OCORRÊNCIA E ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE
Botrytis squamosa RESISTENTES A FUNGICIDAS DO GRUPO
DOS BENZIMIDAZÓIS E DICARBOXIMIDAS

RAQUEL GHINI
Engenheiro Agrônomo

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
Dezembro - 1987

OCORRÊNCIA E ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE
BOTRYTIS SQUAMOSA RESISTENTES A FUNGICIDAS
DO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS E DICARBOXIMIDAS

RAQUEL GHINI

Aprovada em: 02.02.1988

Comissão julgadora:

. Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
. Prof. Dr. Keigo Minami	ESALQ/USP
. Prof. Dr. Tasso Leo Krügner	ESALQ/USP
. Prof. Dr. José Otávio Machado Menten	ESALQ/USP
. Prof. Dr. Chukichi Kurozawa	UNESP/Botucatu

PROF. DR. HIROSHI KIMATI
Orientador

A
meus pais e
minha irmã,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela preciosa orientação, interesse, amizade, confiança e pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela amizade, inestimável apoio, estímulo e auxílio na realização deste trabalho.

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

Aos colegas de curso: Dra. Beatriz M. J. Mendes, M. S. Celso Garcia Auer, M. S. Gisèle M. Fantin, Dra. Margarete Camargo e Dra. Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion, pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Dr. Walter Becker e M. S. Antonio Paulo Ronchi, pelo envio de folhas de cebola com sintoma de queima das pontas.

Ao Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa, pelo gentil fornecimento de sementes de cebola.

À M.S. Margarida M.H.Zaroni, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À biblioteconomista Maria Amélia de T. Leme, pela ajuda na preparação da literatura citada.

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

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

À EMBRAPA/CNPDA, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Resistência de fungos a fungicidas.....	4
2.2. Benzimidazóis.....	7
2.2.1. Modo de ação e seletividade.....	9
2.2.2. Resistência.....	11
2.3. Dicarboximidas.....	19
2.3.1. Modo de ação.....	20
2.3.2. Resistência.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Isolamento.....	35
3.2. Preservação do fungo.....	37
3.3. Produção de conídios.....	37
3.4. Frequência e grau de resistência.....	38
3.5. Obtenção da linhagem resistente a benomyl..	39
3.6. Obtenção da linhagem resistente a iprodione ...	40
3.7. Obtenção da linhagem duplo-resistente.....	41
3.8. Sensibilidade colateral.....	44
3.9. Adaptabilidade	46
3.9.1. Crescimento micelial.....	46

3.9.2. Esporulação.....	47
3.9.3. Patogenicidade.....	48
3.9.4. Competição <i>in vitro</i>	49
3.9.5. Competição <i>in vivo</i>	51
3.9.6. Estabilidade da resistência a benomyl	54
3.9.7. Estabilidade da resistência a benomyl e iprodione.....	55
3.10. Anastomose de hifas.....	56
3.11. Coloração de núcleos de conídios.....	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Frequência e grau de resistência.....	59
4.2. Obtenção da linhagem resistente a benomyl....	60
4.3. Obtenção da linhagem resistente a iprodione..	64
4.4. Obtenção da linhagem duplo-resistente.....	64
4.5. Sensibilidade colateral.....	66
4.6. Adaptabilidade.....	75
4.7. Anastomose de hifas.....	84
4.8. Coloração de núcleos de conídios.....	84
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Origem dos isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	36
2. Efeito de dosagens de benomyl no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	61
3. Efeito de dosagens de benomyl no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	62
4. Efeito de dosagens de iprodione no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	63
5. Efeito de benomyl (1000 ppm) e iprodione (500 ppm) no crescimento micelial de linhagens duplo-resistentes obtidas a partir do isolado Pd44 de <i>Botrytis squamosa</i>	65
6. Efeito de dosagens de captafol no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	67
7. Efeito de dosagens de captan no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	68
8. Efeito de dosagens de dicloran no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	69
9. Efeito de dosagens de mancozeb no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	70
10. Efeito de dosagens de procymidone no crescimento micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i> ...	71

11. Efeito de dosagens de propiconazol no crescimen <u>to</u> micelial de isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	72
12. Faixa de concentração de fungicidas que contém o ED50 (dose do fungicida suficiente para inibir em 50% o crescimento micelial) dos isolados de <i>Botrytis squamosa</i>	73
13. Efeito de fungicidas no crescimento micelial de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i>	74
14. Crescimento micelial de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i> em meio de cultura de BDA.....	77
15. Produção de conídios de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i>	78
16. Patogenicidade de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i> em plântulas de cebola.....	79
17. Patogenicidade de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i> em discos de escama de bulbos de cebola.....	80
18. Competição entre os isolados de <i>Botrytis squamosa</i> resistentes (Pd27 e Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de suspensões de conídios <i>in vitro</i> na ausência do fungicida.....	81
19. Competição entre os isolados de <i>Botrytis squamosa</i> resistentes (Pd27, Pd64, Pd65, Pd67) e sensí <u>l</u>	

vel (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de inóculo em plântulas de cebola, na ausência do fungicida (Experimento 1).....	82
20. Competição entre os isolados de <i>Botrytis squamosa</i> resistentes (Pd27 e Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de inóculo em plântulas de cebola, na ausência do fungicida (Experimento 2).....	83
21. Efeito de benomyl (1000 ppm) no crescimento <u>mi</u> celial de cinco gerações de subculturas monospóricas do isolado Pd44 de <i>Botrytis squamosa</i>	85
22. Efeito de benomyl e iprodione no crescimento <u>mi</u> celial de cinco gerações de subculturas monospóricas da linhagem IUV1 de <i>Botrytis squamosa</i>	86
23. Formação de anastomose entre hifas de linhagens de <i>Botrytis squamosa</i>	87

OCORRÊNCIA E ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE
BOTRYTIS SQUAMOSA RESISTENTES A FUNGICIDAS
DO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS E DICARBOXIMIDAS

Autora: Raquel Ghini

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Isolados de *Botrytis squamosa*, causador da Queima das Pontas da cebola, foram testados quanto a resistência a benomyl e iprodione através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura. Em culturas de cebola, nas quais foi utilizado benomyl, foram obtidos isolados resistentes, apresentando crescimento micelial em meio de cultura de BDA contendo 1000 ppm do fungicida. Em locais onde o benomyl não foi aplicado, os isolados apresentaram-se sensíveis ao produto, sendo o crescimento inibido pela concentração de 1 ppm. Todos os isolados foram considerados sensíveis a iprodione, visto que apresentaram pouco ou nenhum crescimento micelial em meio de cultura contendo 10 ppm do fungicida.

Em condições de laboratório, foram obtidas linhagens iprodione - resistentes, a partir de uma benomyl - sensível através de semeadura densa de conídios em meio de cultura contendo 500 ppm do fungicida; linhagens com dupla-

-resistência foram obtidas a partir da resistente a benomyl, através de irradiação ultravioleta e transferências sucessivas em meios de cultura com gradiente de iprodione.

As linhagens resistentes a benomyl, a iprodione e a iprodione + benomyl não tiveram alteradas suas sensibilidades ao fungicida propiconazol, porém houve uma tendência geral de se mostrarem mais sensíveis ao captan, captanfol e mancozeb do que a linhagem sensível. As linhagens resistentes a iprodione foram também resistentes a procymidone e dicloran.

A adaptabilidade foi estudada através do crescimento micelial, produção de conídios, patogenicidade e competição *in vitro* e *in vivo* das linhagens sensíveis e resistentes a benomyl. As linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl podem ser tão adaptadas quanto as sensíveis, ao passo que as resistentes a iprodione apresentaram-se menos adaptadas.

Testes de anastomose de hifas entre linhagens resistentes e sensíveis aos fungicidas benomyl e iprodione foram feitos. Isolados tanto sensíveis quanto resistentes se anastomosaram livremente, exceto o isolado Pd64, resistente a benomyl. O número de núcleos/conídio em duas linhagens (uma sensível e outra resistente a benomyl) foi determinado, não tendo sido constatadas diferenças; ambas apresentam até 20 núcleos/conídio.

OCCURRENCE AND ADAPTABILITY OF *Botrytis squamosa*
STRAINS RESISTANT TO BENZIMIDAZOLES AND DICARBOXIMIDES

Author: Raquel Ghini

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Isolates of *Botrytis squamosa*, causing agent of onion blast, were tested with respect to their resistance to benomyl and iprodione, through the method of fungicide incorporation in the growth medium. Resistant isolates were obtained from onion fields which had received treatment with benomyl. These isolates grew in PDA containing 1000 ppm of benomyl. Isolates from places where no benomyl treatment was applied were sensitive to 1 ppm of this fungicide. All isolates were considered to be sensitive to iprodione, since they showed little or no mycelial growth in a growth medium containing 10 ppm of the fungicide.

Iprodione resistant strains were obtained from sensitive ones, by plating a dense conidial suspension on a growth medium containing 500 ppm of the fungicide. Strains with double-resistance were obtained from the benomyl-resistant one, by ultraviolet irradiation and successive transfers in culture media with a iprodione gradient.

Resistant strains to benomyl, iprodione and iprodione + benomyl did not have their sensibility to propiconazole altered, but they showed a general tendency to be more sensitive to captan, captafol and mancozeb than the sensitive strain. Iprodione-resistant strains were also resistant to procymidone and dicloran.

Mycelial growth, conidial production, pathogenicity and *in vitro* and *in vivo* competition between the sensitive and resistant strains were the parameters used to study adaptability. Benomyl-resistant strains can be as adapted as the sensitive ones, whereas those resistant to iprodione were less adapted.

Hyphal anastomosis tests between resistant and sensitive strains to benomyl and iprodione were performed. Sensitive and resistant strains anastomosed freely between themselves, with the exception of isolate Pd64, a benomyl-resistant one. Number of nuclei/conidium were determined for two strains (one sensitive to benomyl and the other not). There were no differences between themselves, both of them having up to 20 nuclei/conidium.

1. INTRODUÇÃO

Antes do advento dos fungicidas sistêmicos, a resistência de fungos a fungicidas era de ocorrência rara em condições de campo. A inespecificidade dos produtos convencionais, isto é, a capacidade de interferir em numerosos processos metabólicos vitais, tornava difícil o surgimento de linhagens resistentes.

Com o crescente e intensivo uso dos fungicidas sistêmicos, houve o surgimento do problema, visto que tais produtos se caracterizam por uma alta seletividade, agindo em poucos processos do metabolismo do patógeno que, dessa forma, podem ser mais facilmente transpostos.

O surgimento de populações de fungos resistentes acarreta em descrédito e prejuízos para as indústrias agroquímicas, perdas para os agricultores e, conseqüentemente, maiores custos para o consumidor. A possibilidade de ocorrência de resistência produz incertezas para as firmas fabricantes durante o desenvolvimento de um novo produto. Após a introdução no mercado, se for constatado o problema, o uso do composto tem que ser restringido ou até mesmo abandonado, oca

sionando graves dificuldades para o agricultor se não houver uma alternativa de controle adequada.

Quando ocorre falha no controle de uma doença, após repetidas aplicações de um fungicida, originariamente eficiente, testes em laboratório ou em casa de vegetação podem comprovar se a causa foi o desenvolvimento de resistência ao produto em questão. Entretanto, as perdas seriam evitadas se, antes do aparecimento do problema, informações fossem obtidas em experimentos com fungos, *in vitro* ou *in vivo*, sobre as chances do surgimento de resistência na prática (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982).

Face a esta situação, o estudo da ocorrência de resistência em *Botrytis squamosa* é de grande interesse para o controle químico da Queima das Pontas da cebola, visto ser uma doença de constatação sintomatológica frequente e que causa sérios prejuízos a esta cultura (GHINI, 1984). Entre as hortaliças, a cebola apresenta considerável consumo de fungicidas sistêmicos, sendo que o contínuo uso desses produtos cria uma intensa pressão de seleção que, muito provavelmente, poderá resultar no surgimento de linhagens resistentes.

O presente trabalho, visando estudar o problema apontado, tem por objetivos:

1) Determinação da frequência e grau de resistência a benomyl e iprodione de linhagens de *Botrytis squamosa* obtidas em culturas de cebola;

2) Obtenção, em condições de laboratório, de uma linhagem de *B. squamosa* resistente a benomyl e iprodione (duplo-resistente);

3) Determinação da sensibilidade colateral das linhagens de *B. squamosa* a outros fungicidas utilizados na cultura de cebola;

4) Estudo da adaptabilidade das linhagens de *B. squamosa* resistentes e sensíveis a benomyl e iprodione.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência de fungos a fungicidas

O início da aplicação de fungicidas em larga escala para o controle de doenças está vinculado à descoberta da calda bordalesa por Millardet em 1882, em Bordeaux. Tal mistura, composta por sulfato de cobre e cal hidratada, constituiu o principal fungicida utilizado por mais de 50 anos. Raramente problemas com resistência a este fungicida, em condições de campo, foram relatados (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982). De modo geral, o mesmo ocorreu com os organo-mercuriais, introduzidos por volta de 1914, os ditiocarbamatos, introduzidos na década de 1930, e vários outros fungicidas denominados convencionais, desenvolvidos posteriormente, segundo GEORGOPOULOS & ZARACOVITIS (1967). Todos esses compostos têm em comum a característica de somente fornecer proteção à superfície da planta. Assim devem ser aplicados preventivamente. Esses fungicidas são inibidores de numerosos processos metabólicos vitais, compartilhados por todos os seres vivos, portanto apresentam amplo espectro de ação. Dessa forma, devem ser insolúveis, não podendo penetrar, nem translo-

car nos tecidos da planta, pois seriam altamente fitotóxicos (KIMATI, 1987b).

Segundo DEKKER & GEORGOPOULOS (1982), após a Segunda Grande Guerra, iniciou-se o desenvolvimento de fungicidas que penetrassem na planta, erradicando o patógeno após a infecção ou protegendo partes da planta que não entraram em contato direto com o fungicida. A partir do final da década de 1960, segundo EDGINGTON *et alii* (1980), com a ampla aceitação de benomyl e carboxin, e a seguir de outros fungicidas sistêmicos, o controle químico de doenças de plantas assistiu grandes mudanças. Segundo KIRBY (1972), os fungicidas sistêmicos, em uso na época, caracterizam-se por apresentar fungitoxicidade direta; muito baixa a baixa solubilidade; penetração nos tecidos aéreos e raízes, passando para o xilema; movimento ascendente pela corrente transpiratória, acumulando-se nas margens das folhas; incapacidade de chegar a órgãos que não transpiram e de reexportação para regiões de novos crescimentos; ausente ou reduzida translocação descendente, via floema; e amplo ou estreito espectro de ação.

Analisando as perspectivas dos fungicidas sistêmicos após dez anos de uso, EDGINGTON *et alii* (1980) afirmaram que o número desses produtos aumentou de forma significativa durante esse período, compreendendo aproximadamente

um terço do total de fungicidas utilizados. Segundo KIMATI (1987a), essa escalada se deve ao fato de produtos sistêmicos compartilharem características de maior especificidade e fungitoxidez inerente, bem como de penetração e translocação dentro da planta, tornando-os muito mais vantajosos do que os convencionais: maiores efeitos erradicantes, protetor, curativo e imunizantes; menores dosagens e número de pulverizações; menores problemas de fitotoxidez, de contaminação ambiental e de desequilíbrio biológico; e maior adequação para o uso em programas de manejo integrado.

Entretanto, GEORGOPOULOS (1969) alertou que problemas com resistência de fungos a fungicidas deveriam ser mais frequentes e mais sérios com a utilização dos novos produtos seletivos do que com os convencionais. Segundo TOLEDO (1974), DEKKER (1976) e DELP (1980), tal fato se concretizou com os numerosos relatos de resistência a fungicidas ocorridos desde então.

A seletividade, que permite um fungicida atuar sistemicamente, aumentando tanto a sua eficiência, é, ao mesmo tempo, causa de sua vulnerabilidade, segundo KIMATI (1987a). DEKKER (1977) explica que mudanças genéticas que resultam na resistência de um patógeno a fungicidas ocorrem com maior facilidade com compostos que atuam primariamente em um ou

poucos passos do metabolismo da célula do fungo do que com fungicidas que interferem em muitos passos do processo metabólico. Assim sendo, DELP (1980) afirma que, até 1970, devido à predominância de fungicidas convencionais ou inespecíficos, os casos de resistência relatados no campo limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos; em contraposição, em 1980, com o intensivo e extensivo uso de fungicidas sistêmicos, esse número era de, aproximadamente, 35 gêneros.

No Brasil, poucos trabalhos foram desenvolvidos quanto a resistência de fungos a fungicidas. O estudo da ocorrência e adaptabilidade de linhagens de *B. squamosa* resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas pode constatar um sério problema que compromete o uso desses dois grupos de fungicidas utilizados no controle químico da Queima das Pontas da cebola.

