**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, SEROLÓGICA E
PATOGENICA DE ESPÉCIES DE *Botrytis* QUE OCORREM
NA CULTURA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

RAQUEL GHINI
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1984

A

meus pais e
minha irmã,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela sugestão do assunto, fornecimento de material bibliográfico, preciosa orientação, mas principalmente pela amizade, interesse e incentivo, colaborando de forma decisiva para a minha formação científica.

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização do presente trabalho.

Aos Professores Dr. Armando Bergamin Filho, Dr. Clélio Lima Salgado, Dr. Eric Balmer, Dr. José Carlos Matyis, Dr. Paulo de Campos Torres de Carvalho e Dr. Tasso Leo Krüger, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Professor Dr. Cyro Paulino da Costa, pelo fornecimento de sementes, pela colaboração e estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

Ao M.S. Jandir Francisco Frosi, pelo envio de cebola doente do Estado de Santa Catarina.

À pesquisadora Lesley Currah do National Vegetable Research Station (Inglaterra), pelo gentil envio de informações sobre seus resultados com o teste de inoculação de *Botrytis* em discos de folha.

À amiga M.S. Maria Aparecida Pessôa da Cruz Centurion, pelo incentivo e pela compreensão em todos os momentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e demais colegas, pela amizade e estímulo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e da Biblioteca Central da ESALQ, pela colaboração.

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

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Isolamento.	14
3.2. Preservação do fungo	15
3.3. Obtenção de conídios.	15
3.4. Caracterização morfológica.	16
3.5. Caracterização serológica	17
3.5.1. Preparo de anti-soros.	17
3.5.2. Preparo de antígenos	18
3.5.3. Testes serológicos	19
3.6. Caracterização patogênica	20
4. RESULTADOS	23
4.1. Caracterização morfológica	23
4.2. Caracterização serológica	26
4.2.1. Titulação do anti-soro e do antígeno	26
4.2.2. Comparação serológica das espécies de <i>Botrytis</i>	33
4.3. Caracterização patogênica	33

	Página
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	44
7. LITERATURA CITADA	45

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, SEROLÓGICA E PATOGENICA
DE ESPÉCIES DE *Botrytis* QUE OCORREM NA CULTURA
DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)

Raquel Ghini

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Espécies de *Botrytis* associadas à Queima das Pontas e ao Crestamento de Inflorescências da cebola foram isoladas a partir de amostras provenientes de diferentes localidades dos Estados de São Paulo e Santa Catarina. *B. squamosa* foi a espécie predominante associada à primeira síndrome, e *B. allii*, à segunda; *B. cinerea* apareceu, com baixa frequência, associada às duas síndromes.

Morfologicamente, *B. squamosa* se diferenciou de *B. allii* e *B. cinerea* pela maior dimensão de conídios, menor esporulação e maior produção de escleródios; *B. allii* se diferenciou de *B. cinerea* pela formação de maior número de escleródios nos bordos da placa de Petri, menor crescimento do micélio aéreo e menor dimensão de conídios.

Serologicamente, em testes de dupla difusão em gel de agar de Ouchterlony, com anti-soro anti *B. allii*, pelo menos

3 antígenos específicos dessa espécie foram evidenciados; com anti-soro anti *B. squamosa*, além de antígenos comuns às 3 espécies, evidenciou-se a ocorrência de pelo menos um antígeno específico.

Patogenicamente, *B. squamosa* se distinguiu das outras espécies por afetar, em testes de inoculação de discos de folha, tanto *Allium cepa* L., como *A. fistulosum* L.; *B. cinerea* afetou somente *A. cepa* L. e *B. allii* a nenhum dos dois.

MORPHOLOGICAL, SEROLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION
OF *Botrytis* spp. OCCURRING ON ONION (*Allium cepa* L.) CROPS

Candidate: Raquel Ghini

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Species of *Botrytis* associated with onion blast and inflorescence blight were isolated from samples collected in different localities in the States of São Paulo and Santa Catarina. *B. squamosa* was the predominant species associated with the first syndrome, and *B. allii* with the second; *B. cinerea*, at low frequency, appeared in both cases.

B. squamosa was morphologically distinct from *B. allii* and *B. cinerea* by greater conidia, poorer sporulation, and greater production of sclerotia; *B. allii* was distinct from *B. cinerea* by greater number of sclerotia at the border of the petri dish, smaller growth of the aerial micelium, and smaller conidia.

Serologically, through the Ouchterlony agar double-diffusion method, with anti *B. allii* anti-serum, at least 3 specific antigens of this species were evident; with

anti *B. squamosa* anti-serum, besides the common antigen of the 3 species, it was evident at least one specific antigen of *B. squamosa*.

B. squamosa was pathogenically distinct from the other species by affecting, through leaf disc inoculation tests, both *Allium cepa* L. and *A. fistulosum* L.; *B. cinerea* affected *A. cepa* L. only and *B. allii* neither.

1. INTRODUÇÃO

A cebola é uma hortaliça de grande expressão econômica no Brasil, sendo que a evolução da produção, no período 1969-80, caracterizou-se por apresentar alta taxa de crescimento (CAMARGO, 1983). Entretanto, o cultivo de cebola sofre limitações de ordem agronômica e climática, das quais as doenças são citadas como um dos fatores que contribuem para a redução da produtividade.

Dentre as doenças, tem-se destacado, ultimamente, o estudo do Mal de Sete Voltas (CAMPACCI, 1961 e 1962; AQUINO e WANDERLEY, 1966; ROBBS *et al.*, 1972; SILVA, 1976; BAJUNGU, 1979), Raízes Rosadas (CHAVES e ERICKSON, 1960; KOGUSHI *et al.*, 1971; NODA, 1981), Mosaico em faixas (COSTA *et al.*, 1966), Mancha Púrpura (LIMA *et al.*, 1962; SILVEIRA *et al.*, 1971) e outras. Entretanto, exis-

te uma doença de constatação sintomatológica frequente que ainda não foi pesquisada com a devida seriedade sob o ponto de vista etiológico. Trata-se da Queima das Pontas, Podridão do Pescoço e Crestamento da Inflorescência. Essa variada sintomatologia está associada à presença de várias espécies de fungos do gênero *Botrytis* que, nas condições do Brasil, não estão determinadas com exatidão. Efetivamente, os relatos brasileiros geralmente se referem a *Botrytis* sp. (CAMPACCI, 1961; LUZ, 1961; KIMATI, 1980; SATURNINO E CRUZ, 1980) ou, quando se referem especificamente, como no caso de *B. allii* e *B. squamosa* (DESLANDES, 1944), o fazem apenas em caráter de citação, sem dados que possam ser analisados. Segundo o último autor, o fungo associado às inflorescências de material de cebola do Rio Grande do Sul "revela características de *Botrytis squamosa*" e aquele causando manchas e apodrecimento em folhas e em bulbo "foi determinado por Dr. J.P. da Costa Neto como sendo o *Botrytis allii*".

Em contraposição com a escassez de dados a respeito de espécies de *Botrytis* que ocorrem em cebola nas nossas condições, trabalhos estrangeiros mostram que o problema é bastante importante estando envolvidos, quase sempre simultaneamente, duas ou mais das seguintes espécies de *Botrytis*: *B. cinerea*, *B. allii*, *B. byssoidea* e *B. squamosa* (WALKER, 1925 e 1926; PAGE, 1953; SEGALL e NEWHALL, 1960; HANCOCK e LORBEER, 1963, ELLERBROCK e LORBEER, 1977).

