ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE Alternaria porri (ELLIS)
CHIF. RESISTENTES A IPRODIONE OBTIDAS IN VITRO.

MARIA LUIZA BRAZ ALVES

Bióloga

Orientador: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

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

Piracicaba

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Alves, Maria Luiza Braz

A474a Adaptabilidade de linhagens de Alternaria Porri
(Ellis) Chif. resistentes à iprodione obtidas in
vitro. Piracicaba, 1990.
130p. ilustr.

Tese - ESALQ

Bibliografia.

1. Cebola - Doença - Controle químico 2. Fungo
fitopatogênico - Resistência ao fungicida I. Esco
la Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pira-
cicaba

CDD 635.25

ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE Alternaria porri (ELLIS)
CHIF. RESISTENTES A IPRODIONE OBTIDAS IN VITRO.

MARIA LUIZA BRAZ ALVES

Aprovada em: 24/05/90

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

Prof. Dr. Keigo Minami

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Orientador

Piracicaba

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1990

Ao meu esposo, Gilberto e aos meus filhos, Gilberto Júnior, Vinicius e Rodrigo, pelo apoio, incentivo, compreensão e carinho recebido durante o desenvolvimento desta pesquisa.

DEDICO

Ao meu pai (in memoriam)
A minha mãe, às minhas irmãs,
Conceição, Eula, Fátima,
Suely e aos amigos, pelo
incentivo e colaboração.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força para alcançar este objetivo;

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela orientação, amizade, compreensão e exemplo;

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao meu esposo, Gilberto Alves, pela compreensão, carinho, estímulo e colaboração na concretização deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelos ensinamentos e amizade;

Aos colegas: Pedro Valarini, Maria Aparecida S. Tanaka, João Vida, Maria do Carmo F. Esteves, Maria Ligia Veiga Carvalho, Suely de Souza Costa, Cristina Dudienas, Maria Heloisa Duarte, pela amizade, convívio e colaboração;

Aos funcionários da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" que contribuíram para a execução desta pesquisa;

As entidades que enviaram materiais vegetais com sintomas de mancha púrpura;

As firmas que contribuíram com defensivos agrícolas;

A professora Dra. Marineia de Lara Haddad pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Tasso Leo Krugner, pela elaboração do "Summary";

Aos meus pais pelo estímulo, orientação, colaboração e aos meus filhos, pela compreensão e carinho nesta fase profissional;

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, permitiram a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xvi
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Aspectos gerais do patógeno	04
2.2. Aspectos gerais da doença	05
2.3. Controle da doença	06
2.4. Resistência à fungicidas	08
2.5. Dicarboximidas	14
2.5.1. Modo de ação	15
2.5.2. Resistência à dicarboximidas	18
3 - MATERIAL E METODOS	34
3.1. Local e época de execução da pesquisa	34
3.2. Obtenção e isolamento de <u>Alternaria porri</u>	34

	Página
3.3. Conservação dos isolados	38
3.4. Frequência de linhagens resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione, no campo	38
3.5. Avaliação do grau de sensibilidade de isolados de <u>A. porri</u> a iprodione	39
3.6. Obtenção de linhagens resistentes a iprodione, <u>in vitro</u>	40
3.7. Influência do tamanho do inóculo no surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> , a iprodione	41
3.8. Efeito da concentração de iprodione e período de incubação sobre o surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> ao fungicida	42
3.9. Frequência de mutantes	43
3.10. Estabilidade da resistência	44
3.11. Sensibilidade de linhagens de <u>A. porri</u> sensíveis e resistentes a iprodione, à diferentes fungicidas	45
3.12. Adaptabilidade de linhagens de <u>A. porri</u> resistentes a iprodione	47
3.12.1. Crescimento micelial	47
3.12.2. Esporulação	48
3.12.3. Crescimento micelial de linhagens resistentes em doses crescentes de iprodione	49
3.12.4. Competição	50

	Página
3.12.4.1. Esporos	50
3.12.4.2. Micélio	52
3.12.5. Patogenicidade	53
3.12.5.1. Folhas destacadas de cebola	53
3.12.5.1.1. Reação de cultivar	54
3.12.5.1.2. Seleção de métodos de inoculação e meio para cultivo de inóculo	56
3.12.5.1.3. Patogenicidade de linhagens sensíveis e resistentes	56
3.12.5.2. Sementes	57
3.13. Efeito de iprodione e iprodione acrescido de thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione, em sementes de cebola do cultivar Granex-33	58
4 - RESULTADOS	60
4.1. Frequência de linhagens resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione, no campo	60
4.2. Avaliação do grau de sensibilidade de isolados de <u>A. porri</u> a iprodione	60
4.3. Obtenção de linhagens resistentes a iprodione, <u>in</u> <u>vitro</u>	63
4.4. Influência do tamanho do inóculo no surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione ..	67
4.5. Efeito de concentração de iprodione e período de	

	Página
incubação sobre o surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> ao fungicida 69	69
4.6. Frequência de mutantes 69	69
4.7. Estabilidade da resistência 72	72
4.8. Sensibilidade de linhagens de <u>A. porri</u> à diferentes fungicidas 72	72
4.9. Adaptabilidade de linhagens de <u>A. porri</u> resistentes a iprodione 88	88
4.10. Efeito de iprodione e iprodione acrescido de thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens de <u>A. porri</u> em sementes de cebola do cultivar Granex-33 96	96
5 - DISCUSSÃO 101	101
6 - CONCLUSÃO 110	110
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112	112

LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Relação de isolados de <u>A. porri</u> empregados nos experimentos deste trabalho	35
2 - Fungicidas utilizados nos experimentos	46
3 - Efeito de iprodione sobre o crescimento micelial dos isolados de <u>A. porri</u>	61
4 - Efeito de iprodione a 1 e 10 ppm sobre o crescimento dos isolados de <u>A. porri</u> sensíveis ao produto aos 6 dias de incubação	64
5 - Efeito de dosagens sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes ao fungicida, aos 8 dias de incubação	65
6 - Efeito do tamanho do inóculo (AP-30-S) sobre o surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione, aos 8 dias de incubação	68
7 - Efeito da concentração de iprodione e período de incubação no surgimento de setores resistentes de <u>A. porri</u> ao fungicida	70

8 - Frequência de mutantes de <u>A. porri</u> resistentes a iprodione	72
9 - Efeito de dosagens de iprodione sobre o crescimento de linhagens resistentes de <u>A. porri</u> resistentes ao produto após transferências sucessivas em meio de BDA isento deste fungicida	73
10 - Efeito de dosagens de anilazine sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	75
11 - Efeito de dosagens de benomyl sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	76
12 - Efeito de dosagens de dicloran sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	77
13 - Efeito de dosagens de dichlofluanide sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	78
14 - Efeito de dosagens de iprodione sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	79
15 - Efeito de dosagens de iprodione + thiram sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	80

Página

16 - Efeito de dosagens de mancozeb sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	81
17 - Efeito de dosagens de metalaxyl sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	82
18 - Efeito de dosagens de procymidone sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	83
19 - Efeito de dosagens de quintozene sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	84
20 - Efeito de dosagens de vinclozolin sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de <u>A. porri</u> a iprodione	85
21 - Faixa de concentração de fungicidas (ppm) que contém a dose suficiente para inibir 50% do crescimento micelial (DE 50) das linhagens de <u>A. porri</u> sensíveis e resistentes a iprodione	86
22 - Esporulação de linhagens de <u>A. porri</u> , em BDA	89
23 - Crescimento micelial de linhagens de <u>A. porri</u> sensíveis e resistentes a iprodione em meio de BDA	90
24 - Efeito de dosagens crescentes de iprodione sobre o crescimento micelial de linhagens resistentes de <u>A.</u>	

Página

<u>porri</u> ao produto, aos 7 dias de incubação	91
25 - Competição entre linhagens de <u>A. porri</u> resistentes e sensíveis a iprodione <u>in vitro</u>	93
26 - Efeito do método de inoculação e meios de cultivo sobre o índice de doença de <u>A. porri</u> (AP-34-S) em folhas de cebola destacadas do cultivar Granex-33 ..	94
27 - Patogenicidade de linhagens de <u>A. porri</u> em folhas de cebola destacadas do cultivar Granex-33	96
28 - Efeito do período de inoculação (PI) de sementes de cebola do cultivar Granex-33 sobre o índice de doença de linhagem sensível (AP-34-S) e resistente (AP-34-R) de <u>A. porri</u> a iprodione	97
29 - Índice de doença de linhagens de <u>A. porri</u> , em plântulas de cebola, 6 dias após o plantio	98
30 - Efeito de iprodione e mistura de iprodione + thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens de <u>A. porri</u> , em sementes do cultivar Granex-33	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Efeito de iprodione (1 ppm) sobre o crescimento micelial de <u>A. porri</u>	66
2 - Efeito de fungicidas a 100 ppm sobre o crescimento micelial (PC - Porcentagem de crescimento) de linhagens de A. <u>porri</u>	87

ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE Alternaria porri (ELLIS)
CHIF. RESISTENTES A IPRODIONE OBTIDAS IN VITRO

Autor: MARIA LUIZA BRAZ ALVES

Orientador: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Trinta e três isolados de Alternaria porri foram avaliados quanto à resistência a iprodione através do método de fungicida incorporado ao meio-de-cultura, os quais não apresentaram crescimento micelial em meio contendo 100 e 1000 ppm do produto, observando-se no entanto, a presença de setores resistentes nas concentrações testadas.

Linhagens resistentes a iprodione, obtidas em laboratório a partir destes setores, mostraram um alto nível de resistência ao fungicida e alta estabilidade, mantendo a característica resistência após 15 transferências em meio isento do fungicida.

O tamanho do inóculo, a concentração do fungicida

e o período de incubação influenciaram o surgimento de setores resistentes in vitro.

A frequência de linhagens resistentes em uma população sensível é baixa, só aparecendo após longo período de incubação (9 dias) numa concentração aproximada de 10^5 esporos/ml.

A adaptabilidade das linhagens resistentes, avaliadas através dos parâmetros: crescimento micelial, esporulação, competitividade e patogenicidade, de um modo geral foi menor nas linhagens resistentes.

Testes de patogenicidade através de inoculação de sementes possibilitou melhor visualização da diferença entre as linhagens sensíveis e resistentes e a avaliação precoce de níveis de resistência do cultivares.

As linhagens resistentes a iprodione mostraram resistência cruzada aos hidrocarbonetos aromáticos quintozene e dicloran e aos dicarboximidas procymidone e vinclozolin. Os fungicidas dichlofluanide e iprodione + thiram mostraram-se mais eficientes tanto para as linhagens resistentes quanto para as sensíveis a iprodione.

O tratamento de sementes previamente inoculadas com iprodione + thiram, erradicativamente, reduziu o índice de doença em plântulas, mais acentuadamente que o tratamento com o fungicida iprodione isolado, tanto para as linhagens sensíveis quanto para as resistentes.

ADAPTABILITY OF IPRODIONE RESISTANT STRAINS OF
Alternaria porri (ELLIS) CHIF. OBTAINED IN VITRO

Author: MARIA LUIZA BRAZ ALVES

Adviser: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

Thirty three isolates of Alternaria porri were evaluated with respect to iprodione resistance by using the method of fungicide incorporation into the culture medium. These isolates did not show mycelial growth at the concentrations of 100 and 1000 ppm of the product, the presence of resistant sectors at the tested concentrations being however observed.

Iprodione resistant strains obtained from these sectors in the laboratory showed a high level of resistance to the fungicide and stability, maintaining the resistance character after 15 transfers on medium without the fungicide.

The size of inoculum, the fungicide concentration and the incubation period influenced the appearance of resistant sectors in vitro.

The frequency of resistant strains in a sensible population was low. They only appear after a long period of incubation (a days) at a concentration of approximately 10^5 espores/ml.

The adaptability of resistant strains, evaluated by their mycelial growth, sporulation, competitiveness and pathogenicity, was in general lower than that of the non-resistant ones.

Pathogenicity tests performed through seed inoculation gave a better differentiation between sensible and resistant strains with respect to early resistance levels.

Iprodione resistant strains showed crossed resistance to the aromatic hidrocarbons quintozone and dichloran and to the dicarboximides procymidone and vinclozolin. The fungicides dichlofluanide and iprodione + thiram were more efficient for both the sensible and resistant strains.

Erradicant seed treatment with iprodione + thiram reduced seedling disease index more pronouncedly the treatment with iprodione alone, for both sensible and resistant strains.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de cebola sendo, atualmente, os estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul responsáveis por quase 90 por cento da produção nacional (PROGNÓSTICO 86/87, 1987).

A produtividade desta cultura pode ser afetada pelo tipo de variedade plantada, pelas condições climáticas adversas, assim como, pela grande incidência de doenças, tanto no campo quanto no período de armazenamento.

Dentre as doenças que atingem esta liliácea pode se destacar a mancha púrpura causada por Alternaria porri (Ellis) Chif., cujo agente causal encontra-se disseminado nas diferentes regiões do país. Esta doença pode ocasionar sérios danos à produção afetando a qualidade dos bulbos e das sementes (KIMATI, 1980).

Buscando a redução da doença no campo, são adotadas diversas medidas de controle, tais como: o plantio de cultivares com maior nível de resistência baseado, principalmente, no nível de cerosidade das folhas; a adoção de práticas culturais adequadas e o emprego de

controle químico.

Esta última medida vem sendo bastante empregada em plantios comerciais visando a garantia da produção. Diversos produtos protetores químicos são recomendados para o controle da mancha púrpura. Entretanto, na década passada, foi lançado um produto sistêmico, iprodione, visando o controle principalmente de Botrytis cinerea. Posteriormente foi comprovada a eficiência deste produto no controle de patógenos foliares da cebola (SINIGAGLIA et alii, 1984; FERREIRA & CASTELLANE, 1988), assim os cebolicultores passaram a empregá-lo particularmente em situações de difícil controle da doença.

O fungicida iprodione é um produto sistêmico e desta forma possui um elevado grau de especificidade bioquímica, atuando apenas em um ou poucos sítios bioquímicos específicos do patógeno. A mutação de poucos genes no patógeno podem induzir alterações neste sítio de ação e conseqüentemente ocorrer linhagens resistentes ao produto.

Diversas ocorrências de linhagens de fungos resistentes a iprodione têm sido registradas tanto no laboratório quanto no campo (BEEVER & BYRDE, 1982). Assim, havendo a possibilidade de ocorrer o problema da resistência em campo também em Alternaria porri, este trabalho tem por objetivos: 1) determinar a ocorrência natural e grau de resistência dos isolados de A. porri a

iprodione; 2) determinar a frequência de surgimento de mutantes resistentes in vitro; 3) determinar a sensibilidade colateral das linhagens resistentes a outros fungicidas empregados na cultura de cebola e; 4) avaliar a adaptabilidade e a estabilidade das linhagens resistentes a iprodione.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais do Patógeno

Alternaria porri (Ellis) Chif., agente causal da mancha púrpura da cebola, pertence à classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales e, forma conidióforos isolados ou agrupados, eretos ou pouco curvados, septados, de cor marrom-claro, apresentando 120 μm de comprimento e 5-10 μm de largura, com 1 ou mais conídios bem definidos no ápice. O conídio é geralmente solitário, ereto ou curvo obclavado, com o corpo elipsoidal afilando para a ponta, a qual normalmente possui a mesma largura do corpo mas podendo oscilar. A cor do conídio é marrom claro dourada, sendo liso ou suavemente verrugoso, com o comprimento variando de 100-300 μm e 15-20 μm de largura na parte mais larga. Possui 8-12 septos transversais e nenhum ou vários septos longitudinais ou oblíquos (ELLIS, 1971).

Morfologicamente A. porri é muito semelhante a A. solani pelo que alguns autores consideram-nas uma mesma espécie, dando ao último fungo o nome de A. porri f. sp.

solani (ROTEM, 1968).

Muitos fungos do gênero Alternaria não esporulam satisfatoriamente em meio de cultura. Diversos pesquisadores avaliaram meios-de-cultura e condições de incubação visando a obtenção de esporos deste gênero in vitro (RANDS, 1917; FAHIM, 1966; SHAHIN & SHEPARD, 1979).

Estes últimos autores constataram que o meio de carbonato de cálcio, com 100% de umidade proporcionava elevada esporulação em diversas espécies de Alternaria. Mas BOVEDA (1986) testando o meio de cultura, anteriormente citado, verificou que era possível obter maior esporulação eliminando-se a água que fora utilizada para elevar a umidade do meio e incubando-se o patógeno em condições de luz alternada de 12 horas de escuro e 12 horas de luz próxima a ultra-violeta (NUV).

A luz é citada como um dos fatores fundamentais na esporulação de espécies de Alternaria in vitro (VAKALOUNAKIS & CHRISTIAS, 1986; KUMAGAI, 1986).

2.2. Aspectos gerais da doença

A mancha púrpura causa sérios problemas à produção de bulbos e sementes em cebola (NEERGAARD, 1977; KIMATI, 1980; JACCOUD FILHO et alii, 1985).

Os sintomas nas folhas variam em função da umidade

relativa. Em períodos de alta umidade observa-se sintomas típicos da doença tais como, manchas escuras a púrpuras com halos concêntricos em torno do ponto de infecção mas em períodos secos podem aparecer lesões esbranquiçadas estêreis (BOCK, 1964).

A suscetibilidade da cultura de cebola a A. porri varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, sendo os danos mais acentuados em folhas mais velhas (MILLER, 1983; GUPTA & PATHAK, 1986).

A produção de bulbo e sementes decresce com o aumento da severidade da doença no campo, sendo a perda de produção mais acentuada em sementes que em bulbos (GUPTA & PATHAK, 1988).

2.3 Controle da doença

Para obtenção de um controle efetivo da mancha púrpura, recomenda-se o emprego de práticas culturais apropriadas, associadas ao plantio de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas.

A resistência dos cultivares à doença está relacionada com a espessura da cutícula e a deposição de ceras nas folhas e hastes florais. Cultivares resistentes apresentam cutículas mais espessas. No entanto, se houver ferimentos ocasionados por insetos ou ferramentas, o

patógeno poderá penetrar no tecido do hospedeiro e provocar infecção independentemente do nível de resistência da planta (JONES & MANN, 1963 ; FERREIRA, 1983). Os cultivares "Roxa do Barreiro", "Monte Alegre", "Baia Periforme do Rio Grande", "Baia Periforme de Piracicaba", "Precoce Piracicaba", são recomendados para obtenção de um controle mais eficaz da doença (SILVEIRA et alii, 1971; KIMATI, 1980; MASCARENHAS, 1980).

Além do emprego de cultivares resistentes e da adoção de práticas culturais, a aplicação do controle químico é imprescindível para assegurar uma boa produção de bulbos e sementes nesta cultura. Vários produtos químicos têm sido indicados: acetato de trifenil estanho associado ao espalhante Du Pont (LIMA et alii, 1962) mancozeb e dicloran (BOCK, 1964); metalaxyl (RAMOS, et alii, 1984); mancozeb alternado com captafol (SINIGAGLIA et alii, 1984); iprodione (SINIGAGLIA et alii, 1984; KIMATI et alii, 1986; FERREIRA & CASTELLANE, 1988). Este último fungicida vem sendo recomendado em caso de altas infecções visando a cura do tecido afetado.

Tratando-se de um produto sistêmico, apesar de sua eficácia comprovada, o uso abusivo deste fungicida no campo pode gerar um sério problema que é o surgimento de linhagens resistentes.

2.4. Resistência a fungicidas

Há várias décadas atrás, já existiam diversas citações sobre a ocorrência de resistência de bactéria a antibióticos e de insetos a inseticidas (GEORGHIOU & MELLOW, 1983), mas só a partir de 1960, foram constatados problemas decorrentes da resistência do microorganismo-alvo a fungicidas. Esta época coincide com a introdução de fungicidas sistêmicos na agricultura, visando ao tratamento curativo e erradicativo de doenças de plantas.