2.2. Benzimidazóis

Segundo DAVIDSE (1982), dos fungicidas sistêmicos, os benzimidazóis são os mais conhecidos devido às suas propriedades sistêmicas, eficácia no controle de importantes doenças e também pelos problemas que ocorrem com o surgimento de resistência.

O primeiro composto desenvolvido, segundo

DAVIDSE (1982), foi o thiabendazol, o qual foi introduzido em 1961, como um vermífugo utilizado em medicina humana e veterinária. A seguir, foram introduzidos o benomyl, carbendazim e fuberidazol. Os tiofanatos, introduzidos em 1971, são frequentemente incluídos neste grupo já que, sob condições naturais, são convertidos em compostos classificados como benzimidazóis. Fenbendazol, mebendazol, oxibendazol e parbendazol possuem propriedades anti-helmínticas e são utilizados em medicina veterinária, ao passo que nocodazol, segundo DAVIDSE (1982), foi descrito como sendo ativo contra tumores em mamíferos, incluindo o homem.

O transporte dos benzimidazóis nas plantas se dá via xilema, segundo EDGINGTON (1981), sendo a absorção pelas raízes um processo passivo. O carbendazim pode entrar no floema, mas é devolvido à corrente transpiratória sem haver transporte descendente significante, exceto quando altas dosagens são aplicadas. O thiabendazol é o benzimidazol que apresenta movimento mais lento e carbendazim, o mais rápido.

Segundo KIMATI (1980), o amplo espectro de ação dos fungicidas deste grupo tem um valor muito grande para a Fitopatologia porque abrange gêneros de fungos que ocasionam graves prejuízos em um grande número de importantes culturas, tais como oídios, antracnoses, cercosporídes, sar

nas, mofos cinzentos (*Botrytis*) e bolores (*Penicillium*).

As investigações de Bollen e Fuchs (1970) (1), citados por KAARS SIJPESTEIJN (1977), sobre o espectro de ação de benomyl, revelaram uma notável seletividade dentro do grupo dos Ascomicetos: enquanto muitas espécies estudadas são altamente sensíveis, as pertencentes a Porosporae ou Anellosporae provaram ser insensíveis. Os Oomicetos e outros Ficomicetos foram também insensíveis. EDGINGTON *et alii* (1971) obtiveram resultados semelhantes quanto ao espectro fungitóxico dos benzimidazóis e relataram que *Botrytis* sp. foi altamente sensível, sendo que a concentração que inibia 50% do crescimento em meio de cultura foi de $0,4 \pm 0,05$ ppm.

2.2.1. Modo de ação e seletividade

CLEMONS & SISLER (1969) e Selling *et alii* (1970) (2), citados por DAVIDSE (1982), provaram que benomyl e tiofanato metílico, respectivamente, são transformados em carbendazim e nesta forma eles atuam. Assim sendo, vários estu-

---

(1) BOLLEN, G.J. & A. FUCHS. On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 77, 83. 1970.

(2) SELLING, H. A.; VONK, J. W.; KAARS SIJPESTEIJN, A. Transformation of the systemic fungicide methyl thiophanate into 2- benzimidazole carbamic acid, methyl ester. *Chemistry and Industry*: 1625, 1970.

dos têm mostrado que os benzimidazóis compartilham de um mesmo modo de ação, isto é, interferem na mitose dos fungos, agindo principalmente no crescimento micelial (DAVIDSE, 1982) e com pouco efeito na germinação de conídios.

Uma proteína que se liga ao carbendazim foi encontrada em extrato de micélio de *Aspergillus nidulans*, por DAVIDSE & FLACH (1977), com propriedades bioquímicas características da tubulina (unidade que compõe os microtúbulos do fuso mitótico). Esses autores provaram que o carbendazim se liga à tubulina, no mesmo local de ligação da colchicina, e impede a reunião das tubulinas para formar o fuso mitótico, consequentemente impedindo a divisão celular.

O sistema de fuso mitótico está presente em todas as células de eucariotos, mas nem todos são igualmente sensíveis aos benzimidazóis, o que implica em uma seletividade, por exemplo, entre a planta hospedeira e o patógeno. DAVIDSE & FLACH (1977) provaram que a afinidade do benzimidazol com a tubulina é o principal fator que determina a atividade do fungicida nos organismos. Assim, quanto maior a afinidade de ligação do benzimidazol com a tubulina, mais sensível é o organismo ao fungicida. Da mesma forma, uma mutação que reduza a afinidade de ligação da tubulina com o benzimidazol, sem afetar o funcionamento normal da tubulina, dá origem a uma linhagem resistente.

Entretanto, segundo DAVIDSE (1982), a existência de outros mecanismos de resistência não pode ser inteiramente descartada. Um decréscimo na permeabilidade da célula a carbendazim foi sugerido por NACHMIAS & BARASH (1976), como mecanismo de resistência a benzimidazóis em *Sporobolomyces roseus*. LAMBERT & WUEST (1976) sugerem que a resistência a benomyl em *Verticillium dahliae* está associada à produção de um ácido não identificado que reduziria a atividade do fungicida. Estudando os mecanismos de resistência de *Botrytis cinerea* a carbendazim, TRIPATHI & SCHLÖSSER (1982) verificaram que a linhagem resistente absorvia 44% menos carbendazim e sua tubulina era capaz de ligar com 73% menos fungicida que a linhagem sensível, sendo a união dos dois fatores responsável pela resistência.

2.2.2. Resistência

Segundo DAVIDSE (1982), o desenvolvimento de resistência a benomyl e outros benzimidazóis tem sido reportado para uma larga gama de patógenos, em condições de laboratório ou de campo, tanto na agricultura, quanto na medicina veterinária. DELP (1980) afirmou que até aquela data, a resistência de patógenos a benzimidazóis foi encontrada em 16 gêneros de fungos, sendo o primeiro relato realizado por SCHROEDER & PROVVIDENTI (1969), com oídio do pepino resistent

te a benomyl.

A resistência de *Botrytis cinerea* a benomyl foi primeiramente relatada, em condições de campo, em cicla-me, por BOLLEN & SCHOLTEN (1971). A seguir, numerosos relatos foram feitos em diversas culturas, como por exemplo, em crisântemo, por WATSON & KOONS (1973); pepino, por IIDA (1975); alface, por MILLER & FLETCHER (1974); em tomate, por MILLER & FLETCHER (1974) e FLETCHER & SCHOLEFIELD (1976); morango, por JARVIS & HARGREAVES (1973) e no Brasil, por CABRINI (1985); em *Leucospermum cordifolium*, por CHO (1977); em macieira, feijoeiro e videira, por PEARSON *et alii* (1980); essências florestais, por GILLMAN & JAMES (1980); em eucalipto, por GHINI & KRÜGNER (1987), no Brasil; e em cebola, por PRESLY & MAUDE (1980b). É interessante salientar que PEARSON *et alii* (1980), estudando linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl, isoladas de macieiras, feijoeiros e videiras, provaram que o fungo resistente em uma dessas culturas era patogênico às demais, fato que agrava a situação.

Para DELP (1980), os benzimidazóis representam o início dos graves problemas com o surgimento de resistência na história dos fungicidas. O mesmo autor explica que isto ocorreu não somente porque os benzimidazóis foram extensiva e intensivamente utilizados, mas também porque são

inibidores de um sítio específico do metabolismo do patógeno e muitos fungos possuem linhagens resistentes em sua população natural, que não sofreu pressão de seleção do fungicida, como ocorreu com *B. cinerea* isolado de plantas ornamentais (BOLTON, 1976), com *Ceratocystis ulmi* (SCHREIBER & TOWNSEND, 1976) e *Verticillium dahliae* (WUEST *et alii*, 1974).

Via de regra, quando os problemas com resistência ocorrem, as linhagens resistentes a um benzimidazol são resistentes aos outros do mesmo grupo, isto é, apresentam resistência cruzada (MILLER & FLETCHER, 1974; POLACH & MOLIN, 1975; RUPPEL, 1975; DAVIDSE, 1982 e LEROUX & CLERJEAU, 1985). O mecanismo responsável por esta correlação, segundo GEORGOPOULOS (1982a), deve-se ao fato dos benzimidazóis compartilharem de um mesmo modo de ação. Entretanto, há a exceção de TUYL *et alii* (1974) que observaram a ocorrência de mutantes de *Aspergillus nidulans*, em muito baixa frequência, obtidos em meio de cultura contendo benomyl, que eram sensíveis a thiabendazol, apesar da resistência a benomyl, e mutantes resistentes a thiabendazol que eram mais sensíveis a benomyl do que a linhagem selvagem.

LEROUX & CLERJEAU (1985) observaram uma resistência cruzada negativamente correlacionada entre fenilcarbamatos (barban ou chlorbufam) e benzimidazóis, em linhagens

de *Botrytis cinerea* isoladas de videiras.

O desenvolvimento de linhagens duplo - resistentes, isto é, apresentando resistência a benzimidazóis e outros fungicidas foi constatada em diversas ocasiões: CHASTAGNER & OGAWA (1979) obtiveram linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl e dicloran *in vitro*; PEPIN & MacPHERSON (1982) isolaram *B. cinerea* resistente a benomyl e captan em condições de campo; com os dicarboximidas foram observadas *in vitro* linhagens duplo-resistentes de *B. squamosa* por PRESLY & MAUDE (1982) e em condições de campo, com linhagens de *B. cinerea*, por LEROUX & CLERJEAU (1985), GULLINO & GARBALDI (1986) e NORTHOVER & MATTEONI (1986).

Quanto a genética da resistência, segundo GEORGOPOULOS (1982b), o melhor exemplo disponível sobre a ação de um gene que controla a sensibilidade a um fungicida de uso agrícola é o gene que proporciona resistência a benzimidazóis em *Aspergillus nidulans*, devido aos intensos estudos realizados. TUYL (1977) mostrou que mutações no gene ben-A seriam responsáveis pelo desenvolvimento de linhagens de *A. nidulans* resistentes a benzimidazóis.

O ben-A codifica a B-tubulina, uma das sub-unidades da molécula de tubulina. Mutações nesse gene afetam as

propriedades eletroforéticas da B-tubulina e, ao mesmo tempo, a habilidade da proteína se ligar com o carbendazim, a qual é inversamente correlacionada com a resistência ao fungicida.

Outros genes conferindo resistência aos benzimidazóis foram reconhecidos em vários outros fungos, embora sua ação não tenha sido estudada no nível bioquímico. A análise genética de mutantes resistentes a benomyl de *Neurospora crassa*, realizada por BORCK & BRAYMER (1974), sugeriu que um único gene dominante é responsável pela resistência. BRASSIER & GIBBS (1975), estudando *Ceratocystis ulmi*, concluíram que a resistência a carbendazim, provavelmente, era conferida por um único gene. Em pesquisa realizada com *Venturia inaequalis*, MARTIN (1982) observou que a resistência a benomyl é controlada por um só gene e KATAN *et alii* (1983) constataram, após diversos cruzamentos entre linhagens, que o nível de resistência a benomyl era controlado por mutações em quatro alelos de um gene de segregação mendeliana, sendo que não foram observados efeitos de genes modificadores ou componentes citoplasmáticos.

A adaptabilidade das linhagens resistentes a benzimidazóis parece variar largamente, mas a maioria dos relatos indica que a resistência não está ligada a uma redu

ção da adaptabilidade e se mantêm estável em vários patógenos, por longos períodos, mesmo na ausência do fungicida.

Um dos primeiros casos de constatação de resistência a benzimidazóis, a nível de campo, ocorreu com *Cercospora beticola* em beterraba açucareira na Grécia. No início, segundo GEORGOPOULOS & DOVAS (1973), o benomyl apresentou excelentes resultados, controlando a doença e por isso passou a ser usado exclusivamente em diversas regiões da Grécia, durante 1970 e 1972. Entretanto, em 1972 a doença aumentou rapidamente e não foi controlada devido ao surgimento de resistência aos benzimidazóis. DOVAS *et alii* (1976) concluíram que a adaptabilidade das linhagens resistentes não diferia das sensíveis, visto que sua frequência na população permanecia constante, mesmo na ausência do fungicida.

Estudando o mesmo problema nos Estados Unidos, RUPPEL (1975) concluiu que as linhagens de *Cercospora beticola* resistentes a benzimidazóis não diferiam das sensíveis quanto ao crescimento e esporulação *in vitro* ou patogenicidade e esporulação *in vivo*. Mais tarde, RUPPEL *et alii* (1980) verificaram que as linhagens resistentes apresentavam um alto grau de persistência na ausência de benomyl, mes

mo em campos onde outros fungicidas estavam sendo usados.

Uma alta persistência da linhagem resistente em relação à sensível também foi observada por MILLER & JEVES (1979), que relataram a ocorrência de linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl, em tomateiros cultivados comercialmente em estufas, três ou mais anos após o fungicida deixar de ser utilizado. Esses autores enfatizam a persistência das linhagens resistentes comparando seus resultados com os obtidos por FLETCHER & SCHOLEFIELD (1976). No levantamento realizado em 1977, MILLER & JEVES (1979) constataram que 64,3% dos isolados eram resistentes, enquanto que FLETCHER & SCHOLEFIELD (1976), nas mesmas condições, em 1974, observaram que a frequência se manteve ao redor de 49,6%.

Resultados semelhantes também foram obtidos no estudo da estabilidade da resistência a benzimidazóis em populações de *B. cinerea* em videiras na Suíça, realizado por SCHUEPP & KÜNG (1981). A frequência das linhagens resistentes decresceu somente 5 pontos percentuais após quatro anos sem utilizar tais fungicidas. Uma alta adaptabilidade da linhagem de *B. cinerea* resistente a benzimidazóis em videiras também foi relatada por LEROUX & CLERJEAU (1985).

No estudo da competição *in vivo* entre uma linhagem de *Venturia inaequalis* resistente e uma sensível a be

nomyl, MARTIN (1982) constatou que a linhagem resistente predominou após algumas gerações, sendo este resultado obtido para diversas linhagens testadas e também na confrontação de uma linhagem resistente e uma população sensível (mistura de linhagens sensíveis). Entretanto, a concentração de inóculo total e a relação entre as concentrações das linhagens influenciaram na velocidade de desaparecimento da linhagem menos competitiva, no caso, a sensível.

Todavia, nem sempre a linhagem resistente é tão adaptada quanto a linhagem sensível. JORDAN & RICHMOND (1974) observaram que linhagens de *B. cinerea* resistentes a benomyl, apresentando diferentes velocidades de crescimento em meio de cultura, diferiam quanto a patogenicidade. Da mesma forma, GEESON (1976) encontrou considerável variação no diâmetro da colônia, esporulação e produção de escleródios de linhagens de *B. cinerea* resistentes a carbendazim na ausência do fungicida.

SOULIER (1984), estudando a competição *in vivo* entre uma linhagem de *Venturia inaequalis* resistente a benimidazóis (BAT) e duas linhagens sensíveis (R₂ e 106), através de inoculações sucessivas de misturas de conídios, obteve resultados diferentes para cada uma das linhagens sensíveis. Na competição entre BAT e 106, houve o desaparecimento

da linhagem sensível após duas gerações na planta hospedeira, ao passo que na confrontação DE BAT e R_2 , a linhagem resistente teve sua frequência reduzida e mantida ao nível de 3%.

2.3. Dicarboximidas

O termo dicarboximida tem sido amplamente usado, segundo BEEVER & BYRDE (1982), para os fungicidas vinclozolin, iprodione e procymidone, sendo que o primeiro dicarboximida a ser desenvolvido, dichlozoline, foi retirado do mercado logo após a sua introdução. Entretanto, BAILLY & DUBOIS (1981) incluem também nesse grupo de fungicidas: captan, folpet, captafol e ditalimfos, sendo esta classificação pouco utilizada.

Os dicarboximidas têm sido empregados no controle de doenças causadas por patógenos taxonomicamente relacionados (Sclerotiniaceae), incluindo *Sclerotinia*, *Monilinia* e *Botrytis*. Entre os dicarboximidas, iprodione é recomendado para o controle de importantes doenças, tais como o mofo cinzento em morangos, causado por *Botrytis cinerea*; a podridão parda de frutos, causada por *Monilinia*, a podridão branca do alho, causada por *Sclerotium cepivorum*; e *Alternaria* em cebola e cenoura (KIMATI *et alii*, 1986).

Segundo EDGINGTON (1981), embora os dicarboximidas não sejam considerados sistêmicos, inclusive pelas indústrias produtoras dos fungicidas, há evidências de que são sistêmicos. Hisada *et alii* (1977) (1), citados por BEEVER & BYRDE (1982), demonstraram que procymidone é translocado em pepino, tanto em movimento acropétalo, quanto basipétalo. Segundo BEEVER & BYRDE (1982), iprodione, relatado inicialmente como não sistêmico, é translocado em batata.