O presente trabalho, visando trazer esclarecimentos ao problema apontado, tem por objetivos:

1) Levantamento de fungos do gênero *Botrytis* que ocorrem em cebola, causando Queima das Pontas das folhas e Crestamento de Inflorescência.

2) Caracterização morfológica das espécies de *Botrytis* constatadas.

3) Caracterização serológica das mesmas.

4) Caracterização patogênica das mesmas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Podridão do Pescoço ("Neck Rot") da cebola foi relatada primeiramente como uma doença causada por *B. allii* Munn e, posteriormente, se descobriu que podiam estar envolvidas mais duas espécies: *B. byssoidea* Walker e *B. squamosa* Walker (WALKER, 1925 e 1926). Segundo WALKER (1925), essas três espécies podem ser distinguidas pelos tipos de crescimento em meios de cultura, como o BDA. *B. allii* produz colônia de rápido crescimento (50 mm em 4 dias, a 20-22°C), inicialmente constituída de micélio aéreo, branco no centro, circundado por uma zona de aproximadamente 5 mm de largura de cordões miceliais ralos, deslizantes; conidióforos e conídios aparecem no 3º dia e, com o tempo, a colônia se torna cinzenta; escleródios não se formam comumente. *B. byssoidea* cresce mais rapidamente que a espécie anterior, formando colônia mais elevada e cotonosa; conídios raramente são produzidos e escleródios são ausentes. *B. squamosa* produz colônia de lento

crescimento que, depois de 2 a 3 semanas, se cobre abundantemente de escleródios; a esporulação a 20-22°C é pobre, mas há profusa formação de conidióforos a partir de escleródios a 12-16°C.

Ao nível microscópico, a distinção dessas espécies, segundo WALKER (1926), é feita pela dimensão dos conídios: os de *B. allii* variam de 6-16 x 4-8 micra, a maioria caindo dentro de 7-11 x 5-6 micra; os de *B. byssoidea* tem um aspecto mais oblongo e variam de 8-20 x 5-11 micra, caindo a maioria dentro dos limites de 10-16 x 6-8 micra; os de *B. squamosa* medem 13-24 x 9-18 micra, a maioria caindo dentro de 15-22 x 11-15 micra.

Ao nível sintomatológico, WALKER (1926) sugeriu as denominações de "gray-mold neck rot", "mycelial neck rot" e "small sclerotial neck rot", para distinguir as podridões causadas por *B. allii*, *B. byssoidea* e *B. squamosa*, respectivamente.

Essas três espécies e *Botrytis cinerea* Pers. podem estar associadas com a Queima das Pontas da cebola, mais conhecida em países de língua inglesa por "onion blast" (YARWOOD, 1938; HICKMAN e ASHWORTH, 1943; PAGE, 1953; SEGALL e NEW HALL, 1960; HANCOCK e LORBEER, 1963).

Botrytis cinerea, segundo HANCOCK e LORBEER (1963), produz numerosos conídios globosos (7-10 x 9-14 micra),

micélio pardo acinzentado e abundantes escleródios, semelhantes àqueles de *B. squamosa*.

A frequência relativa de cada espécie de *Botrytis* associada à Queima das Pontas varia nos diversos trabalhos encontrados. YARWOOD (1938) relatou a ocorrência de *B. cinerea* como principal agente causal dessa doença. HICKMAN e ASHWORTH (1943) encontraram, predominantemente, *B. squamosa*, sendo que *B. cinerea* e uma terceira espécie de *Botrytis* não identificada foram isoladas com menor frequência. PAGE (1953) observou a predominância de *B. squamosa*. SEGALL e NEWHALL (1960) obtiveram isolados de *B. allii*, predominantemente. No trabalho de HANCOCK e LORBEER (1963) foi encontrada prevalência de *B. squamosa* e *B. cinerea*, sendo que *B. byssoidea* e *B. allii* foram raramente isolados.

Um estudo de taxonomia numérica, com 12 espécies de *Botrytis*, foi realizado por MORGAN (1971). O autor utilizou 85 características da fase imperfeita dos fungos, tais como: tamanho de conídio, produção de esporos e escleródios, taxa de crescimento e número de núcleos por célula. A chave dicotômica apresentada nesse trabalho atribui para *B. cinerea* as seguintes características: comprimento do conidióforo maior do que 750 micra (usualmente, 1000 micra ou mais), conidióforo sem dilatação na base, produção moderada ou abundante de esporos em vários meios de cultura, tamanho de esporos de 9-17 x 6-9 micra (média: 12 x 8 micra), mais de 30 núcleos por célula de hifa e

larga gama de hospedeiros. Para *B. squamosa*, as características atribuídas são: comprimento do conidióforo maior do que 750 micra (geralmente, 1.000 micra ou mais), conidióforo sem dilatação na base, pouca produção de esporos em vários meios de cultura, geralmente menos de 30 núcleos por célula, estreita gama de hospedeiros, escleródios esparsos ou ausentes no meio de cultura e conidióforos ramificados lateralmente. Para *B. allii*, as características utilizadas são: comprimento do conidióforo menor do que 750 micra (geralmente, 500 ou menos), escleródios raramente produzidos, abundante produção de conídios em meio de cultura, conídios pequenos (9 x 4 micra) e geralmente uninucleados, conidióforos presentes em grande número e preenchendo completamente a placa de Petri, e comprimento das células da hifa de 45 micra. Para *B. byssoidea* são atribuídas as características: comprimento do conidióforo menor do que 750 micra (geralmente, 500 micra ou menos), escleródios raramente produzidos, conidióforos com dilatação na base e colônia de cor branca.

Sob o ponto de vista de patogenicidade, HANCOCK e LORBEER (1963) concluíram que *B. squamosa* e *B. cinerea* causam manchas foliares muito mais extensas do que *B. allii*, em condições controladas de casa de vegetação. Esses autores também concluíram que as lesões das duas primeiras espécies podem ser sintomatologicamente distinguidas entre si, isto é, as de *B. squamosa* são elípticas, se estendem por toda secção transversal e

levam à murcha e morte das pontas, enquanto que as de *B. cinerea* são superficiais, não acompanhadas de queima das pontas.

Pelo que se depreende do trabalho de ELLER-BROCK e LORBEER (1977), as mesmas espécies de *Botrytis* citadas atacando folhas e bulbos de cebola podem estar envolvidas no crestamento de flores e cápsulas de sementes imaturas. Esses pesquisadores encontraram com bastante frequência a ocorrência de *B. cinerea*, *B. squamosa* e *B. allii*, os quais inoculados em inflorescências reduziram a produção de sementes em 98, 93 e 47%, respectivamente, em relação às testemunhas não inoculadas.

KRITZMAN e NETZER (1978), desenvolvendo um meio seletivo para isolamento de *Botrytis* spp., constataram a presença de fungos desse gênero em semente comercial de cebola, o que aumenta o potencial de danos desses fungos à cebola cultura.

Mais recentemente, STALLKNECHT e GARRISON (1982) avaliaram os efeitos de *B. allii* em três cultivares espanhóis de cebola, em condições de campo. Além da redução significativa na produção de sementes, foi observada pelos autores uma redução na taxa de germinação e no vigor das plantas originadas por estas sementes.