No entanto, a seletividade dos fungicidas modernos, é indubitavelmente a base de sua vulnerabilidade (KIMATI, 1987).

Assim em 1969, SCHROEDER & PROVVIDENTI (1969), obtiveram linhagens resistentes a benomyl de Sphaerotheca fuliginea em culturas de pepino tratadas com este produto. Mais tarde, DEKKER (1977) encontrou linhagens resistentes de Cladosporium cucumerinum a 6-azauracil, em condições de laboratório.

A partir desta época, vários casos de ocorrência de linhagens resistentes a fungicidas foram citados na literatura (OGAWA et alii, 1983).

O desenvolvimento de resistência a fungicida no campo resulta normalmente de um uso exclusivo e intensivo de um único tipo de fungicida. Com a suspensão da aplicação do produto, a população resistente tenderá a diminuir. Miura

& Takahashi,¹ citados por UESUGI (1981), trabalhando com Pyricularia oryzae resistente a kasugamicina, verificaram que, com a suspensão do produto, houve um decréscimo acentuado de linhagens resistentes no campo.

Em uma população fúngica, originalmente sensível a um determinado produto químico podem surgir ou já existir formas que são menos sensíveis ao fungicida. O decréscimo de sensibilidade pode ser causado por alterações genéticas, fisiológicas ou adaptação da célula fúngica. As alterações não genéticas, podem ser instáveis e desaparecer na ausência do produto. Entretanto as mudanças genéticas permanecem, mesmo na ausência do produto, podendo transformar-se em um problema sério para o agricultor, para a indústria química responsável e para a produção agrícola envolvida. A pressão de seleção do produto aplicado sobre o patógeno-alvo pode ser um fator determinante no surgimento de linhagens resistentes. Se o produto é aplicado puro e por longo tempo, em aplicações frequentes pode tornar-se indutor de linhagens resistentes (DEKKER, 1982 b).

Segundo KOLLER & SCHEINPFLUG (1987), quanto menor a especificidade quanto ao modo de ação de um fungicida, menor a chance de ocorrência de linhagens resistentes.

-
1. MIURA, H.; ITO, H., I TAKAHASHI, S. Occurrence of resistant strains of Pyricularia oryzae to kasugamycin as a cause of the diminished fungicidal activity to rice blast; Annals Phytopathological Society of Japan, s.l., 42: 117-123, 1975.

Como exemplo disto têm-se os produtos convencionais, os quais interferem em diversas formas metabólicas do patógeno e necessitam de várias modificações no seu genoma para desencadear o processo de resistência, sendo assim, extremamente rara a ocorrência de linhagens resistentes devido à aplicação destes produtos.

Por outro lado, os fungicidas sistêmicos têm um alto grau de especificidade bioquímica e inibem somente um ou poucos sítios específicos no patógeno. Assim, a modificação em um único gen é suficiente para induzir alteração no sítio de ação do produto, consequentemente possibilitando o desenvolvimento de linhagens resistentes. No entanto, esta população pode ser mascarada pela presença mais acentuada da linhagem selvagem (WOLFE, 1982).

Quando se detecta a falha de controle de uma doença, no campo, após aplicação de um produto químico originalmente eficiente, pode-se estar frente a um problema de surgimento de linhagens resistentes ao fungicida, fato este, que poderá ser confirmado através de testes em laboratório e casa-de-vegetação (OGAWA et alii, 1983).

O surgimento de linhagens resistentes está intrinsecamente associada ao tamanho do ciclo reprodutivo do patógeno e ao tempo de atividade do fungicida. Quanto menor o ciclo do patógeno e maior o período ativo do produto, maior será a probabilidade de ocorrência de mutantes resistentes (GILPATRICK, 1983).

Alguns parâmetros estudados em laboratório e casa-de-vegetação, tais como, adaptabilidade de linhagens resistentes, podem fornecer subsídios para a previsão de prováveis consequências que poderão advir da expansão da população resistente no campo (DEKKER, 1982 b).

Segundo este autor, a adaptabilidade, isto é, a virulência e ou habilidade competitiva destas linhagens, é um fator importante no estabelecimento das mesmas. Se a mutação para resistência ou adaptação ao produto afetar negativamente a sua adaptabilidade, dificilmente esta nova população poderá ser dominante. Caso contrário, o fungicida seletivamente reduzirá ou eliminará a linhagem sensível e a população resistente poderá sobreviver e disseminar.

Segundo WADE (1982), a taxa de sobrevivência e a disseminação das linhagens resistentes depende: a) do grau de resistência adquirido pelos mutantes; b) do número de esporos resistentes dentro da população selvagem; c) da quantidade de inóculo que sobreviveu para a próxima estação; d) do tipo de doença; e) da intensidade do uso do fungicida. A intensidade do uso de fungicida é uma função composta por cinco fatores: a dose aplicada, o número de aplicação por estação, a área tratada, a eficiência da aplicação e a persistência do químico. Outro parâmetro crucial é a pressão de seleção exercida sobre a população do patógeno, principalmente quando se usa um único tipo de fungicida. Neste caso, a emergência de linhagens

resistentes é rápida e pode tornar-se dominante.

A emergência de linhagens resistentes, in vitro, não é um indicativo seguro de que este produto possa falhar no controle da doença no campo. O surgimento de linhagens resistentes, no campo, depende de vários fatores: probabilidade de infecção, a velocidade de colonização do tecido hospedeiro e o grau de esporulação do mutante, os quais dependerão do nível de adaptabilidade das linhagens resistentes (DEKKER, 1982 b).

No campo a ocorrência de linhagens resistentes é rara. Como estas linhagens surgiram há menos de 3 décadas, provavelmente não se adaptaram integralmente ao meio ambiente. Esta baixa adaptabilidade tem sido observada pelo decréscimo da taxa de crescimento, da esporulação e da virulência em relação à linhagem selvagem (BEEVER et alii, 1989). Além disto, a competição entre estas linhagens pelo espaço e por nutrientes pode ser outro fator importante no estabelecimento das linhagens resistentes no campo.

Dentre os fatores que favorecem a emergência de linhagens resistentes no campo, o uso de fungicida pode ser controlado. Como citado, o uso exclusivo e intensivo de um produto é a causa da emergência de linhagens resistentes. Assim, o uso de dois ou mais fungicidas alternados ou em misturas, pertencentes a grupo e mecanismo bioquímico de ação distintos pode ser uma alternativa para evitar o desenvolvimento de resistência (CHIN, 1987).

Segundo WADE (1982), quando não se pode evitar o emprego de um determinado fungicida propenso a induzir resistência, deve-se minimizar a pressão de seleção exercida por ele sobre o patógeno através de: a) aplicação somente em épocas críticas do ano; b) redução da dose e frequência de aplicação ao mínimo necessário para um controle econômico; c) seleção de um método de aplicação que minimize a exposição do patógeno ao químico; d) limitação da área tratada; e) aplicação do produto, curativamente, logo após o início da infecção; f) aplicação do produto em combinação com outras medidas de controle.

Uma estratégia na aplicação de um fungicida consiste em minimizar a exposição da população do patógeno a um produto químico, embora mantendo um nível aceitável de controle da doença. Para isto, torna-se necessário estabelecer o nível tolerável da doença na cultura estudada sem acarretar-lhe perdas econômicas, evitando, assim, a aplicação excessiva de fungicidas. O incremento de monitoramento e de sistema de previsão de doença, bem como o uso mais adequado de variedades resistentes e novas tecnologias de aplicação de fungicidas são fatores muito importantes dentro da sistemática de uso de fungicidas (GILPATRICK, 1983).

Nesta última década, têm sido formuladas misturas de fungicidas de sítio específico com fungicidas de contato, visando minimizar os problemas relativos à resistência de

patógenos a estes produtos. Resultados favoráveis empregando esta estratégia foram encontrados por SANDERS et alii (1985), SAMOUCOA & GISI (1987) e SAMOUCOA & COHEN (1988).

UESUGI (1981) discute ainda que um conhecimento maior sobre as características fisiológicas e bioquímicas das linhagens resistentes oferecerá novas alternativas na prevenção contra a resistência, visto que várias pesquisas já evidenciaram diferença entre as linhagens sensíveis e resistentes a fungicidas.

2.5. Dicarboximidas

Os fungicidas do grupo dos dicarboximidas, surgiram na década de 70. Neste grupo, estão reunidos os fungicidas vinclozolin, iprodione e procymidone (BEEVER & BYRDE, 1982).

Os dicarboximidas, inicialmente, foram lançados no mercado como produtos não sistêmicos. Entretanto CAYLEY & HIDE (1980), ao aplicar o fungicida iprodione em raízes de batata, detectaram o produto na parte aérea da planta. A detecção foi dependente do tipo de solo empregado.

Estes fungicidas possuem um amplo espectro de ação, abrangendo diversos gêneros de fungos causadores de doenças de plantas, tais como Botrytis cinerea (PAPPAS et

alii, 1979), Sclerotinia homoeocarpa(DETWEILER, et alii, 1983), Monilinia laxa (KATAN & SHABI, 1982), Sclerotinia minor (PORTER & PHIPPS, 1985), Ophiostoma ulmi (MITCHELL, 1987), Alternaria alternata (HUTTON, 1988), Monilinia fructicola (RITCHIE, 1982), Rhizoctonia solani, (PASINI, et alii, 1985), Alternaria porri (MIURA, 1985) entre outros.

Neste grupo, o fungicida iprodione tem sido o mais amplamente empregado. No Brasil, tem sido recomendado para o controle de Botrytis cinerea, de Monilinia, de Sclerotium cepivorum, de Alternaria dauci e de Alternaria porri (KIMATI et alii, 1986).

2.5.1. Modo de ação

O mecanismo de ação dos dicarboximidas é bastante discutido. PAPPAS & FISHER (1979) comparando o mecanismo de ação de vinclozolin, procymidone, iprodione e prochloraz, verificaram que todos eles inibiam o crescimento micelial mais que a germinação dos esporos de Botrytis cinerea. Nenhum dos compostos afetou a respiração, a permeabilidade da membrana ou a produção de RNA, mas o iprodione inibiu a síntese de DNA. Estes fungicidas alteraram a composição lipídica do fungo, entretanto o iprodione não inibiu a produção de triglicerídios. Iprodione e prochloraz reduziram

a biossíntese de esterol. De acordo com os resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que, embora o mecanismo de ação dos dicarboximidas não esteja totalmente elucidado, há evidências de que ele não seja uniforme para este grupo de fungicida, apesar da similaridade da fórmula estrutural destes produtos.

Neste mesmo ano, COOKE et alii (1979) observaram que o iprodione, ao ser dissolvido em solução alcoólica, sofre um desarranjo estrutural e que este isômero formado se mostrou menos fungitóxico ao crescimento micelial de Botrytis cinerea, quando comparado com o produto puro, divergindo, assim, dos fungicidas vinclozolin e procymidone, os quais mantiveram inalterado seu poder fungitóxico. Este resultado poderia justificar, parcialmente, as divergências observadas por PAPPAS & FISHER (1979) quanto ao modo de ação dos dicarboximidas.

Hisada et alii, citados por BEEVER & BYRDE (1982), verificaram que uma concentração inibitória de procymidone estimulou a síntese da parede celular de Botrytis cinerea aumentando seu peso mas não afetando seriamente a sua composição.

Em 1975, GEORGOPOULOS et alii (1979), estudando o

-
1. HISADA, Y.; KATO, T. ; KAWASE, Y. Mechanism of antifungal action of procymidone in Botrytis cinerea. Annals of the Phytopathological Society of Japan, s. l., 44: 509-518, 1978.

efeito de iprodione, procymidone e vinclozolin sobre a mitose de Aspergillus nidulans, encontraram um incremento considerável na frequência de recombinação mitótica deste organismo na presença dos produtos, sendo o efeito dependente da concentração usada. Provavelmente, o mecanismo pelo qual estes fungicidas aumentam a recombinação mitótica é responsável parcialmente pela fungitoxidade dos mesmos.

Os dicarboximidas, apesar de mais potentes, não diferem em sua atividade dos membros do grupo hidrocarbonetos aromáticos (GEORGOPOULOS et alii, 1979). A existência de mecanismo de ação semelhante entre estes dois grupos de fungicidas poderia justificar a ocorrência de resistência cruzada entre eles (GEORGOPOULOS, 1982a).

O modo de ação dos dicarboximidas, entretanto, é ainda obscuro. GEORGOPOULOS et alii (1976) constataram uma interferência mitótica em Aspergillus nidulans, causada por iprodione, vinclozolin e procymidone, o que poderia aumentar o volume protoplástico do fungo, e concluíram que o aumento protoplasmático associado à incapacidade da célula dividir-se, na presença do fungicida, poderia ocasionar o rompimento da parede celular e conseqüentemente a germinação do conídio.

Segundo DAVIS & DENNIS (1981a), a germinação de esporos e a formação de tubos germinativos na presença dos

fungicidas dicarboximidas são fortes indícios de que estes produtos afetam a parede celular ou a integridade da membrana direta ou indiretamente.

2.5.2. Resistência a dicarboximidas

A obtenção de linhagens resistentes a dicarboximida em laboratório é bastante comum. Estas linhagens, geralmente, são obtidas a partir da segregação da linhagem selvagem crescida em meio contendo o fungicida (KATAN & SHABI, 1982; NORTHOVER, 1983; GHINI, 1987).

No campo, a presença de linhagens resistentes pode ser observada, mas, muitas vezes, não está associada à perda da eficácia do fungicida (BEEVER & BRIEN, 1983; NOWACKA, 1987). No entanto, dados de ocorrência de linhagens resistentes associadas à perda da eficácia do fungicida, apesar de raros, podem ser encontrados na literatura (CHASTAGNER & VASSEY, 1979; BEEVER et alii, 1989).

Um dos trabalhos pioneiros detectando a resistência de Botrytis cinerea a dicarboximidas e a benomyl foi realizado por PAPPAS et alii (1979). Os autores obtiveram um isolado do patógeno resistente a vinclozolin, procymidone e iprodione em plantio de morangos inoculado com um isolado resistente a benomyl e tratado com iprodione. Este isolado manteve sua resistência ao benomyl e mostrou

também resistência cruzada ao quintozene e dicloran. Inoculações feitas sobre frutos de morango destacados mostraram que o isolado resistente foi tão virulento quanto o sensível aos fungicidas testados.

Diversos autores têm conduzidos estudos visando evidenciar a presença de dois grupos distintos de linhagens quanto ao nível de resistência a dicarboximidas: linhagens com baixo nível de resistência e linhagens com alto nível de resistência (DAVIS & DENIS, 1981b; BEEVER et alii, 1989).

De um modo geral, isolados resistentes a dicarboximida encontrados em condições de campo, apresentam um baixo nível de resistência, sendo esporádicos os casos com DE50 maior que 10 ppm. Entretanto linhagens com alto nível de resistência podem ser facilmente observadas in vitro (BEEVER, 1983). Isolados com alto nível de resistência obtidos em campo, normalmente apresentam crescimento micelial reduzido, baixa esporulação, alta sensibilidade osmótica e, conseqüentemente, baixa adaptabilidade, fato este que poderia esclarecer a sua rara ocorrência em condições naturais, mesmo na presença de dicarboximida (DAVIS & DENNIS, 1981b).

Por outro lado, os isolados com baixo nível de resistência são mais adaptados e mais frequentes na natureza, entretanto não se encontram associados à perda de controle da doença.

WANG et alii (1986) isolaram linhagens com baixo

nível de resistência a dicarboximida (DE50=1a2,4ppm) em plantio de alface tratado com iprodione, sendo que, em laboratório, foram obtidas linhagens com alto nível de resistência. Entretanto as linhagens obtidas em laboratório foram menos adaptadas que aquelas encontradas no campo.

Dando continuidade a estes estudos, WANG & COLEY SMITH (1986) verificaram que os isolados de Botrytis cinerea resistentes a dicarboximidas, com alto nível de resistência, cresceram pobremente e apresentaram baixa taxa de esporulação sobre cotilédones de pepino e folhas de alface, enquanto os isolados obtidos do campo, com baixo nível de resistência, mostraram-se semelhante aos isolados sensíveis nestes aspectos estudados. Em estudos de competição realizados, através de mistura de populações sensíveis e resistentes, não foi possível recuperar isolados com alta resistência na ausência de dicarboximidas, recuperando apenas uma pequena porcentagem de isolados moderadamente resistentes.

BEEVER et alii (1989), estudando a competição entre linhagens de Botrytis cinerea, verificaram que as de baixo nível de resistência a dicarboximida isoladas de uva competiam muito bem com as sensíveis, em meio-de-cultura, mas, quando inoculadas em frutos, desapareciam rapidamente da população. Esta diferença em comportamento pode ser explicada pela presença de alta pressão osmótica nos frutos

de uva.

Estudos realizados, nesta última década, têm evidenciado que os mutantes resistentes a dicarboximida são mais sensíveis a meios-de-cultura com alta pressão osmótica.

Segundo os estudos realizados por GRINDLE (1984), mutantes de Neurospora crassa resistentes a vinclozolin, obtidos em laboratório, foram mais resistentes que o isolado selvagem aos fungicidas cloroneb, dicloran, iprodione, procymidone, quintozene, mas permaneceram sensíveis a benomyl, captan, clorotalonil e cycloheximide. A resistência a dicarboximida associou-se à redução de crescimento e esporulação destas linhagens em meio-de-cultura, principalmente quando suplementado com cloreto de sódio ou nutrientes orgânicos, pois os mutantes mostraram-se muito sensíveis ao meio contendo alta pressão osmótica. A sensibilidade osmótica pode ser devido à alteração da parede celular dos mutantes, tornando-os mais sensíveis às mudanças na concentração dos solutos no citoplasma fúngico ou no ambiente externo. Segundo PERKINS et alii (1982), muitos mutantes osmóticos têm composição anormal da parede celular.

Em Nova Zelândia, BEEVER et alii (1989), encontraram linhagens de Botrytis cinerea resistentes tanto a benzimidazóis quanto a dicarboximida. As linhagens resistentes a benzimidazóis apresentaram um alto nível de

resistência (DE50 maior que 100 ppm de carbendazim) enquanto as resistentes a dicarboximida apresentaram baixo nível de resistência. As linhagens resistentes a dicarboximida foram divididas em dois subgrupos, de acordo com o crescimento apresentado em meio-de-cultura acrescido de cloreto de sódio. O primeiro subgrupo formou uma densa margem sobre este meio e apresentou DE50 para crescimento micelial sobre meio com iprodione de 3,2 ppm, enquanto o segundo grupo formou uma margem fibrilosa e apresentou DE50 de 1,3 ppm. Estes subgrupos apresentaram taxa de crescimento micelial e produção de conídios semelhantes, embora um pouco mais reduzidos no segundo subgrupo. O primeiro subgrupo apresentou-se menos competitivo e menos virulento que o segundo. Pelos dados, os autores encontraram uma correlação positiva entre incidência de doença e frequência de resistência no campo, indicando uma perda da eficácia do dicarboximida. Entretanto, em alguns blocos, verificou-se uma baixa porcentagem de linhagens resistentes associados à uma alta incidência de doença, o que foi atribuído a uma ineficiente técnica de aplicação do produto.

Ao detectar a presença de linhagens resistentes a um produto, no campo ou laboratório, deve-se avaliar o padrão de resistência cruzada destes variantes em relação a outros produtos empregados na cultura, ou melhor, se esta resistência afetou a sensibilidade a outros fungicidas (BEEVER & BYRDE, 1982).