2.3.1. Modo de ação

Apesar das intensas investigações, conforme BEEVER & BYRDE (1982), o modo de ação dos dicarboximidas permanece indefinido. As semelhanças quanto às características químicas, os efeitos similares em fungos e o modelo de resistência cruzada dos dicarboximidas suportam a proposição de que todos os fungicidas deste grupo compartilham um mesmo modo de ação. Ainda segundo BEEVER & BYRDE (1982), alguns autores erroneamente sugerem que iprodione difere dos outros dicarboximidas, isto porque em solução etanólica ou metanólica, iprodione é transformado em um isômero muito menos atiu

---

(1) HISADA, Y. KATO, T. ; KAWASE, Y. Sistemic movement in cucumber plants and control of cucumber gray mold by a new fungicide, S-7131. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83 (suppl. 1): 71-78. 1977.

vo (COOKE *et alii*, 1979) e estas soluções são frequentemente utilizadas em testes biológicos.

FRIETZ *et alii* (1977), estudando o mecanismo de ação de procymidone e vinclozolin em *Botrytis cinerea*, concluíram que há uma forte inibição no crescimento micelial e germinação de conídios; pouco efeito na respiração; pouco efeito na síntese proteica; pouca influência no metabolismo do esterol, entretanto, com algum aumento na fração dos ácidos graxos livres; e forte redução na taxa de incorporação de uridina radioativamente marcada nos ácidos ribonucleicos.

Na comparação do mecanismo de ação de vinclozolin, procymidone e iprodione em *Botrytis cinerea*, PAPPAS & FISCHER (1979) não conseguiram determinar o modo de ação primário destes fungicidas. Os resultados mostraram que os dicarboximidas têm pouco efeito na germinação de conídios e o crescimento micelial é afetado, sendo que, em adição à redução no diâmetro da colônia, houve um decréscimo visível na quantidade de micélio aéreo. Nenhum composto afetou a respiração, a permeabilidade das membranas e a síntese proteica e de RNA, exceto iprodione que reduziu a incorporação de timina radioativamente marcada na síntese de DNA. Os dicarboximidas alteraram a síntese de lipídios, sendo que vinclozolin e procymidone reduziram a síntese de trigliceratos e iprodione

reduziu a síntese do esterol. A síntese de quitina foi pouco afetada.

Segundo PAPPAS & FISHER (1979), os resultados divergentes quanto ao modo de ação dos dicarboximidas são, provavelmente, devido a diferenças nas técnicas utilizadas, por exemplo, a inibição do crescimento micelial de procymidone é muito influenciada pela densidade de inóculo.

GEORGOPOULOS *et alii* (1979) relataram que os dicarboximidas aumentam a frequência de recombinação mitótica em *Aspergillus nidulans*, assim sua ação nos cromossomos é a principal razão da fungitoxicidade, atuando de forma semelhante aos fungicidas pertencentes ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos (dicloran e quintozene). Para BEEVER & BYRDE (1982), esta conclusão é prematura, visto que tais efeitos podem ser secundários ou refletem a ação em somente um dos numerosos sítios.

2.3.2. Resistência

Segundo BEEVER & BYRDE (1982), linhagens resistentes a dicarboximidas têm sido obtidas tanto em condições de campo quanto de laboratório. Todavia, são poucos os exemplos de falha no controle de doenças devido a resistência do patógeno a estes fungicidas. Para POMMER & LORENZ (1982),

experimentos em laboratório têm mostrado que fungos do gênero *Botrytis* se tornam resistentes a crescentes concentrações de dicarboximidas com ou sem o uso de agentes mutagênicos. Entretanto, o rápido desenvolvimento de resistência *in vitro* não implica necessariamente em um rápido surgimento de resistência em condições de campo. As observações têm indicado que a resistência aos dicarboximidas não ocorre tão rapidamente em condições naturais, como ocorre nos laboratórios.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de ocorrência de resistência a dicarboximidas de *Botrytis cinerea* isolado de videiras, LEROUX *et alii* (1977) selecionaram *in vitro* linhagens resistentes a iprodione (30 ppm), vinclozolin (30 ppm) e dicloran (100 ppm) a partir de linhagens sensíveis e resistentes a benzimidazóis, com ou sem exposição à luz ultravioleta. Os resultados mostraram que as linhagens resistentes aos dicarboximidas podem ser tão vigorosas e patogênicas quanto as sensíveis. A frequência de obtenção de linhagens resistentes a dicloran, vinclozolin e iprodione, a partir da sensível a benomyl, foi de 2 a $5 \cdot 10^{-7}$ e 30 a $140 \cdot 10^{-7}$, sem e com exposição à luz ultravioleta, respectivamente. Com a linhagem resistente a benomyl, a frequência foi inferior a 10^{-7} .

Ainda em condições *in vitro*, CHASTAGNER &

VASSEY (1979) obtiveram linhagens de *B. tulipae* resistentes a iprodione e vinclozolin, após a transferência de conídios para meio de cultura de BDA contendo 50 ppm dos fungicidas, nas frequências de $1,8 \cdot 10^{-6}$ e $4,0 \cdot 10^{-5}$, respectivamente. A taxa de crescimento da linhagem resistente foi aproximadamente a metade da sensível em meio de cultura de BDA sem fungicida. As linhagens resistentes esporulavam e produziam escleródios e eram tão patogênicas quanto as sensíveis.

Apesar de não terem sido relatados casos de resistência a dicarboximidas para *Botrytis squamosa* em culturas de cebola, PRESLY & MAUDE (1982) estudaram a possibilidade de surgimento do problema a partir de linhagens resistentes e sensíveis a benomyl. Foram obtidas, *in vitro*, linhagens capazes de crescer em meio de cultura contendo 4, 20, 100, 500 e 2500 ppm de iprodione. Estas linhagens apresentaram menor crescimento micelial na ausência do fungicida, menor capacidade de esporulação e foram menos patogênicas que as linhagens sensíveis. Entretanto, a resistência não foi perdida após diversas transferências na ausência do fungicida.

A possibilidade de desenvolvimento de resistência a dicarboximidas também foi estudada em linhagens que adquiriram resistência em experimentos realizados com subs-

tratos naturais.

DENNIS & DAVIS (1979) isolaram linhagens de *B. cinerea* resistentes a iprodione e vinclozolin em algumas lesões com lento desenvolvimento, em morangos utilizados num experimento cuja finalidade era avaliar a eficiência dos dois fungicidas em pré e pós-colheita, durante dois anos. A concentração que reduzia o crescimento micelial do isolado resistente em 50% variou de 160 a 480 ppm para iprodione e 150 a 650 ppm para vinclozolin, sendo que todos os isolados resistentes eram capazes de crescer em meio de BDA contendo 10000 ppm de iprodione ou 1000 ppm de vinclozolin. Baixas concentrações dos fungicidas estimulavam o crescimento das linhagens resistentes. Transferências sucessivas em meio de cultura sem os fungicidas ocasionaram perda da resistência. Os autores concluíram que a eficiência destes produtos no controle da doença nos experimentos realizados poderia ser devido a baixa frequência das linhagens resistentes ou à instabilidade da resistência na ausência dos fungicidas ou pela menor patogenicidade das linhagens resistentes.

Um isolado de *B. cinerea* resistente a vinclozolin, procymidone e iprodione foi obtido por PAPPAS *et alii* (1979), em morangos inoculados com um isolado resistente a benomyl e tratados com iprodione. O isolado resistente a di

carboximidas manteve a resistência a benomyl, além de apresentar resistência a quintozene e dicloran, entretanto, permaneceu sensível a captan, thiram, chlorothalonil, dichlofluanid, triadimefon, imazalil e prochloraz.

Testes em morangos destacados mostraram que a linhagem resistente a iprodione era tão patogênica quanto a sensível. Não foi observada diferença na quantidade de fungicida absorvido pelas linhagens sensíveis e resistentes. Na ausência do fungicida, também não foi observada diferença no crescimento micelial e germinação de conídios, entretanto, o crescimento micelial do isolado sensível foi completamente inibido com 2 ppm de iprodione e a germinação de conídios foi reduzida 65% com 20 ppm. Com esses resultados, PAPPAS *et alii* (1979) concluíram que a partir de isolados resistentes a benomil constatados em alta frequência por outros autores em condições de campo, é possível o surgimento de linhagens apresentando dupla-resistência a benzimidazóis e dicarboximidas.

Para POMMER & LORENZ (1982), apesar de não terem sido relatados sérios prejuízos com o surgimento de resistência aos dicarboximidas em condições de campo, uma situação diferente parece estar ocorrendo em culturas protegidas por estufas. HARTILL *et alii* (1983) explicam que a barreira física da estufa dificulta a entrada de conídios, portanto a

competição entre as linhagens não é tão intensa quanto fora da estufa. Assim, uma vez que a população resistente se desenvolveu em uma estufa, ela pode ser mais estável do que uma população similar em condições de campo.

PANAGIOTAKU & MALATHRAKIS (1981) e KATAN (1982a) realizaram levantamentos sobre a ocorrência de *B. cinerea*, causador do mofo cinzento em diversas plantações comerciais em estufas, resistentes a dicarboximidas na Grécia e em Israel, respectivamente. Ambos os levantamentos constataram a presença de linhagens resistentes reduzindo a eficácia do fungicida, mas foram testados baixos níveis de resistência (2,5 ppm e 5 ppm, respectivamente).

Estudando mais detalhadamente o problema, KATAN (1982b) verificou que os conídios de *B. cinerea* resistentes a iprodione e vinclozolin, isolados de pepino, tomate, morango e berinjela cultivados em estufa, germinavam normalmente em meio de cultura de BDA contendo 100 ppm de vinclozolin. De modo geral, as linhagens resistentes apresentavam uma taxa de crescimento linear 25 a 30% menor do que as sensíveis em meio de cultura de BDA. As concentrações que reduziam a taxa de crescimento linear das linhagens resistentes em 50% variavam de 1,0 a 4,2 ppm para vinclozolin, iprodione e procymidone.

Na Nova Zelândia, onde os dicarboximidas eram

amplamente utilizados desde 1978, HARTILL *et alii* (1983) constataram que aplicações frequentes de vinclozolin e procymidone falharam no controle de *B. cinerea* em folhas e frutos de tomate e pepino cultivados comercialmente em estufas, em 1980. Testes de laboratório comprovaram que os isolados eram capazes de crescer em meio de cultura contendo dichlozolate, iprodione, procymidone, vinclozolin, dicloran, quintozene e benzimidazóis.

No mesmo país, BEEVER & BRIEN (1983) realizaram um levantamento da resistência de *B. cinerea* a dicarboximidas em diferentes culturas. Em plantações de videira, kiwi, morango, e "boysenberry", linhagens resistentes foram obtidas em somente duas das 18 propriedades examinadas, uma em videira e outra em morangueiro, sendo que em nenhum caso, aparentemente, houve perda de controle da doença. Em plantios comerciais de tomate, feijão-vagem e pepino, em estufas, linhagens resistentes a dicarboximidas foram isoladas nas sete propriedades visitadas, com alguns casos de fracasso no controle da doença devido a resistência ao fungicida. Entretanto, o grau de resistência era baixo (dose necessária para inibir 50% do crescimento radial menor que 5 ppm). Os autores observaram uma correlação positiva entre a frequência de uso de dicarboximidas e a ocorrência de resistência, embora em plantações fora de estufas não foram verificados casos de

resistência apesar do intensivo uso dos fungicidas.

Para estudar o desenvolvimento de linhagens de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas em videiras na França, LEROUX & CLERJEAU (1985) dividiram os vinhedos em três grupos, sendo o primeiro localizado na região de Champagne; o segundo em Alsace, Burgundy e Loire Valley e o terceiro, no sul da França. As plantações de videiras do primeiro grupo receberam pelo menos quatro tratamentos com dicarboximidas por ano, entre 1977 e 1982. Entretanto, desde 1980 estes fungicidas apresentaram-se menos efetivos, sendo que em 1982, o mofo cinzento não foi controlado devido ao desenvolvimento de resistência a dicarboximidas. Face a esta situação, tais produtos não foram recomendados em 1983. Apesar disso alguns viticultores continuaram a utilizá-los. Nesse ano houve uma redução na frequência de linhagens resistentes a dicarboximidas, no entanto, insuficiente para utilizá-los na estação seguinte.

No segundo grupo, LEROUX & CLERJEAU (1985) incluíram vinhedos que receberam dois tratamentos à base de dicarboximidas por ano, desde 1977. Neste grupo, os resultados foram contraditórios, sendo que o tratamento foi eficiente em alguns casos e não em outros. No terceiro grupo, as plantações de videiras não estavam afetadas por linhagens resistentes, visto que elas não recebiam mais do que uma aplica

ção anual de dicarboximidas. Com estes resultados, os autores sugerem estratégias diferentes para cada região da França, visando reduzir ou prevenir o problema de resistência.

Em um levantamento semelhante sobre a ocorrência de linhagens resistentes a dicarboximidas em vinhedos de Ontario (Canadá), NORTHOVER & MATTEONI (1986) detectaram a presença de linhagens de *B. cinerea* com baixo nível de resistência (2 - 4 ppm) a iprodione em plantações que receberam dez ou mais aplicações desse fungicida ou vinclozolin, durante quatro anos. Baixo nível de resistência a iprodione também foi constatado em culturas comerciais em estufas, após o uso de iprodione por cinco anos, havendo uma correlação positiva significativa entre o uso do fungicida e a presença de linhagens resistentes.

Na Itália, em um programa de monitoramento de resistência a fungicidas em videiras, iniciado em 1981, GULLINO & GARIBALDI (1986) constataram a presença de linhagens de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas em 21 a 56% dos campos monitorados, entretanto, em baixa incidência dentro de cada campo. A resistência a dicarboximidas foi monitorada utilizando duas concentrações de vinclozolin (3 e 30 ppm) para selecionar linhagens com baixo e alto nível de resistência. Os autores concluíram que os dicarboximidas continuam sen

do efetivos em condições de campo, entretanto, frente aos problemas com resistência a esses fungicidas observados em outras culturas ou outros países e o baixo, mas constante, aumento na incidência de resistência, foi sugerido um contínuo monitoramento da população do patógeno.

Com a finalidade de estudar a adaptabilidade de linhagens de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas, DAVIS & DENNIS (1981a) analisaram isolados obtidos em condições de campo e de laboratório. Foram consideradas resistentes as linhagens que crescessem em meio de cultura contendo 50 ppm de iprodione ou vinclozolin. Seis dos oito isolados de morangueiro mantiveram a resistência aos dicarboximidas durante 40 sub-cultivos na ausência do fungicida, durante 6 meses, sendo portanto considerada uma resistência estável. Entretanto, segundo os autores, as linhagens de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas pareciam ser de pouca importância prática naquela ocasião, visto apresentarem ocorrência esporádica. A reduzida frequência de linhagens resistentes é explicada por DAVIS & DENNIS (1981a) devido à menor adaptabilidade, especialmente na ausência do fungicida, demonstrada pela reduzida taxa de crescimento e capacidade de esporulação em relação à linhagem sensível.

Complementando o estudo anterior, DAVIS &

DENNIS (1981b) demonstraram a menor sobrevivência das linhagens resistentes a dicarboximidas, além de menor capacidade de dispersão, contribuindo para a menor adaptabilidade de tais linhagens. Entretanto, a habilidade de infectar morangos destacados era igual para as linhagens sensíveis e resistentes.

Resultados semelhantes foram obtidos por HISADA *et alii* (1981) no estudo da adaptabilidade de linhagens de *B. cinerea* resistentes a procymidone. A menor capacidade de esporulação, sobrevivência e patogenicidade eram as características das linhagens resistentes responsáveis pelo não surgimento de problemas com resistência em condições de campo.

Conídios de linhagens de *B. cinerea* sensíveis e resistentes a dicarboximidas foram misturados (50:50; 10:90) por GULLINO & GARIBALDI (1981) e a competitividade de cada linhagem foi avaliada *in vitro* e *in vivo* (videiras e roseiras), determinando-se a cada geração a porcentagem de conídios resistentes e sensíveis. Em ambos os casos a linhagem resistente reduziu sensivelmente a sua frequência, demonstrando a sua menor adaptabilidade.

BEEVER & BRIEN (1983) observaram que as linhagens de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas apresenta-

vam alta sensibilidade à pressão osmótica, comprovada pelo menor crescimento em meio de cultura com NaCl, em relação à linhagem sensível. Esta característica poderia contribuir para uma menor adaptabilidade, representada por uma reduzida patogenicidade em frutos maduros, onde o acúmulo de açúcares solúveis contribuiria para uma alta pressão osmótica. Resultados semelhantes foram obtidos por LEROUX & CLERJEAU (1985), que observaram resistência cruzada negativamente correlacionada entre os dicarboximidas e alguns sais minerais (NaCl, KCl, CaCl_2), açúcares (glicose, lactose, sacarose) e álcoois (manitol e sorbitol).