Apesar das espécies de *Botrytis*, que ocorrem em cebola, estarem morfológicamente definidas, muitos dos cri

térios usados para a sua delimitação são contestáveis. Assim, a diferença entre *B. allii* e *B. byssoidea* reside basicamente na fácil esporulação da primeira espécie em BDA, pois as dimensões dos conídios são muito semelhantes (WALKER, 1926).

Ora, em *B. cinerea*, HANSEN e SMITH (1932) demonstraram a ocorrência de heterocárions de tipos miceliais e esporulantes com consequente segregação somática. Em vista desses antecedentes OWEN *et al.* (1950) empreenderam um estudo comparativo de variabilidade morfológica de *B. byssoidea* e *B. allii*, concluindo, no entanto, que não obstante o grande número de variantes, naturais ou induzidos, as características de ambas se mantinham dentro dos limites da espécie e que, portanto, não havia indicações de que qualquer uma delas pudesse ser vista como variante de outra.

Mais recentemente, em *B. squamosa* foram encontrados vários variantes morfológicos, dentre os quais mutantes que esporulam no escuro e aqueles que não formam escleródios (BERGQUIST e LORBEER, 1973), o que torna um tanto falha a delimitação dessa espécie, feita anteriormente (WALKER, 1925 e 1926).

A dificuldade na identificação morfológica das espécies de *Botrytis* da cebola também é evidente no trabalho de NETZER e DISHON (1967), que deixaram essa tarefa para a Commonwealth Mycological Institute, Londres. Esses autores desenvolveram meios de culturas para distinção de *B. allii* e

B. cinerea, isto é, um meio sintético suplementado com sorbose e BDA contendo 10 a 1.000 ppm de Euparen, que restringem diferentemente o crescimento das duas espécies.

Nesse contexto de dificuldade taxonômica, do ponto de vista morfológico, poucos estudos de natureza serológica foram realizados visando a caracterização dessas espécies de *Botrytis* como, aliás, tem sido feito para fungos de outros gêneros, por exemplo, *Ascochyta* (FIGUEIREDO, 1972), *Fusarium* (MADHOSINGH, 1964a e 1964b), *Ceratocystis* (AMOS e BURRELL, 1967; CARDOSO, 1976), *Cronartium* (GOODING Jr. e POWERS Jr., 1965), *Phytophthora* (MERZ *et al.*, 1969) e *Verticillium* (WILLIE e DEVAY, 1970; TERANISHI *et al.*, 1973).

Em todos esses casos, a serologia se mostrou uma ferramenta útil, adicional, que usada em associação com outros processos diagnósticos clássicos, como sugeria SEELIGER (1968), possibilitou uma melhor compreensão das relações entre as espécies pesquisadas. Os testes serológicos, evidenciando os componentes antigênicos específicos e os comuns, tornam-se instrumentos indispensáveis na classificação de microrganismos, mormente considerando-se que através deles há possibilidade de se estabelecerem relações filogenéticas (SEELIGER, 1968).

Em estudos visando a caracterização do gênero *Botrytis*, Preece e Cooper (1969), citados por JARVIS (1980), foram capazes de diferenciar *B. cinerea* de outros três gêneros não relacionados, através de testes em lâmina de vidro, pela técnica de anticorpo fluorescente.

OLIVIER (1979) teve grandes dificuldades em obter um anti-soro com atividade suficiente para diferenciar *B. cinerea*, *B. fabae*, *B. tulipae* e *B. allii*, através do teste de anel de precipitação, dupla difusão em ágar e imunoeletroforese. O antígeno foi preparado a partir do micélio dessas espécies de *Botrytis*. Os quatro isolados de *B. cinerea* estudados comportaram-se de forma semelhante na reação serológica, e distintos das outras três espécies, particularmente *B. tulipae*. Entretanto, foi difícil diferenciar *B. fabae* e *B. tulipae*. OLIVIER (1979) conclui que a utilização de técnicas serológicas é de grande interesse para o estudo do gênero *Botrytis*, mas só serão obtidos os resultados esperados, se forem associados os diferentes métodos de diversos autores.

Segundo JARVIS (1980), os estudos serológicos ainda não forneceram importantes contribuições à taxonomia do gênero *Botrytis*, visto que eles foram realizados poucas vezes e com sucesso limitado.

Sob o ponto de vista fitopatológico, as características morfológicas e serológicas não são de muito valor se não forem correlacionadas com as patogênicas e, sob esse ponto de vista, pouco foi feito com respeito a respostas de diferentes cultivares de cebola às diferentes espécies de *Botrytis*. Efetivamente, nos trabalhos, já citados, de SEGALL e NEWHALL (1960), HANCOCK e LORBEER (1963) e ELLERBROCK e LORBEER (1977), apesar de terem sido demonstrados alguns aspec-

tos da patogenicidade, não foi testado o comportamento de diferentes variedades de cebola, o que pode dar informações valiosas sobre o controle das doenças causadas por *Botrytis* spp.

Dos diversos testes *in vivo*, segundo TUIITE (1969), os testes de inoculação em folha destacada podem ser de grande utilidade na determinação da patogenicidade, seleção para resistência e estudo de raças de patógenos. As vantagens do método da folha destacada, citadas pelo mesmo autor, são: economia de espaço, inóculo e plantas; fácil controle de luz e temperatura; fácil observação dos resultados; menor chance de contaminação; além da alta correlação encontrada entre os resultados obtidos a partir de experimentos com folhas destacadas e não destacadas.

O método da folha destacada foi utilizado por SHERWOOD (1957), com a finalidade de diferenciar cinco raças fisiológicas de *Uromyces trifolii* var. *fallens*. Folhas de *Trifolium pratense* L. foram inoculadas e mantidas em placas de Petri, contendo uma solução de água destilada e sacarose a 2%. Concomitantemente, foram inoculadas folhas não destacadas. Os resultados mostraram uma alta correlação entre os dois testes utilizados.

Com a finalidade de selecionar clones de alfafa resistentes a *Phoma herbarum*, WARD (1959) avaliou a eficiência dos testes de inoculação realizados em condições de campo,

casa de vegetação e laboratório. O método da folha destacada, feito em condições de laboratório, apresentou resultados semelhantes aos outros dois tipos de teste, entretanto, proporcionou vantagens adicionais. Além de não destruir toda a planta inoculada, foi observada uma economia de tempo e espaço.

O teste de inoculação de segmento foliar foi utilizado por CURRAH (1982), para detectar resistência a *Botrytis squamosa* em progênie de cebola num programa de melhoramento envolvendo o cruzamento de *Allium cepa* e *A. fistulosum*. O inóculo constou de gotas de suspensão de esporos, com concentração de 1×10^6 a 5×10^6 esporos/ml, colocadas sobre segmentos ou discos de folhas adultas. Os resultados mostraram que *A. fistulosum* é mais resistente a *B. squamosa*, do que *A. cepa*. O teste foi também usado para determinar a resistência de folhas com diferentes idades, variabilidade dentro de cultivares e inóculo necessário para compensar as mudanças sazonais na textura da folha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento

Folhas e inflorescências de cebola com sintomas de queima das pontas e crestamento, respectivamente, foram colocadas em câmara úmida (placa de Petri com chumaço de algodão embebido em água destilada) e submetidas a 18°C e luminosidade constante. A luminosidade foi fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 40 watts, colocadas a uma altura de, aproximadamente, 30 cm. Após 24 horas de incubação, apareceram frutificações típicas do gênero *Botrytis* (BARNETT e HUNTER, 1972) que, sendo facilmente visíveis sob um microscópio estereoscópico, foram repicadas com auxílio de uma agulha histológica para placas de Petri contendo meio de cultura de cebola (folhas de *Allium fistulosum* L. - 200 g; ágar - 20 g; água destilada - q.s.p. - 1000 ml).