Se a mutação afetou a sensibilidade para um produto mas não para outros, trata-se, neste caso, de uma resistência não correlacionada em termos de resistência cruzada. Se o mutante é mais resistente que o tipo selvagem a um determinado produto, entretanto mais sensível a outro, trata-se de uma resistência cruzada correlacionada negativamente (GEORGOPOULOS, 1982a).

A resistência cruzada correlacionada positivamente entre os hidrocarbonetos aromáticos e os dicarboximidas pode ser explicada pela semelhança entre o mecanismo de ação destes grupos de fungicidas (GEORGOPOULOS, et alii, 1979).

Apesar do escasso conhecimento sobre a base genética das linhagens resistentes aos dicarboximidas, GEORGOPOULOS et alii (1979) constataram que iprodione, procymidone e vinclozolin elevam consideravelmente a frequência de recombinação mitótica em colônias diplóides de Aspergillus nidulans. Segundo estes autores, o efeito destes produtos sobre os cromossomos e, possivelmente, sobre o fuso mitótico é a principal razão da sua ação fungitóxica.

A resistência a fungicidas, quando decorrente de alterações genéticas, geralmente, é estável e persistente na ausência do químico. Em Israel, falhas do controle de Botrytis cinerea, em pepino tratado com vinclozolin e iprodione foram atribuídos ao desenvolvimento de resistência ao produto. A maioria das casas-de-vegetação onde a resistência tinha sido encontrada em 1981, mostrou-se também

resistente no ano seguinte, demonstrando a capacidade das linhagens resistentes sobreviverem ao verão quente e seco do mediterrâneo e competirem com as linhagens sensíveis na estação subsequente (KATAN, 1982).

Experimentos em laboratório, nos quais os mutantes resistentes são cultivados em meio-de-cultura isento do fungicida têm sido conduzidos para avaliar a estabilidade da resistência .

Em Israel, KATAN & SHABI (1982) verificaram que a resistência de mutantes de Monilinia laxa a vinclozolin e iprodione foi estável, em meio isento do fungicida, até aproximadamente um ano.

No Brasil, GHINI (1987) verificou que linhagens de Botrytis cinerea resistentes a iprodione retinham sua resistência mesmo após transferências sucessivas em meio-de-cultura isento do fungicida. Dados semelhantes foram obtidos por FANCELLI (1987), ao trabalhar com Alternaria dauci resistente a iprodione.

No entanto, dados discordantes em relação à estabilidade de Botrytis cinerea podem ser encontrados na literatura. ¹ Davis & Dennis , citados por BEEVER & BYRDE

-
1. DAVIS, R. P. & DENNIS, C., Use of dicarboximide fungicides on strawberries and potencial problems of resistance in Botrytis cinerea. Proceedings of the 1979 British Crop Protection Conference, Brighton, England British Crop Production Council, London, 1979 - p. 193 - 201.

(1983), mostraram, que pode ocorrer perda da resistência de isolados de Botrytis cinerea, se os variantes não forem subcultivados sobre um meio-de-cultura contendo fungicida.

A obtenção de esporos resistentes de Botrytis cinerea, em meio-de-cultura contendo fungicida, é bastante instável. Culturas monospóricas resistentes podem originar tanto esporos sensíveis quanto resistentes ao fungicida, provavelmente devido à presença de vários núcleos neste patógeno.

A obtenção de linhagens resistentes a dicarboximidas, em laboratório, não está associada obrigatoriamente ao surgimento rápido destes mutantes em condições naturais. A ocorrência de linhagens resistentes a um produto químico, no campo, depende fundamentalmente de sua adaptabilidade.

O termo adaptabilidade é relativo, pois sempre se mede a adaptabilidade de um organismo em relação a outro, em determinadas condições ambientais. Vários parâmetros podem compor a adaptabilidade de uma linhagem resistente. Entre eles, podem-se citar: o período latente, o período infeccioso, a taxa de multiplicação diária, o crescimento micelial, e a esporulação (ZADOCKS, 1982).

A maioria dos estudos de adaptabilidade de variantes resistentes a dicarboximida foi realizada com o fungo Botrytis cinerea. Os dados alcançados sugerem que

estas linhagens são menos adaptadas ecologicamente que as linhagens sensíveis (GRINDLE, 1979). Trabalhando com Alternaria dauci, FANCELLI (1987) obteve dados semelhantes. Tratando-se de espécies que possuem conídios multinucleados, torna-se inseguro extrapolar estes resultados para outras espécies fúngicas.

Em estudos realizados por GHINI (1987) e FANCELLI (1987), tanto o crescimento micelial de linhagens resistentes de Botrytis cinerea e Alternaria dauci quanto a produção de esporos foi inferior ao da linhagem sensível. Dados discordantes foram obtidos por MARAITE *et alii*, 1981), ao trabalharem com Botrytis cinerea, verificando que linhagens resistentes oriundas do campo se mostraram semelhantes às linhagens sensíveis nestes parâmetros estudados.

Até o momento, existe pouco conhecimento sobre o comportamento de linhagens resistentes a dicarboximidas no campo, e é bastante arriscado extrapolar resultados alcançados em laboratório para o campo.

Estudando a sobrevivência e a habilidade infectiva de linhagens de Botrytis cinerea resistentes a iprodione, obtidas em substratos naturais e produzidas em laboratório, DAVIS & DENNIS (1981b) verificaram que as linhagens resistentes, apesar de apresentarem baixa esporulação, eram similares às linhagens sensíveis quanto à sua viabilidade e habilidade infectiva. A esporulação reduzida foi apontada

pelos autores como um dos principais fatores na limitação do desenvolvimento e dispersão das linhagens resistentes no campo. Concluíram que, apesar da presença de linhagens resistentes aos fungicidas dicarboximidas no campo, o uso correto deste produto não implicaria incremento da população resistente de B. cinerea, mantendo-se, assim, reduzido o nível de infecção.

No Japão, HISADA et alii (1981) obtiveram linhagens resistentes a procymidone a partir de conídios e micélio de linhagens de Botrytis cinerea sensíveis ao produto. Entretanto estas linhagens apresentaram menor habilidade de esporulação in vitro e menor patogenicidade em folha de pepino que as linhagens selvagens.

KATO et alii (1983), estudando o comportamento de Botrytis cinerea em relação ao fungicida procymidone, verificaram que através de transferências sucessivas do micélio de linhagens sensíveis ao fungicida em meio contendo 50% da dose letal do produto, é difícil a obtenção de linhagens tolerantes. Por outro lado, torna-se fácil obtê-las a partir do cultivo de um grande número de esporos sobre um meio contendo o fungicida em concentrações letais. Usando esta mesma técnica, obtiveram linhagens de B. cinerea tolerantes a iprodione, a vinclozolin, a diclozoline e à um hidrocarboneto aromático. A partir do micélio obtiveram linhagens tolerantes, quando este foi cultivado em meio-de-cultura contendo doses letais do

fungicida por um período de incubação mínimo de 5 dias. Algumas linhagens toleraram até 1600 ppm do fungicida e cresceram melhor na presença do produto. As linhagens tolerantes apresentaram resistência cruzada aos dicarboximidas e hidrocarbonetos aromáticos testados, sugerindo, mais uma vez, similaridade entre o modo de ação destes fungicidas. Os quatros parâmetros - taxa de crescimento, taxa de esporulação, formação de escleródios e patogenicidade - mostraram uma oscilação entre as linhagens resistentes mas sempre inferiores aos das linhagens sensíveis. Os autores observaram também alteração no aspecto morfológico das linhagens tolerantes.

As linhagens tolerantes foram menos competitivas que as resistentes, desaparecendo após cinco transferências sucessivas, podendo ser esta uma das razões da ausência de linhagens tolerantes na natureza. Os autores verificaram que, após 19 aplicações do fungicida em plantas, em casa-de-vegetação, não surgiram linhagens resistentes. Na tentativa de compreender o mecanismo pelo qual estas linhagens tornam-se tolerantes tão facilmente em laboratório, concluíram que, tratando-se de um fungo multinucleado e heterocariótico é possível que a tolerância ocorra a partir de certas associações heterocarióticas. No entanto não descartaram a possibilidade de tolerância devidos a mutações genéticas.

LITTLE & RAHE (1984) obtiveram isolados de

Sclerotium cepivorum tolerantes a vinclozolin e iprodione, a partir de linhagens sensíveis. Estas linhagens resistentes apresentavam resistência cruzada aos dicarboximidas iprodione, myclozolin, vinclozolin e a dicloran e quintozene, mas não a benomyl, captan e thiram. A sensibilidade a benomyl não foi alterada pela tolerância a dicarboximidas, sendo assim este produto sugerido como um candidato para o uso em mistura ou alternadamente no controle da podridão branca da cebola.

Na Itália, a viabilidade do emprego de iprodione para o controle de Rhizoctonia solani foi demonstrada por PASINI et alii (1985). Paralelamente, os autores conseguiram facilmente linhagens resistentes ao produto em laboratório, porém com menor virulência quando comparadas às linhagens sensíveis. Esta característica, se deve provavelmente ao reduzido crescimento micelial destas linhagens no solo. Os autores concluíram que, se ocorrer resistência ao fungicida no campo, dificilmente ela representará problema para o agricultor.

BRENNEMAN et alii (1987a) avaliando a sensibilidade de Sclerotinia minor de amendoim aos fungicidas dicloran, iprodione, quintozene e vinclozolin, verificaram que os quatro fungicidas apresentaram uma boa fungitoxidade para o patógeno in vitro. Avaliando a resistência deste patógeno aos produtos testados, obtiveram linhagens de S. minor resistentes a iprodione e a

vinclozolin, a partir de setores crescidos em meio-de-cultura contendo os fungicidas. Estas linhagens cresceram em meio contendo até 1000 ppm dos produtos e mantiveram a resistência durante 23 meses em meio-de-cultura isento do produto. Porém não foram obtidas linhagens resistentes em condições naturais. A ausência de linhagens resistentes no campo foi atribuída ao emprego recente deste produto para o controle de doenças desta cultura. Entretanto os autores concluíram que o aumento da pressão de seleção poderá estimular o desenvolvimento de populações resistentes no campo, o que poderá causar sérios problemas para o agricultor, caso não haja um monitoramento da resistência.

Mais tarde, BRENNEMAN et alii (1987b), estudando a relação entre resistência in vitro e eficiência dos fungicidas dicarboximidas no campo, para o controle de Sclerotinia minor, encontraram resistência cruzada entre iprodione, vinclozolin, assim como para dicloran e quintozene. Os autores concluíram que o perigo de resistência no campo é menor do que se esperava inicialmente.

Apesar da obtenção constante de linhagens resistentes a dicarboximida em laboratório, poucos exemplos podem ser citados de perda do controle da doença, em condições de campo, atribuídos à presença destas linhagens. A redução na taxa de crescimento, na esporulação e na virulência provavelmente são fatores responsáveis pela falta

de adaptabilidade destes mutantes. Porém baixa adaptabilidade inicial no campo pode elevar-se através da adaptação dos mutantes às novas condições (DAVIS & DENNIS, 1981b).

Há diferenças marcantes na dose tolerada pelas linhagens resistentes a dicarboximida. Linhagens com alta resistência, que toleram in vitro, dose superior a 100 ppm são usualmente de baixa adaptabilidade (DAVIS & DENNIS, 1981a), entretanto linhagens com baixa resistência podem ser quase tão adaptadas quanto às sensíveis.

Na Noruega, foram encontrados isolados de Botrytis cinerea resistentes a iprodione a partir de pequenas lesões presentes em morangueiros após tratamentos com iprodione e vinclozolin. As linhagens resistentes cresceram em meio de BDA contendo 10.000 ppm de iprodione. Os autores observaram que baixas concentrações do fungicida estimularam o crescimento dos isolados tolerantes. Apesar da obtenção de linhagens resistentes, no campo, não foi observada a perda de controle da doença após duas estações sucessivas de tratamento com os dicarboximidas (DENNIS & DAVIS, 1979).

Neste trabalho, linhagens de Botrytis cinerea resistentes a dicarboximidas foram isoladas em substratos naturais e também obtidas em laboratório. As linhagens apresentavam níveis de resistência semelhantes para iprodione e vinclozolin, sendo esta resistência provavelmente genética. A frequência natural das

linhagens resistentes foi de 3 em 10 milhões de conídios, mas quando os conídios foram expostos a uma dose sub-letal do produto a frequência aumentava até 1000 vezes. As linhagens resistentes infectaram frutos e vegetais tanto quanto as linhagens sensíveis, embora tenham sido menos agressivas para raízes de cenoura.

Estas linhagens apresentaram baixa esporulação, podendo ser este o fator que contribuiu para a baixa ocorrência destas linhagens em plantações de morangos tratados com os produtos (DAVIS & DENNIS, 1981b).

Na Grécia, linhagens de Botrytis cinerea resistentes à vinclozolin apresentaram menor crescimento micelial que as sensíveis em BDA, mas não se diferenciaram quanto à esporulação (PANAGIOTAKU & MALATHRAKIS, 1981).

Em Nova Zelândia, o primeiro relato de resistência de Botrytis cinerea a dicarboximida foi feito por HARTILL et alii (1983). Os isolados mostraram resistência cruzada aos dicarboximidas, a dicloran e a quintozene, e a maioria foi também resistente aos fungicidas benzimidazóis. O crescimento micelial dos mutantes foi reduzido, mas não inibido, em meio-de-cultura contendo 10 e 100 ppm dos fungicidas dicarboximidas. Os isolados resistentes variaram em sua habilidade de colonização do tecido das plantas. Nas casas-de-vegetação, em estudo, a presença das linhagens resistentes afetou superficialmente a eficácia do fungicida.

No Canadá, após 5 anos de uso de dicarboximida

para o controle de Botrytis cinerea, em vinhedo, foi observada a emergência de linhagens de baixo nível de resistência em casa-de-vegetação, a partir dos isolados testados (NORTHOVER & MATTEONI, 1986).

Mais tarde, NORTHOVER (1988) observou em 4 vinhedos avaliados, a incidência de isolados de Botrytis cinerea tolerantes a iprodione. Na ausência do fungicida, no campo, o nível de incidência declinou, mas após o retorno da aplicação do produto elevou-se novamente. O autor concluiu que o nível de isolados tolerantes no campo era dependente da frequência de aplicação do produto.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Local e época de execução da pesquisa

O presente trabalho foi realizado a partir de dados obtidos em experimentos desenvolvidos nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, no período de julho de 1987 a abril de 1989.

3.2. Obtenção e isolamento de Alternaria porri

Os isolados, de diferentes localidades, foram obtidos a partir de material vegetal naturalmente infectado no campo, exceto os isolados Ap. 26, Ap. 27 e Ap. 29 que foram cedidos pela EMBRAPA UEPAE/Acre (Tabela 1).

Após a coleta ou recebimento de folhas de cebola (Allium cepa L.) com sintomas típicos da doença, ou seja, manchas escuras a púrpuras às vezes com zonas concêntricas contendo a massa de esporos do fungo, estas foram colocadas

TABELA 1: Relação de isolados de Alternaria porri empregados nos experimentos deste trabalho

Isolado	Origem	Data coleta	Variedade de cebola	Fungicidas usados
Ap-01	Itajai - SC	07/08/87	Baia Periforme	Iprodione - Mancozeb
Ap-02	Itajai - SC	07/08/87	Baia Periforme	Iprodione - Mancozeb
Ap-03	Pilar do Sul - SP	21/07/87	Baia Periforme	---
Ap-04	Pilar do Sul - SP	21/07/87	Baia Periforme	---
Ap-05	Pilar do Sul - SP	21/07/87	Baia Periforme	---
Ap-06	Pilar do Sul - SP	21/07/87	Baia Periforme	Iprodione (sub-dose)
Ap-07	Itajai - SC	23/08/87	Baia Periforme	Iprodione
Ap-08	Lavras - MG	28/08/87	Baia Periforme	Mancozeb - Metalaxyl
Ap-09	Lavras - MG	28/08/87	Baia Periforme	Mancozeb - Metalaxyl
Ap-10	Lavras - MG	28/08/87	Baia Periforme	Mancozeb - Metalaxyl
Ap-22	S.Miguel Arcanjo - SP	20/11/87	Baia Periforme	---
Ap-23	Piracicaba - SP	01/10/87	Baia Periforme	Nenhum
Ap-25	Piedade - SP	17/11/87	Pira Ouro	Iprodione - Benomyl
Ap-26	Rio Branco - AC	03/12/87	Texas Grano - 502	Benomyl - Mancozeb
Ap-27	Rio Branco - SC	03/12/87	Texas Grano - 502	Benomyl - Mancozeb
Ap-29	Rio Branco - AC	03/12/87	Texas Grano - 502	Benomyl - Mancozeb

TABELA 1 (Cont.)

Isolado	Origem	Data coleta	Variedade de cebola	Fungicidas usados
Ap-30	Piracicaba - SP	01/02/88	Baia Periforme	Oxicloreto de cobre
Ap-31	Piracicaba - SP	09/03/88	Baia Periforme	Mancozeb - Benomyl
Ap-32	Piracicaba - SP	09/03/88	Baia Periforme	Mancozeb - Benomyl
Ap-33	Piracicaba - SP	09/03/88	Baia Periforme	Oxicloreto de cobre
Ap-34	Piedade - SP	29/04/88	Granex - 33	Iprodione - Benomyl
Ap-35	Piedade - SP	29/04/88	Granex - 33	Iprodione - Benomyl
Ap-36	Piedade - SP	29/04/88	Pira Ouro	Iprodione - Benomyl
Ap-37	Piedade - SP	29/04/88	Pira Ouro	Iprodione - Benomyl
Ap-38	Piedade - SP	29/04/88	Baia Periforme	Iprodione
Ap-39	Piedade - SP	29/04/88	Baia Periforme	Iprodione - Benomyl
Ap-40	S. Jose do Rio Pardo - SP	04/05/88	Granex - 33	Iprodione - Benomyl -
Ap-41	S. Jose do Rio Pardo - SP	04/05/88	Granex - 33	Iprodione - Benomyl -
Ap-42	Piedade - SP	29/04/88	Baia Periforme	Iprodione - Benomyl -
Ap-43	S. Jose do Rio Pardo - SP	04/05/88	Granex - 33	Iprodione - Benomyl -
Ap-44	Piedade - SP	29/04/88	Baia Periforme	Benomyl - Mancozeb
Ap-45	Piedade - SP	08/06/88	Baia Periforme	Benomyl
Ap-46	Piracicaba - SP	28/06/88	Baia Periforme	Nenhum

... Isolados sem informação sobre o tratamento químico utilizado.

em câmara-úmida, que consistia em 01 placa de Petri estéril contendo 3 discos de papel de filtro umedecidos em água destilada. Os fragmentos de folhas, com os sintomas característicos, foram depositados sobre lâminas de vidro previamente flambadas, que foram colocadas sobre os discos de papel e incubados à 26°C sob luz fluorescente contínua, por 24 horas. O fornecimento da luz foi realizado a partir de 2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 15 watts, colocadas a uma altura de aproximadamente 40 cm. Posteriormente, este material foi observado ao microscópio estereoscópico e os esporos característicos do gênero Alternaria (BARNETT & HUNTER, 1972) foram transferidos individualmente com o auxílio de um estilete, para placas de Petri contendo o meio de ágar - água, (18g de ágar e 1 litro de água destilada) e incubadas por 48 horas, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após este período, retirou-se da extremidade das colônias, discos de 6 mm de diâmetro do meio contendo o micélio, os quais foram transferidos para o centro da placas de Petri contendo meio de BDA (água do cozimento de batata - 200g; dextrose - 20 g; ágar - 18 g; água destilada até completar 1000 ml). [A incubação das placas foi feita à 22°C em luz próxima ao ultravioleta (NUV - Near Ultra Violet) alternada - 12 horas de luz (fornecida por 04 tubos de luz negra - Sylvânia F30T12/LN, a uma altura de 40 cm das placas) e 12 horas de escuro durante 7 dias para

identificação dos isolados de A. porri (ELLIS, 1971) e obtenção de culturas puras.