Os mecanismos pelos quais os fungos se tornam resistentes aos fungicidas, segundo BEEVER & BYRDE (1982), são muitos, sendo que em alguns casos podem envolver o sítio de ação do produto, mas em outros podem não estar relacionados. Quanto aos dicarboximidas, pouco se sabe sobre o seu modo de ação e também do mecanismo de resistência.

Vários trabalhos provam que há resistência cruzada positivamente correlacionada entre os dicarboximidas entre si (FRITZ *et alii*, 1977; CHASTAGNER & VASSEY, 1979; PRESLY & MAUDE, 1982; HARTILL *et alii*, 1983; LEROUX & CLERJEAU, 1985) e entre os dicarboximidas e o grupo dos hidrocarboretos aromáticos (FRITZ *et alii*, 1977; LEROUX *et alii*, 1977;

GEORGOPOULOS *et alii*, 1979; PAPPAS *et alii*, 1979; PRESLY & MAUDE, 1982; KATAN, 1982b; HARTILL *et alii*, 1983; LITTLE & RAHE, 1984).

Várias características das linhagens resistentes a dicarboximidas têm sido examinadas, segundo BEEVER & BYRDE (1982), na esperança de que elas possam revelar o mecanismo de resistência e os fatores que alteram sua adaptabilidade. Todavia, esses autores alegam que há muito pouca informação para outras espécies além de *Botrytis cinerea*, cuja interpretação dos resultados é dificultada devido à sua grande variabilidade, como também ocorre com *B. squamosa* (BERQUIST & LORBEER, 1973). A ocorrência de heterocariose e a presença de vários núcleos por conídio (MORGAN, 1971) fazem com que as características apresentadas pela linhagem resistente possam ser um reflexo dessa variabilidade, mais do que uma consequência da presença de um gene particular de resistência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

3.1. Isolamento

Folhas de cebola (*Allium cepa* L.) com sintoma de queima das pontas, de diferentes procedências (Tabela 1), foram colocadas em câmara úmida (placa de Petri com dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada) e submetidas a 20°C e luz fluorescente contínua. A luminosidade foi fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de, aproximadamente, 30 cm, em uma câmara de crescimento (Biotronette Mark III, Lab-Line Instruments). Após 24 horas de incubação apareceram conidióforos e conídios típicos do gênero *Botrytis* (BARNETT & HUNTER, 1972) que, sendo facilmente visíveis sob um microscópio estereoscópico, foram transferidos, com auxílio de uma agulha histológica, para placas de Petri contendo meio de cultura de cebolinha (folhas de *Allium fistulosum* L. - 100g; ágar - 20g; água destilada - q.s.p. 1000 ml), com a finalidade de identificar os isolados de *B. squamosa* e obter culturas puras (GHINI, 1984).

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	DATA DE COLETA	LOCAL DE COLETA	VARIETADE DE CEBOLA	FUNGICIDAS APLICADOS NO CAMPO
P4	10/11/83	Piracicaba (SP)	Grupo Agregatum	nenhum
P5	10/11/83	Piracicaba (SP)	Grupo Agregatum	nenhum
Pd6	13/09/82	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, mancozeb
Pd8	27/09/83	Piedade (SP)	Granex 33	benomyl, mancozeb
Pd16	27/09/83	Piedade (SP)	Granex 33	benomyl, mancozeb
Pd17	27/09/83	Piedade (SP)	Granex 33	benomyl, mancozeb
Pd21	27/09/83	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, mancozeb
Pd22	27/09/83	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, mancozeb
Pd27	27/09/83	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, mancozeb
Pd28	27/09/83	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, mancozeb
Pd32	11/10/83	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, mancozeb
Pd39	03/09/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, mancozeb
Pd41	16/10/84	Piedade (SP)	Pira Ouro	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd42	16/10/84	Piedade (SP)	Pira Ouro	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd43	16/10/84	Piedade (SP)	Pira Ouro	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd44	16/10/84	Piedade (SP)	Pira Ouro	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd46	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd47	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd48	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd49	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd50	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd51	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd52	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd53	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd55	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Piracicaba	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd56	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd57	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd58	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd59	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd60	16/10/84	Piedade (SP)	Baia Periforme	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd61	16/10/84	Piedade (SP)	Pira Ouro	benomyl, iprodione, mancozeb
Pd63	27/08/86	Piedade (SP)	Baia Periforme	oxicloreto de cobre, chlorothalonil
Pd64	27/08/86	Piedade (SP)	Baia Periforme	oxicloreto de cobre, chlorothalonil
Pd65	27/08/86	Piedade (SP)	Baia Periforme	oxicloreto de cobre, chlorothalonil
Pd66	27/08/86	Piedade (SP)	Baia Periforme	oxicloreto de cobre, chlorothalonil
Pd67	27/08/86	Piedade (SP)	Baia Periforme	oxicloreto de cobre, chlorothalonil
SC19	15/08/83	Ituporanga (SC)	Creola	

3.2. Preservação do fungo

Os isolados de *Botrytis squamosa* foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura de BDA inclinado (batata - 200g; dextrose - 20g; ágar - 20g; água destilada - q.s.p. 1000 ml), através de transferências sucessivas, e em água, segundo o método de Castellani, descrito por FIGUEIREDO (1967): os fungos são repicados, através de disco de meio de cultura contendo micélio, para vidros de penicilina, com capacidade de 6 ml, contendo 4 a 5 ml de água destilada esterilizada; em seguida, os vidros são tampados com rolhas de borracha e lacrados com tampas herméticas de alumínio, com auxílio de uma máquina cravadora especial. Segundo FIGUEIREDO & PIMENTEL (1975), isolados de *Botrytis tulipae* foram mantidos viáveis por esse método, por um período de pelo menos 8 anos.

3.3. Produção de conídios

Conídios foram produzidos em meio de cultura de cebolinha, contido em placas de Petri, sob condições de câmara de crescimento durante 10 dias, com temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro, sendo o fotoperíodo de 14 horas. A luminosidade dessa câmara é conferida por uma lâmpada fluorescente, luz do dia, e duas lâmpa

das próximas ao ultravioleta (NUV), de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente. O método adotado se baseia no trabalho de esporulação de *B. squamosa* feito por BERGQUIST *et alii* (1972), com as modificações utilizadas por GHINI (1984).

3.4. Frequência e grau de resistência

A frequência e o grau de resistência a fungicidas dos isolados de *Botrytis squamosa* foram testados através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura.

Os isolados foram repicados, através de discos de meio de cultura contendo micélio (diâmetro de 0,7cm), para placas de Petri contendo BDA com concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm de benomyl (1- butilcarbamoil) - 2- benzimidazol carbamato de metilo, produto comercial: Benlate 500) e iprodione (3- (3,5 - diclorofenil) - N - (1- metiletil) - 2,4 - dioxo - 1- timidazolina carboximida; produto comercial: Rovral), em duas e três repetições, respectivamente.

As suspensões de benomyl foram feitas em acetona 20% e as suspensões de iprodione em água destilada. O iprodione foi incorporado ao meio de cultura fundido e resfriado a, aproximadamente, 45°C, sendo que o benomyl foi adi

cionado antes da autoclavagem.

As placas foram incubadas a 20°C, no escuro, sendo a avaliação feita após dois dias, determinando-se o crescimento linear através de medições de diâmetro médio das culturas, exceto para os isolados Pd63 até Pd67, cuja resistência a benomyl foi avaliada com 6 dias de idade.

3.5. Obtenção da linhagem resistente a benomyl

Com a finalidade de obter, em condições de laboratório, uma linhagem de *B.squamosa* resistente a benomyl e sensível a iprodione, suspensões de conídios do isolado P4 (sensível a benomyl e iprodione) foram transferidas para placas de Petri contendo BDA com 0, 500 e 1000 ppm de benomyl, em 5, 11 e 33 repetições, respectivamente. A concentração das suspensões de conídios era de, aproximadamente, 10^6 conídios/ml, sendo transferido 1 ml por placa de Petri.

A seguir, as placas foram incubadas, durante 20 dias, em condições de câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14 horas, à temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro, sendo a luminosidade fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta e uma fluorescente, luz do dia, de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altu

ra de 30 cm, aproximadamente. A avaliação foi feita através da observação do crescimento de culturas de *B. squamosa*.

3.6. Obtenção da linhagem resistente a iprodione

A obtenção da linhagem resistente a iprodione foi realizada, em condições de laboratório, a partir de uma linhagem sensível a benomyl e iprodione. Para tanto, suspensões de conídios do isolado P4, com concentração de 10^5 conídios/ml, aproximadamente, foram transferidas para 30 placas de Petri (1 ml/placa) contendo BDA com 500 ppm de iprodione e 3 placas sem o fungicida, para comprovar a viabilidade dos conídios.

A incubação foi realizada em condições de câmara ambiente com fotoperíodo de 12 horas, sendo a temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro. A luminosidade foi fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta (NUV) e uma lâmpada fluorescente, luz do dia, de 40 watts, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente.

Após uma semana de incubação, foi observado o número de linhagens resistentes a iprodione e seu crescimento micelial. A linhagem que apresentou maior vigor no crescimento micelial no meio de cultura de BDA contendo 500 ppm de iprodione foi selecionada para utilização em experimentos

posteriores.

3.7. Obtenção da linhagem duplo-resistente

A linhagem de *B. squamosa* duplo - resistente, ou seja, resistente a benomyl e iprodione, foi obtida a partir de um isolado benomyl-resistente e iprodione - sensível, em condições de laboratório.

Suspensões de conídios (10^3 conídios/ml) do isolado Pd44 (resistente a benomyl e sensível a iprodione) foram tratadas com luz ultravioleta, fornecida por uma lâmpada germicida (Tungsram), 15 W, colocada a uma altura de 40 cm. O tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 6 minutos que, segundo GRINDLE (1979), corresponde à DL90 (dose letal a 90% dos conídios). A seguir, as suspensões de conídios, tratadas ou não, foram transferidas para placas de Petri (1 ml/ placa) contendo meio de cultura de BDA com 10 ppm de iprodione, em 10 repetições, e para placas sem o fungicida, para comprovar a viabilidade dos conídios, em 2 repetições. A incubação foi realizada durante 20 dias, a uma temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro, sendo o fotoperíodo de 14 horas e a luminosidade fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta (NUV) e uma fluorescente, luz do dia, de 40 watts, marca Philips.

Após o período de incubação, as linhagens obtidas através de tratamento com luz ultravioleta (IUV1 e IUV2), juntamente com o isolado Pd44 e M5 (Pd44.17.7.20.5.10, obtido na quinta geração de transferência monospórica do isolado Pd44, ver 3.9.6.) foram transferidos para meio de cultura de BDA com gradiente de iprodione (0 a 100 ppm). Este meio de cultura foi preparado vertendo-se, inicialmente, BDA com 100 ppm de iprodione nas placas de Petri inclinadas e, depois de solidificado este meio, completando-se a placa na posição horizontal com BDA sem o fungicida. Assim, discos de meio de cultura contendo micélio (0,7 cm de diâmetro) foram transferidos para tais placas nos bordos correspondentes a 0 ppm de iprodione, em 3 repetições e placas sem o fungicida, em 2 repetições. A incubação foi feita em condições de câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14 horas, a 24°C no período luminoso e 15°C no escuro, sendo a luminosidade fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta e uma fluorescente, luz do dia, durante um mês.

Após o período de incubação, discos (0,7 cm de diâmetro) foram retirados dos bordos das placas de Petri correspondentes à concentração de 100 ppm de iprodione e transferidos para placas contendo meio de cultura de BDA com 1000 ppm de benomyl e 100 ppm de iprodione, em 5 repetições. A incubação foi realizada em condições de câmara de cresci-

mento, com a mesma regulagem anterior, durante 10 dias. A seguir, para cada linhagem, foi selecionada a repetição que apresentava maior diâmetro de crescimento. Da placa selecionada foram retirados discos de 0,7 cm de diâmetro e transferidos para placas de Petri contendo BDA com gradiente de iprodione de 0 a 1000 ppm, em 5 repetições, sendo feita a incubação nas mesmas condições anteriores. Após cultivo em meio com gradiente de iprodione, o isolado Pd44 passou a ser denominado Pd44G. Depois de um mês, foi testado o crescimento das linhagens em meio de cultura de BDA contendo 1000 ppm de benomy1 e 500 ppm de iprodione.

Para tanto, discos (0,7 cm de diâmetro) foram retirados dos bordos das placas de Petri correspondentes a 1000 ppm de iprodione e transferidos para placas contendo BDA com 1000 ppm de benomy1 e 500 ppm de iprodione e placas sem os fungicidas, em 5 repetições. A incubação foi feita a 22°C, no escuro, durante uma semana, quando foi feita a avaliação através da medição do diâmetro médio das culturas.

A seleção do duplo-resistente foi feita levando-se em consideração a linhagem que apresentou melhor desempenho quanto a crescimento micelial, além de vigor e esporulação, observados visualmente.

3.8. Sensibilidade colateral

Dois ensaios foram realizados para avaliar a sensibilidade colateral das linhagens de *B. squamosa*, através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura. No primeiro foram utilizados os seguintes isolados obtidos em produções comerciais de cebola: P4, Pd17, Pd32, Pd39, Pd51, Pd53, Pd56, Pd60 e Pd61 para mancozeb (etilenobisditiocarbamato de manganês com 10% zinco; produto comercial: Dithane M 45) e os isolados P4, Pd8, Pd17, Pd27, Pd32, Pd44, Pd58 e SC19 para captafol (N- (1, 1,2, 2- tetracloroetiltiltio) - 4- ciclohexeno - 1,2- dicarboximida; produto comercial: Difolatan 480), captan (N- (triclorometiltio) - 4- ciclohexeno - 1,2- dicarboximida; produto comercial Orthocide 750), dicloran (1,2- dicloro - 4- nitroanilina; produto comercial: Botran 75PM), procymidone (n, (3,5- diclorofenil) - 1,2- dimetil ciclo - propano - 1,2- dicarboximida; produto comercial: Sumilex) e propiconazol (1- [2- (2,4- diclorofenil) - 4- propil - 1,3- dioxolan - 2- IL - metil] - 1H - 1, 2, 4 triazol; produto comercial: Tilt).

As suspensões estoque de fungicidas, para o primeiro ensaio, foram feitas em acetona 20% para benomyl, em álcool etílico 20% para captan, captafol, dicloran, mancozeb, propiconazol e procymidone e em água destilada para iprodione.

De cada suspensão estoque foi feita diluição em série, tomada uma alíquota de 1 ml e transferida para o meio de cultura de BDA fundido e resfriado a, aproximadamente, 45°C (exceto benomyl, que foi acrescentado antes da autoclavagem), de tal forma a se obter concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm. De forma análoga foi preparada a testemunha sem a adição de fungicida.

No segundo ensaio foram testadas as linhagens: P4 (sensível a benomyl e iprodione); Pd27 e Pd67 (resistentes a benomyl e sensíveis a iprodione); P4BSIR (obtida em condições de laboratório, sensível a benomyl e resistente a iprodione) e IUV1 (obtida em condições de laboratório, resistente a benomyl e iprodione). Os fungicidas utilizados foram: benomyl (produto comercial: Benlate 500), iprodione (produção comercial: Rovral), procymidone (produto comercial, Dicyclidine 50%), captan (produto comercial: Captan 750), captafol (produto comercial: Orthodifolatan 70), dicloran (produto comercial: Botran 75 PM), mancozeb (produto comercial: Dithane M45) e propiconazol (produto comercial: Tilt). Para o preparo dos meios de cultura com fungicida, foi feita uma suspensão estoque dos produtos em álcool etílico 20% (exceto iprodione que foi suspenso em água destilada), sendo tomada uma alíquota constante de 1 ml de cada solução e transferida para 300 ml de BDA fundente (45°C, aproximadamente), de tal

forma a se obter a concentração de 100 ppm. Simultaneamente, foi preparada a testemunha sem a adição de fungicida.

Nos dois ensaios as linhagens foram transferidas para as placas de Petri através de discos de meio de cultura contendo micélio (diâmetro de 0,7 cm), em 3 repetições, e incubadas no escuro a 20°C, durante dois e quatro dias para o primeiro e o segundo ensaio, respectivamente. A avaliação foi feita através da medição do diâmetro médio das culturas.