Os isolados foram obtidos em diversas culturas de cebola do Estado de São Paulo e Santa Catarina, em diferentes variedades e órgãos da planta (Tabela 1).

3.2. Preservação do Fungo

Os isolados de *Botrytis* foram preservados em água, segundo o método de Castellani, descrito por FIGUEIREDO (1967): os fungos são repicados através de disco de micélio para vidros de penicilina, com capacidade de 6 ml, contendo 4 a 5 ml de água destilada esterilizada; em seguida, os vidros são tamponados com rolhas de borracha e lacrados com tampas herméticas de alumínio, usando-se para isso, máquina cravadora especial. Segundo FIGUEIREDO e PIMENTEL (1975), isolados de *Botrytis tulipae* foram mantidos viáveis por esse método, por um período de pelo menos 8 anos.

3.3. Obtenção de Conídios

Conídios foram produzidos em meio de cebola, contido em placas de Petri, sob condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III, Lab - Line Instruments), com temperatura de 18°C no período escuro e 23°C no período luminoso, sendo o fotoperíodo de 14 horas. A luminosidade dessa câmara é conferida por três lâmpadas fluorescentes, luz do dia, e uma lâmpada próxima ao ultravioleta, 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 al.* (1972).

As suspensões de conídios foram obtidas por lavagem das placas com água destilada e Tween 20, 10 dias após a repicagem do fungo através de disco de micélio.

3.4. Caracterização Morfológica

Os isolados de *Botrytis* foram cultivados em BDA (batata-extrato de 200 g; dextrose - 20 g; ágar - 18 g; água destilada - q.s.p. - 1000 ml) e meio de cebola, sendo observadas as suas características de crescimento (aspecto da colônia, produção de conídios, produção de escleródios).

Pelo menos 50 conídios/isolado de 24 isolados foram dimensionados microscopicamente, através do comprimento e largura, fazendo-se uso da ocular micrométrica (Filar Micrometer Eyepiece da Bausch & Lomb), previamente calibrada. A objetiva utilizada proporcionava um aumento de 40X. Para o dimensionamento, os conídios foram suspensos em corante de lactofenol (cristais de fenol, 20 g; ácido lático, 20 g; glicerol, 40 g; cotton blue, 1 g; água destilada, 20 ml).

3.5. Caracterização Serológica

3.5.1. Preparo de Anti-Soros

Para obtenção de anti-soros, coelhos da raça Nova Zelândia, de aproximadamente 2 kg, foram injetados duas vezes por semana, com antígenos do isolado P₁ de *Botrytis allii* ou SC₁₀ de *B. squamosa*.

O antígeno para essas injeções foram suspensões de esporos, submetidas a lavagens em salina tamponada (NaCl, 0,85%; K₂HPO₄ - KH₂PO₄ 0,01M a pH 7,2) e centrifugações (Centrífuga Sorvall SS4, 1000 rpm/10 minutos), alternadamente, por duas vezes consecutivas. As concentrações finais das suspensões de esporos foram de aproximadamente 10⁷ e 10⁶ esporos/ml para os isolados de *B. allii* e *B. squamosa*, respectivamente.

As suspensões de conídios antigênicos, preservadas em congelador, eram misturadas em volumes iguais com adjuvante completo ou incompleto de Freund (Difco), pouco antes das injeções. As aplicações foram feitas por via intramuscular na coxa, num volume de 1 ml/aplicação.

As sangrias (20 ml de sangue), através de secção da veia marginal da orelha, foram feitas duas vezes por semana, antes de cada injeção, a partir da 4.^a semana após o início da vacinação. Em cada coelho imunizado com *B. allii* fo-

ram feitas 19 sangrias, sendo que em cada coelho imunizado com *B. squamosa* foram feitas 9 sangrias, além daquela para obtenção do soro normal, feita antes da 1.^a injeção. Para obtenção do soro, o sangue coagulado a temperatura de 5^oC, por uma noite, foi centrifugado (6500 rpm/10 minutos). Ao soro, assim conseguido, adicionou-se merthiolate (etil-mercúrio-salicilato de sódio) a 1%, na proporção de 1/100 (v/v), e sua conservação foi feita em congelador (-12^oC).

Assim sendo, foram obtidos 4 anti-soros: anti *B. allii* preparado com adjuvante completo (AS al c), anti *B. allii* preparado com adjuvante incompleto (AS al i), anti *B. squamosa* preparado com adjuvante completo (AS sq c) e anti *B. squamosa* preparado com adjuvante incompleto (AS sq i).

3.5.2. Preparo de Antígenos

Antígenos para reações serológicas foram preparados através da maceração de esporos em almofariz, com adição de areia (malha 40, lavada com ácido clorídrico) e nitrogênio líquido. Os esporos foram previamente lavados e centrifugados, por duas vezes consecutivas, de forma semelhante ao preparo de antígenos para injeções.

Após a maceração, os conídios foram ressuspensos em salina tamponada, recompondo o volume inicial, corres-

pondendo a uma concentração de aproximadamente, 10^6 esporos/ml para os antígenos de *B. squamosa* e 10^8 esporos/ml para os antígenos de *B. allii* e *B. cinerea*. Para separar a areia e os esporos não macerados, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm/10 minutos. Ao antígeno, assim conseguido, adicionou-se merthiolate 1% na proporção de 1/100 (v/v) e a conservação foi feita em congelador.

Os antígenos foram preparados com os isolados P_1 e P_3 de *B. allii*; P_2 , I_2 e SC_{28} de *B. cinerea* e P_4 , P_5 , P_{13} , Pd_{27} , Pd_{33} , Pd_{37} e SC_{10} de *B. squamosa*.

Para a comparação serológica, os antígenos heterólogos foram diluídos de maneira a terem a mesma potência de reação, determinada pela titulação.

3.5.3. Testes Serológicos

Os testes serológicos foram feitos através da técnica de dupla difusão em gel de ágar de Ouchterlony, em lâminas. O meio gel foi preparado com: 1% de ágar (Ágar Difco); $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$ 0,01M a pH 7,2 e 0,01% de merthiolate. Essa metodologia utilizada se baseia nos trabalhos de GOODING Jr. e POWERS Jr. (1965), FIGUEIREDO (1972) e KIMATI (1975).

Os orifícios sobre o ágar foram abertos com um aparelho Furagar (LEITE e OLIVEIRA, 1975), com um diâmetro

aproximado de 0,25 cm. O esquema de distribuição dos orifícios foi um hexágono, inscrito num círculo de 1,25 cm de diâmetro.

Depois de abertos com auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios foram preenchidos duas vezes com antígeno ou anti-soro. A avaliação do teste serológico foi feita 24 horas após o preparo da reação, sendo que as lâminas permaneceram em câmara úmida (placa de Petri com chumaço de algodão embebido em água), durante esse período.

A titulação dos anti-soros e antígenos foi feita utilizando-se também a técnica de dupla difusão em ágar, através da diluição, em salina tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5).