3.3. Conservação dos isolados

Os isolados foram preservados pelo "método de Castellani" descrito por FIGUEIREDO (1967).

Consistiu na transferência de discos de meio de BDA contendo o micélio viável do fungo, para vidros esterilizados com aproximadamente 6 ml de capacidade contendo 4 ml de água destilada estéril, que foram a seguir tampados com rolhas de borracha e vedados com fita transparente de PVC. Estes vidros foram mantidos em temperatura ambiente (25 - 28°C) e/ou geladeira ($\pm 10^\circ\text{C}$). Paralelamente, os isolados foram mantidos através de transferências sucessivas em tubos de ensaio, contendo meio de BDA inclinado, nas duas temperaturas citadas anteriormente.

3.4. Frequência de linhagens resistentes de A. porri a iprodione, no campo.

A frequência de linhagens resistentes ao

fungicida, no campo, foi avaliada inoculando-se os 33 isolados em meio de BDA contendo 100 e 1000 ppm de iprodione (3,5 - diclorofenil) - N - (1.metiletil) - 2.4 - dioxo - 1 - timidazolina carboximida; nome comercial - Rovral). Como testemunha, foi depositado disco de BDA contendo o micélio em meio de BDA isento do fungicida, perfazendo 4 repetições para cada tratamento.

O fungicida foi incorporado ao meio de BDA fundente, após pesagem em balança de precisão (Marca-Sartorius, com precisão = 0,001 g).

O inóculo consistiu de discos de BDA (6 mm) contendo o micélio, obtidos da periferia das colônias com 7 dias de idade, desenvolvidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descrito no item 3.2.

As placas foram incubadas à 28°C, no escuro, sendo a avaliação realizada após 4 dias, determinando-se o crescimento linear através da mensuração do diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares entre si.

As placas foram mantidas incubadas até o sétimo dia, quando avaliou-se a ocorrência de setores resistentes ao fungicida.

3.5 Avaliação do grau de sensibilidade de isolados de A. porri a iprodione

Para avaliar o grau de sensibilidade dos isolados selvagens de A. porri a iprodione, inoculou-se 17 isolados (Tabela 7) em meio de BDA contendo 0; 1 e 10 ppm do fungicida, conforme metodologia descrita no item 3.4, sendo a incubação das placas e a avaliação realizada conforme este mesmo item, aos 6 dias de idade.

A partir do diâmetro micelial médio obtido nas respectivas concentrações calculou-se a porcentagem de inibição de crescimento (PIC) dos isolados a 1 ppm do fungicida, em relação à testemunha, de acordo com a seguinte fórmula:

$$PIC = \frac{CT - Ct \times 100}{CT} \quad \text{onde:}$$

CT = crescimento médio da testemunha

Ct = crescimento do tratamento

3.6 Obtenção de linhagens resistentes a iprodione, in vitro

A partir de isolados de A. porri sensíveis a iprodione mas que apresentaram setores resistentes ao fungicida, tentou-se obter uma linhagem resistente, em condições de laboratório.

Fragmentos de disco de meio de BDA com micélio que não manifestaram crescimento e setores que cresciam sobre

meio de BDA acrescido de iprodione no ensaio 3.4 foram cultivados em BDA isento do fungicida e incubados durante 03 dias à 22°C sob luz alternada como descrito no item 3.2.

Após este período, discos de BDA de 6 mm de diâmetro contendo micélio de 05 linhagens supostamente sensíveis (Ap-06-S, Ap-22-S, Ap-25-S, Ap-29-S, Ap-30-S) e 5 linhagens supostamente resistentes (Ap-06-R, Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R, Ap-30-R) a iprodione, foram transferidos para meio de BDA acrescido de 1; 10; 100 e 1000 ppm de iprodione sendo preparado e incubado de acordo com o método descrito no item 3.4. Como testemunha, as diferentes linhagens foram inoculadas em BDA isento de fungicida.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo a avaliação feita 8 dias após, medindo-se o diâmetro médio de crescimento das colônias, perpendicularmente.

3.7 Influência do tamanho do inóculo no surgimento de setores resistentes de A. porri, a iprodione

Para avaliar a influência do diâmetro do disco do inóculo contendo o micélio de A. porri quanto ao surgimento de linhagens resistentes ao fungicida iprodione, testou-se 4 tamanhos de discos: 6; 4; 3 e 2 mm obtidos de 1 linhagem selvagem (Ap-30). O inóculo foi obtido de acordo

com o método descrito no item 3.4, sendo depositado no centro das placas de Petri contendo meio de BDA acrescido do fungicida iprodione nas concentrações de 0; 1; 10; 100 e 500 ppm, preparado conforme metodologia descrita no item 3.4.

Foram realizados 3 repetições por tratamento (diâmetro do inóculo X concentração de fungicida), sendo a incubação feita no escuro, à 28°C. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias no oitavo dia assim como, anotando-se o número de setores resistentes presentes nos diferentes tamanhos do inóculo.

3.8 Efeito da concentração de iprodione e período de incubação sobre surgimento de setores resistentes de A. porri ao fungicida

Para avaliar a influência da concentração de iprodione e do período de incubação sobre o surgimento de setores de A. porri resistentes ao fungicida, selecionou-se 5 linhagens selvagens do patógeno (Ap-06, Ap-22, Ap-25, Ap-29, Ap-30) e inoculou-as em meio de BDA contendo diferentes concentrações do fungicida (0; 1; 10; 100 e 1000 ppm) preparado conforme metodologia descrito no item 3.4.

A incubação foi feita de acordo com as condições descritas no item 3.4, sendo as avaliações realizadas diariamente, durante 8 dias, medindo-se o diâmetro das

colônias nas concentrações em que havia crescimento micelial e anotando-se o número e data de aparecimento de setores resistentes ao fungicida.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

3.9 Frequência de mutantes

Para avaliar a frequência de surgimento de linhagens resistentes a iprodione in vitro, testou-se o isolado Ap-25 através do método de fungicida incorporado ao meio de BDA.

A obtenção de esporos foi feita em meio de CaCO_3 sem água (BOVEDA, 1986).

Os esporos foram suspensos em água estéril determinando-se a concentração com auxílio de um hemacitômetro. A concentração máxima obtida foi de $1,1 \times 10^5$ esporos/ml, a partir da qual foram obtidas as concentrações de 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos/ml através de diluições em água destilada estéril.

A seguir, 0,1 ml de cada concentração de esporos foi depositado centralmente, com o auxílio de uma pipeta estéril, em placa de Petri contendo BDA acrescido de iprodione (500 ppm) num total de 10 placas para cada concentração, exceto para a maior concentração, onde foi

transferido 0,05 ml da suspensão por placa num total de 20 placas.

A incubação foi feita como descrita no item 3.2, sendo a avaliação realizada durante 16 dias através da contagem das colônias monospóricas surgidas em cada concentração.

3.10 Estabilidade da resistência

Para avaliar a estabilidade da resistência, realizou-se transferências sucessivas de 5 linhagens de A. porri resistentes a iprodione (Ap-06-R, Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R, Ap-30-R) em meio de BDA isento de fungicida.

Discos de micélio (3 mm) das diferentes linhagens foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de BDA e incubados por 7 dias no escuro à 25-28°C. A partir deste período, foram realizadas transferências sucessivas, de discos de micélio, em meio de BDA, semanalmente.

Realizaram-se quinze transferências sucessivas avaliando-se as linhagens quanto a resistência a iprodione, na 1ª, 5ª, 10ª e 15ª transferências, a partir de inoculação de micélio em meio de BDA contendo 10, 100 e 1000 ppm de iprodione, em 4 repetições.

A incubação foi realizada como mencionado no item

3.4, durante 7 dias, sendo a avaliação feita através da mensuração do crescimento diametral das culturas.

Para uniformização dos dados obtidos, calculou-se a porcentagem de crescimento (PC) em relação à testemunha, através da fórmula:

$$PC = \frac{C T}{C t} \times 100 \quad \text{onde:}$$

CT = crescimento diametral médio de cada tratamento (linhagem x concentração do fungicida iprodione).

Ct = crescimento diametral médio da testemunha (linhagem em BDA isento de fungicida).

3.11 Sensibilidade de linhagens de A. porri sensíveis e resistentes a iprodione, a diferentes fungicidas

Para avaliar a ocorrência de sensibilidade colateral ou de resistência cruzada dez linhagens de A. porri, sendo 5 sensíveis (Ap-06-S, Ap-22-S, Ap-25-S, Ap-29-S e Ap-30-S) e 5 resistentes (Ap-06-R, Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R, Ap-30-R) foram comparadas através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura.

Os fungicidas (Tabela 2) foram testados nas concentrações de 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm e foram incorporados ao meio de BDA de acordo com o descrito no item 3.4 para iprodione.

TABELA 2: Fungicidas utilizados nos experimentos

Nome técnico	Nome comercial	Grupo químico	Porcentagem de i.a.
Anilazine	Dyrene	Triazina	75
Benomyl	Benlate 500	Benzimidazol	50
Dicloran	Botran	Heterocíclico aromático	50
Dichlofluanide	Euparem	Sulfamida	75
Iprodione	Rovral	Dicarboximida	50
Iprodione + Thiram	Rovrin	Dicarboximida	20 + 60
Mancozeb	Dithane M-45	Ditiocarbamato	80
Metalaxyl	Ridomil	Acilalanina	25
Procymidone	Sumilex	Dicarboximida	50
Quintozene	Semetol	Heterocíclico aromático	75
Vinclozolin	Ronilan	Dicarboximida	50

O inóculo (discos de 3 mm de diâmetro de meio de BDA contendo o micélio, das respectivas linhagens) foi obtido conforme mencionado no item 3.4. A incubação foi feita no escuro à 25-28°C, durante seis dias, sendo a avaliação realizada através da mensuração do diâmetro médio das colônias (4 repetições). Para uniformização dos dados, calculou-se a porcentagem de crescimento (PC) de acordo com a fórmula citada no item 3.10.

3.12 Adaptabilidade de linhagens de A. porri resistentes a iprodione

3.12.1 Crescimento micelial

Para avaliar o crescimento micelial de linhagens sensíveis (Ap-06-S, Ap-22-S, Ap-25-S, Ap-29-S) e linhagens resistentes (Ap-06-R, Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R, Ap-30-R) de A. porri a iprodione cultivou-as, previamente em meio de BDA sob temperatura e fotoperíodo idêntico ao descrito no item 3.2.

Discos de micélio das linhagens (3mm) foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubados à 22°C sob luz alternada.

Avaliou-se o crescimento micelial medindo-se o diâmetro médio das colônias, no segundo, quarto e sexto dia.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 04 repetições.

3.12.2 Esporulação

Comparou-se a produção de esporos das linhagens sensíveis (Ap-06-S, Ap-22-S, Ap-25-S, Ap-29-S e Ap-30-S) e linhagens resistentes (Ap-06-R, Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R e Ap-30-R) de A. porri a iprodione.

A metodologia empregada foi semelhante àquela usada por FANCELLI (1987) com algumas modificações.

Discos de meio de BDA contendo micélio das linhagens (3 mm) foram transferidos para meio de BDA (3 placas) e incubados durante sete dias, à 22°C no escuro, seguido de 24 horas de luz próxima ao ultravioleta (NUV) e mais dois dias de escuro.

Após o período de incubação, quantificou-se os esporos dos diferentes tratamentos. Para isto, foram retirados, ao acaso, 5 discos de 6 mm de diâmetro das colônias formadas nos diferentes tratamentos, os quais foram transferidos para tubos de ensaio de 5 ml contendo 1 ml de água destilada e 1 gota de Tween 20 (Polyoxyethileno mono-oleato de sorbitan). Dando prosseguimento, os tubos foram agitados, manualmente, para obtenção da suspensão conidial. Com o auxílio de um pipetador automático, com 10 µl

de capacidade, depositou-se 10 gotas de cada repetição em 01 lâmina comum de vidro, realizando-se a contagem dos esporos com auxílio de um microscópio composto.

3.12.3 Crescimento micelial de linhagens resistentes em doses crescentes de iprodione

Para determinar a capacidade de crescimento micelial de linhagens resistentes a iprodione em doses crescentes do fungicida selecionou-se 5 linhagens (Ap-06-R, Ap-07-R, Ap-08-R, Ap-22-R, Ap-42-R) e cultivou-as em meio de BDA contendo 0; 500; 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000 ppm do produto.

A adição da fungicida foi feita de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.

O inóculo (discos de meio de BDA de 3 mm contendo o micélio dos isolados) foi obtido de acordo com o método descrito no item 3.4, sendo a incubação feita à 22°C sob luz alternada (escuro e NUV - como descrito no item 3.2), durante 06 dias.

A avaliação foi feita através da mensuração do diâmetro médio das colônias, sendo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições.

3.12.4 Competição

Para se avaliar a competição entre linhagens resistentes e sensíveis a iprodione misturou-se, esporos das linhagens Ap-25-S com Ap-25-R e micélios das linhagens Ap-25-S com Ap-25-R e Ap-06-S com Ap-06-R.

3.12.4.1 Esporos

A obtenção de esporos foi feita em meio de CaCO_3 sem água (BOVEDA, 1986).

Após determinação da concentração dos esporos das linhagens Ap-25-S e Ap-25-R ($6 \cdot 10^4$ esporos/ml) preparou-se suspensões de conídios na proporção de 1S:1R e 1S:9R do seguinte modo: em um tubo de ensaio (5 ml) misturou-se 1 ml de suspensão de esporos resistentes, à mesma proporção de suspensão de esporos sensíveis. Num segundo ensaio misturou-se 0,2 ml da suspensão de esporos sensíveis à 1,8 ml da suspensão de esporos resistentes.

Após homogeneização das 2 suspensões, através de agitação manual, com o auxílio de um pipetador automático depositou-se 2 gotas (20 μl) por placa de cada mistura em 10 placas de Petri contendo meio de BDA. Simultaneamente, foram depositadas 2 gotas das suspensões de cada linhagem isoladamente em 10 placas de Petri contendo BDA para testar

a viabilidade dos esporos, sendo a incubação realizada a 22°C em luz alternada (escuro e NUV) por 7 dias.

Após o período de incubação, transferiu-se discos de micélio das colônias formadas para meio de CaCO_3 sem água, para obtenção de esporos.

Os esporos obtidos eram suspensos em água destilada estéril e 2 gotas (20 µl) de cada suspensão eram transferidas semanalmente para meio de BDA, como descrito anteriormente, totalizando-se 10 transferências.

Para avaliar a proporção de esporos sensíveis e resistentes a iprodione, após a 1ª, 2ª, 4ª, 5ª e 10ª transferências de micélio para CaCO_3 , à colônia restante em BDA, era adicionado 3 ml de água estéril e com o auxílio de uma lâmina de vidro estéril, os esporos e micélio eram suspensos. Com o auxílio de um pipetador automático, gotas desta suspensão eram transferidas para meio de ágar-água (18 g ágar/1000 ml de água) acrescido de streptomomicina (100 ppm) para obtenção de esporos germinados. A incubação era feita por 48 horas nas mesmas condições descritas no item 3.2 (22°C, luz alternada).

Após germinação dos esporos, estes eram transferidos monospóricamente com o auxílio de uma agulha entomológica, sob microscópio estereoscópico para meio de BDA acrescido de iprodione (500 ppm), sendo depositados 10 esporos por placa, distribuídos equidistantemente, num total de 10 placas por transferência e por suspensão conidial

(1R:1S; 1S:9R) as quais foram incubadas, por 48 horas, nas condições citadas acima.

Determinou-se o número de linhagens resistentes ou sensíveis a iprodione a partir do número de colônias monospóricas formadas, ou não, respectivamente no meio de BDA com fungicida.

A ausência de crescimento de colônias no local de deposição dos esporos era considerada como presença de linhagem sensível após a transferência dos mesmos para meio de BDA isento do fungicida e observação da sua viabilidade.

3.12.4.2 Micélio

A avaliação da competição através da mistura de micélio foi realizada de maneira semelhante.

Após crescimento das linhagens sensíveis (Ap-25-S e Ap-06-S) e resistentes (Ap-25-R e Ap-06-R) em BDA incubadas como descrito no item 3.2 obteve-se discos de micélio (3 mm) da periferia das colônias e misturou-os nas seguintes proporções: 1S (Ap-25-S) : 1R (Ap-25-R); 1S (Ap-25-S) : 9R (Ap-25-R); 9S (Ap-25-S) : 1R (Ap-25-R); e 1S (Ap-06-S) : 1R (Ap-06-R).

Para homogeneizar as misturas, os discos foram transferidos para uma lâmina de vidro esterilizada e com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado realizou-se a

trituração dos micélios. A seguir, a mistura correspondente à cada tratamento foi transferida para placa de Petri contendo BDA e espalhada, uniformemente, por toda a placa com auxílio de uma alça de platina (5 repetições), sendo a incubação realizada por 7 dias como descrito no item 3.2.

Após este período foram realizadas transferências sucessivas de micélio, semanalmente, quantificando-se o número de esporos de linhagens resistentes e sensíveis na 1ª, 5ª e 10ª transferências como foi descrito para o ensaio de competição de esporos no item 3.12.4.1.

3.12.5 Patogenicidade

Avaliou-se a patogenicidade de linhagens de A. porri sensíveis e resistentes a iprodione através de inoculação de micélio em folhas destacadas de cebola e inoculação de micélio em sementes de cebola.

3.12.5.1 Folhas destacadas de cebola

Neste ensaio, realizou-se preliminarmente testes para seleção: de cultivar, de método de inoculação e de tipo de meio onde serão cultivadas as linhagens a serem testadas.

3.12.5.1.1 Seleção de cultivar

Discos de micélio (3 mm) da linhagem sensível Ap-25-S foram inoculados em pedaços basais de folhas (6 cm) de 4 cultivares (Texas Early Grano-502; Cristal Wax; Granex-33; Baia Periforme). As folhas foram obtidas de plantas com 3 meses de idade, cultivadas em casa-de-vegetação, que foram cortadas na base, com auxílio de uma tesoura e transferidas, imediatamente, para tubos de ensaio contendo água destilada. Em laboratório, 4 pedaços de folhas, eram colocados em 1 placa de Petri que continha 3 discos de papel de filtro umedecidos em água destilada e 2 lâminas de vidro esterilizadas sobre eles, sendo acoplado à extremidade basal das folhas um chumaço de algodão umedecido em água destilada, num total de 5 repetições para cada tratamento (20 pedaços de folhas). O método de inoculação consistiu em ferir o centro da folha com auxílio de uma agulha, e a seguir depositava-se sobre o ferimento um disco de meio de de CaCO_3 , que continha micélio e esporos, de forma que o inóculo encontrava-se em contato direto com o ferimento.

A seguir as placas eram tampadas e incubadas em uma Biotronete (Mark-III Lab-Line Instruments), à temperatura de 14°C , no escuro, por 2 dias e durante mais 6 dias sob luz contínua fornecida por 2 lâmpadas

fluorescentes, luz do dia de 40 Watts, colocadas 40 cm acima do nível das placas.

A avaliação foi feita a partir do Índice de doença (ID) (CIRULLI & ALEXANDER, 1966), onde $ID = \frac{\sum f_i v_i}{n \cdot x} \cdot 100$, onde:

SOM = somatória;

f_i = número de plantas com determinado grau de infecção;

v_i = grau de infecção;

n = número total de plantas inoculadas;

x = grau máximo de infecção.