3.9. Adaptabilidade

3.9.1. Crescimento micelial

As linhagens P4 (sensível a benomyl e iprodione), Pd27 e Pd67 (resistentes a benomyl e sensíveis a iprodione), P4BSIR (sensível a benomyl e resistente a iprodione) e IUV1 (duplo-resistente) foram testadas quanto ao crescimento linear em meio de cultura de BDA.

Discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio das linhagens foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, em 4 repetições, e incubados a 20°C, no escuro. A avaliação foi feita através da medição

diária do diâmetro médio das culturas.

3.9.2. Esporulação

As linhagens P4 (sensível a benomyl e iprodione), Rd27 e Pd67 (resistentes a benomyl e sensíveis a iprodione), P4BSIR (sensível a benomyl e resistente a iprodione) e IUV1 (duplo-resistente) foram testadas quanto à esporulação em meio de cultura.

Discos de meio de cultura (diâmetro de 0,7cm) contendo micélio das linhagens foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura de cebolinha, em 4 repetições, e incubados em câmara de crescimento com temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro, sendo o fotoperíodo de 14 horas. A luminosidade foi conferida por uma lâmpada fluorescente, luz do dia, e duas lâmpadas próximas ao ultravioleta (NUV), de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente.

Após uma semana de incubação, foi feita uma suspensão de conídios em água destilada, filtrada em gaze e a avaliação foi realizada através da contagem, em hemocitômetro, dos conídios produzidos por placa de Petri.

3.9.3. Patogenicidade

A patogenicidade das linhagens P4 (sensível a benomyl e iprodione), Pd27 e Pd67 (resistente a benomyl e sensível a iprodione), P4BSIR (sensível a benomyl e resistente a iprodione) e IUV1 (duplo-resistente) foi testada através da inoculação de suspensão de conídios em plântulas de cebola e inoculação de micélio em discos de escama de bulbo.

No primeiro teste, suspensões de conídios (10^4 conídios/ml) foram inoculadas com pulverizador De Vilbiss em plântulas de cebola da cultivar Baia Periforme. Cada linhagem foi inoculada em dois vasos (5 ml de suspensão de conídios/vaso), sendo que cada vaso, com capacidade de 300 ml, continha, aproximadamente, 25 plântulas com 45 dias de idade. Como testemunha, dois vasos foram pulverizados com água destilada. Após a inoculação, os vasos foram mantidos a 20°C, sob luz fluorescente contínua, permanecendo em câmara úmida nas primeiras 24 horas. Quatro dias após a inoculação, a avaliação foi feita através da contagem de folhas apresentando sintoma de queima da ponta em cada vaso.

No segundo teste, discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio das linhagens foram inoculados em discos (1,8 cm de diâmetro) de escamas internas

de bulbo de cebola Baia Periforme. Cada linhagem foi inoculada em quatro discos de escama contidos em placas de Petri, em quatro repetições, totalizando 16 discos por isolado. A inoculação foi feita ferindo-se o disco do lado externo da escama com auxílio de uma agulha histológica e, a seguir, colocando-se sobre o ferimento, um disco de meio de cultura contendo micélio do patógeno, de modo que o micélio permanecesse em contato direto com o ferimento. Como testemunha foram utilizados discos de escama que receberam ferimento e um disco de meio de cultura sem o patógeno. A incubação foi realizada em placas de Petri de plástico contendo dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada, colocadas sob luz fluorescente contínua e 20°C. A avaliação foi feita 3 e 6 dias após a inoculação, através da observação dos discos que apresentavam sintoma de podridão e crescimento micelial.

3.9.4. Competição *in vitro*

A competição *in vitro* entre as linhagens sensíveis e resistentes a benomyl foi testada através de transferência sucessivas de suspensões de conídios calibradas, inicialmente, com 50% dos conídios da linhagem resistente e 50% da sensível.

Para tanto, foram preparadas suspensões de co

conídios da linhagem P4 (sensível a benomyl), Pd27 e Pd67 (resistentes a benomyl), com concentração de $4 \cdot 10^4$ conídios/ml. Uma gota (volume de 1/80 ml) da suspensão de conídios da linhagem sensível a benomyl foi colocada no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura de cebolinha, e a seguir foi colocada uma gota da suspensão de conídios da linhagem resistente (Pd27 ou Pd67), em 5 repetições. Para testar a viabilidade dos conídios de cada isolado, suspensões de conídios de cada linhagem foram transferidas separadamente para placas de Petri, em 3 repetições.

A incubação foi realizada em condições de câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14 horas, sendo a temperatura de 24°C no período luminoso e 15°C no período escuro. A luminosidade foi fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta (NUV) e uma fluorescente, luz do dia, de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente,

Após uma semana de incubação, foram feitas suspensões dos conídios em água destilada, para cada placa de Petri, sendo transferidas duas gotas para novo meio de cultura de cebolinha. Dessa forma as suspensões de conídios foram transferidas sucessivamente *in vitro* até que uma das linhagens desaparecesse.

Para avaliar a proporção de conídios resistentes e sensíveis a benomyl, a cada transferência eram feitas repicagens monospóricas e a seguir era testado, de forma qualitativa, o crescimento dessas linhagens em meio de BDA contendo 500 ppm de benomyl. A repicagem monospórica foi realizada a partir de 1 ml da suspensão de conídios de cada tratamento, colocado em placas de Petri contendo ágar - água e incubado por 18 horas no escuro para permitir a germinação dos conídios. Após a germinação, os conídios eram identificados sob microscópio ótico e transferidos para meio de cultura de cebolinha. Com dois dias de idade, discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio das linhagens monospóricas eram transferidos para placas de Petri contendo BDA com 500 ppm de benomyl e incubados a 20°C no escuro. Após dois dias de incubação, era determinado o número de linhagens que cresciam ou não no meio de cultura com o fungicida, correspondendo à proporção de conídios resistentes e sensíveis a benomyl, respectivamente.

3.9.5. Competição *in vivo*

A competição *in vivo* entre as linhagens sensíveis e resistentes a benomyl foi avaliada através de transferência sucessiva de inóculo calibrado, inicialmente, com igual concentração de conídios de cada linhagem.

Dois experimentos foram efetuados com tal finalidade. No primeiro foram testadas as linhagens resistentes a benomyl: Pd27, Pd64, Pd65 e Pd67, ao passo que no segundo testou-se somente Pd27 e Pd67. Em ambos, a linhagem sensível a benomyl usada para a comparação foi P4.

Sementes de cebola da cultivar Baia Periforme foram semeadas em vasos plásticos, com capacidade de 300 ml, contendo solo esterelizado. Com um mês de idade, as plântulas foram inoculadas, com auxílio de um pulverizador De Vilbiss, com suspensões de conídios ($4 \cdot 10^4$ conídios/ml), sendo 50% dos conídios da linhagem sensível e 50% da resistente a benomyl. Antes da inoculação, foram retiradas as folhas mais velhas das plântulas, permanecendo somente folhas verdes.

No primeiro experimento foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo que cada repetição constituiu-se por um vaso com, aproximadamente, 5 plântulas inoculadas com 1 ml de suspensão de conídios. No segundo experimento, foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo que cada repetição constituiu-se por um vaso com, aproximadamente, 25 plântulas inoculadas com 3 ml de suspensão de conídios.

Como testemunha, plântulas foram pulveriza-

das de forma semelhante aos demais tratamentos, com água destilada. Para confirmar a viabilidade dos conídios, as linhagens foram também inoculadas separadamente.

A incubação ocorreu em condições de câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14 horas, sendo a temperatura no período luminoso de 25°C e no período escuro de 15°C. A luminosidade foi fornecida por duas lâmpadas próximas ao ultravioleta e uma fluorescente, luz do dia, de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente. Durante as primeiras 24 horas após a inoculação, os vasos permaneceram em câmara úmida.

Após uma semana de incubação, as folhas das plântulas foram retiradas e colocadas sob condições que favorecem a produção de conídios, semelhantes às utilizadas para isolamento (ver 3.1.), durante dois dias. Após esse período foram feitas suspensões de conídios que foram inoculadas em plântulas de cebola, repetindo-se o método até a eliminação de uma das linhagens testadas na mistura.

Para avaliar a proporção de conídios resistentes e sensíveis a benomyl, a cada transferência de inóculo eram feitas repicagens monospóricas e testadas, qualitativamente, quanto ao crescimento em meio de cultura de BDA contendo 500 ppm de benomyl, como foi feito para avaljar a com-

petição *in vitro* (ver. 3.9.4).

3.9.6. Estabilidade da resistência a benomyl

A estabilidade da resistência a benomyl foi avaliada através de sucessivas transferências monospóricas *in vitro* do isolado Pd44.

Suspensões de conídios do isolado Pd44 foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura de BDA e incubadas por 18 horas no escuro, a 20°C. Após esse período, os conídios germinados eram identificados sob microscópio ótico, transferidos isoladamente para placas de Petri contendo meio de cultura de cebolinha e incubados em condições que favorecem a produção de conídios (ver 3.3).

As transferências monospóricas foram realizadas durante cinco gerações, sendo que do isolado original Pd44 foram obtidas 18 linhagens monospóricas (Pd44-1 até Pd44-18); a segunda geração monospórica (Pd44-17-1 até Pd44-17-13) foi obtida a partir de Pd44-17; a terceira geração (Pd44-17-7-1 até Pd44-17-7-21) foi obtida a partir de Pd44-17-7; a quarta geração (Pd44-17-7-20-1 até Pd44-17-7-20-12) a partir de Pd44-17-7-20 e a quinta geração (Pd44-17-7-20-5-1 até Pd44-17-7-20-5-15) a partir de Pd44-17-7-20-5.

Cada geração de monospóricos foi testada quanto a resistência a benomyl, através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura. Discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio foram transferidos para placas de Petri contendo BDA com 1000 ppm de benomyl, em 3 repetições. As placas foram incubadas no escuro a 20°C, sendo a avaliação feita 48 horas após, através da medição do diâmetro médio das culturas.

3.9.7. Estabilidade da resistência a benomyl e iprodione

A estabilidade da resistência a benomyl e iprodione foi avaliada através de sucessivas transferências monospóricas *in vitro* da linhagem IUV1.

Suspensões de conídios de IUV1 foram transferidas para placas de Petri contendo ágar - água e incubadas no escuro, durante 18 horas, a 20°C. A seguir, os conídios germinados foram identificados sob microscópio ótico e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura de cebolinha, que foram incubadas em condições que permitem a produção de conídios (ver 3.3.).

Cinco gerações de transferências monospóricas foram obtidas, sendo que de IUV1 foram obtidas 20 linhagens

monospóricas (IUV1-1 até IUV1-20); a segunda geração monospórica (IUV1-8-1 até IUV1-8-22) foi obtida a partir de IUV1-8; a terceira geração (IUV1-8-17-1 até IUV1-8-17-15), a partir de IUV1-8-17; a quarta geração (IUV1-8-17-10-1 até IUV1-8-17-10-20), a partir de IUV1-8-17-10 e a quinta geração (IUV1-8-17-10-3-1 até IUV1-8-17-10-3-20), a partir de IUV1-8-17-10-3.

Para cada geração obtida, as linhagens monospóricas foram testadas quanto a resistência a benomyl e iprodione através do método do fungicida incorporado ao meio de cultura. Discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio das linhagens foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura de BDA, BDA com 1000 ppm de benomyl, BDA com 500 ppm de iprodione e BDA com 500 ppm de iprodione e 1000 ppm de benomyl, em 3 repetições. As placas foram incubadas no escuro, a 20°C, sendo a avaliação realizada após 3 dias, através da medição do diâmetro médio das culturas.

3.10. Anastomose de hifas

A formação de anastomose entre as hifas dos isolados de *Botrytis squamosa* foi observada *in vitro*, sob microscópio ótico. Para tanto, as linhagens foram dispostas duas a duas, através da colocação de discos de meio de cultura

ra (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio, nas extremidades de fitas de membrana de diálise (0,8 x 4,0 cm), previamente esterelizadas e mergulhadas em meio de cultura de cebolinha fundente. Foram colocadas, em forma de "Y", 3 fitas de membrana de diálise por placa de Petri contendo ágar - água, em 8 placas.

As placas foram incubadas em condições de luminosidade contínua (lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 40 watts, marca Philips, colocadas a uma altura de 30 cm, aproximadamente), a 20°C, durante 2 dias.

Após o período de incubação, as placas foram examinadas, sob microscópio ótico, observando-se a presença ou não de anastomose de hifas.

3.11. Coloração de núcleos de conídios

Para a determinação do número de núcleos por conídio, foi utilizado o método de coloração de núcleos utilizado por BARROS (1977).

Os conídios foram, inicialmente, fixados com solução de albumina a 5% em lâminas para microscópio. Após a secagem, foram fixados com solução de etanol, ácido acéti-

co e ácido lático, na proporção 6:1:1, durante 20 minutos. A seguir, foram feitas lavagens sucessivas em soluções alcoólicas a 95%, 70%, 50% e água destilada, durante 5 minutos cada uma. Seguiu-se hidrólise em HCl 1 N por 5 minutos, em temperatura ambiente, e por 6 minutos a 60 - 63°C. Após a hidrólise, foram feitas cinco lavagens em água destilada, durante 7 minutos cada uma, e uma lavagem em tampão fosfato pH 7,2 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 , na proporção 7:3), durante 20 minutos.

A coloração foi feita com solução de giemsa, durante 35 minutos. A giemsa foi preparada diluindo-se a solução estoque de giemsa em tampão fosfato pH 7,2, na proporção em volume 7:3, sendo a solução estoque composta de 250 ml de metanol, 250 ml de glicerina e 28 g de giemsa.

Os isolados utilizados foram P₄ (sensível a benomyl) e Pd27 (resistente a benomyl), sendo feitas duas lâminas por isolado e contados os núcleos de 10 conídios por lâmina.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência e grau de resistência

A partir do crescimento micelial em meio de cultura contendo diferentes concentrações de benomyl, os isolados de *B. squamosa* podem ser classificados quanto a sensibilidade ao fungicida (tabelas 2 e 3). Os isolados P₄ e P₅ apresentaram-se sensíveis ao produto, sendo o seu crescimento inibido pela concentração de 1 ppm. Os demais isolados cresceram em todas as concentrações testadas de benomyl. Entretanto, houve uma redução no crescimento micelial com o aumento da concentração de benomyl.

Para os diâmetros médios de crescimento dos isolados resistentes a benomyl, apresentados na tabela 2, foi realizada uma regressão linear:

$$y = 1,09175 - 0,247375 x$$

Sendo: y = diâmetro da cultura (cm)

x = logaritmo da concentração de benomyl (ppm)

teste F = 171,08

Dessa forma foi obtido o ED50 (concentração do fungicida capaz de inibir 50% do crescimento do isolado) de 246 ppm de benomyl.

Os isolados foram considerados sensíveis a iprodione visto que apresentaram pouco ou nenhum crescimento micelial em meio de cultura contendo 10 ppm do fungicida, sendo o crescimento totalmente inibido com 100 e 1000 ppm (tabela 4).

4.2. Obtenção da linhagem resistente a benomyl

Todos os conídios da linhagem P4 (sensível a benomyl e iprodione), transferidos para meio de cultura, contendo benomyl, foram inibidos pelo fungicida. Somente houve crescimento do fungo em meio de cultura sem o produto. Dessa forma não foi obtida uma linhagem resistente a benomyl, em condições de laboratório.