3.6. Caracterização Patogênica

A caracterização patogênica dos isolados de *Botrytis* foi feita utilizando-se o método de inoculação de discos de folha (LESLEY CURRAH, National Vegetable Research Station, Warwick, Inglaterra, Comunicação Pessoal).

Discos de 15 mm de diâmetro foram retirados das folhas de cebola, com auxílio de um furador de rolha, e colocados em placas de Petri contendo dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada.

Como inóculo, foram utilizadas suspensões de esporos, com concentração de 10^6 esporos/ml, sendo os esporos previamente lavados com água destilada e centrifugados (10000 rpm/10 minutos), por duas vezes consecutivas. A cada 10 ml de suspensão foi adicionada uma gota de Tween 20.

Os discos de folha foram inoculados através da colocação de uma gota (volume de 1/80 ml) de suspensão de esporos sobre o lado ceroso. Como testemunha, discos de folha foram inoculados com água destilada e Tween 20 (1 gota/10 ml).

A seguir, as placas foram incubadas em condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III), com temperatura de 18°C no período escuro e 23°C no período luminoso, sendo o fotoperíodo de 14 horas.

A avaliação foi feita diariamente, através da contagem dos discos apresentando sintoma de mancha e crescimento micelial de *Botrytis*.

No Experimento 1 foram utilizadas folhas de cebola de *Allium cepa* L. cv. Pira Ouro e de *Allium fistulosum* L., colhidas em plantações na cidade de Piracicaba (SP). De cada folha foram retirados 4 discos e colocados na mesma placa de Petri, sendo que para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, totalizando 16 discos de folha por tratamento. Os isolados inoculados foram: P₁ (*B. allii*), SC₂₈ (*B.*

cinerea) e SC₁₀ (*B. squamosa*).

No Experimento 2 foram utilizadas folhas de *Allium cepa* L. cv. Baia Piracicaba (plantio de bulbilhos) e *Allium fistulosum* L., colhidas em plantações na cidade de Piedade (SP). De cada planta de *A. cepa*, com um mês de idade, foi coletada a 3.^a folha mais velha. De cada folha foi retirado um disco, a uma distância de aproximadamente 10 cm acima da inserção da folha. Para cada tratamento utilizou-se 3 repetições, sendo que cada repetição constou de uma placa de Petri com 6 discos de folha. Os isolados testados neste experimento foram: P₁ de *B. allii*; SC₂₈ de *B. cinerea*; P₅, P₉, P₁₃, Pd₂₇ e Pd₃₃ de *B. squamosa*.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização Morfológica

Através das características morfológicas dos 71 isolados obtidos, foi possível identificar três espécies de *Botrytis*: *B. allii*, *B. cinerea* e *B. squamosa* (Tabela 1).

A maioria dos isolados obtidos em folhas de cebola com queima das pontas pertence à espécie *B. squamosa*, sendo que em inflorescências com crestamento foi observada predominância da espécie *B. allii*. *B. cinerea* foi isolado tanto de folhas, quanto de inflorescências doentes. *B. squamosa* não foi isolado a partir de inflorescências com crestamento, nem *B. allii* em folhas com sintoma de queima das pontas (Tabela 1).

Os isolados de *B. allii* produziram um crescimento micelial ralo, de cor cinzenta circundada por uma estreij

Tabela 1 - Prevalência de espécies de *Botrytis* da cebola coletadas em várias localidades.

Referência	Local	Data	Variedade de Cebola	Órgão	Espécie
P ₁ [*]	Piracicaba (S.P.)	19/09/81	Pira Ouro	inflorescência	<u>B. allii</u>
I ₁	Itu (S.P.)	09/08/82	Baia Periforme	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₄	Piedade (S.P.)	13/09/82	Granex Yellow	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₅	Piedade (S.P.)	13/09/82	Granex Yellow	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₆	Piedade (S.P.)	13/09/82	Baia Periforme (Agroflora)	folha	<u>B. squamosa</u>
P ₂	Piracicaba (S.P.)	23/09/82	Pirana	inflorescência	<u>B. cinerea</u>
P ₃	Piracicaba (S.P.)	23/09/82	Pirana	inflorescência	<u>B. allii</u>
I ₂	Itu (S.P.)	16/06/83	Baia Periforme	folha	<u>B. cinerea</u>
SC ₂ até SC ₂₇	Ituporanga (S.C.)	15/08/83	Creola	folha	<u>B. squamosa</u>
SC ₂₈	Itajaí (S.C.)	15/08/83	Creola	folha	<u>B. cinerea</u>
Pd ₇ até Pd ₂₀	Piedade (S.P.)	27/09/83	Granex 33	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₂₁ até Pd ₂₇	Piedade (S.P.)	27/09/83	Baia Piracicaba	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₂₈ e Pd ₂₉	Piedade (S.P.)	27/09/83	Baia Periforme (Agroflora)	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₃₁ até Pd ₃₆	Piedade (S.P.)	11/10/83	Baia Periforme	folha	<u>B. squamosa</u>
Pd ₃₇	Piedade (S.P.)	11/10/83	Baia Periforme	folha	<u>B. squamosa</u>
P ₈ , P ₉ , P ₁₃	Piracicaba (S.P.)	10/11/83	Baia Piracicaba	folha	<u>B. squamosa</u>
P ₄ , P ₅ , P ₆	Piracicaba (S.P.)	10/11/83	Grupo Agregatum	haste da inflorescência	<u>B. squamosa</u>

Obs.: não foram obtidos isolados de *Botrytis* em folhas de *Allium fistulosum* apresentando sintoma de queima das pontas, em 15 tentativas.

* amostra composta de 25 isolados.

ta faixa branca. Os conidióforos e conídios surgiram em grande quantidade a partir do 3º dia de idade da colônia. Os escleródios apareceram nos bordos da placa de Petri e apresentaram menores dimensões do que os produzidos pelas outras duas espécies. Quando cultivados em meio de cebola e sujeitos a um fotoperíodo de 14 horas, responderam à alternância do período luminoso (fornecido por 3 lâmpadas fluorescentes e uma lâmpada próxima ao ultravioleta) e escuro, através da formação de círculos concêntricos.

As colônias dos isolados de *B. cinerea* apresentaram um crescimento micelial mais vigoroso do que *B. allii*, sendo inicialmente de cor branca e com o tempo tornaram-se cinzentas. Numerosos conidióforos e conídios apareceram no 4º ou 5º dia de idade da colônia. Com o envelhecimento da colônia, houve o surgimento de escleródios dispersos por toda a placa de Petri. Os isolados de *B. cinerea* não alteraram suas características de crescimento da colônia, quando sujeitos a um fotoperíodo de 14 horas (3 lâmpadas fluorescentes e uma lâmpada próxima ao ultravioleta) e meio de cultura de cebola.

Os isolados de *B. squamosa* apresentaram um vigoroso crescimento micelial, com coloração branca. Em meio de BDA, sob condições de luminosidade constante (lâmpadas fluorescentes, luz do dia, 40 watts) e temperatura de 18°C, os conídios raramente foram produzidos, sendo que com uma semana de idade surgiram escleródios, maiores do que os produzidos

pelas outras duas espécies, por toda a placa de Petri. Em meio de cebola, sob condições de temperatura de 18⁰C no período escuro e 23⁰C no período luminoso (3 lâmpadas fluorescentes e uma lâmpada próxima ao ultravioleta), e fotoperíodo de 14 horas, os isolados de *B. squamosa* cresceram formando círculos concêntricos, nos quais surgiram conidióforos e conídios, e posteriormente escleródios.