O grau de infecção foi obtido a partir de uma escala de notas baseadas nos sintomas visualizados nas folhas:

Graus:

0 - sem sintoma;

1 - presença de micélio escasso sobre a folha;

2 - mancha branca com micélio escasso sobre a folha e esporos restritos ao disco de micélio;

3 - mancha escura, com micélio abundante e esporos nos discos de micélio, de tamanho até 3,0 cm;

4 - mancha escura, de tamanho entre 3,5 a 5,0 cm com esporos sobre o tecido foliar.

3.12.5.1.2 Seleção de métodos de inoculação e meio para cultivo do inóculo

Neste ensaio, o inóculo empregado foi obtido a partir do isolado Ap-34-S que foi cultivado em meios de cebola, de CaCO_3 e BDA conforme metodologia descrita por BOCK (1964), BOVEDA (1986) e FANCELLI (1987) respectivamente. O cultivar empregado, Granex-33 foi selecionado a partir dos resultados do item anterior.

A inoculação, a incubação e a avaliação foram realizadas de modo semelhante ao descrito anteriormente, acrescidos dos métodos de inoculação sem fermento e sem cerosidade que consistiu no depósito do inóculo no centro das folhas, sem fermento prévio e em folhas sem cerosidade (a cerosidade da folha era retirada com o auxílio de um chumaço de algodão umedecido em água destilada).

3.12.5.1.3 Patogenicidade de linhagens sensíveis e resistentes

Após avaliação dos ensaios preliminares cultivou-se linhagens sensíveis e resistentes a iprodione obtidas a partir dos isolados selvagens Ap-42, Ap-43, Ap-25 e Ap-40 (conforme metodologia descrita no item 3.6) em meio de CaCO_3 e inoculou-as em folhas destacadas do cultivar Granex-33, feridas previamente conforme metodologia descrita no item 3.12.5.1.1.

Como testemunha, foram mantidas folhas feridas em placas de Petri, com e sem disco de meio de CaCO_3 .

3.12.5.2 Sementes

Com a finalidade de verificar o efeito de linhagens de A. porri sensíveis e resistentes a iprodione em sementes de cebola, conduziu-se este experimento.

Preliminarmente, selecionou-se através de testes em laboratório o tempo de inoculação necessário para permanência das sementes sobre o micélio do fungo, que consistiria na fonte de inóculo.

As linhagens sensíveis e resistentes a iprodione obtidas através dos isolados selvagens Ap-06, Ap-25, Ap-32, Ap-40, Ap-42, Ap-43 foram desenvolvidas em meio de BDA durante 7 dias em condições de incubação semelhantes às descritas no item 3.2.

Sementes dos cultivares Baia Periforme e Granex-33, após imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 3 minutos, de lavagem em água estéril e secagem em papel de filtro, foram postas em contato direto com a superfície das colônias de A. porri, das diferentes linhagens onde permaneceram por 18 horas (tempo preliminarmente selecionado).

Após esse período foram transferidas para recipientes plásticos (80 ml de capacidade) contendo 40 ml de água-agar (2%) num total de 7 sementes por recipiente. Cada tratamento era composto por 5 repetições, constando as testemunhas de recipientes com sementes que permaneceram o mesmo tempo de inoculação, sobre meio de BDA.

Os recipientes foram cobertos com plásticos transparentes para manter a umidade e incubados à 22°C, sob luz branca.

A avaliação foi feita após 7 dias, calculando-se o Índice de Doença (ID) para cada repetição de acordo com a fórmula apresentada no item 3.12.5.1.1.

O grau de infecção foi obtido a partir de uma escala de notas qualitativa baseada nos sintomas visíveis:

0 - sementes germinadas e não germinadas sem sintomas;

1 - sementes não germinadas, com presença de micélio de A. porri;

2 - necrose do hipocótilo seguida de morte da plântula.

3.13 Efeito de Iprodione e Iprodione acrescido de Thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens sensíveis e resistentes de A. porri a iprodione, em sementes de cebola do cultivar Granex-33

Neste ensaio, avaliou-se o efeito preventivo e erradicativo dos fungicidas Iprodione e Iprodione + Thiram sobre sementes antes e após a inoculação, com as linhagens sensíveis e resistentes a iprodione (Ap-25, Ap-25-R, Ap-43-S e Ap-43-R).

O tratamento preventivo foi realizado misturando os fungicidas, Iprodione (250g do p.c./100kg sementes) ou mistura de iprodione + thiram (150g do p.c./100kg sementes), homogeneamente, às sementes secas. Para isto, o produto químico foi depositado em um recipiente juntamente com as sementes, sendo vedado e agitado manualmente. Posteriormente as sementes eram inoculadas conforme metodologia descrita no item 3.12.5.2.

O tratamento erradicativo consistiu na imersão das sementes inoculadas em solução dos fungicidas, preparada em água destilada, conforme proporção citada anteriormente, durante 2 minutos. A seguir, as sementes eram secadas em papel de filtro e avaliadas patogenicamente.

A avaliação foi realizada calculando-se o índice de doença conforme descrito no item 3.12.5.2 para todos os tratamentos em relação à testemunha, que consistiu em sementes inoculadas com as 4 linhagens isoladamente, no entanto sem a aplicação dos fungicidas.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de linhagens resistentes de A. porri a iprodione no campo.

Quatro dias após o início da incubação, os isolados de A. porri inoculados em meio de BDA contendo o fungicida iprodione a 100 e 1000 ppm, não apresentaram nenhum crescimento micelial.

No entanto, três dias após a primeira avaliação, observou-se a presença de setores de crescimento em 21 e 16 isolados inoculados em meio de BDA, contendo 100 e 1000 ppm de iprodione, respectivamente (Tabela 3).

4.2. Avaliação do grau de sensibilidade de isolados de A. porri a iprodione.

Aos 6 dias de incubação, verificou-se que não houve crescimento micelial em quase todos os isolados de A. porri testados a 10 ppm de iprodione, excetuando-se o

TABELA 3: Efeito de iprodione sobre o crescimento micelial dos isolados de A. porri.

Isolados	* Diâmetro (cm) das colônias nas concentrações de iprodione (ppm) de		
	0	100	1000
Ap-01	3,9	0 1**	0
Ap-02	4,1	0 1	0
Ap-03	4,0	0 1	0
Ap-04	3,9	0	0 1
Ap-05	4,3	0 1	0 2
Ap-06	5,1	0	0
Ap-07	3,9	0 1	0
Ap-08	4,3	0	0 1
Ap-09	4,1	0 1	0 1
Ap-10	3,9	0 1	0
Ap-22	5,2	0	0
Ap-23	4,5	0 1	0 2
Ap-25	4,9	0	0
Ap-26	3,9	0	0
Ap-27	5,1	0 2	0 1
Ap-29	4,4	0	0 1
Ap-30	4,5	0 1	0 1
Ap-31	4,5	0 1	0
Ap-32	4,5	0 3	0
Ap-33	4,4	0	0

TABELA 3 (Cont.)

Isolados	* Diâmetro (cm) das colônias nas concentrações de iprodione (ppm) de		
	0	100	1000
Ap-34	4,8	0 ²	0 ¹
Ap-35	4,6	0 ²	0 ¹
Ap-36	4,3	0 ¹	0
Ap-37	4,3	0 ¹	0
Ap-38	5,1	0 ¹	0 ²
Ap-39	4,4	0 ¹	0 ³
Ap-40	4,5	0 ¹	0
Ap-41	4,4	0 ¹	0 ¹
Ap-42	4,0	0 ¹	0 ³
Ap-43	4,5	0 ¹	0 ²
Ap-44	4,2	0 ¹	0
Ap-45	4,1	0 ¹	0 ¹
Ap-46	4,9	0 ¹	0

* Média de 4 repetições, 4 dias após a inoculação.

** Número de placas com setores resistentes, 7 dias após inoculação.

isolado Ap-22. (Tabela 4).

A maior porcentagem de inibição de crescimento (PIC) a 1 ppm foi observado no isolado Ap-25 (89,36%) e Ap-43 (84,45%).

O isolado Ap-42 foi o menos inibido a 1 ppm (52,25%) seguido pelos isolados Ap-38 (56%) e Ap-33 (59,97%).

De acordo com as PIC obtidas verificou-se que a ED50 (dose suficiente do fungicida para inibir 50% do crescimento micelial do isolado) destes isolados está abaixo de 1 ppm de iprodione (Figura 1).

4.3. Obtenção de linhagens resistentes a iprodione, in vitro.

Os setores que cresciam sobre o meio de BDA acrescido de 100 e 1000 ppm de iprodione apresentaram um crescimento micelial normal quando cultivados em meio de BDA. A partir deste resultado selecionou-se 5 setores os quais foram inoculados em BDA acrescido de iprodione em diferentes dosagens, sendo avaliados os crescimentos diametrais juntamente com as linhagens sensíveis. (Tabela 5).

As linhagens resistentes cresceram em todas

TABELA 4: Efeito de iprodione a 1 e 10 ppm sobre o crescimento micelial de isolados de *Alternaria porri* sensíveis ao produto aos 6 dias de incubação.-----

Isolados	* Crescimento diametral (cm) das colônias nas concentrações (ppm) de iprodione de			
	0	1	10	Médias
Ap-06-S	7.03 a	1.43 efg	0.00 a	2.88 bc
Ap-22-S	6.75 abc	1.35 efg	2.28 a	2.79 bc
Ap-25-S	7.05 a	0.75 g	0.00 a	2.60 cd
Ap-29-S	7.05 a	1.03 fg	0.00 a	2.69 cd
Ap-30-S	7.23 a	2.58 ab	0.00 a	3.27 a
Ap-31-S	6.25 cdef	1.73 cdef	0.00 a	2.66 cd
Ap-32-S	6.30 bcdef	1.85 cde	0.00 a	2.72 c
Ap-33-S	6.83 abc	2.73 ab	0.00 a	3.18 ab
Ap-34-S	6.23 cdefg	2.15 bcd	0.00 a	2.79 bc
Ap-35-S	6.28 cdef	2.30 abc	0.00 a	2.86 bc
Ap-36-S	6.03 defg	1.48 def	0.00 a	2.50 cd
Ap-37-S	5.53 efg	1.38 efg	0.00 a	2.30 d
Ap-38-S	6.55 abcde	2.88 a	0.00 a	3.14 ab
Ap-39-S	5.75 fg	1.75 cde	0.00 a	2.50 cd
Ap-40-S	5.85 efg	2.15 bcd	0.00 a	2.67 cd
Ap-42-S	6.68 abcd	1.45 defg	0.00 a	2.71 c
Ap-43-S	7.00 ab	1.45 defg	0.00 a	2.88 bc
Médias	6.49 A	1.79 B	0.02 C	

c.v.= 10.253%

* Média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúscula na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 5: Efeito de dosagens de iprodione sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes ao fungicida, aos 8 dias de incubação.

Linhagens	Crescimento diametral (cm) nas concentrações de iprodione (ppm) de					
	0	1	10	100	1000	Médias
Ap-06-S	8.65 a	5.13 d	0.00 c	0.00 e	0.00 d	2.78 e
Ap-22-S	8.50 a	3.83 e	0.00 c	0.00 e	0.00 d	2.47 g
Ap-25-S	7.83 bc	5.20 d	0.00 c	0.00 e	0.00 d	2.61 efg
Ap-29-S	7.55 cd	5.43 d	0.00 c	0.00 e	0.00 d	2.60 efg
Ap-30-S	7.98 b	5.43 d	0.00 c	0.00 e	0.00 d	2.68 ef
Ap-06-R	7.55 cd	7.33 ab	7.30 ab	7.00 b	5.63 ab	6.96 b
Ap-22-R	7.20 e	6.95 c	7.15 b	6.18 d	3.58 c	6.21 d
Ap-25-R	7.68 bcd	7.53 a	7.60 a	7.20 ab	5.38 b	7.08 ab
Ap-29-R	7.35 de	7.15 bc	7.33 ab	6.55 c	5.43 b	6.76 c
Ap-30-R	7.63 cd	7.53 a	7.60	7.35 a	5.80 a	7.18 a
Médias	7.79 A	6.15 B	3.70 C	3.43 D	2.58 E	

1/

C.V.= 3.155%

* Média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

FIGURA 1: Efeito de iprodione (1 ppm) sobre o crescimento micelial de Alternaria porri

as concentrações de iprodione testadas, observando-se uma redução no crescimento micelial à medida em que a concentração do fungicida aumentava.

As linhagens resistentes diferiram estatisticamente das linhagens sensíveis, sendo o crescimento micelial destas últimas inibido totalmente a 10 ppm.

Entre as linhagens resistentes, a Ap-30-R e Ap-22-R apresentaram o maior e o menor crescimento micelial médio nas doses de iprodione avaliadas, respectivamente.

4.4. Influência do tamanho do inóculo no surgimento de setores resistentes de A. porri a iprodione.

Segundo a avaliação realizada aos 8 dias de idade, verificou-se que não houve diferença quanto ao número de setores surgidos quando inoculou-se um disco de 6 e 5 mm de diâmetro (Tabela 6). Entretanto houve uma redução no número de setores utilizando-se um disco de micélio com 2 mm de diâmetro.

Tabela 6: Efeito do tamanho do inóculo (Ap-30-S) sobre o surgimento de setores resistentes de *Alternaria porri* a iprodione, aos 8 dias de incubação

Diâmetro Inóculo (mm)	* Diâmetro (cm) das colônias nas concentrações do fungicida (ppm) de					Total setores
	0	1	10	100	500	
60	8.47	5.07	2**	2	2	6
40	7.50	4.90	2	2	2	6
30	7.40	4.76	2	1	2	5
20	7.61	3.96	2	0	0	2

* Média de 3 repetições

** Corresponde ao número de setores resistentes surgidos após 8 dias de incubação

4.5. Efeito de concentração de iprodione e período de incubação sobre o surgimento de setores resistentes de A. porri ao fungicida.

De um modo geral, observou-se o aparecimento mais acentuado de setores resistentes a partir do quinto dia de incubação, e à medida que a dose do fungicida era aumentada (Tabela 7).

Houve diferença quanto ao número de setores resistentes surgidos entre as linhagens selvagens testadas, observando-se um número maior de setores na Ap-30 (10 setores) e um menor na Ap-29 (6 setores).

4.6. Frequência de mutantes

A avaliação da frequência de mutantes resistentes a iprodione, a partir de uma inoculação de uma densa suspensão de esporos sensíveis ao produto em meio de BDA contendo uma alta concentração de fungicida (500 ppm), mostrou que o aparecimento de linhagens resistentes só foi possível nas maiores concentrações de esporos (10^4 e 10^5 esporos/ml) a partir do nono dia da incubação. Com o prolongamento do período de incubação, pôde observar-se o aumento no número de mutantes nestas 2 concentrações de

TABELA 7: Efeito da concentraçao de iprodione e período de incubação no surgimento de setores resistentes de Alternaria porri ao fungicida.

Período de incubação (dias)	Crescimento diametral (cm) nas concentrações de fungicidas (ppm) de											
	0			1			10			100		
	6	22	25	29	30	Isolados sensíveis	6	22	25	29	30	Isolados sensíveis
2	20	20	21	23	25	14 12 13 12 15	0	0	0	0	0	0
3	27	30	30	31	35	19 17 17 18 20	0	0	0	0	0	1
4	40	41	40	39	43	24 20 22 23 25	0	0	0	0	0	1
5	54	55	52	43	55	35 31 33 33 35	0	0	0	0	0	7
6	61	64	61	46	63	42 39 39 40 42	0	0	0	0	0	1
7	72	75	70	53	73	50 46 45 46 48	0	0	0	0	0	1
8	80	85	78	67	80	57 53 52 54 55	0	0	0	0	0	1
SOM							2	4	0	2	3	11

* Média de 05 repetições

** Corresponde ao número de placas com setores resistentes, surgidos até 8 dias de incubação

SOM Total de setores resistentes

esporos (surgindo 01 colônia resistente aos 09 dias e outra aos 15 dias de incubação em 10^4 esporos/ml; 01 colônia resistente aos 09 dias, 03 aos 13 dias, 01 aos 15 dias e 02 aos 16 dias de incubação em 10^5 esporos/ml-Tabela 8).

4.7. Estabilidade da resistência.

Pelas análises estatísticas, não houve diferença significativa entre o índice de crescimento micelial das linhagens resistentes entre a primeira e a quinta transferência e entre a décima e a décima quinta transferência. As linhagens Ap-22-R, Ap-25-R, Ap-29-R, Ap-30-R mantiveram um elevado nível de resistência após sucessivas transferências, ocorrendo uma baixa redução no crescimento em função do número de transferências. No entanto, a linhagem Ap-6-R apesar de manter a característica resistência, apresentou uma redução mais acentuada no crescimento com o aumento do número de transferências (Tabela 9).

4.8. Sensibilidade de linhagens de A. porri, a diferentes fungicidas.

Neste ensaio, os fungicidas iprodione, iprodione + thiram e procymidone inibiram totalmente o crescimento das linhagens sensíveis a 100 ppm (Tabelas 14,

TABELA 8: Frequência de mutantes de Alternaria porri resistentes
a iprodione

Concentração de esporos / ml	Número de colônias resistentes
2	
10	0
3	
10	0
4	
10	2
5	
10	7

TABELA 9: Efeito de dosagens de iprodione sobre o crescimento de linhagens (%) de Alternaria porri resistentes ao produto após transferências sucessivas em meio de BDA isento deste fungicida.

* % do crescimento nas concentrações de iprodione (em ppm) de																
Transferências	1000															
	100															
	10															
	Linhagens A. porri					Linhagens A. porri					Linhagens A. porri					Médias
	06R	22R	25R	29R	30R	06R	22R	25R	29R	30R	06R	22R	25R	29R	30R	
1a.	97.00	-	100.90	100.30	99.00	93.00	-	99.00	89.20	100.00	75.00	-	79.00	74.30	95.90	
5a.	96.80	100.00	100.00	101.80	100.30	89.00	95.70	94.00	95.60	95.90	66.00	85.80	80.40	84.10	88.30	
10a.	29.90	94.70	100.00	98.90	99.60	11.00	74.60	91.10	85.50	95.10	8.30	43.90	45.50	49.80	61.50	
15a.	20.00	92.80	92.80	95.70	99.50	13.33	82.30	83.90	86.30	100.00	12.00	53.00	49.20	50.40	57.70	
Médias	88.51 A					79.86 A					58.73 B					

c.v.= 18.290% Dados transformados - Raiz ($x + 0.5$)

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

15, 18 e Figura 2).

A maior redução na porcentagem de crescimento (PC) das linhagens resistentes a 100 ppm foi observada na presença dos fungicidas iprodione + thiram (8,04%) e dichlofluanide (9,17%) (Tabelas 13 e 15) seguida pelo fungicida mancozeb com PC = 18,64 (Tabela 16).

A porcentagem de crescimento micelial foi elevada tanto para as linhagens sensíveis quanto para as resistentes, na presença dos fungicidas benomyl e metalaxyl (Tabela 11 e 17) seguida pelo fungicida anilazine (tabela 10).

Ocorreu resistência cruzada entre dicloran, iprodione, procymidone, quintozene e vinclozolin, observando uma acentuada eficiência destes fungicidas, para as linhagens sensíveis enquanto que para as linhagens resistentes os fungicidas foram praticamente ineficazes (Tabela 12, 14, 18, 19 e 20).

Na tabela 21 encontraram-se as faixas de concentração de fungicidas que contém a ED50 para cada linhagem testada. Verifica-se que a ED50 dos fungicidas iprodione + thiram e dichlofluanide está localizada na faixa de 0 a 1 ppm destes fungicidas, tanto para as linhagens sensíveis quanto para as resistentes, excetuando-se o Ap-06-S na presença de iprodione + thiram.