Tabela 2: Efeito de dosagens de benomyl no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE BENOMYL (PPM)					MEDIA
	0	1	10	100	1000	
P4	3,05 ^{1/} ab ^{2/}	0 b	0 b	0 b	0 b	0,61 e
P5	3,45 ab	0 b	0 b	0 b	0 b	0,69 e
Pd6	3,35 ab	3,15 a	3,35 a	2,55 a	0,65 a	2,61 ab
Pd16	2,80 ab	2,30 a	2,25 a	2,20 a	0,35 a	1,98 bcd
Pd17	3,55 a	3,20 a	3,50 a	2,40 a	0,80 a	2,69 ab
Pd21	3,20 ab	3,15 a	3,30 a	2,60 a	1,00 a	2,65 ab
Pd27	3,55 a	3,40 a	3,35 a	2,55 a	0,95 a	2,76 a
Pd32	3,20 ab	3,05 a	3,20 a	2,60 a	0,55 a	2,52 ab
Pd39	1,80 b	2,05 a	2,10 a	1,65 a	0,45 ab	1,61 d
Pd41	2,55 ab	2,05 a	2,00 a	1,50 a	0,40 ab	1,70 cd
Pd43	3,40 ab	3,35 a	3,10 a	2,30 a	0,75 a	2,58 ab
Pd44	3,25 ab	2,95 a	2,90 a	2,05 a	0,80 a	2,39 abc
Pd47	3,35 ab	3,15 a	3,20 a	2,55 a	0,65 a	2,58 ab
Pd48	3,30 ab	3,35 a	3,05 a	2,50 a	0,65 a	2,57 ab
Pd50	3,35 ab	3,40 a	3,50 a	2,60 a	0,70 a	2,71 ab
Pd51	3,75 a	3,40 a	3,65 a	2,45 a	0,60 a	2,77 a
Pd52	2,90 ab	2,65 a	2,75 a	1,80 a	0,50 a	2,12 abcd
Pd53	2,80 ab	2,75 a	2,90 a	1,70 a	0,65 a	2,16 abcd
Pd55	3,10 ab	2,85 a	2,85 a	1,90 a	0,55 a	2,25 abcd
Pd57	3,00 ab	3,05 a	3,00 a	2,55 a	0,85 a	2,49 ab
Pd58	3,05 ab	3,30 a	3,40 a	2,15 a	0,70 a	2,52 ab
Pd59	2,70 ab	2,55 a	2,65 a	2,30 a	0,65 a	2,17 abcd
MEDIA	3,11 A	2,73 B	2,69 B	2,04 C	0,60 D	

C.V. = 20,58%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 2 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 3: Efeito de dosagens de benomyl no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE BENOMYL (PPM)					MÉDIA
	0	1	10	100	1000	
Pd63	7,30 ^{1/}	7,88	6,30	2,63	0,80	6,03
Pd64	7,88	7,35	6,58	3,80	1,00	5,32
Pd65	8,30	7,55	7,25	4,20	0,70	5,60
Pd66	8,30	8,05	7,88	4,23	1,25	5,94
Pd67	8,30	8,30	8,30	3,83	0,85	5,92
MÉDIA	8,02	7,83	7,26	3,74	0,92	

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 2 repetições, com 6 dias de idade.

Tabela 4: Efeito de dosagens de iprodione no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE IPRODIONE (PPM)			MÉDIA
	0	1	10	
P4	1,73 ^{1/} ijklmn ^{2/} A	0,53 abc B	0 C	0,76 fghijkl
Pd6	1,16 no A	0,46 abc B	0 C	0,54 klm
Pd8	1,56 jklmno A	0,40 abc B	0 C	0,66 ijklm
Pd16	2,80 ab A	0,96 a B	0,23 C	1,33 a
Pd17	2,73 abcd A	0,63 abc B	0 C	1,12 abcde
Pd21	2,13 defghij A	0,70 abc B	0,10 C	0,98 abcdefghi
Pd22	1,40 klmno A	0,20 bc B	0 B	0,53 klm
Pd27	1,96 fghijk A	0,66 abc B	0 C	0,88 cdefghijkl
Pd28	2,80 ab A	0,67 abc B	0,06 C	1,18 abcd
Pd32	2,86 ab A	0,73 ab B	0,10 C	1,23 abc
Pd39	1,33 lmno A	0,76 ab B	0 C	0,70 hijklm
Pd41	1,00 o A	0,10 c B	0 B	0,37 m
Pd42	2,76 abc A	0,66 abc B	0,03 C	1,16 abcd
Pd43	2,63 abcde A	0,76 ab B	0,03 C	1,14 abcde
Pd44	2,76 abc A	0,70 abc B	0 C	1,16 abcd
Pd46	1,63 jklmn A	0,33 bc B	0 B	0,66 ijklm
Pd47	1,96 fghijk A	0,76 ab B	0 C	0,91 bcdefghij
Pd48	1,90 ghijklm A	0,43 abc B	0,03 C	0,79 efghijkl
Pd49	2,36 abcdefgh A	0,50 abc B	0,06 C	0,98 abcdefghi
Pd50	2,30 bcdefghi A	0,76 ab B	0,13 C	1,07 abcdefg
Pd51	1,66 jklmn A	0,40 abc B	0,06 B	0,71 ghijklm
Pd52	1,80 hijklm A	0,80 abc B	0,13 C	0,84 defghijkl
Pd53	1,33 lmno A	0,40 abc B	0 C	0,58 jklm
Pd55	1,00 o A	0,56 abc B	0 C	0,52 lm
Pd56	2,16 cdefghij A	0,40 abc B	0 C	0,86 defghijkl
Pd57	2,06 efghij A	0,56 abc B	0,03 C	0,89 bcdefghijk
Pd58	2,96 a A	0,66 abc B	0,10 C	1,24 ab
Pd59	2,53 abcdef A	0,56 abc B	0 C	1,03 abcdefgh
Pd60	1,93 fghijkl A	0,43 abc B	0 C	0,79 efghijkl
Pd61	2,50 abcdefg A	0,73 ab B	0 C	1,08 abcdef
SC19	1,30 mno A	0,33 bc B	0 B	0,54 klm
MÉDIA	2,04 A	0,56 B	0,04 C	

C.V. = 15,88%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

4.3. Obtenção da linhagem resistente a iprodione

Da transferência de suspensões de conídios do isolado P4 (sensível a benomyl e iprodione) para meio de cultura contendo iprodione, foram obtidas cinco linhagens que foram consideradas resistentes a iprodione. Através de avaliação visual foi selecionada a linhagem apresentando crescimento mais vigoroso em meio de cultura contendo o fungicida e denominada P4BSIR.

4.4. Obtenção da linhagem duplo-resistente

As quatro linhagens foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1000 ppm de benomyl e 500 ppm de iprodione (tabela 5), após transferência sucessivas em meio com gradiente de fungicida. Entretanto, a linhagem IUV1 foi selecionada para participar dos experimentos seguintes pois, além de crescer em presença dos dois fungicidas, apresentou maior vigor e capacidade de esporular, avaliados visualmente.

Tabela 5 - Efeito de benomyl (1000 ppm) e iprodione(500 ppm) no crescimento micelial de linhagens duplo-resistentes obtidas a partir do isolado Pd44 de *Botrytis squamosa*.

LINHAGEM	DIÂMETRO DA COLÔNIA (CM) ^{1/}	
	BDA	BDA COM BENOMYL E IPRODIONE
Pd44G ^{2/}	7,81	1,59
M5 ^{3/}	8,30	1,15
IUV1 ^{4/}	6,23	1,80
IUV2 ^{4/}	6,35	1,85

1/ Média de 5 repetições, com 1 semana de idade.

2/ Pd44 cultivado em meio de cultura com gradiente de iprodione.

3/ Pd44 após 5 gerações de transferências monospóricas.

4/ Pd44 tratado com luz ultravioleta.

4.5. Sensibilidade colateral

No primeiro ensaio, onde foram testados diferentes fungicidas em diversas concentrações, os isolados de *B. squamosa*, obtidos em condições de campo, apresentaram crescimento micelial em meios de cultura contendo somente baixas concentrações de captan, dicloran, procymidone e propiconazol (tabelas 7, 8, 10 e 11, respectivamente), sendo portanto considerados sensíveis a esses fungicidas. Para captafol e mancozeb, alguns isolados foram capazes de crescer em todas as concentrações testadas (tabelas 6 e 9). A partir desses resultados foi calculada a faixa de concentração de fungicidas que contém o ED50 (dose do fungicida suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) para cada isolado testado (tabela 12).

No segundo ensaio, as linhagens sensíveis a benomyl (P4 e P4BSIR) e as sensíveis a iprodione (P4, Pd27 e Pd67) não cresceram em meio de cultura contendo esses fungicidas na concentração testada (100 ppm), ao passo que as resistentes cresceram, como podem ser observados, de forma qualitativa, os resultados da tabela 13. Houve resistência cruzada entre iprodione, procymidone e dicloran. Nenhuma linhagem cresceu em meio de cultura contendo propiconazol.

Tabela 6: Efeito de dosagens de captafol no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE CAPTAFOI (PPM)					MÉDIA
	0	1	10	100	1000	
P4	2,20 d A	2,16 abc A	0,73 bcd B	0,20 b C	0 C	1,06 bc
Pd8	2,76 b A	2,26 ab B	1,10 a C	0 b D	0 D	1,23 a
Pd17	2,76 b A	1,40 f B	0,50 d C	0 b D	0 D	0,93 cd
Pd27	3,13 a A	2,00 bcd B	0,86 abc C	0,10 b D	0 D	1,22 a
Pd32	2,30 cd A	1,73 de B	0,63 bcd C	0,10 b D	0 D	0,95 c
Pd44	2,00 d A	1,50 ef B	0,56 cd C	0 b D	0 D	0,81 d
Pd58	2,60 bc A	2,36 a A	0,90 ab B	0,06 b C	0 C	1,19 ab
SC19	2,13 d A	1,93 cd A	1,10 a B	0,60 a C	0,20 D	1,19 ab
MÉDIA	2,49 A	1,92 B	0,80 C	0,13 D	0,03 E	

C.V. = 11,09%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 7: Efeito de dosagens de captan no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE CAPTAN (PPM)			MÉDIA
	0	1	10	
P4	1,46 ^{1/} A	1,30 b ^{2/} A	1,20 cd A	1,32 c
Pd8	1,00 AB	1,23 bc A	0,76 de B	1,00 d
Pd17	2,20 B	2,83 a A	2,43 a AB	2,49 a
Pd27	2,40 A	1,70 b B	1,96 ab B	2,02 b
Pd32	2,13 AB	2,46 a A	2,03 ab B	2,21 ab
Pd44	2,43 A	2,43 a A	1,50 bc B	2,12 b
Pd58	2,60 A	2,53 a A	1,80 b B	2,31 ab
SC19	0,76 A	0,70 c A	0,63 e A	0,70 d
MÉDIA	1,88 A	1,90 A	1,54 B	

C.V. = 11,67%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 8: Efeito de dosagens de dicloran no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE DICLORAN (PPM)			MÉDIA
	0	1	10	
P4	2,10 ^{1/} / c ^{2/} A	1,36 a B	0,20 C	1,22 b
Pd8	3,20 a A	1,30 ab B	0,23 C	1,58 a
Pd17	2,66 b A	1,13 ab B	0 C	1,27 b
Pd27	2,86 ab A	1,33 ab B	0 C	1,40 ab
Pd32	3,20 a A	1,40 a B	0,16 C	1,59 a
Pd44	1,90 c A	0,90 b B	0 C	0,93 c
Pd58	2,76 ab A	1,53 a B	0,03 C	1,44 ab
SC19	2,73 b A	1,26 ab B	0,06 C	1,36 ab
Média	2,68 A	1,28 B	0,09 C	

C.V. = 13,31%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 9: Efeito de dosagens de mancozeb no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE MANCOZEB (PPM)					MÉDIA
	0	1	10	100	1000	
P4	2,26 ^{1/} A	2,20 a A	2,50 a A	1,43 a B	0,56 C	1,79 a
Pd17	2,26 ab A	1,86 a AB	1,50 bcd B	0,16 c C	0 C	1,16 b
Pd32	0,93 de AB	1,16 bc A	1,06 cde A	0,46 bc BC	0 C	0,73 c
Pd39	0,66 e A	0,60 c A	0,70 e A	0,23 bc AB	0 B	0,44 d
Pd51	1,70 bc A	1,76 ab A	1,76 b A	0,86 ab B	0,10 C	1,24 b
Pd53	1,40 cd A	0,73 c B	0,90 de AB	0,36 bc BC	0,03 C	0,69 cd
Pd56	2,60 a A	1,93 a B	1,80 b B	0,46 bc C	0 C	1,36 b
Pd60	0,93 de AB	0,93 c AB	1,30 bcde A	0,53 bc BC	0 C	0,74 c
Pd61	1,83 bc A	1,76 ab A	1,56 bc A	0,53 bc B	0,06 B	1,15 b
MÉDIA	1,62 A	1,44 A	1,46 A	0,56 B	0,09 C	

C.V. = 23,63%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 10: Efeito de dosagens de procymidone no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE PROCYMIDONE (PPM)		MÉDIA
	0	1	
P4	1,76 ^{1/} A c ^{2/}	0,33 B	1,05 b
Pd8	1,40 cd A	0,23 B	0,82 bc
Pd17	3,10 ab A	0,56 B	1,83 a
Pd27	2,90 b A	0,40 B	1,65 a
Pd32	3,16 ab A	0,36 B	1,77 a
Pd44	1,83 c A	0,16 B	1,00 b
Pd58	3,40 a A	0,23 B	1,82 a
SC19	1,00 d A	0,26 B	0,63 c
MÉDIA	2,32 A	0,32 B	

C.V. = 14,08%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 11: Efeito de dosagens de propiconazol no crescimento micelial de isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	CONCENTRAÇÃO DE PROPICONAZOL (PPM)			MÉDIA
	0	1	10	
P4	1,30 ^{1/} ef ^{2/} A	0,16 bc B	0 B	0,49 de
Pd8	0,86 f A	0 c B	0 B	0,29 e
Pd17	3,40 a A	0,90 a B	0,13 C	1,48 a
Pd27	2,40 bc A	0,13 bc B	0 B	0,84 c
Pd32	2,56 b A	0,60 ab B	0,33 B	1,17 b
Pd44	1,50 de A	0 c B	0 B	0,50 de
Pd58	1,93 cd A	0 c B	0 B	0,64 cd
SC19	1,33 ef A	0 c B	0 B	0,44 de
MÉDIA	1,91 A	0,23 B	0,06 C	

C.V. = 25,20%

1/ Diâmetro médio de colônias (cm) de 3 repetições, com 2 dias de idade.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo que letras à direita das médias são para comparações de isolados dentro de concentrações e letras abaixo, para comparações de concentrações dentro de isolados (Tukey 5%).

Tabela 12: Faixa de concentração de fungicidas que contêm o ED50 (dose do fungicida suficiente para inibir em 50% o crescimento micelial) dos isolados de *Botrytis squamosa*.

ISOLADO	FUNGICIDAS (PPM)				
	CAPTAFOL	CAPTAN	DICLORAN	MANCOZEB	PROCYMIDONE PROPICONAZOL
P4	1 - 10 ¹ /	10 - 100	1 - 10	100 - 1000	0 - 1
Pd8	1 - 10	10 - 100	0 - 1		0 - 1
Pd17	1 - 10	10 - 100	0 - 1	10 - 100	0 - 1
Pd27	1 - 10	10 - 100	0 - 1		0 - 1
Pd32	1 - 10	10 - 100	0 - 1	10 - 100	0 - 1
Pd44	1 - 10	10 - 100	0 - 1		0 - 1
Pd58	1 - 10	10 - 100	1 - 10		0 - 1
SC19	10 - 100	10 - 100	0 - 1		0 - 1

1/ Os limites não estão incluídos na faixa de concentração.

Tabela 13: Efeito de fungicidas no crescimento micelial de linhagens de *Botrytis squamosa*.

L. INHAGEM	FUNGICIDAS 1/								TESTE MÚLTIPLA
	BENOMYL	IPRODIONE	CAPTAFOLO	CAPTAN	DICLORAN	MANCOZEB	PROPICONAZOL	PROCYMIDONE	
P4	0 ^{2/}	0	0,45	0,25	0	2,70	0	0	5,17
Pd27	1,93	0	0,07	0,17	0	2,73	0	0	6,05
Pd67	1,28	0	0,12	0	0	2,78	0	0	4,92
P4BSIR	0	2,70	0	0	1,70	0	0	3,87	4,53
IUV1	1,90	2,32	0,42	0,10	1,20	2,80	0	3,75	4,23

1/ Concentração de 100 ppm em meio de cultura de BDA.

2/ Diâmetro médio (cm) de colônias de 3 repetições, com 4 dias de idade.

4.6. Adaptabilidade

O crescimento micelial na ausência de fungicidas dos isolados P4, Pd27 e Pd67, sensíveis a dicarboximidas, seguiu taxas diárias maiores do que as observadas para as linhagens resistentes, P4BSIR e IUV1, que foram obtidas em condições de laboratório (tabela 14). Entre os isolados obtidos em condições de campo, Pd27 apresentou maior taxa de crescimento diário, assim como maior produção de conídios (tabela 15).

Todas as linhagens testadas foram patogênicas a plântulas e discos de escamas de cebola, sendo que os isolados P4 e Pd27 apresentaram maior porcentagem de folhas com queima das pontas (tabela 16) e maior número de discos com sintomas (tabela 17).

A competição *in vitro* entre isolados sensíveis e resistentes a benomyl resultou no desaparecimento da linhagem sensível da mistura P4 + Pd27 e sua predominância na mistura P4 + Pd67 (tabela 18). Resultado semelhante foi obtido na competição *in vivo*, nos dois experimentos realizados (tabelas 19 e 20). No experimento 1, o isolado resistente a benomyl (Pd27) predominou na segunda transferência de inóculo, entretanto Pd64 e Pd67, também resistentes a benomyl,

desapareceram na primeira transferência, sendo que Pd65 não sofreu outras transferências devido a problemas de contaminação com bactérias. No Experimento 2, da mesma forma, o isolado Pd27 predominou na segunda transferência de inóculo, entretanto, não foi observado o desaparecimento de Pd67 quando um maior número de sub-culturas foi testado, apesar de uma redução em sua frequência na população.