A distinção entre as espécies de *Botrytis* da cebola também pôde ser auxiliada pela comparação das médias e distribuições de frequências do comprimento e da largura dos esporos. Os esporos de *B. squamosa* apresentaram maiores dimensões do que os esporos de *B. allii* e *B. cinerea* (Tabelas 2 e 3).

4.2. Caracterização Serológica

4.2.1. Titulação do anti-soro e do antígeno

Os anti-soros preparados com o isolado P₁ de *B. allii* apresentaram um título mais alto e maior número de linhas de precipitação nas reações com o antígeno homólogo do que os anti-soros anti *B. squamosa*. Entretanto, os anti-soros preparados com adjuvante incompleto de Freund (Difco) produziram linhas de precipitação mais nítidas e apresentaram um título mais alto do que os anti-soros preparados com o adjuvante completo, para as duas espécies de *Botrytis* (Tabelas 4,5,6 e 7).

Tabela 2 - Média e distribuição da frequência dos comprimentos (μ) dos esporos dos isolados de *Botrytis*.

Isolados	Porcentagem de esporos com comprimento (μ) de																				Média	Variância	
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			28
<u>B. allii</u>																							
P1	10	30	40	16	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,82 ¹	0,95
P3	0	0	22	32	28	14	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,50 ¹	1,14
<u>B. cinerea</u>																							
P2	0	0	2	30	38	22	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,11 ¹	1,01
I2	3	13	38	25	17	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,52 ²	1,09
SC28	0	5	34	28	19	8	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,04 ²	1,32
<u>B. squamosa</u>																							
II	0	0	0	0	0	0	2	6	18	22	16	20	16	0	0	0	0	0	0	0	0	17,77 ¹	1,55
Pd5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	10	10	20	10	10	14	6	8	0	0	0	20,73 ¹	2,35
Pd6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	20	24	18	6	18	4	2	0	0	0	20,67 ¹	1,69
Pd7	0	0	0	0	0	0	0	6	8	18	18	22	12	12	0	2	0	2	0	0	0	18,50 ¹	2,00
Pd8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	8	8	26	28	8	10	4	4	0	0	0	20,71 ¹	1,87
Pd9	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	12	20	28	4	14	6	6	0	0	0	20,82 ¹	1,97
Pd12	0	0	0	0	0	0	0	6	4	14	18	26	14	4	6	8	0	0	0	0	0	18,89 ¹	2,01
Pd16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	16	20	38	10	3	2	1	0	0	0	0	19,44 ²	1,40
Pd18	0	0	0	0	0	0	0	2	0	8	12	18	26	14	6	6	2	2	2	0	0	20,04 ¹	2,24
Pd22	0	0	0	0	0	0	1	2	7	12	19	25	15	11	2	5	1	0	0	0	0	18,91 ²	1,88
Pd23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	14	14	16	12	6	6	4	2	2	21,39 ¹	2,65
Pd24	0	0	0	0	0	0	2	6	4	16	12	12	16	10	4	8	8	2	0	0	0	19,38 ¹	2,68
Pd25	0	0	0	0	0	0	0	2	6	22	14	20	26	6	2	0	0	2	0	0	0	18,75 ¹	1,75
Pd26	0	0	0	0	0	0	0	0	6	10	20	16	20	18	0	6	2	2	0	0	0	19,49 ¹	1,93
Pd29	0	0	0	0	0	0	0	2	10	30	22	14	16	4	0	0	2	0	0	0	0	18,17 ¹	1,16
SC10	0	0	0	0	0	1	1	1	12	14	18	18	14	3	9	7	1	1	0	0	0	18,89 ²	2,32
SC17	0	0	0	0	0	0	0	0	20	28	20	10	16	4	0	0	0	2	0	0	0	18,10 ¹	1,77
SC18	0	0	0	0	0	0	0	6	8	38	8	10	14	8	4	4	0	0	0	0	0	18,26 ¹	2,10
SC24	0	0	0	0	0	0	0	2	10	16	16	14	16	8	6	8	2	0	2	0	0	19,22 ¹	2,33

¹ Média de 50 repetições² Média de 100 repetições

Tabela 3 - Média e distribuição da frequência das larguras (μ) dos esporos dos isolados de *Botrytis*.

Isolados	Porcentagem de esporos com largura (μ) de																	Média	Variância
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
<u>B. allii</u>																			
P1	8	74	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,11 ¹	0,45
P3	2	34	58	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,71 ¹	0,51
<u>B. cinerea</u>																			
P2	0	0	6	84	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,14 ¹	0,40
I2	0	11	54	33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,33 ²	0,60
SC28	0	3	40	44	10	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,78 ²	0,77
<u>B. squarrosa</u>																			
IL	0	0	0	0	0	16	36	36	10	2	0	0	0	0	0	0	0	10,50 ¹	0,91
Pd5	0	0	0	0	0	8	32	24	28	4	4	0	0	0	0	0	0	11,01 ¹	1,19
Pd6	0	0	0	0	0	0	2	14	46	24	8	6	0	0	0	0	0	12,50 ¹	1,03
Pd7	0	0	0	0	0	0	6	16	26	20	16	14	2	0	0	0	0	12,70 ¹	1,51
Pd8	0	0	0	0	0	0	2	8	20	54	10	6	0	0	0	0	0	12,77 ¹	0,94
Pd9	0	0	0	0	0	0	0	12	14	20	30	18	4	2	0	0	0	13,41 ¹	1,38
Pd12	0	0	0	0	0	0	2	28	30	20	12	4	4	0	0	0	0	12,38 ¹	1,33
Pd16	0	0	0	0	0	0	5	27	44	17	7	0	0	0	0	0	0	12,01 ²	0,92
Pd18	0	0	0	0	0	0	4	8	30	28	20	10	0	0	0	0	0	12,83 ¹	1,19
Pd22	0	0	0	0	2	9	34	24	18	7	5	1	0	0	0	0	0	10,93 ²	0,34
Pd23	0	0	0	0	0	0	0	16	30	14	28	10	2	0	0	0	0	12,95 ¹	1,37
Pd24	0	0	0	0	0	0	6	28	18	10	8	4	0	0	0	0	0	11,37 ¹	1,53
Pd25	0	0	0	0	0	0	2	18	28	30	18	4	0	0	0	0	0	11,50 ¹	1,16
Pd26	0	0	0	0	0	0	6	18	34	16	12	10	4	0	0	0	0	12,64 ¹	1,44
Pd29	0	0	0	0	0	0	2	6	62	20	8	2	0	0	0	0	0	12,35 ¹	0,80
SC10	0	0	0	0	1	1	9	23	31	21	11	2	1	0	0	0	0	12,09 ²	1,58
SC17	0	0	0	0	0	0	6	44	34	8	6	2	0	0	0	0	0	11,73 ¹	0,99
SC18	0	0	0	0	0	0	30	26	30	4	2	0	0	0	0	0	0	10,95 ¹	1,07
SC24	0	0	0	0	0	0	18	38	34	10	0	0	0	0	0	0	0	11,43 ¹	0,91

¹ Média de 50 repetições

² Média de 100 repetições

Tabela 4 - Reação de titulação dos anti-soros anti *B. allii* preparados com adjuvante incompleto (AS a1 i) diluídos em salina tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5), com o antígeno homólogo P₁ (do isolado P₁ de *B. allii*).