TABELA 10: Efeito de dosagens de anilazine sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de anilazine (ppm) de				
	1	10	100	1000	Médias
Ap-06-S	100.31 b	89.85 abc	45.23 abc	4.92 c	60.08 cde
Ap-06-R	101.93 b	71.94 d	37.10 bcd	8.06 bc	54.76 e
Ap-22-S	108.06 ab	88.59 abc	33.22 d	13.09 abc	60.74 cd
Ap-22-R	100.32 b	90.71 ab	26.60 d	2.89 c	55.13 de
Ap-25-S	115.98 a	96.72 a	48.36 ab	20.49 a	70.39 a
Ap-25-R	110.26 ab	87.83 abc	51.71 a	17.11 ab	66.73 ab
Ap-29-S	108.55 ab	80.67 bcd	46.10 abc	9.67 abc	61.24 bc
Ap-29-R	108.42 ab	81.76 bcd	34.74 cd	4.91 c	57.45 cde
Ap-30-S	100.58 b	78.61 cd	51.44 a	20.81 a	62.86 bc
Ap-30-R	105.88 ab	81.98 bcd	35.29 cd	8.45 bc	57.90 cde
Médias	106.03 A	84.87 B	40.98 C	11.04 D	
C.V. = 8.298%					

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 11: Efeito de dosagens de benomyl sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* à iprodione

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de benomyl (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-06-S	100.99 ab	94.39 abc	72.61 b	35.31 ab		75.83 b
Ap-06-R	99.29 ab	89.64 bcde	60.72 c	24.29 c		68.48 de
Ap-22-S	94.29 b	85.39 e	61.90 c	24.13 c		66.43 e
Ap-22-R	104.29 a	93.93 abcd	66.79 bc	30.00 abc		73.75 bc
Ap-25-S	95.08 b	90.47 bcde	73.85 ab	27.08 bc		71.62 bcd
Ap-25-R	104.68 a	88.30 cde	67.56 bc	29.43 abc		72.49 bcd
Ap-29-S	94.56 b	89.73 bcde	72.81 b	26.59 c		70.92 cd
Ap-29-R	99.36 ab	98.06 ab	71.19 b	27.83 bc		74.11 bc
Ap-30-S	101.88 ab	101.25 a	81.88 a	37.50 a		80.63 a
Ap-30-R	98.63 ab	85.57 de	66.67 bc	26.82 c		69.42 de
Médias	99.30 A	91.67 B	69.60 C	28.90 D		

c.V. = 5.188%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 12: Efeito de dosagens de dicloran sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de dicloran (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-06-S	96.83 b	46.13 c	20.78 cd	3.51 c		41.81 c
Ap-06-R	99.20 ab	95.58 b	81.53 a	46.98 a		80.82 a
Ap-22-S	81.25 c	42.71 c	9.03 e	4.68 c		34.42 de
Ap-22-R	96.25 b	93.18 b	66.89 b	23.21 b		69.88 b
Ap-25-S	81.10 c	44.49 c	7.87 e	0.00 c		33.36 e
Ap-25-R	97.37 b	94.49 b	76.32 ab	28.57 b		74.19 b
Ap-29-S	97.44 b	43.96 c	15.02 de	0.00 c		39.10 cd
Ap-29-R	100.36 ab	97.45 b	74.18 ab	22.18 b		73.54 b
Ap-30-S	95.72 b	42.86 c	30.00 c	0.00 c		42.14 c
Ap-30-R	110.39 a	112.99 a	81.81 a	19.48 b		81.17 a
Médias	95.59 A	71.38 B	46.34 C	14.86 D		

c.v. = 8.869%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 13: Efeito de dosagens de dichlofluanide sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	* % de crescimento nas concentrações de dichlofluanide (ppm) de					Médias

	1	10	100	1000		
Ap-06-S	82.15 a	54.65 a	27.14 a	5.36 a	42.32 a	
Ap-06-R	51.51 cd	12.50 e	9.09 bcd	3.03 a	19.03 e	
Ap-22-S	75.20 a	31.30 b	14.23 bcd	2.44 a	30.79 b	
Ap-22-R	64.51 b	22.22 cd	5.73 d	1.43 a	23.47 cd	
Ap-25-S	57.84 bc	23.76 bcd	13.90 bcd	1.79 a	24.32 cd	
Ap-25-R	57.46 bc	28.51 bc	14.91 bc	2.63 a	25.88 cd	
Ap-29-S	54.78 c	25.65 bcd	13.48 bcd	1.74 a	23.91 cd	
Ap-29-R	45.35 d	18.60 de	7.36 cd	5.04 a	19.09 e	
Ap-30-S	64.70 b	25.00 bcd	16.18 b	1.47 a	26.84 bc	
Ap-30-R	52.19 cd	23.25 bcd	8.77 bcd	2.63 a	21.71 de	

Médias	60.57 A	26.54 B	13.08 C	2.76 D		

c.v.= 14.876%						

* Em relação à testemunha; médias de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 14: Efeito de dosagens de iprodione sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* ao produto

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de iprodione (ppm) de				
	1				
	1	10	100	1000	Médias
Ap-06-S	20.10 b	0.00 c	0.00 c	0.00	2.27 c
Ap-06-R	80.69 a	29.86 b	10.94 b	2.96 b	26.70 b
Ap-22-S	19.99 b	2.98 c	0.00 c	0.00	3.31 c
Ap-22-R	98.59 a	94.69 a	74.42 a	43.87 a	76.19 a
Ap-25-S	10.54 b	0.00 c	0.00 c	0.00	1.35 c
Ap-25-R	99.62 a	100.00 a	91.02 a	45.51 a	82.22 a
Ap-29-S	14.43 b	0.00 c	0.00 c	0.00	1.74 c
Ap-29-R	97.03 a	98.91 a	85.43 a	49.63 a	81.39 a
Ap-30-S	22.35 b	0.00 c	0.00 c	0.00	2.48 c
Ap-30-R	98.59 a	94.69 a	74.42 a	43.88 a	76.19 a
Médias	48.27 A	24.21 B	18.05 C	10.84 D	

c.v.= 17.513% (Dados transformados para Raiz ($x + 0,5$))

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (mínusculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 15: Efeito de dosagens de iprodione + thiram sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de iprodione + thiram (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-06-S	90.81 ab	55.19 a	0.00 b	0.00 a		36.50 ab
Ap-06-R	74.66 bcd	20.95 cd	0.00 b	0.00 a		23.90 cd
Ap-22-S	70.70 bcd	27.11 bcd	0.00 b	0.00 a		24.45 cd
Ap-22-R	99.65 a	47.35 ab	24.74 a	0.00 a		42.93 a
Ap-25-S	72.73 bcd	19.53 cd	0.00 b	0.00 a		23.06 cd
Ap-25-R	61.92 d	14.24 cd	0.00 b	0.00 a		19.04 d
Ap-29-S	79.14 abcd	29.86 bcd	0.00 b	0.00 a		27.25 bcd
Ap-29-R	84.25 abc	27.40 bcd	0.00 b	0.00 a		27.91 bcd
Ap-30-S	64.36 cd	11.91 d	0.00 b	0.00 a		19.07 d
Ap-30-R	74.52 bcd	34.36 abc	15.44 ab	0.00 a		31.08 bc
Médias	77.21 A	28.79 B	4.02 C	0.00 C		

c.v. = 34.982%

* Em relação à testemunha; médias de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 16: Efeito de dosagens de mancozeb sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	* % de crescimento nas concentrações de mancozeb (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-22-S	99.22 ab	62.02 c	30.62 a	8.53 ab		50.10 ab
Ap-22-R	95.13 ab	71.54 ab	28.84 ab	4.12 ab		49.90 ab
Ap-25-S	92.80 b	62.50 ab	21.59 abc	12.88 a		47.44 bc
Ap-25-R	94.31 ab	74.02 a	20.64 bcd	7.83 ab		49.20 abc
Ap-29-S	100.00 ab	56.98 c	19.24 cd	2.27 b		44.62 cd
Ap-29-R	99.25 ab	59.40 c	11.65 d	0.00 b		42.57 d
Ap-30-S	103.06 a	77.21 a	30.53 a	0.00 b		52.70 a
Ap-30-R	97.97 ab	55.29 c	13.42 cd	0.00 b		41.70 d
Médias	97.72 A	64.87 B	22.07 C	4.45 D		
c.v. = 9.186%						

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si, estatisticamente (Tukey 5%).

TABELA 17: Efeito de dosagens de metalaxyl sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de metalaxyl (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-06-S	94.07 b	82.61 c	78.66 d	47.04 bc		75.59 g
Ap-06-R	103.01 ab	95.11 ab	94.36 ab	44.74 cd		84.30 bcd
Ap-22-S	98.15 b	97.40 ab	78.89 d	34.07 d		77.13 fg
Ap-22-R	95.35 b	93.80 ab	82.56 cd	43.80 cd		78.87 efg
Ap-25-S	95.06 b	88.89 bc	87.24 bcd	46.09 bc		79.32 defg
Ap-25-R	96.75 b	94.31 ab	91.46 abc	42.68 cd		81.83 cdef
Ap-29-S	97.83 b	96.93 ab	93.48 ab	55.65 ab		85.97 abc
Ap-29-R	99.15 b	96.17 ab	98.09 ab	42.98 cd		84.10 bcde
Ap-30-S	112.31 a	103.08 a	89.99 bc	60.00 a		91.34 a
Ap-30-R	104.08 ab	103.17 a	101.36 a	47.51 bc		89.03 ab
Médias	99.57 A	95.15 B	89.61 C	46.46 D		

c.v. = 5.814%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 18: Efeito de dosagens de procymidone sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

* % de crescimento nas concentrações de procymidone (ppm) de					
Linhagens	1	10	100	1000	Médias
Ap-06-S	32.07 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 d	8.02 d
Ap-06-R	106.96 b	110.45 ab	81.62 b	72.14 c	92.79 c
Ap-22-S	26.73 de	0.00 c	0.00 c	0.00 d	6.68 d
Ap-22-R	106.37 b	106.36 ab	103.19 a	81.36 b	99.32 b
Ap-25-S	29.50 cde	6.45 c	0.00 c	0.00 d	8.99 d
Ap-25-R	103.76 b	113.61 a	104.69 a	94.37 a	104.11 a
Ap-29-S	24.07 e	0.00 c	0.00 c	0.00 d	6.02 d
Ap-29-R	100.00 b	104.52 b	103.62 a	87.79 ab	98.98 b
Ap-30-S	35.66 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	8.92 d
Ap-30-R	115.85 a	110.38 ab	110.38 a	88.52 ab	106.28 a
Médias	68.10 A	55.18 B	50.35 C	42.42 D	

c.v. = 6.216%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 19: Efeito de dosagens de quintoze sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de quintoze (ppm) de					Médias
	1	10	100	1000		
Ap-06-S	75.72 c	28.40 d	15.64 de	12.34 cd		33.02 d
Ap-06-R	94.69 a	60.18 ab	52.66 ab	40.71 b		62.06 b
Ap-22-S	75.95 c	25.74 de	18.57 d	13.50 c		33.44 d
Ap-22-R	95.12 a	56.91 b	47.97 b	40.65 b		60.16 b
Ap-25-S	73.77 c	18.85 ef	9.02 e	7.79 cd		27.36 e
Ap-25-R	98.71 a	66.09 a	57.08 a	51.50 a		68.35 a
Ap-29-S	74.69 c	15.77 f	9.55 e	7.47 cd		26.87 e
Ap-29-R	86.59 b	40.24 c	36.99 c	35.37 b		49.80 c
Ap-30-S	76.34 c	19.08 ef	9.92 e	6.11 d		27.86 e
Ap-30-R	99.01 a	55.45 b	48.02 b	48.51 a		62.75 b
Médias	85.06 A	38.67 B	30.54 C	26.40 D		

c.v. = 7.054%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 20: Efeito de dosagens de vinclozolin sobre o crescimento micelial de linhagens sensíveis e resistentes de *Alternaria porri* a iprodione.

Linhagens	% de crescimento nas concentrações de vinclozolin (ppm) de				
	1				
	10	100	1000	Médias	
Ap-06-S	102.80 abc	32.71 d	12.61 c	8.88 d	39.25 cd
Ap-06-R	94.86 bc	92.99 c	89.72 b	72.90 bc	87.62 b
Ap-22-S	94.06 c	26.03 d	10.50 c	8.68 d	34.82 de
Ap-22-R	100.47 abc	101.42 abc	90.53 b	73.94 abc	91.59 b
Ap-25-S	81.22 d	23.47 d	15.49 c	5.16 d	31.33 e
Ap-25-R	102.22 abc	104.89 ab	100.44 ab	84.89 a	98.11 a
Ap-29-S	110.40 a	32.18 d	14.85 c	7.43 d	41.21 c
Ap-29-R	103.77 abc	98.11 bc	93.40 b	67.45 c	90.68 b
Ap-30-S	82.60 d	30.43 d	11.59 c	7.25 d	32.97 e
Ap-30-R	106.11 ab	101.00 a	106.66 a	83.33 ab	101.52 a
Médias	97.85 A	65.22 B	54.58 C	41.99 D	

c.v. = 7.715%

* Em relação à testemunha; média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 21: Faixa de concentração de fungicidas (ppm) que contém a dose suficiente para inibir 50% do crescimento micelial (DE 50) das linhagens de Alternaria porri sensíveis e resistentes à iprodione

Linha	Fungicidas (ppm)										
	Anilazine	Benomyl	Dicloran	Dichlofluanide	Iprodione	Iprodione + Thiram	Mancozeb	Metalaxyl	Procy- midone	Vinclo- zolin	Quintozene
S : Ap-06	10 -- 100	10 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	0 -- 1	10 -- 100	10 -- 100	100 -- 1000	0 -- 1	1 -- 10	1 -- 10
E :											
N : Ap-22	10 -- 100	10 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	0 -- 1	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	0 -- 1	1 -- 10	1 -- 10
S :											
I : Ap-25	10 -- 100	10 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	0 -- 1	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	0 -- 1	1 -- 10	1 -- 10
V :											
E : Ap-29	10 -- 100	10 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	0 -- 1	1 -- 10	10 -- 100	> 1000	0 -- 1	1 -- 10	1 -- 10
I :											
S : Ap-30	10 -- 1000	10 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	0 -- 1	1 -- 10	10 -- 100	> 1000	0 -- 1	1 -- 10	1 -- 10
:											
:											
R :											
E : Ap-06	10 -- 100	100 -- 1000	100 -- 1000	1 -- 10	1 -- 10	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	> 1000	> 1000	100 -- 1000
S :											
I : Ap-22	10 -- 100	100 -- 1000	100 -- 1000	1 -- 10	100 -- 1000	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	> 1000	> 1000	10 -- 1000
S :											
T : Ap-25	10 -- 100	100 -- 1000	100 -- 1000	1 -- 10	100 -- 1000	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	> 1000	> 1000	> 1000
E :											
N : Ap-29	10 -- 100	100 -- 1000	100 -- 1000	1 -- 10	100 -- 1000	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	> 1000	> 1000	1 -- 10
T :											
E : Ap-20	10 -- 100	100 -- 1000	100 -- 1000	1 -- 10	> 1000	1 -- 10	10 -- 100	100 -- 1000	> 1000	> 1000	1 -- 10
S :											

FIGURA 2: Efeito de fungicidas a 100 ppm sobre o crescimento micelial
(PC - Porcentagem de Crescimento) de linhagens de Alternaria porri

LEGENDA: 1 - Linhagens sensíveis - média de 05 linhagens com 04 repetições
2 - Linhagens resistentes - média de 05 linhagens com 04 repetições

4.9. Adaptabilidade de linhagens de A. porri resistentes a iprodione.

De um modo geral, a esporulação das linhagens sensíveis foi maior em relação a esporulação das resistentes.

As linhagens Ap-06-S, Ap-6-R, Ap-22-S e Ap-22-R, apresentaram as menores esporulações não diferindo entre si pelas análises estatísticas, seguidas pela esporulação das linhagens Ap-29-R, Ap-30-S, Ap-29-S e Ap-30-R, as quais também não diferiram entre si. As linhagens Ap-29-S e Ap-22-R apresentavam a maior e a menor esporulação respectivamente (Tabela 22).

Quanto ao crescimento micelial não houve uma diferença muito acentuada entre as linhagens sensíveis e resistentes, sendo o maior crescimento observado em uma linhagem sensível (Ap-29-S) e o menor em uma linhagem resistente (Ap-30-R) (Tabela 23).

Todas as linhagens resistentes (Ap-6-R, Ap-7-R, Ap-8-R, Ap-22-R e Ap-42-R) cresceram em doses crescentes de iprodione até 5000 ppm, entretanto observou-se uma redução no crescimento à medida que eleva-se a dose do fungicida (Tabela 24). Houve diferença estatística significativa entre todas as doses e entre as linhagens testadas exceto entre Ap-7-R e Ap-22-R.

Tabela 22: Esporulação de linhagens de *Alternaria porri*, em BDA.

Linhagens	Produção média de esporos x 10 ² / 5 discos	
Ap-06-S	0.25	c
Ap-06-R	0.25	c
Ap-22-S	1.10	c
Ap-22-R	1.04	c
Ap-25-S	14.24	ab
Ap-25-R	2.32	bc
Ap-29-S	17.72	a
Ap-29-R	6.06	abc
Ap-30-S	9.82	abc
Ap-30-R	3.92	abc

c.v. = 11.819% (dados transformados em Log (x + 10))

* Discos de 60 mm de diâmetro

** Média de 03 repetições; médias seguidas por letras distintas diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 23: Crescimento micelial de linhagens de *Alternaria porri* sensíveis e resistentes a iprodione em meio de BDA.

Linhagens	Crescimento diametral médio (cm) após horas de incubação			
	48	96	144	Médias
1				
Ap-06-S	2.03 b	4.20 abc	6.75 b	4.33 cd
Ap-22-S	2.08 ab	4.18 abc	6.60 b	4.28 d
Ap-25-S	2.23 ab	4.45 a	6.93 ab	4.53 abc
Ap-29-S	2.48 a	4.53 a	7.23 a	4.74 a
Ap-06-R	2.18 ab	4.03 bc	7.20 a	4.47 bcd
Ap-22-R	2.08 ab	4.18 abc	6.60 b	4.28 d
Ap-25-R	2.23 ab	4.28 abc	6.70 b	4.40 bcd
Ap-29-R	2.23 ab	4.43 ab	7.18 a	4.61 ab
Ap-30-R	2.08 ab	3.93 c	6.03 c	4.01 e
Médias	2.18 C	4.24 B	6.80 A	
C.V. = 4.243%				

1 - Média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

Tabela 24: Efeito de dosagens crescentes de iprodione sobre o crescimento micelial de linhagens resistentes de *Alternaria porri* ao produto, aos 7 dias de incubação.

Linhagens	Concentração de iprodione (ppm)							Médias
	0	500	1000	2000	3000	4000	5000	
Ap-06-R	7.43 a	4.53 c	3.07 bc	1.63 b	1.20 bc	0.97 a	0.77 ab	2.80 b
Ap-07-R	7.03 bc	5.50 c	3.13 b	1.40 c	1.00 c	0.93 a	0.73 ab	2.68 c
Ap-08-R	7.23 ab	5.17 a	4.10 a	2.10 a	1.60 a	1.10 a	0.90 a	3.17 a
Ap-22-R	6.60 d	4.87 b	3.23 b	1.33 c	1.00 c	1.00 a	0.63 b	2.68 c
Ap-42-R	7.00 c	4.53 c	2.87 c	1.67 b	1.40 ab	1.07 a	0.77 ab	2.76 bc
Médias	7.06 A	4.72 B	3.28 C	1.63 D	1.25 E	1.01 F	0.76 G	

$$C.V. = 4.701\%$$

* Diâmetro médio de 3 repetições (cm); médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Duncan 5%)

A linhagem resistente (Ap-25-R) desapareceu após a quarta e quinta transferência, quando se misturou proporções equivalentes de conídios e micélio de Ap-25-S e Ap-25-R, respectivamente o mesmo acontecendo com a mistura de micélio de Ap-6-R e Ap-6-S. Por outro lado, houve predominância das linhagens resistentes até a quinta transferência quando se misturou conídios das linhagens Ap-25-R e Ap-25-S na proporção 9R:1S, no entanto na décima transferência observou-se o desaparecimento desta linhagem. A mistura de micélio de Ap-25-R e Ap-25-S, nas proporções 9R:1S e 9S:1R resultou-se na predominância e eliminação da linhagem sensível e resistente respectivamente até a décima transferência (Tabela 25).