Tabela 14: Crescimento micelial de linhagens de *Botrytis squamosa* em meio de cultura de BDA.

LINHAGEM	DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA(CM) APÓS DIAS DE INCUBAÇÃO ^{1/}									TAXA MÉDIA DE CRESCIMENTO DIÁRIO (CM/DIA)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
P4	0,10	0,68	3,26	5,13	7,41	8,30				1,80 b ^{2/}
Pd27	0,15	1,51	4,09	6,29	8,24	8,30				2,04 a
Pd67	0	0,35	2,01	4,01	6,74	8,30				1,79 b
P4BSIR	0	0,79	2,00	3,06	4,26	5,44	6,76	8,10	8,30	1,15 c
IUV1	0	0,61	2,11	3,21	4,30	5,51	6,73	7,99	8,30	1,14 c

C.V. = 4,94%

1/ média de 4 repetições.

2/ médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

Tabela 15: Produção de conídios de linhagens de *Botrytis squamosa*.

LINHAGEM	CONÍDIOS/PLACA DE PETRI ^{1/}
P4	6,211.10 ⁵ b ^{2/}
Pd27	14,712.10 ⁵ a
Pd67	1,458.10 ⁵ b
P4BSIR	5,727.10 ⁵ b
IUV1	2,292.10 ⁵ b

C.V. = 45,77%

1/ Média de 4 repetições.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

Tabela 16: Patogenicidade de linhagens de *Botrytis squamosa* em plântulas de cebola.

LINHAGEM	PORCENTAGEM DE FOLHAS COM QUEIMA DAS PONTAS ^{1/}
P4	81,6 a ^{2/}
Pd27	89,8 a
Pd67	25,4 b
P4BSIR	41,8 b
IUV1	51,8 b

C.V. = 8,86%

1/ Média de 2 repetições.

2/ Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%; dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}$).

Tabela 17: Patogenicidade de linhagens de *Botrytis squamosa* em discos de escama de bulbos de cebola.

LINHAGEM	3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO		6 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	
	DISCOS COM SINTOMAS	DISCOS COM CRESCIMENTO MICELIAL	DISCOS COM SINTOMAS	DISCOS COM CRESCIMENTO MICELIAL
P4	16	0	16	16
Pd27	16	0	16	15
Pd67	5	5	16	5
P4BSIR	12	12	16	12
IUV1	3	3	16	3
Tes temunha	0	0	0	0

Tabela 18: Competição entre os isolados de *Botrytis squamosa* resistentes (Pd27 e Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de suspensões de conídios *in vitro* na ausência do fungicida.

ISOLADOS E MISTURAS (1+1) de <u>B.</u> <u>squamosa</u>	1. ^a TRANSFERÊNCIA			2. ^a TRANSFERÊNCIA		
	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES
P4	3	0	0			
Pd27	3	3	100			
Pd67	3	3	100			
Pd27+P4	36	36	100			
Pd67+P4	38	4	11	42	0	0

Tabela 19: Competição entre os isolados de *Botrytis squamosa* resistentes (Pd27, Pd64, Pd65, Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de inóculo em plântulas de cebola, na ausência do fungicida (Experimento 1).

ISOLADOS E MISTURAS (1+1) de <u>B</u> <u>squamosa</u>	1ª TRANSFERÊNCIA			2ª TRANSFERÊNCIA		
	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES
P4	4	0	0			
Pd27+P4	25	17	68	32	32	100
Pd64+P4	28	0	0			
Pd65+P4	32	6	19			
Pd67+P4	3	0	0			

Tabela 20: Competição entre os isolados de *Botrytis squamosa* resistentes (Pd27 e Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de inóculo em plântulas de cebola, na ausência do fungicida (Experimento 2).

ISOLADOS E MISTURAS (1+1) de <u>B. squamosa</u>	1ª TRANSFERÊNCIA			2ª TRANSFERÊNCIA		
	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES	TOTAL DE SUBCULTURAS TESTADAS	SUBCULTURAS RESISTENTES A BENOMYL	PORCENTAGEM DE SUBCULTURAS RESISTENTES
P4	5	0	0			
Pd27	5	5	100			
Pd67	5	5	100			
Pd27+P4	15	10	67	12	12	100
Pd67+P4	22	10	45	16	1	6

O isolado Pd44 permaneceu resistente a benomyl após cinco gerações de transferências monospóricas, na ausência do fungicida, não havendo o surgimento de nenhuma subcultura sensível, demonstrando a estabilidade da resistência a benomyl (tabela 21). Da mesma forma, a linhagem duplo-resistente IUV1 permaneceu resistente a benomyl e iprodione após sucessivas transferências monospóricas *in vitro* (tabela 22).

4.7. Anastomose de hifas

A observação da presença ou não de anastomose entre hifas de diferentes linhagens de *B. squamosa* está apresentada na tabela 23. Houve formação de anastomose em todas as combinações de linhagens testadas, exceto nas que continham o isolado Pd64.

4.8. Coloração de núcleos de conídios

O isolado resistente a benomyl (Pd27) e o sensível (P4) apresentaram semelhante número de núcleos por conídio, ou seja, até 20 núcleos.

Tabela 21: Efeito de benomy1 (1000 ppm) no crescimento micelial de cinco gerações de subculturas monospóricas do isolado Pd44 de *Botrytis squamosa*.

GERAÇÃO	DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (MM) 1/
1ª	5,09 2/
2ª	3,63 3/
3ª	3,89 4/
4ª	7,16 5/
5ª	4,70 6/

- 1/ com 2 dias de idade, em meio de cultura de BDA contendo 1000 ppm de benomy1
- 2/ média de 18 subculturas monospóricas (Pd44-1 até Pd44-18), em 3 repetições
- 3/ média de 13 subculturas monospóricas (Pd44-17-1 até Pd44-17-13), em 3 repetições
- 4/ média de 21 subculturas monospóricas (Pd44-17-7-1 até Pd44-17-7-21), em 3 repetições
- 5/ média de 12 subculturas monospóricas (Pd44-17-7-20-1 até Pd44-17-7-20-12), em 3 repetições
- 6/ média de 15 subculturas monospóricas (Pd44-17-7-20-5-1 até Pd44-17-7-20-5-15), em 3 repetições

Tabela 22 - Efeito de benomyl e iprodione no crescimento micelial de cinco gerações de subculturas monospóricas da linhagem IUV1 de *Botrytis squamosa*.

GERAÇÃO	DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (CM) ^{1/}			TESTEMUNHA
	BENOMYL (1000 ppm)	IPRODIONE (500 ppm)	BENOMYL (1000 ppm)+ IPRODIONE (500 ppm)	
1ª 2/	1,19	1,07	0,81	3,35
2ª 3/	0,81	1,02	0,51	2,88
3ª 4/	1,50	1,50	1,00	4,20
4ª 5/	1,30	1,43	0,80	4,08
5ª 6/	1,39	1,43	0,94	4,01

1/ com 3 dias de idade, em meio de cultura de BDA contendo fungicidas, em 3 repetições.

2/ IUV1-1 até IUV1-20

3/ IUV1-8-1 até IUV1-8-22

4/ IUV1-8-17-1 até IUV1-8-17-15

5/ IUV1-1-8-17-10-1 até IUV1-1-8-17-10-20

6/ IUV1-1-8-17-10-3-1 até IUV1-1-8-17-10-3-20

Tabela 23: Formação de anastomose entre hifas de linhagens de *Botrytis squamosa*.

LINHAGENS	FORMAÇÃO DE ANASTOMOSE DE HIFAS
Pd27 - Pd27	+ 1/
Pd27 - Pd65	+
Pd27 - IUUV2	+
Pd67 - Pd67	+
Pd67 - Pd46	+
Pd67 - Pd64	-
P4 - P4	+
P4 - Pd27	+
P4 - Pd46	+
P4 - Pd64	-
P4 - Pd65	+
P4 - Pd67	+
P4 - IUUV2	+

1/ + = formação de anastomose.

- = não formação de anastomose.

5. DISCUSSÃO

Do levantamento de frequência de resistência a benomyl dos isolados de *B. squamosa*, ficou demonstrado que a pressão de seleção exercida pela aplicação deste fungicida deu origem ao desenvolvimento de linhagens resistentes. Assim sendo, P4 e P5, obtidos em Piracicaba (SP), em culturas onde este fungicida não foi utilizado, apresentaram-se sensíveis a benomyl. Por outro lado, os isolados procedentes de culturas onde tal fungicida foi utilizado, isto é, do Município de Piedade (SP), comportaram-se como resistentes ao produto, como ocorreu com diversos patógenos em diferentes culturas onde este produto foi utilizado (DAVIDSE, 1982). Além disso, houve uma diferença acentuada entre o nível de resistência das linhagens resistentes (1000 ppm) e as sensíveis (1 ppm), sem a constatação de resistência intermediária, como também foi observado por diversos autores (GEORGOPOULOS & DOVAS, 1973; MILLER & FLETCHER, 1974; GEESON, 1976; CHO, 1977; GRINDLE, 1979; PRESLY & MAUDE, 1980a e RUPPEL *et alii*, 1980).

Para iprodione, a situação verificada foi diferente da constatada para benomyl. Todos os isolados testa-

dos apresentaram-se sensíveis a este fungicida. O mesmo ocorreu, segundo LORBEER¹, em culturas comerciais de cebola em New York (USA), onde houve problemas com o surgimento de linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl logo após a introdução deste produto, enquanto que os dicarboximidas, após anos de uso, não apresentaram tais problemas.

No presente trabalho não foi obtida uma linhagem resistente a benomyl a partir de uma sensível, como também ocorreu com GEESON (1976), entretanto foi obtida por POLACH & MOLIN (1975). Todavia, foram obtidas linhagens resistentes a iprodione em condições de laboratório, apesar da não ocorrência em condições de campo, como tem sido observado, de modo geral, com os dicarboximidas (BEEVER & BYRDE, 1982).

Segundo DEKKER (1982), a emergência *in vitro* de linhagens resistentes a um fungicida não implica que o uso deste produto no campo resultará em falha do controle da doença, sendo que tal fato depende da adaptabilidade do mutante resistente e da pressão de seleção. No presente trabalho, o estudo da adaptabilidade das linhagens de *B. squamosa*, sensíveis e resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas, pode explicar a frequência de resistência a estes fungicidas

---

¹ LORBEER, J. W. (Department of Plant Pathology, Cornell University, New York, USA) Comunicação pessoal, 1985.

constatada em condições de campo.

Houve variação na adaptabilidade dos isolados de *B. squamosa* resistentes a benzimidazóis, isto é, o isolado Pd27 apresentou maior capacidade de crescimento, esporulação, patogenicidade e competição com a linhagem sensível do que o isolado Pd67. Dessa forma, tais características do isolado Pd27 demonstram que linhagens resistentes a benomyl podem ser tão ou mais adaptadas do que as sensíveis, conferindo-lhes, assim, capacidade de predominar e permanecer na população do patógeno. Por outro lado, as linhagens estudadas de *B. squamosa* resistentes a dicarboximidas apresentaram menor adaptabilidade do que os isolados sensíveis, sendo esta a possível razão da não ocorrência de tais isolados em condições de campo.

Apesar do método utilizado para estudar a competição *in vivo* entre as linhagens resistentes e sensíveis não avaliar a competição quanto a disseminação e sobrevivência do patógeno, os resultados obtidos refletiram as diferenças das linhagens quanto a adaptabilidade. O isolado Pd 27, resistente a benomyl, predominou na população do fungo após poucas transferências de inóculo, mesmo na ausência de pressão de seleção causada pelo uso deste fungicida, sendo que tal situação pode estar ocorrendo em condições de campo. O

isolado Pd67, também resistente a benomyl, foi eliminado da população no Experimento 1 (tabela 19), entretanto, quando foi testado um maior número de subculturas (tabela 20), sua frequência foi reduzida na população, mas não eliminado. Tal fato pode ser devido a ocorrência de anastomose de hifas, onde núcleos conferindo resistência aos benzimidazóis poderiam ter sido doados ao isolado sensível(P4), como foi observado *in vitro* (tabela 23). Da mesma forma, a ausência de anastomose de hifas observada *in vitro* entre os isolados P4 e Pd 64 pode explicar o desaparecimento de Pd 64 na competição *in vivo* com P4 (tabela 19).

Além da pressão de seleção e adaptabilidade da linhagem resistente, segundo DEKKER (1982), a velocidade de surgimento do problema de resistência de fungos a fungicidas depende do tipo de doença, da natureza do patógeno e das circunstâncias que promovem ou dificultam o desenvolvimento da resistência. Entre esses fatores, o referido autor cita: a) capacidade de multiplicação e disseminação do patógeno, visto que o surgimento de resistência deve ser mais rápido em patógenos com abundante esporulação em partes aéreas da planta do que em patógenos que esporulam pouco ou produzem esporos que não são facilmente transportados, como pode ser o caso de vários patógenos de raízes; b) sobrevivência da linhagem sensível, pois durante os períodos de reduzida

pressão de seleção, esta linhagem poderá competir com a linhagem resistente, como é o caso das murchas vasculares e dos patógenos de raízes, nas quais os patógenos são dificilmente atingidos por fungicidas aplicados em pulverizações; c) limiar de infecção da doença, já que com doenças com um alto limiar de infecção, o surgimento de uma célula mutante raramente resultará em infecção, assim o risco de desenvolvimento de resistência na população é baixo; d) células multi-nucleadas, visto que genes que conferem resistência em fungos multi-nucleados podem, sob pressão de seleção do fungicida, ter sua frequência rapidamente aumentada na população do patógeno, como nos fungos heterocarióticos; e) severidade da epidemia, visto que em vários casos, os fungicidas, apesar de apresentarem controle satisfatório da doença em diversos anos, falharam em estações nas quais ocorreram severas epidemias.

No caso da Queima das Pontas da cebola, as características da doença permitem e favorecem o desenvolvimento de resistência a fungicidas. Isto porque é uma doença foliar, causada por um patógeno que produz conídios facilmente disseminados e que apresenta uma grande variabilidade genética devido a ocorrência de heterocariose.

O efeito da heterocariose na resistência de

B. cinerea a dicloran foi estudado por WEBSTER *et alii* (1970). Esses autores selecionaram, *in vitro*, linhagens praticamente homocarióticas quanto a resistência a dicloran a partir de linhagens sensíveis. Por ser um fungo heterocariótico, face a uma pressão de seleção, os núcleos podem ser selecionados no micélio de uma linhagem.

A seleção de linhagens sensíveis a partir das resistentes não foi verificada no presente trabalho, visto que as linhagens resistentes a benomyl e duplo - resistente apresentaram-se estáveis, mesmo após sucessivas transferências monospóricas. Da mesma forma, pode-se verificar que os isolados Pd64, Pd65, Pd66 e Pd67 mostraram-se resistentes a benomyl, mesmo sendo isolados em um campo onde o produtor deixou de utilizar esse produto (tabela 1), evidenciando a estabilidade da resistência.

Para GEORGIOPOULOS (1982), quando ocorre falha no controle de uma doença devido ao desenvolvimento de resistência do patógeno a um fungicida, na prática é importante verificar se a efetividade de outros fungicidas foi afetada. Se uma mutação afeta a sensibilidade a um produto e não a outro, os dois compostos são ditos não correlacionados em termos de resistência cruzada. Uma correlação positiva existe quando o mutante é menos sensível ou menos resistente

aos dois compostos do que a linhagem selvagem. Se o mutante é mais resistente do que a linhagem selvagem a um produto químico e mais sensível a outro produto, trata-se de uma resistência cruzada negativamente correlacionada. Entretanto, quando uma linhagem é resistente a dois diferentes fungicidas devido a duas mutações independentes, os dois compostos não são correlacionados, visto que a resistência cruzada não pode ser suposta sem evidências de que a sensibilidade aos dois produtos é controlada pelo mesmo gene.

O estudo da sensibilidade colateral dos isolados de *B. squamosa* mostrou que a resistência a iprodione acarreta em resistência a procymidone e dicloran, isto é, há resistência cruzada entre esses fungicidas. Pouco ou nenhum crescimento foi observado para captafol e captan, sendo que propiconazol, pertencente ao grupo dos inibidores da síntese do esterol, não permitiu o crescimento de nenhuma linhagem (tabela 13).

Embora não tenham havido perdas associadas com o desenvolvimento de resistência a dicarboximidas, BEEVER & BRIEN (1983) afirmam que há evidências de que a presença de linhagens resistentes pode levar à redução da eficácia do fungicida e, sob condições de alta pressão de doença, não controle da doença. Além disso, a longo termo, com a exposi-

ção de linhagens com baixo nível de resistência a seleção do fungicida, pode ocorrer aumento da adaptabilidade e do grau de resistência.

