, R.B., 1973. Seedborne diseases and their control. Apud: Seed Ecology. W. Heydecker, ed., Pennsylvania State University Press, University Park, 325-335.
- MCPHEE, W.J., 1980. Some characteristics of *Alternaria alternata* strains resistant to iprodione. *Plant Disease*, 64: 847-849.

- MEIER, F.C.; C. DRECHSLER & E.D. EDDY, 1922. Black rot of carrots caused by *Alternaria radicina* n. sp. *Phytopathology*, 12(4): 157-166.
- MISATO, T.; KAKIKI, K. & M. HORI, 1977. Mechanism of polyoxin resistance. *Neth. J. Pl. Path.*, 83: 253-260.
- NEERGAARD, P., 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphyllium*, Copenhagen, E. Munksgaard; London, Oxford, University Press, 560 p. Apud: *The Review of Applied Mycology*, 1946, XXV:579-583.
- NETZER, D. & R.G. KENNETH, 1969. Persistence and transmission of *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko in the semi-arid conditions of Israel. *Ann. Appl. Biol.* 63: 289-294.
- NETZER, D. & R.G. KENNETH, 1970. Apparent heterokaryosis in *Alternaria dauci*. *Can. J. Bot.*, 48: 831-835.
- PÁDUA, J.G.; C.M.F. PINTO & V.M.D. CASALI, 1984. Cultivares de cenoura. Apud: Informe Agropecuário - Umbelíferas nº 120: 15-17.
- PARTRIDGE, A.D. & A.E. RICH, 1962. Induced tolerance to fungicides in three species of fungi. *Phytopathology* 52: 1000-1004.
- PEPIN, H.S. & E.A. MacPHERSON, 1982. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to Benomyl and Captan in the field. *Plant Dis. Repr.*, 66: 404-405.

- REIFSCHNEIDER, F.J.; C.B. SIQUEIRA & C.M.T. CORDEIRO, 1983. Índice de doenças de hortaliças no Brasil; bactérias e fungos. Brasília, EMBRAPA/CNPQ. 156 p.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B., 1984. Doenças fúngicas e bacterianas da cenoura - sintomatologia e controle. Apud: Informe Agropecuário - Umbelíferas nº 120:40-43.
- REZENDE, L.O.C.; M.B. FIGUEIREDO & B.P.B. CRUZ, 1962. Experiências de controle da queima das folhas de cenoura. *Arq. Inst. Biológico*, 29: 83-91.
- RIBEIRO, R.L.D.; S. SUDO, N.R. LEAL & Y. MASUDA, 1966. Ensaio de fungicidas no controle à "queima" da folhagem da cenoura (*Daucus carota* L.) durante o verão. *Revista de Olericultura*, 6: 203-206.
- ROSENBERGER, D.A.; F.W. MEYER & C.V. CECILIA, 1979. Fungicide strategies for control of benomyl-tolerant *Penicillium expansum* in apple storages. *Plant Disease Reporter* 63: 1033-1037.
- SCOTT, D.J. & H.T. WENHAM, 1972. Occurrence of two seed-borne pathogens, *Alternaria radicina* and *Alternaria dauci*, on imported carrot seed in New Zealand. *N.Z.J. Agric. Res.* 16: 247-250.
- SHERALD, J.L., N.N. RAGSDALE & H.D. SISLER, 1973. Similarities between the systemic fungicides triforine and triarimol. *Pesticide Science* 4: 719-727.

SONNEMBERG, P.E. & Y. CARVALHO, 1974. Eficiência de alguns fungicidas no controle da queima das folhas da cenoura (*Daucus carota* L.) por *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko. *Revista de Olericultura*, 14: 125-132.

SONNEMBERG, P.E.; M.S.R. MONTEIRO & J.C. MARTINS, 1979. Comportamento dos cultivares de cenoura 'Tropical', 'Nantes' e 'Kuroda', em diferentes épocas do ano. *R. Olericultura* XVII: 178-185.

SOTEROS, J.J., 1979a. Pathogenicity and control of *Alternaria radicina* and *A. dauci* in carrots. *N.Z.J. Agric. Res.* 22: 191-196.

SOTEROS, J.J., 1979b. Detection of *Alternaria radicina* and *A. dauci* from imported carrot seed in New Zealand. *N.Z.J. Agric. Res.* 22: 185-190.

STRANDBERG, J.O., 1977. Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 67: 1262-1266.

STRANDBERG, J.O., 1983. Infection and colonization of inflorescences and mericarps of carrot by *Alternaria dauci*. *Plant Disease* 67: 1351-1353.

STRANDBERG, J.O., 1984. Efficacy of fungicides against persistence of *Alternaria dauci* on carrot seed. *Plant Disease* 68: 39-42.

- STRIDER, D.L., 1963. Control of Alternaria blight of carrot. *Plant Dis. Rep.* 47(1): 66-69.
- SZTEJNBERG, A. & A.L. JONES, 1978. Tolerance of the brown rot fungus *Monilinia fructicola* to iprodione, vinclozolin and procymidone fungicides. *Phytopathology News.* 12: 187-188.
- THRELFALL, R.J., 1968. The genetics and biochemistry of mutants of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzenes. *Journal of General Microbiology*, 52: 35-44.
- TILLMAN, R.W. & H.D. SISLER, 1973. Effect of chloroneb on the growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology*, 63: 219-225.
- WADE, M., 1982. Resistance to fungicides. *Span*, 25(1): 8-10.
- WEBER, P.V.V.; S.G. YOUNKING & F.L. MERWARTH, 1954. Fungicidal control of Alternaria blight of carrot. *Phytopathology*, 44(2): 112.
- WEBSTER, R.K., J.M. OGAWA & E. BOSE, 1970. Tolerance of *Botrytis cinerea* to 2,6-dichloro-4-nitroaniline. *Phytopathology* 60: 1489-1492.
- WICKS, T., 1974. Tolerance to the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. *Plant Dis. Repr.*, 58: 886-889.

- WICKS, T., 1977. Tolerance to benzimidazole fungicides in blue mold (*Penicillium expansum*) on pears. *Plant Dis. Repr.* 61(6): 447-449.
- WILD, B.L. & L.E. RIPPON, 1975. Response of *Penicillium digitatum* strains to benomyl, thiabendazole and sodium O-phenylphenate. *Phytopathology*, 65: 1176-1177.
- WOLFE, M.S., 1982. Dynamics of the pathogen population in relation to fungicide resistance. Apud: DEKKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS, Eds. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 139-148.
- ZIMMER, R.C. & W.E. McKEEN, 1969. Interaction of light and temperature on the sporulation of carrot foliage pathogen *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 59: 743-749.