O índice de doença avaliado em folhas destacadas, previamente feridas, dos 4 cultivares mostrou uma alta suscetibilidade para os cultivares Texas Early Grano-502, Cristal Wax e Granex-33 (ID = 100), diferindo somente do cultivar Baia Periforme que apresentou ID = 75. Quanto ao método de inoculação das folhas e meios para cultivo do inóculo, verificou-se que o meio de CaCO_3 associado ao método de inoculação "com fermento" elevou o índice de doença da linhagem AP-34-S (Tabela 26).

Tanto as linhagens sensíveis quanto as resistentes mostraram-se patogênicas as folhas de cebola, no entanto, verificou-se um aumento no índice de doença das linhagens sensíveis exceto para a linhagem Ap-43-S (Tabela

TABELA 25: Competição entre linhagens de *Alternaria porri* resistentes e sensíveis a iprodione in vitro

Inóculo												
Micélio das linhagens												
Esporos da linhagem Ap-25						Ap-25						
						Ap-06						
Transferência	R	S	1R : 1S	9R : 1S	R	S	1R : 1S	9R : 1S	9S : 1R	R	S	1R : 1S
1/												
1a.	86	0	43	86	89	0	39	92	0	83	0	45
2a.	97	0	4	97	-	-	-	-	-	-	-	-
4a.	92	0	0	93	-	-	-	-	-	-	-	-
5a.	82	0	0	81	85	0	0	97	0	81	0	0
10a.	78	0	0	0	81	0	0	82	0	77	0	0

1/ Número de colônias monospóricas resistentes a iprodione / 100 esporos cultivados

- Não avaliados

TABELA 26: Efeito do método de inoculação e meios de cultivo sobre o índice de doença de *Alternaria porri* (Ap-34-S) em folhas de cebola destacadas do cultivar Granex-33

Inóculo produzido em meio de	Índice de doença nos métodos de inoculação (%)			
	Com fermento	Sem fermento	Sem cerosidade	Médias
BDA	77.50 b A	25.00 a B	0.00 b C	34.17 b
Cebola	40.00 c A	25.00 a B	28.75 a B	31.25 b
CaCO ₃	96.25 a A	21.25 a B	0.00 b C	39.17 a
Médias	71.25 A	23.75 B	9.59 C	

c.v. = 11.952%

* Baseado numa escala de notas de 0 a 4 e transformados em % de infecção segundo CIRULLI & ALEXANDER (1966)

** Média de 05 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

27).

Em sementes de cebola, o período de inoculação (PI) influenciou sobre o índice de doença (ID) das linhagens Ap-34-S e Ap-34-R, entretanto o PI = 24 horas não diferiu pelas análises estatísticas do PI = 18 horas. O índice de doença da linhagem sensível foi maior (35,35) que o da linhagem resistente (12,85) diferindo entre si, pelas análises estatísticas (Tabela 28).

A avaliação da patogenicidade em sementes do cultivar Granex-33 mostrou maior sensibilidade deste à A. porri quando comparado com o cultivar Baia Periforme em relação a todas as linhagens testadas. As linhagens sensíveis testadas por este método foram mais patogênicas que as resistentes diferindo entre si, pelas análises estatísticas (Tabela 29).

4.10. Efeito de iprodione e iprodione acrescido de thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens de A. porri em sementes de cebola do cultivar Granex - 33.

O tratamento de sementes com o fungicida iprodione + thiram reduziu o índice de doença das linhagens mais acentuadamente que o tratamento com produto puro (iprodione), diferindo entre si, estatisticamente. Houve

TABELA 27: Patogenicidade de linhagens de *Alternaria porri* em
folhas de cebola destacadas do cultivar Granex-33.

Linhagens	Índice de doença	
		*
Ap-25-S	100.00	a **
Ap-25-R	88.75	b
Ap-40-S	73.75	c
Ap-40-R	68.75	c
Ap-42-S	97.50	a
Ap-42-R	83.75	b
Ap-43-S	25.00	d
Ap-43-R	30.00	d

c.v.= 4.620%

* Baseado numa escala de notas de 0 a 4 e transformados em % de infecção, segundo CIRULLI & ALEXANDER (1966)

** Média de 05 repetições; médias seguidas por letras distintas diferem entre si (Tukey 5%)

TABELA 28: Efeito do período de inoculação (PI) de sementes de cebola do cultivar Granex-33 sobre o índice de doença de linhagem sensível (AP-34-S) e resistente (AP-34-R) de *Alternaria porri* a iprodione.

* Índice de doença resultante da inoculação com as linhagens			
PI(horas)	AP-34-S	AP-34-R	Médias
06	21.42	5.71	13.57 ^{1/} c
12	27.14	11.42	19.28 bc
18	38.57	12.85	25.71 ab
24	54.28	21.42	37.85 a
Médias	35.35 ^{1/} A	12.85 B	

c.v. = 24.653% (dados transformados em raiz ($x = 0,5$))

1/ Média de 05 repetições; médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

* Baseado numa escala de notas de 0 a 2 e transformados em % de infecção, segundo CIRULLI & ALEXANDER (1966)

TABELA 29: Índice de doença de linhagens de Alternaria porri, em plântulas de cebola, 6 dias após o plantio

Cultivares	Linhagens de Alternaria porri														
	Sensíveis à iprodione							Resistentes à iprodione							
	6	25	32	40	42	43	Média	6	25	32	40	42	43	Média	Médias de cultivares
Granex-33	49.08 a	48.19 a	38.38 a	40.47 a	34.57 a	52.78 a	44.35 a	44.37 a	30.81 a	27.79 a	32.86 a	32.30 a	22.12 a	31.37 a	37.58 a
Baia															
Periforme	20.70 b	8.21 b	15.12 b	4.22 b	18.28 b	9.78 b	12.01 b	0	b	7.21 b	1.51 b	2.00 b	2.10 b	2.01 b	6.06 b
Médias de linhagens				25.68 A								12.57 B			

c.v.= 30.034% (dados transformados em raiz ($\sqrt{x + 0.5}$))

1/ Índice de doença (05 repetições) segundo CIRULLI & ALEXANDER (1966)

2/ Médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

também diferença significativa entre o tratamento preventivo e erradicativo sendo o tratamento erradicativo mais eficiente. A interação entre tipo de fungicida usado e tipo de tratamento de sementes foi altamente significativa sendo o fungicida iprodione + thiram associado ao tratamento erradicativo o mais eficaz na redução das linhagens sensíveis e resistentes em sementes de cebola (Tabela 30).

TABELA 30: Efeito de iprodione e mistura de iprodione + thiram sobre a prevenção e erradicação de linhagens de *Alternaria porri*, em sementes de cebola do cultivar Granex-33

Fungicidas	Linhagens	Índice de doença nos tratamentos		Médias
		Preventivo	Erradicativo	
Iprodione	Ap-25-S	0.16	0.08	0.12
	Ap-43-S	0.20	0.04	0.12
	Ap-25-R	2.05	1.18	1.62
	Ap-43-R	4.64	3.01	3.83
		----- *	-----	-----
		1.76 a	1.08 a	1.42 a
Iprodione + Thiram	Ap-35-S	0.05	0.00	0.03
	Ap-43-S	0.15	0.00	0.08
	Ap-25-R	1.54	0.10	0.82
	Ap-43-R	2.80	0.10	1.45
		-----	-----	-----
		1.14 b	0.05 b	0.06 b

Médias		1.45 A	0.57 B	

c.v.= 16.226% (dados transformados para Raiz (x + 0.5))

* Médias seguidas por letras distintas (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) diferem entre si (Tukey 5%)

5 - DISCUSSÃO:

A partir da população de A. porri avaliada (33 isolados), não foi obtida linhagem resistente a iprodione, em condições de campo. Na última década, ao se trabalhar com o problema de resistência de fungos a dicarboximida, tem-se observado que, muitas vezes, a falta de obtenção de linhagens resistentes aos produtos reside na busca de linhagens com alto nível de resistência no campo (BEEVER et alii, 1989). De um modo geral, a procura de linhagens com baixo nível de resistência tem sido mais bem sucedida, e, segundo estudos realizados, estas linhagens apresentam um nível de adaptabilidade semelhante ao do isolado sensível (BEEVER et alii, 1989). Entretanto, ao avaliar 17 isolados de A. porri em baixas concentrações de iprodione (1 e 10 ppm), observou-se uma inibição de crescimento micelial semelhante entre todas as linhagens a 1 ppm e ausência de crescimento a 10 ppm do produto, descartando assim a hipótese de ocorrência de linhagens de A. porri com baixo nível de resistência no campo. Por outro lado, a presença de linhagens com baixo nível de resistência não apresenta um

perigo para a agricultura, visto que normalmente a dosagem de defensivo empregado no campo para combater a doença é suficiente para eliminá-las.

Na avaliação da frequência de linhagens resistentes de A. porri a iprodione, no campo, observou-se que o aumento do período de incubação dos isolados favoreceu o aparecimento de setores resistentes ao fungicida. Resultados semelhantes foram alcançados por FANCELLI (1987) ao trabalhar com Alternaria dauci.

Obteve-se linhagens resistentes a partir de setores que cresciam em altas concentrações de iprodione (100 e 1000 ppm) em condições de laboratório. Segundo BEEVER & BYRDE (1982) isto é muito comum quando se trabalha com fungicidas do grupo dicarboximida. Diversos autores (LEROUX et alii, 1977; CHASTAGNER & VASSEY, 1979; PRESLEY & MAUDE, 1980) têm realizado estudos sobre a resistência de patógenos a dicarboximida a partir de linhagens obtidas in vitro, visando avaliar a adaptabilidade destas linhagens. Segundo GEORGOPOULOS (1982a) o estudo destas linhagens obtidas em condições de laboratório poderão fornecer importantes subsídios para enfrentar o problema de resistência, caso estas venham a surgir em condições de campo.

As linhagens resistentes obtidas in vitro apresentaram um alto nível de resistência, conseguindo crescer em altas concentrações do fungicida (até 5000 ppm)

Linhagens com este nível de resistência normalmente são pouco adaptadas.

A concentração do inóculo influenciou o surgimento de linhagens resistentes. Ao se trabalhar com uma suspensão de esporos de 10^5 esporos/ml, somente após 9 dias de incubação, observou-se a presença de linhagens resistentes. Os resultados alcançados sugerem a ocorrência lenta de adaptação da célula fúngica do fungo ao novo meio, fazendo com que, após alguns dias, ou por perda da eficácia do produto ou por adaptação do patógeno, o conídio sofra uma mutação, resultando no aparecimento de colônias crescendo no meio acrescido do produto. Com o aumento da concentração de esporos, esperar-se-ia uma ocorrência mais rápida e acentuada de linhagens resistentes. As linhagens resistentes diferiram fenotipicamente das linhagens sensíveis, podendo serem observadas mudanças na coloração das colônias resistentes em relação às sensíveis.

Através de observações feitas ao microscópio estereoscópico verificou-se que, apesar da ausência de colônias resistentes até o nono dia de incubação, ocorria a germinação dos esporos na presença do fungicida. Segundo DAVIS & DENNIS (1981a), os fungicidas do grupo dicarboximida afetam mais o crescimento micelial que a germinação dos esporos.

Pelos dados obtidos, verificou-se que a característica de resistência a iprodione observada nos

mutantes de A. porri é bastante estável, sendo mantida durante um período de 105 dias na ausência do produto, sugerindo assim a ocorrência de mudanças genéticas na célula fúngica conferindo a resistência. DAVIS & DENNIS (1981b), ao trabalhar com linhagens de Botrytis cinerea resistentes a dicarboximida obtidas em campo e laboratório, verificaram que a maioria dos isolados mantiveram a resistência a dicarboximida durante 40 cultivos sucessivos na ausência dos produtos.

A tolerância do fungo a fungicidas pode ocorrer após uma intensiva aplicação do produto (WEBSTER et alii, 1970) no entanto esta característica é perdida quando se cultiva o patógeno em meio isento do produto (DEKKER, 1982b).

Ao serem obtidas linhagens resistentes a um determinado produto, GEORGOPOULOS (1982b) sugere que sejam realizados estudos verificando se a mutação para resistência afetou a sensibilidade a outros produtos geralmente empregados na cultura ou similares entre si quanto à estrutura química e/ou ao modo de ação. No presente trabalho, ao se estudar a sensibilidade das linhagens resistentes a outros fungicidas, verificou-se que ocorreu resistência cruzada entre todos os fungicidas do grupo dicarboximida testados (iprodione, procymidone e vinclozolin) assim como entre os fungicidas do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos (dicloran e quintozene). Estes

resultados eram já esperados devido à semelhança química existente entre estes fungicidas assim como a semelhança quanto ao modo de ação destes produtos (GEORGOPOULOS, 1982). A ocorrência de resistência cruzada entre hidrocarbonetos aromáticos e dicarboximidas foi observada também por LEROUX et alii (1977) e SZTEJNBERG & JONES (1978).

A mistura do iprodione ao fungicida thiram aumentou a eficácia do produto em relação à população de linhagens resistentes, reduzindo acentuadamente o crescimento micelial das linhagens testadas. Dados semelhantes foram obtidos por PRUSKY et alii (1985) ao trabalharem com populações resistentes de Botrytis cinerea a thiabendazol. O fungicida metalaxyl mostrou-se ineficaz para o controle de linhagens de A. porri.

De um modo geral, tanto a esporulação quanto o crescimento micelial das linhagens resistentes foram ligeiramente menores quando comparadas às linhagens sensíveis. Dados semelhantes foram obtidos por DAVIS & DENNIS (1981b) e HISADA et alii (1981) ao trabalharem com populações de Botrytis cinerea resistentes a dicarboximidas.

Todas as linhagens resistentes apresentaram um alto nível de resistência podendo crescer em meio de BDA contendo até 5000 ppm de iprodione. PRESLY & MAUDE (1982) obtiveram linhagens de Botrytis cinerea resistentes à dicarboximida, a partir de linhagens sensíveis e resistentes à benomyl, capazes de crescer em meio-de-cultura contendo

até 2500 ppm de iprodione. DENNIS & DAVIS (1979) conseguiram isolar linhagens deste patógeno no campo em plantações de morango e verificaram que estas linhagens eram capazes de crescer em meio-de-cultura contendo até 10000 ppm de iprodione e 1000 ppm de vinclozolin.

Ao estudar a competitividade entre linhagens sensíveis e resistentes, verificou-se que a linhagem resistente reduziu sua frequência com a intensificação das transferências em meio isento do fungicida, independente de se trabalhar com micélio ou com suspensão de esporos. Houve desaparecimento de linhagens resistentes mesmo quando se iniciou o ensaio com alta proporção de conídios de linhagens resistentes (9R : 1S), o mesmo não ocorrendo quando se trabalhou com micélio, apesar de ser observada uma redução no número de colônias resistentes no decorrer do ensaio. GULLINO & GARIBALDI (1981) avaliando a competitividade de B. cinerea (1R : 1S; 1S : 9R) in vitro e in vivo, verificaram que, nos dois casos, ocorreu uma redução da linhagem resistente mostrando uma menor adaptabilidade destas linhagens. HUNTER & BEEVER (1982) estudaram a competitividade das linhagens sensíveis e resistentes de B. cinerea, inoculando proporções equivalentes de conídios em morangos, mas um ano após a linhagem resistente não foi recuperada.

O surgimento de linhagens resistentes, tomando como base uma população sensível em presença do fungicida

iprodione, foi observada somente a partir do nono dia de incubação. Segundo DELP (1980), mutantes resistentes a um fungicida podem surgir naturalmente, no entanto numa frequência muito baixa ($1 \text{ em } 10^8$ esporos sensíveis) devido principalmente à baixa adaptabilidade destas linhagens. LEROUX et alii (1977) obtiveram linhagens resistentes de Botrytis cinerea a dicloran, vinclozolin e iprodione, a partir de linhagens sensíveis a benomyl, numa frequência de $2 \text{ em } 5.10^7$ e $30 \text{ em } 140.10^7$ esporos sensíveis sem e com exposição à luz ultra-violeta respectivamente.

A resistência dos cultivares de cebola está diretamente vinculada à espessura da cutícula e deposição de ceras nas folhas e hastes florais. Entretanto, na presença de ferimentos da planta, a resistência é praticamente anulada (JONES & MANN, 1963 e FERREIRA, 1983). Nos ensaios realizados visando selecionar um cultivar para avaliar a patogenicidade das linhagens de A. porri verificou-se que, ferindo-se a cutícula da folha, somente o cultivar Baía Periforme não apresentou um Índice de Doença = 100.

No teste de patogenicidade realizado em folhas destacadas de cebola, provavelmente o método de inoculação facilitou a penetração do patógeno, mas, mesmo assim, a maioria das linhagens sensíveis inoculadas apresentaram um índice de doença semelhante mas um pouco superior ao das linhagens resistentes respectivas. A diferença entre a virulência das linhagens sensíveis e resistentes pôde ser

melhor visualizada ao se inocular sementes de cebola e avaliar a patogenicidade nas plântulas. Neste método, o índice de doença das linhagens sensíveis foi significativamente diferente e superior ao obtido para as linhagens resistentes. O método de inoculação de A. porri em sementes possibilitou a diferenciação entre a suscetibilidade dos cultivares precocemente. O cultivar Baia Periforme mostrou-se mais resistente para ambas as linhagens. Em relação a baixa virulência das linhagens resistentes obtidas in vitro, os resultados obtidos por BRENNEMAN et alii (1987b) ao trabalharem com linhagens resistentes de Sclerotinia minor a dicarboximida concordam plenamente com os alcançados.

Ao serem tratadas sementes previamente inoculadas com o fungicida iprodione + thiram, observou-se uma redução na patogenicidade das linhagens sensíveis e resistentes a iprodione. Atualmente, a recomendação de emprego de formulação mista de fungicida sistêmico com um fungicida residual, visando reduzir os riscos de danos provocados pela presença de linhagens resistentes, faz parte das estratégias recomendadas para a prevenção da resistência (CHIN, 1987). Em Israel, ELAD et alii (1988) obtiveram um bom controle de linhagens resistentes e sensíveis a benomyl através do emprego de uma mistura de NPC e carbendazin.