ANTI-SORO	NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO NAS DILUIÇÕES DO ANTI-SORO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Soro Normal	0	0	0	0	0	0
1	3	2	2	2	1	0
2	3	2	2	1	0	0
3	3	3	3	1	0	0
4	3	3	3	2	1	0
5	3	3	3	2	1	0
6	3	3	3	2	1	0
7	3	3	3	3	2	0
8	3	3	3	2	1	0
9	3	3	1	0	0	0
10	3	3	2	2	2	0
11	4	3	2	2	1	0
12	4	3	2	2	1	0
13	3	2	1	1	0	0
14	3	3	2	1	1	0
15	3	3	1	1	0	0
16	3	3	3	2	1	0
17	3	3	2	2	1	0
18	3	3	3	2	0	0
19	3	3	3	3	1	0

Tabela 5 - Reação de titulação dos anti-soros anti *B. allii* preparados com adjuvante completo (AS al c) diluídos em salina tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5), com o antígeno homólogo P₁ (do isolado P₁ de *B. allii*).

ANTI-SORO	NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO NAS DILUIÇÕES DO ANTI-SORO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Soro Normal	0	0	0	0	0	0
1	2	1	1	0	0	0
2	2	1	1	0	0	0
3	2	1	1	0	0	0
4	3	1	0	0	0	0
5	3	3	2	1	0	0
6	3	3	2	1	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	3	3	3	1	0	0
9	3	3	3	3	0	0
10	3	3	3	2	0	0
11	3	2	2	1	0	0
12	3	3	2	1	0	0
13	3	3	2	2	1	0
14	3	3	3	2	0	0
15	4	4	3	1	0	0
16	4	4	3	1	0	0
17	4	4	3	1	0	0
18	4	4	3	1	0	0
19	3	3	2	0	0	0

Tabela 6 - Reação de titulação dos anti-soros anti *B. squamosa* preparados com adjuvante incompleto (AS sq i) diluídos em salina tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5), com o antígeno homólogo SC₁₀ (do isolado SC₁₀ de *B. squamosa*).

ANTI-SORO	NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO NAS DILUIÇÕES DO ANTI-SORO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Soro Normal	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0
8	1	1	1	0	0	0
9	1	1	1	0	0	0

Tabela 7 - Reação de titulação dos anti-soros anti *B. squamosa* preparados com adjuvante completo (AS sq c) diluídos em salina tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5), com o antígeno homólogo SC₁₀ (do isolado SC₁₀ de *B. squamosa*).

ANTI-SORO	NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO NAS DILUIÇÕES DO ANTI-SORO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Soro Normal	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0
8	1	1	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0

Todos os anti-soros reagiram com os antígenos homólogos a partir da 1.^a sangria (4 semanas após o início das injeções).

A titulação dos antígenos com anti-soros homólogos ou heterólogos está apresentada na Tabela 8.

4.2.2. Comparação serológica das espécies de *Botrytis*

A reação serológica entre os antígenos de diferentes isolados de *B. squamosa* e o anti-soro anti *B. squamosa* é apresentada na Figura 1. O resultado mostra que estes isolados não diferiram, sob o ponto de vista serológico.

A comparação serológica de isolados de *B. allii*, *B. cinerea* e *B. squamosa*, utilizando-se o anti-soro anti *B. allii* e anti *B. squamosa*, está apresentada nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Nota-se claramente que com o anti-soro anti *B. allii* foram evidenciados pelo menos 3 antígenos específicos dessa espécie; com o anti-soro anti *B. squamosa*, além dos antígenos comuns às 3 espécies, evidenciou-se a ocorrência de pelo menos 1 antígeno específico.

4.3. Caracterização Patogênica

Os dois experimentos realizados para a caracterização patogênica das espécies de *Botrytis* apresentaram re-

Tabela 8 - Reação de titulação dos antígenos diluídos em sãli na tamponada, por fatores de 2 (2^{-n} , n variando de 1 a 5).

Antígeno dos Isolados ¹	Anti-soro ² usado na titulação	Número de Linhas de Precipitação nas Diluições do Antígeno					
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>B. allii</i>							
P ₁	ASa1 i	3	3	1	1	1	0
P ₁	ASa1 c	3	3	3	2	1	0
P ₁	ASsq i	1	1	1	0	0	0
P ₃	ASa1 i	3	3	1	1	1	1
P ₃	ASa1 c	3	3	3	2	1	1
P ₃	ASsq i	1	1	1	0	0	0
<i>B. cinerea</i>							
I ₂	ASsq i	1	1	1	0	0	0
SC ₂₈	ASsq i	2	2	2	1	1	1
<i>B. squamosa</i>							
P ₄	ASsq i	1	0	0	0	0	0
P ₄	ASsq c	1	0	0	0	0	0
P ₅	ASsq i	1	0	0	0	0	0
P ₅	ASsq c	1	0	0	0	0	0
P ₁₃	ASsq i	1	0	0	0	0	0
P ₁₃	ASsq c	1	0	0	0	0	0
Pd ₂₇	ASsq i	3	2	1	0	0	0
Pd ₂₇	ASsq c	1	1	1	1	0	0
Pd ₃₃	ASsq i	3	3	2	2	0	0
Pd ₃₃	ASsq c	3	1	1	1	0	0
Pd ₃₇	ASsq i	3	3	2	0	0	0
Pd ₃₇	ASsq c	3	1	1	1	0	0
SC ₁₀	ASsq i	1	1	1	1	0	0
SC ₁₀	ASsq c	1	0	0	0	0	0

¹ Vide identificação na Tabela 1.

² ASa1 = anti-soro anti *B. allii* (19ª sangria) preparado com adjuvante incompleto (i) ou completo (c); ASsq = anti-soro anti *B. squamosa* (9ª sangria) preparado com adjuvante incompleto (i) ou completo (c).

Figura 1 - Reação do anti-soro X (ASsq i = anti-soro anti *B. squamosa* preparado com adjuvante incompleto) com os antígenos dos isolados de *B. squamosa*, diluídos em salina tamponada: P₄ (não diluído), Pd₂₇ (1:4), Pd₃₇ (1:4), Pd₃₃ (1:8), P₁₃ (não diluído) e SC₁₀ (1:2).

Figura 2 - Reação do anti-soro X (ASal c = anti-soro anti *B. allii* preparado com adjuvante completo) com os antígenos, diluídos em salina tamponada: P₃ (1:4) e P₁ (1:4), isolados de *B. allii*; I₂ (1:4) e SC₂₈ (1:8), isolados de *B. cinerea*; Pd₃₃ (1:4) e SC₁₀ (1:2), isolados de *B. squamosa*.

Figura 3 - Reação do anti-soro X (ASsq i = anti-soro anti *B. squamosa* preparado com adjuvante incompleto) com os antígenos, diluídos em salina tamponada: P₃ (1:4) e P₁ (1:4), isolados de *B. alli*; I₂ (1:4) e SC₂₈ (1:8), isolados de *B. cinerea*; Pd₃₃ (1:4) e SC₁₀ (1:2), isolados de *B. squamosa*.

sultados semelhantes, como mostram as Tabelas 9 e 10.