Segundo STAUB & SOZZI (1984), quando há risco de desenvolvimento de resistência do patógeno, a pressão de seleção do fungicida deve ser reduzida através da aplicação de outras medidas de controle, reduzindo o período de exposição do patógeno ao fungicida. Para DEKKER (1982), a pressão de seleção deve ser reduzida restringindo-se a aplicação do fungicida vulnerável a períodos críticos; reduzindo a quantidade aplicada e a frequência de aplicação; limitando a área tratada com o fungicida isoladamente; utilizando um método de aplicação que reduza a exposição do patógeno ao fungicida; usando dois fungicidas específicos, de diferentes modos de ação, em sequência e não em mistura; e realizando monitoramento para detectar a presença de linhagens resistentes.

Segundo KIMATI (1987), após o advento dos fungicidas sistêmicos, o monitoramento da resistência tornou-se indispensável. Para STAUB & SOZZI (1984), o monitoramento pode ser útil: 1) durante o desenvolvimento e introdução de um novo fungicida, avaliando a vulnerabilidade do produto; 2) após a introdução no mercado, analisando riscos de falha de eficiência devido ao desenvolvimento de resistência; 3) acom

panhando a resistência nas condições de campo, verificando o sucesso das estratégias anti-resistência; e 4) determinando a estabilidade da resistência, ano após ano, depois da retirada do fungicida. Dessa forma, o estudo da resistência de fungos a fungicidas deve ser contínuo, com a finalidade de assegurar o controle da doença.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. A resistência de *B. squamosa* a benomyl se encontra amplamente difundida. De um total de 29 isolados provenientes de campos comerciais de cebola, 27 foram resistentes até 1000 ppm de benomyl.
2. A resistência de *B. squamosa* a iprodione ainda não ocorre nas condições de cultura comercial, sendo todos os isolados completamente inibidos a 100 ppm e a maioria a 10 ppm deste fungicida.
3. Linhagens de *B. squamosa* resistentes a iprodione podem ser facilmente obtidas da linhagem sensível por semeadura densa de conídios em meio de cultura contendo 500 ppm do fungicida.
4. Linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl + iprodione podem ser obtidas a partir de linhagens benomyl - resistentes através de irradiação ultravioleta e transferên-

cias sucessivas em meios de cultura com gradiente de iprodione.

5. Linhagens de *B. squamosa* resistentes a iprodione foram também resistentes a procymidone e dicloran.
6. Linhagens resistentes a benomyl, a iprodione e a iprodione + benomyl não tiveram alteradas suas sensibilidades ao fungicida propiconazol, porém houve uma tendência geral de se mostrarem mais sensíveis ao captan, captafol e mancozeb do que a linhagem sensível.
7. Linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl podem ser tão adaptadas quanto as sensíveis, por outro lado linhagens resistentes a iprodione e a duplo-resistente tiveram reduzida sua adaptabilidade, com relação ao crescimento micelial, produção de conídios, patogenicidade e competição *in vivo* e *in vitro*.
8. Linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl e iprodione podem ou não formar anastomoses de hifas com as sensíveis.
9. O número de núcleos/conídios não diferiu entre a linhagem sensível e a resistente, sendo de até 20 núcleos/conídio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILLY, R. & DUBOIS, G. *Index phytosanitaire*. 17. ed. Paris, ACTA, 1981. 479 p.
- BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3. ed. Minneapolis, Burgess, 1972. 241 p.
- BARROS, J. P. de. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidem) Winter. Piracicaba, 1977. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- 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.

- BERQUIST, R. R. & LORBEER, J. W. Genetics of variation in *Botryotinia squamosa*. *Mycologia*, New York, 63: 36-47, 1973.
- BERGQUIST, R. R.; HORST, R. K.; LORBEER, J. W. Influence of polychromatic light, carbohydrate source, and pH on conidiation of *Botryotinia squamosa*. *Phytopathology*, St. Paul, 62: 889-95, 1972.
- BOLLEN, G. J. & SCHOLTEN, G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 77: 83-90, 1971.
- BOLTON, A. T. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea*, the result of selective pressure on resistant strains already present in nature. *Canadian Journal of Plant Science*, Ireland, 56: 861-4, out. 1976.
- BORCK, K. & BRAYMER, H. D. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, London, 85:51-6, 1974.
- BRASIER, C.M. & GIBBS, J. N. MBC tolerance in aggressive and non-aggressive isolates of *Ceratocystis ulmi*. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 80:231-5, 1975.

- CABRINI, H. M. Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no Estado de São Paulo, Piracicaba, 1985. 66p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CHASTAGNER, G. A. & OGAWA, J. M. DCNA - benomyl multiple tolerance in strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, St. Paul, 69 (7):699-702, 1979.
- CHASTAGNER, G. A. & VASSEY, W. E. Tolerance of *Botrytis tulipae* to glycophene and vinclozolin. *Phytopathology*, St. Paul, 69 (8):914, 1979.
- CHO, J. J. Shoot and flower blight of *Leucospermum cordifolium* incited by a benomyl - tolerant strain of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, St. Paul, 67:124-7, jan. 1977.
- CLEMONS, G. P. & SISLER, H. D. Formation of a fungitoxic derivative from Benlate. *Phytopathology*, St. Paul, 59:705, mai. 1969.
- COOKE, K; LOEFFLER, R.S.T.; PAPPAS, A. C. The structural rearrangement of iprodione in ethanolic solution. *Pesticide Science*, Oxford, 10:393-8, 1979.

- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G., ed. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p.60-70.
- DAVIDSE, L. C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol -2- yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, New York, 72: 174-93, 1977.
- 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. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 14:405-28, 1976.
- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R. W. *Systemic Fungicides* 2. ed. London, Butler & Tanner, 1977. cap. 9, p. 176-97.

- DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S. G. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265p.
- DELP, C. J. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Disease*, St. Paul, 64 (7):652-7, 1980.
- DENNIS, C. & DAVIS, R. P. Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin. *Plant Pathology*, Oxford, 28; 131-3, 1979.
- DOVAS, C.; SKYLAKAKIS, G.; GEORGOPOULOS, S. G. The adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in Northern Greece. *Phytopathology*; St. Paul, 66: 1452-6 dez. 1976.
- EDGINGTON, L.V. Structural requirements of systemic fungicides *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 19: 107-24, 1981.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, 61: 42-4, jan. 1971.
- EDGINGTON, L. V.; MARTIN, R.A.; BRUIN, G.C; PARSONS, I.M. Systemic fungicides: a perspective after 10 years. *Plant Disease*, St. Paul, 64 (1): 19-23, 1980.

- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33: 9-13, 1967.
- FIGUEIREDO, M. B. & PIMENTEL, C.P.V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 299-302, 1975.
- FLETCHER, J. T. & SCHOLEFIELD, S.M. Benomyl tolerance in isolates of *Botrytis cinerea* from tomato plants. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 82: 529-36, 1976.
- FRITZ, R.; LEROUX, P.; GREDT, M. Mécanisme de l'action fongitoxique de la promidione (26019 RP ou glycophène), de la vinchlozoline et du dicloran sur *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 90: 152-63, 1977.
- GEERSON, J. D. Comparative studies of methyl - benzimidazol -2- yl-carbamate-tolerant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* and other fungi *Transactions British Mycological Society*, London, 66, (1). 123-9, 1976.
- 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. The problem of fungicide resistance. *Bioscience*, Arlington, 19 (11): 971-3, nov. 1969.
- GEORGOPOULOS, S. G. & DOVAS, C. A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in Northern Greece. *Plant Disease Reporter*, Washington, 57 (4): 321-4, abr. 1973.
- 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.
- GEORGOPOULOS, S.G. & ZARACOVITIS, C. Tolerance of fungi to organic fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 5: 109-30, 1967.
- GHINI, R. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura da cebola (*Allium cepa* L.) Piracicaba, 1984. 53p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

- GHINI, R. & KRÜGNER, T.L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomyl em viveiro de *Eucalyptus viminalis*, em Três Barras - SC. *Summa Phytopathologica*. Resumos do 10º Congresso Paulista de Fitopatologia, Piracicaba, 1987. Piracicaba, Grupo Paulista de Fitopatologia, 1987. p.36.
- GILLMAN, L. S. & JAMES, R. L. Fungicidal tolerance of *Botrytis*, within Colorado greenhouses. *Tree Planters Notes*, Washington, 31 (1): 25-8, 1980.
- GRINDLE, M. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, London, 111:109-20, 1979.
- GULLINO, M. L. & GARIBALDI, A. Competition *in vitro* and *in vivo* between strains of *Botrytis cinerea* Pers. sensitive and resistant to dicarboximides. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 87: 243, 1981.
- GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. Monitoring the spread of dicarboximide and benzimidazole - resistant strains of *Botrytis cinerea* in italian vineyards. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON EPIDEMIOLOGY OF PLANT DISEASES. 5. Jerusalém, 1986. Summaries of Contributions.

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

IIDA, W. On the tolerance of plant pathogenic fungi and bacteria to fungicides in Japan. *Japan Pesticide Information*, Tokyo, (23):13-6, 1975.

JARVIS, W. R. & HARGREAVES, A. J. Tolerance to benomyl in *Botrytis cinerea* and *Penicillium corymbiferum*. *Plant Pathology*, Oxford 22:139-41, 1973.

JORDAN, V. W. L. & RICHMOND, D. V. The effects of benomyl on sensitive and tolerant isolates of *Botrytis cinerea* infecting strawberries. *Plant Pathology*, Oxford, 23:81-3, 1974.

- KAARS SIJPESTEIJN, A. Effects on fungal pathogens. In: MARSH, R.W., ed. *Systemic fungicides*. 2. ed. London, Butler & Tanner, 1977. cap. 7, p. 131-59.
- KATAN, T. Persistence of dicarboximide-fungicide resistance in populations of *Botrytis cinerea* in a warm, dry temperate agroclimate. *Phytoparasitica*, Dagan, 10 (3):209-11, 1982a.
- KATAN, T. Resistance to 3,5 - dichlorophenyl - N. cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology*, Oxford, 31:133-41, 1982b.
- KATAN, T.; SHABI, E.; GILPATRICK, J. D. Genetics of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis* isolates from Israel and New York. *Phytopathology*, St. Paul, 73 (4):600. - 3, 1983.
- KIMATI, H. Fungicidas. In: GALLI, F, coord. *Manual de fitopatologia*. 2. ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1978. v 1, cap. 18, p. 325-73.
- KIMATI, H. Resistência de fitopatôgenos a substâncias químicas usadas no controle de doenças de plantas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 10., Piracicaba, 1987. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, Grupo Paulista de Fitopatologia, 13 (1,2):72-4, 1987a.

- KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. *Agrotécnica*, São Paulo, (1):5-7, 1987b.
- KIMATI, H.; SOAVE, J.; ESKES, A.B.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; FERNANDES, N. G. *Guia de fungicidas agrícolas*. Piracicaba, Livroceres, 1986. 281 p.
- KIRBY, A.H.M. Progress towards systemic fungicides *PANS*, Hampshire, 18(1):1-33, 1972.
- LAMBERT, D. H. & WUEST, P. J. Acid production, a possible basis for benomyl tolerance in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, St. Paul, 66:1144-47, set. 1976.
- LEROUX, P. & CLERJEAU, M. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt) Berl. and de Toni to fungicides in french vineyards. *Crop Protection*, Guilford 4(2):137-60, 1985.
- LEROUX, P.; FRITZ, R.; GREDT, M. Etudes en laboratoire de souches de *Botrytis cinerea* Pers, résistantes à la dichlozoline, au dicloran, au quintozone, à la vinchlozoline et au 26019RP (ou glycophene). *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 89: 347-58, 1977.

- LITTLE, E. R. & RAHE, J. E. Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, St. Paul, 68 (5):371-4, mai. 1984.
- MARTIN, D. Contribution a l'etude du pouvoir pathogene et de la resistance au benomyl de *Venturia inaequalis* (CKE.) Wint: competition entre biotypes et heredite des caracteres. Paris, 1982. 115 p. (Doutorado - Centre d'Orsay/Universite de Paris - Sud).
- MILLER, M. W. & FLETCHER, J. T. Benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* isolates from glasshouse crops. *Transactions British Mycological Society*, London, 62 (1):99-103, 1974.
- MILLER, M. W. & JERVES, T. M. The persistance of benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* in glasshouse tomato crops. *Plant Pathology*, Oxford, 28:119-22, 1979.
- MORGAN, D.J. Numerical taxonomic studies of the genus *Botrytis*. *Transactions British Mycological Society*. London, 56 (3): 327-35, 1971.
- NACHMIAS, A. & BARASH, I. Decreased permeability as a mechanism of resistance to methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Sporobolomyces roseus*. *Journal of General Microbiology*, London, 94:167-72, 1976.

- NORTHOVER, J. & MATTEONI, J. A. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to fungicides alone or mixed with captan. *Plant Disease*, St. Paul, 70 (5):398-402, 1986.
- 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.
- PEARSON, R.C.; ROSENBERGER, D.A.; SMITH, C. A. Benomyl-resistant strain of *Botrytis cinerea* on apples, beans, and grapes. *Plant Disease*, St Paul, 64(3):316-8, mar. 1980.
- PEPIN, H. S. & MacPHERSON, E. A. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to benomyl and captan in the field. *Plant Disease*, St. Paul, 66(5):404-5, 1982.

- POLACH, F. J. & MOLIN, W. T. Benzimidazole - resistant mutant derived from a single ascospore culture of *Botryotinia fuckeliana*. *Phytopathology*, St. Paul, 65:902-4, ago. 1975.
- POMMER, E. H. & LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. *Crop Protection*, Guildford, 1 (2):221-30, 1982.
- 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, 1980b.
- PRESLY, A. H. & MAUDE, R. B. The effect of seed treatment with benzimidazole - based fungicides on infection of the foliage of overwintered salad onions by *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 94:185-96, 1980a.
- PRESLY, A. H. & MAUDE, R. B. Tolerance in *Botrytis squamosa* to iprodione. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 100:117-27, 1982.
- RUPPEL, E. G. Biology of benomyl - tolerant strain of *Cercospora beticola* from sugar beet. *Phytopathology*, St. Paul, 65:785-9, jul. 1975.

RUPPEL, E. G.; JENKINS, A. D.; BURTCH, L. M. Persistence of benomyl - tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of benomyl. *Phytopathology*, St. Paul, 70(1) : 25 - 6, 1980.

SCHREIBER, L. R. & TOWNSEND, A. M. Naturally occurring tolerance in isolates of *Ceratocystis ulmi* to methyl 2 - benzimidazolecarbamate hydrochloride. *Phytopathology*, St. Paul, 66:225-7, fev. 1976.

SCHROEDER, W. T. & PROVVIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant Disease Reporter*, Washington, 53(4):271-5, abr. 1969.

SCHUEPP, H. & KÜNG, M. Stability of tolerance to MBC in populations of *Botrytis cinerea* in vineyards of northern and eastern Switzerland. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, 3:180-1, 1981.

SOULIER, G. Etude experimentale de la resistance des *Venturia* aux benzimidazoles. Lyon, 1984. 110 p. (Doutorado - U.E.R. Faculte de Pharmacie Universite de Lyon).

STAUB, T. & SOZZI, D. Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant Disease*, St. Paul, 68(12):1026-31, dez. 1984.

- TOLEDO, A. C. D. de. Resistência a fungicidas. *O Biológico*, São Paulo, 40: 163-70, 1974.
- TRIPATHI, R. K. & SCHLÖSSER, E. The mechanism of resistance of *Botrytis cinerea* to methyl benzimidazol - 2 - yl carbamate (MBC). *Journal of Plant Disease and Protection*, Stuttgart, 89 (3):151-6, 1982.
- TUYL, J. M. van. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen Landbouwhogeschool*, Wageningen, 77-2, 1977. 236p.
- TUYL, J. M. van; DAVIDSE, L. C.; DEKKER, J. Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 80:165-8, 1974.
- WATSON, A. G. & KOONS, C. E. Increased tolerance to benomyl in greenhouse population of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* St. Paul, 63:1218-9, 1973.
- WEBSTER, R. K.; OGAWA, J. M.; BOSE, E. Tolerance of *Botrytis cinerea* to 2,6 - dichloro - 4 - nitroaniline. *Phytopathology*, St. Paul, 60:1489-1492, out. 1970.
- WUEST, P. J.; COLE JR., H.; SANDERS, P. L. Tolerance of *Verticillium dahliae* to benomyl. *Phytopathology*, St. Paul, 64:331-4, mar. 1974.