Além da intensiva e extensiva aplicação de um fungicida sistêmico e da adaptabilidade da linhagem

resistente, o rompimento de problemas de resistência de fungos a fungicidas depende do tipo de doença, da natureza do patógeno e das circunstâncias que induzem ou retraem o desenvolvimento da resistência (DEKKEK, 1982a). Baseando-se nesta afirmativa, apesar de não terem sido encontradas linhagens resistentes de A. porri em condições de campo, acredita-se que, tratando-se de uma doença foliar, associada à elevada esporulação do patógeno na hospedeira e a intensificação constante do uso de iprodione, vista a sua comprovada eficácia para o combate deste patógeno, torna-se necessário um acompanhamento constante do comportamento destas populações em presença do fungicida. Consciente da possibilidade de ocorrência destas linhagens também no campo, o ideal seria empregar estratégias visando evitar o surgimento destas populações no campo.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- 1 - Linhagens de Alternaria porri da cebola resistentes a iprodione não foram observadas em lavouras comerciais; porém podem ser obtidas em laboratório na presença do fungicida, numa proporção de 1 em 10^4 a 10^5 conídios.
- 2 - Linhagens assim obtidas se mantêm estáveis em transferências sucessivas na ausência do fungicida e podem crescer a concentrações superiores a 5000 ppm; entretanto, são menos adaptadas com relação ao crescimento, esporulação, competição e patogenicidade do que as originais.
- 3 - Linhagens resistentes a iprodione apresentaram resistência cruzada aos fungicidas do grupo dos dicarboximidas (procymidone e vinclozolin) e do grupo

dos heterociclicos aromaticos (dicloran e quitozene),
porém se mostraram mais sensíveis aos fungicidas
iprodione + thiram e dichlofluanide do que as linhagens
selvagens.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis, Burgess Publishing Co. 1972. 241 p.

BEEVER, R. E. Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. Transactions British Mycological Society, London, 80: 327 - 31, 1983.

BEEVER, R. E. & BRIEN, H. M. R. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in Botrytis cinerea. New Zealand Journal of Agricultural Research, Wellington, 26: 391 - 400, 1983.

BEEVER, R.E. & BYRDE, R. J. W. Resistance to the dicarboximide fungicides. In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G., ed. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 101 - 17.

- BEEVER, R. E.; LARACY, E. P.; PAK, H.A. Strains of Botrytis cinerea resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. Plant Pathology, Oxford, 38:427 - 37, 1989.
- BOCK, K. R. Purple blotch (Alternaria porri) of onion in Kenya Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 54: 303 - 11, 1964.
- BOVEDA, R. R. V. Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas in vitro de Alternaria solani (Ell. e Mart.) Jones e Grout e Alternaria alternata (Fr.) Keissler de solanáceas. Piracicaba, 1986, 106 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BRENNEMAN, T. B.; PHIPPS, P.M.; STIPES, R. J. Control of Sclerotinia blight of peanut: sensitivity and resistance of Sclerotinia minor to vinclozolin, iprodione, dicloran and PCNB. Plant Disease, St. Paul, 71: 87 - 90, 1987a.
- BRENNEMAN, T.B.; PHIPPS, P.M.; STIPES, R.J. Sclerotinia blight of peanut: relationship between in vitro resistance and field efficacy of dicarboximide fungicides. Phytopathology, St. Paul, 77: 1028 - 32, 1987b.

- CAYLEY, G.R. & HIDE, G.A. Uptake of iprodione and control of diseases on potato stems. Pesticide Science, Oxford, 11: 15 - 9, 1980.
- CHASTAGNER, G.A. & VASSEY, W.E. Tolerance of Botrytis tulipae to glycophene and vinclozolin. Phytopathology, St. Paul, 69: 914, 1979.
- CHIN, K. M. A simple model of selection for fungicide resistance in plants pathogen populations. Phytopathology, St. Paul, 77: 666 - 9, 1987.
- CIRULLI, M. & ALEXANDER, L.J. A comparison of pathogenic isolates of Fusarium oxysporum f. lycopersici and different sources of resistance in tomato. Phytopathology, S.Paul, 56: 1301-1304, 1966.
- COHEN, Y. & REUVENI, M. Occurrence of metalaxyl - resistant isolates of Phytophthora infestans in potato fields in Israel. Phytopathology, St. Paul, 73: 925 - 7, 1983.
- COOKE, B.K.; LOEFFLER, R.S.T.; PAPPAS, A.C. The structural rearrangement of iprodione in ethanolic solution. Pesticide Science, Oxford, 10: 393 - 8, 1979.

- DAVIS, R.P. & DENNIS, C. Properties of dicarboximide - resistant strains of Botrytis cinerea. Pesticide Science, Oxford, 12: 521 - 35, 1981a.
- DAVIS, R.P. & DENNIS, C. Studies on the survival and infective ability of dicarboximide - resistant strains of Botrytis cinerea. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 98: 395 - 402, 1981b.
- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. Systemic Fungicides 2.ed. London, Butler & Tanner, 1977. Cap. 9, p. 176 - 97.
- DEKKER, J. Introduction. In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS ed. Fungicide resistance in crop protection; Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982a p. 1-6.
- DEKKER, J. Can we estimate the fungicide - resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests? In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, ed. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982b. p 128 - 38.
- DELP, C.J. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Disease, St. Paul, 64: 652 - 7, 1980.

- DENNIS, C. & DAVIS, R.P. Tolerance of Botrytis cinerea to iprodione and vinclozolin. Plant Pathology, Oxford, 28: 131 - 3, 1979.
- DETWEILER, A.R.; VARGAS, J. M. JR.; DANNENBERGER, T.K. Resistance of Sclerotinia homoeocarpa to iprodione and benomyl. Plant Disease, St. Paul, 67: 627 - 30, 1983.
- ELAD, Y.; SHABI, E.; KATAN, T. Negative cross resistance between benzimidazole and N. phenylcarbamate fungicides and control of Botrytis cinerea on grapes. Plant Pathology, Oxford, 37: 141 - 7, 1988.
- ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes Kew, Surrey Commonwealth Mycological Institute, 1971. p. 464 - 86.
- FAHIM, M. M. The effect of light and others factors on the sporulation of Alternaria porri. Transactions British Mycological Society, London, 49: 73 - 8, 1966.
- FANCELLI, M. I. Ocorrência e adaptabilidades de linhagens de Alternaria dauci (kuhn) Groves e Skolko resistentes ao fungicida iprodione. Piracicaba, 1987 84 p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- FERREIRA, M. D. & CASTELLANE, P. D. Cultura da cebola - Recomendações gerais. Boletim Técnico Olericultura, Guaxupê, 1988. 9p.
- FERREIRA, P.V. Aspectos fisiológicos e implicações genéticas da cerosidade foliar em cebola (Allium cepa L.) Piracicaba, 1983. 101 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani, para a conservação de fungos patogênicos de plantas. O Biológico, São Paulo, 33: 9 - 13, 1967.
- GEORGHIOU, G. P. & MELLON, R.B. Pesticide resistance in time and space In:GEORGHIOU, G.P. & SAITO, T. ed. Pest resistance to pesticides. Plenum Press, New York,1983. p. 1 - 46.
- GEORGOPOULOS, S.G. The problem of fungicide resistance. Bioscience, Arlington, 19: 971 - 3, 1969.
- GEORGOPOULOS, S.G. Cross - resistance In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G., ed. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982a. p. 53 - 9.

GEORGOPOULOS, S.G. Genetical and biochemical background of fungicide resistance. In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S. G., ed. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982b p. 46 - 52.

GEORGOPOULOS, S.G.; KAPPAS, A.; HASTIE, A.C., Induced sectoring in diploid Aspergillus nidulans as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. Phytopathology, St. Paul, 66: 217 - 20, 1976.

GEORGOPOULOS, S.G.; SARRIS, M.; ZIOGAS, B. N. Mitotic instability in Aspergillus nidulans caused by the fungicides iprodione, procymidone, and vinclozolin. Pesticide Science, Oxford, 10: 389 - 92, 1979.

GHINI, R. Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de Botrytis squamosa resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. Piracicaba, 1987, 114 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- GILPATRICK, J. D. Management of resistance in plant pathogens. In: GEORGHIOU, G.P. & SAITO, T. ed. Pest Resistance to pesticides. Plenum Press, New York, 1983 p. 735 - 67.
- GRINDLE, M. Phenotypic differences between natural and induced variants of Botrytis cinerea. Journal of General Microbiology, London, 111: 109-20, 1979.
- GRINDLE, M. Isolation and characterization of vinclozolin resistant mutants of Neurospora crassa. Transactions British Mycological Society, London, 82: 635-43, 1984.
- GULLINO, M.L. & GABIBALDI, A. Competition in vitro and in vivo between strains of Botrytis cinerea Pers. sensitive and resistance to dicarboximides. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, 87: 243, 1981.
- GUPTA, R.B.L. & PATHAK, V.N. Effect of age of host, inoculum density and duration of high relative humidity on development of purple blotch on onion. Phytophylactica, Pretoria, 18: 151 - 2, 1986.

- GUPTA, R.B.L. & PATHAK, V.N. Yield losses in onions due to purple blotch disease caused by Alternaria porri. Phytophylactica, Pretoria, 20: 21-3, 1988.
- HARTILL, W.F.T.; TOMPKINS, G.R.; KLEINSMAN, P.J. Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in Botrytis cinerea, to acylalalinines in Phytophthora infestans, and to guazatine in Penicillium italicum. New Zealand Journal of Agricultural Research, Wellington, 26: 261-9, 1983.
- HISADA, Y.; TAKAKI, H.; KATO, T.; OZAKI, T.; KAWASE, Y. Fitness of procymidone-resistant Botrytis cinerea strains developed in vitro. Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, 87: 243, 1981.
- HUNTER, T. & BEEVER, R.E. Resistance to dicarboximide fungicides in Botrytis cinerea on strawberries. Seventh Botrytis Symposium. Aberdeen, 1982.
- HUTTON. D.G. The appearance of dicarboximide resistance in Alternaria alternata in passionfruit in south-east Queensland Australasian. Plant Pathology, Oxford, 17: 34 - 36, 1988.

JACCOUD FILHO, D.S.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ FILHO, J. Alho e Cebola - Doenças causadas por fungos e bactérias. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 11:3 - 14, 1985.

JONES, H.A. & MANN, L.K. Onion and their allies. London, Leonard Hill Books Limited. 1963. 286 p.

KATAN, T. Persistence of dicarboximide fungicide resistance in populations of Botrytis cinerea in a warm dry temperate agroclimate. Phytoparasitica, Dagan, 10: 209-11, 1982.

KATAN, T. & SHABI, E. Characterization of a dicarboximide - fungicide resistant laboratory isolate of Monilia laxa, Phytoparasitica, Dagan, 190: 241-5, 1982.

KATO, T.; HISADA, Y.; KAWASE, Y. Nature of procymidone - tolerant Botrytis cinerea strains obtained in vitro. In: GEORGHIOU, G.P. & SAITO, T., ed. Pest Resistance to pesticides. Plenum Press, New York, 1983. p. 505 - 24.

KIMATI, H. Doenças do alho e cebola. In: GALLI, F. Coord. Manual de Fitopatologia, 2 ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1980, v.II, p. 49 - 65.

KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. Agrotécnica, São Paulo, 1: 5-7, 1987.

KIMATI, H.; SOAVE, J.; ESKES, A.B.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; FERNANDES, N.G. Guia de Fungicidas Agrícolas, Livrocere, Piracicaba, 1986, 281 p.

KOLLER, W. & SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. Plant Disease, St. Paul, 71: 1066 - 74, 1987.

KUMAGAI, T. Suppressive effect of preirradiation with blue light on near ultraviolet light induced conidiation in Alternaria tomato. Canadian Journal of Botany, Guelph, 64: 896 - 9, 1986.

LEROUX, P.; FRITZ, R. ; GREDT, M. Etudes in laboratorie 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, Berlin, 89: 347 - 58, 1977.

- LIMA, A.G. COUTO, A.A. ; CHAVES, G.M. Ensaio comparativo da eficiência de fungicidas associados a espalhantes adesivos no controle à mancha púrpura da cebola. Revista de Olericultura, Lavras, 2: 168 - 75, 1962.
- LITTLE, E.R. & RAHE, J.E. Specific tolerance of Sclerotium cepivorum to dicarboximide fungicides Plant Disease, St. Paul, 68: 371-4, 1984.
- MASCARENHAS, M.H.T. Cultivares de cebola. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 6: 17-20, 1980.
- MARAITE, H.G. G.; MEUNIER, S.; WEYNS, J.; BAL, E. Resistance of Botrytis cinerea Pers et Pers. to dicarboximide fungicides in strawberry fields. Parasitica, Gembloux , 36: 90-101, 1981.
- MCPHEE, W.J. Some characteristics of Alternaria alternata strains resistant to iprodione. Plant Disease, St. Paul, 64: 847-9, 1980.
- MILLER, M.E. Relationships between onion leaf age and susceptibility to Alternaria porri. Plant Disease, St. Paul, 67: 284-6, 1983.

- MITCHELL, A.G. Characterization of iprodione tolerance in Ophiostoma ulmi. Transactions British Mycological Society, London, 88: 283-8, 1987.
- MIURA, L. Controle de fungos em sementes de cebola. Pesquisa em andamento. Florianópolis, 45: 1-2, 1985.
- NEERGAARD, P. Seed Pathology, London, The Macmillan Press. Ltd, 1977, 839 p.
- NORTHOVER, J. Segregation and parasitic fitness of isolates of Botrytis cinerea. Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph, 5: 215-21, 1983.
- NORTHOVER, J. Persistence of dicarboximide - resistant Botrytis cinerea in Ontario vineyards. Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph, 10: 123-32, 1988.
- NORTHOVER, J. & MATTEONI, J.A. Resistance of Botrytis cinerea to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. Plant Disease, St. Paul, 70: 398-402, 1986.

- NOWACKA, H. Studies on the resistance of Botrytis cinerea Pers populations on the dicarboximide fungicides used in disease control of strawberries. Fruit Science Report, Skierniewice, 14: 85-90, 1987.
- OGAWA, J.M.; MANJI, B.T.; HEATON, C.R.; PETRIE, J. ; SONADA, R.M.; Methods for detecting and monitoring the resistance of plant pathogens to chemicals. In: GEORGHIOU, G.P. & SAITO, T., ed. Resistance to pesticides. Plenum Press, New York, 1983, p.117-62.
- PANAGIOTAKU, M.G. & MALATHRAKIS, N.E. Resistance of Botrytis cinerea Pers. to dicarboximide fungicides Netherlands Journal of Plant Pathology, Wageningen, 87: 242, 1981.
- PAPPAS, A.C. & FISHER, D.J. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against Botrytis cinerea. Pesticide Science, Oxford, 10: 239-46, 1979.
- PAPPAS, A.C.; COOKE, B.K.; JORDAN, V.W.L. Insensitivity of Botrytis cinerea to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus. Plant Pathology, Oxford, 28: 71-6, 1979.

- PASINI, C.; D'AQUILA, F.; GULLINO, M.L. Effect in soil of fungicides on strains of Rhizoctonia solani Kuhn laboratory resistant to iprodione. Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiano, Florence, 69: 281-6, 1985.
- PERKINS, D.D.; RADFORD, A.; NEWMAYER, D.; BJORKMAN, M. Chromosomal loci of Neurospora crassa. Microbiological Reviews, Washington. 46: 426-70, 1982.
- PORTER, D.M. & PHIPPS, P.M. Tolerance of Sclerotinia minor to procymidione and cross tolerance to other dicarboximide fungicides and dicloran; Peanut Science, Raleigh, 12: 41-5, 1985.
- PRESLY, A.H. & MAUDE, R.B. Control of Botrytis cinerea and Botrytis squamosa in overwintered salad onion by fungicide sprays. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 94: 197-204, 1980.
- PROGNOSTICO AGRICOLA 86/87, São Paulo, 15: 154-6, 1987.
- PRUSKY, D.; BAZAK, M.; BEN-AIRE, R. Development, persistence, survival, and strategies for control of thiabendazole resistant strains of Penicillium expansum on pome fruits. Phytopathology, St. Paul, 75: 877-82, 1985.

- RAMOS, R.S.; ISSA, E.; SINIGAGLIA, C.; CHIBA, S.
Controle químico do mildio Peronospora destructor
(Berk) Casp. e da mancha púrpura Alternaria porri
(Ell.) Cif. de cebola (Allium cepa L.) O Biológico. São
Paulo, 50: 97-101, 1984.
- RANDS, R.D. The production of spore by Alternaria solani
in pure culture. Phytopathology, Lancaster, 7: 316- 7,
1917.
- RITCHIE, D.F. Effect of dicloran, iprodione, procymidone,
and vinclozolin on the mycelial growth, sporulation,
and isolation of resistant strains of Monilinia
fructicola. Plant Disease, St. Paul, 66: 484-6, 1982.
- ROTEM, J. Thermoxerophytic properties of Alternaria
porri f. sp. solani. Phytopathology, St. Paul, 58:
1284-7, 1968.
- SAMOUCHA, Y. & COHEN, Y. Synergistic interaction of
cymoxanil mixtures in the control of metalaxyl -
resistant Phytophthora infestans of potato.
Phytopathology, St. Paul, 78: 636-40, 1988.

SAMOUCHA, Y. & GISI, U. Use of two and three - way mixtures to prevent buildup of resistance to phenyl amide fungicides against Phytophthora and Plasmopara. Phytopathology, St. Paul, 77: 1405-9, 1987.

SANDERS, P.L.; HOUSER, W.J.; PARISH, P.J.; COLE JR.; H. Reduced - rate fungicide mixtures to delay fungicides resistance and to control selected turfgrass diseases. Plant Disease, St. Paul, 69: 939-43, 1985.

SCHROEDER, W.T. & PROVVIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. Plant Disease Reporter, Washington 53: 271-5, 1969.

SHAHIN, E.A. & SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of Alternaria species. Phytopathology, St. Paul, 69: 618-20, 1979.

SILVEIRA, A.P.; CRUZ, B.P.B. ; CAMPOS, H. R.; SILVEIRA, S.G.P. Resistência de variedades de cebola (Allium cepa L.) à queima das folhas (Alternaria porri (Ell.) Cif.) O Biológico. São Paulo, 37: 141-4, 1971.

- SINIGAGLIA, C.; ISSA, E.; RAMOS, R.S.; CHIBA, S.
Controle químico da mancha púrpura (Alternaria porri
(Ell.) Cif. em cebola (Allium cepa L.) In: Resumos do
VII Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu,
1984, p.19.
- SZTEJNBERG, A. & JONES, A.L. Tolerance of the brown rot
fungus Monilinia fructicola to iprodione, vinclozolin
and procymidone fungicides. Phytopathology News, St.
Paul, 12: 187-8, 1978.
- UESUGI, Y. Fungicide resistance: problem with modern
fungicides in Japan. Tropical Agriculture Research
Series, Ibaraki, 14: 105-11, 1981.
- VAKALOUNAKIS, D.J. & CHRISTIAS, C. Dark reversion of blue
- light inhibition of conidiation in Alternaria
cichorri. Canadian Journal of Botany, Guelph, 64: 1016-
7, 1986.
- WANG, Z.N.; COLEY-SMITH, J.R. Studies on some
characteristics of dicarboximide - resistant isolates
of Botrytis cinerea from protected lettuce. Plant
Pathology, Oxford, 35: 544-50, 1986.

- WANG, Z.N.; COLEY-SMITH, J.R.; WAREING, P.W.
Dicarboximide resistance in Botrytis cinerea in
protected lettuce. Plant Pathology, Oxford, 35: 427-
33, 1986.
- WADE, M. Resistance to fungicides, Span, Oxon, 25: 8-10,
1982.
- WEBSTER, R.K.; OGAWA, J.M.; BOSE, E. Tolerance of
Botrytis cinerea to 2, 6 - dichloro - 4 -
nitroaniline. Phytopathology, St. Paul, 60: 1489-92,
1970.
- WOLFE, M.S. Dynamics of the pathogen population in
relation to fungicide resistance In: DEKKER, J.; S.G.
GEORGOPOULOS, ed. Fungicide resistance in crop
protection. Wageningen, Centre for Agricultural
Publishing and Documentation, 1982, p. 139-148.
- ZADOCKS, J.C. Can we models describing the population
dynamics of fungicide - resistant strains. In: DEKKER,
J.& GEORGOPOULOS, S.G. ed. Fungicide resistance in
crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural
Publishing and Documentation, 1982, p. 149-160.