Os isolados de *B. squamosa* foram patogênicos às duas espécies de cebola. O isolado de *B. cinerea* causou doença somente em *Allium cepa*, sendo que no cultivar Pira Ouro os sintomas surgiram no primeiro dia de incubação, ao passo que no cultivar Baia Piracicaba, a partir do quarto dia. O isolado de *B. allii* não foi patogênico às duas espécies de cebola testadas.

Tabela 9 - Teste de patogenicidade de *Botrytis* spp. em *Allium* spp. pelo método de inoculação de discos foliares (Experimento 1).

<i>Botrytis</i>		Sintomas ¹ em	
Espécie	Isolado	<i>A. cepa</i> ²	<i>A. fistulosum</i>
<i>B. allii</i>	P ₁	-	-
<i>B. cinerea</i>	SC ₂₈	+	-
<i>B. squamosa</i>	SC ₁₀	+	+
Testemunha		-	-

¹ Sem sintomas (-); com sintomas em 50% dos discos, a partir do primeiro dia (+).

² *Allium cepa* L. cv. Pira Ouro.

Tabela 10 - Teste de patogenicidade de *Botrytis* spp. em *Allium* spp. pelo método de inoculação de discos foliares (Experimento 2).

<i>Botrytis</i>		Sintomas ¹ em	
Espécie	Isolado	<i>A. cepa</i> ²	<i>A. fistulosum</i>
<i>B. allii</i>	P ₁	-	-
<i>B. cinerea</i>	SC ₂₈	+	-
<i>B. squamosa</i>	P ₅	++	++
	P ₉	++	++
	P ₁₃	++	++
	Pd ₂₇	++	++
	Pd ₃₃	++	++
Testemunha		-	-

¹ Sem sintomas (-); com sintomas em 50% dos discos, a partir do primeiro dia (++) ou do quarto dia (+).

² *Allium cepa* L. cv. Baía Piracicaba.

5. DISCUSSÃO

Os relatos nacionais sobre fungos do gênero *Botrytis* causando doenças em cebola não citam as espécies envolvidas (CAMPACCI, 1961; LUZ, 1961; KIMATI, 1980; SATURNINO e CRUZ, 1980), sendo que quando o fazem não apresentam um levantamento das espécies e as respectivas frequências de ocorrência. O presente trabalho mostra claramente que quando se trata de Queima das Pontas o agente causal é com predominância *B. squamosa*, e Crestamento de Inflorescências é *B. allii*. DESLANDES (1944) se referiu a *B. allii* e *B. squamosa* como causadores de Bolor Cinzento ou Podridão do Pescoço, entretanto, não apresentou dados que possam ser analisados.

Não são *B. allii* e *B. squamosa*, mas também *B. cinerea*, constatadas no presente trabalho causando Queima das Pontas e Crestamento de Inflorescências em cebola, não dife-

rem das espécies relatadas por YARWOOD (1938), HICKMAN e ASHWORTH (1943), PAGE (1953), SEGALL e NEWHALL (1960), HANCOCK e LORBEER (1963) e ELLERBROCK e LORBEER (1977). Entretanto, nenhum dos isolados pôde ser identificado como *B. byssoidea*, que segundo WALKER (1925 e 1926) é uma das espécies que também pode estar envolvida.

O fato de não terem sido obtidos isolados de *B. byssoidea* pode ser devido a associação dessa espécie com Podridão de Pescoço e neste trabalho não foi feito o levantamento dessa doença. Mesmo levando-se em conta a literatura mundial, essa espécie foi poucas vezes relatada. Além do relato inicial de WALKER (1925), HANCOCK e LORBEER (1963) afirmaram que *B. byssoidea* foi isolado muito raramente e somente em campos de cebola com severa intensidade de Queima das Pontas. Entretanto, a referência a *B. byssoidea* nesse trabalho se restringiu simplesmente ao relato da rara obtenção de isolados dessa espécie, sem sequer discutir esse resultado ou testar a sua patogenicidade. Fato semelhante ocorreu no trabalho de ELLERBROCK e LORBEER (1977), visto que no levantamento de espécies de *Botrytis* associadas ao Crestamento de Inflorescências de cebola, os autores obtiveram uma frequência de ocorrência de *B. byssoidea* muito baixa, isto é, somente 2,9% de um total de 136 isolados; além disso, esses isolados quando testados patogenicamente não diferiram da testemunha.

A caracterização morfológica das espécies de

Botrytis obtidas estão de acordo com as descrições feitas por WALKER (1925 e 1926), HANCOCK e LORBEER (1963) e MORGAN (1971). As características das colônias e as dimensões dos esporos dos isolados estão dentro dos limites de cada espécie apresentados por esses autores. Contudo, apesar de ser possível identificar as três espécies de *Botrytis*, as características morfológicas não constituem um critério rigoroso para diferenciá-las, devido a grande variabilidade existente dentro das espécies, já demonstrada por BERGQUIST e LORBEER (1973); a possibilidade de ocorrência de heterocárions (HANSEN e SMITH, 1932); além da semelhança entre as características da colônia e dimensões de esporos, especialmente de *B. allii* e *B. cinerea*.

A distinção morfológica das espécies de *Botrytis* foi complementada pelos testes serológicos. A serologia é uma delicada ferramenta com alta especificidade, determinada pela natureza química do antígeno (SHATTOCK, 1955). A diferença antigênica dos isolados das três espécies foi evidenciada principalmente nos testes com o anti-soro desenvolvido para P₁, isolado de *B. allii*. Essa diferença também foi observada nas reações com o anti-soro anti *B. squamosa* que, todavia, apresentou uma menor especificidade do que o anti-soro anti *B. allii*, visto que foram observadas linhas de precipitação na reação com os antígenos heterólogos. Entretanto, a reação do anti-soro anti *B. squamosa* e o antígeno homólogo apre-

sentou uma linha de precipitação mais nítida do que a reação com os antígenos heterólogos.

FIGUEIREDO (1972), conseguindo melhor resultado do que MADHOSINGH e WALLEN (1967) quanto a especificidade de anti-soros de *Ascochyta phaseolorum*, atribui o fato ao tipo de antígeno imunizante: conídios, em seu caso, e micélio no dos outros. Assim sendo, o bom resultado obtido no presente trabalho também pode estar relacionado com o tipo de antígeno imunizante utilizado. Essa poderia também ser uma explicação para a dificuldade encontrada por OLIVIER (1979) em obter um anti-soro com atividade suficiente para diferenciar *B. cinerea*, *B. fabae*, *B. tulipae* e *B. allii*, visto que esse autor utilizou um antígeno imunizante preparado com micélio.

Os resultados dos testes de patogenicidade, mostrando que os isolados de *B. squamosa* são mais patogênicos às folhas de cebola do que as outras duas espécies de *Botrytis*, concordam com os de HANCOCK e LORBEER (1963). Este resultado evidencia a importância de *B. squamosa* para a Queima das Pontas da cebola, visto que, além de apresentar a maior frequência de ocorrência, comportou-se como a espécie mais patogênica.

O fato do isolado de *B. cinerea* (SC₂₈) ter causado sintomas somente em *Allium cepa*, nos dois experimentos, evidencia um maior grau de resistência em *A. fistulosum*. Este resultado está de acordo com o obtido por CURRAH (1982). De fa

to, não foram obtidos, no presente trabalho, isolados de *Botrytis* em folhas de *A. fistulosum* apresentando sintoma de queima das pontas. O maior período de tempo necessário para surgirem os sintomas causados por *B. cinerea* no cultivar Baia Piracicaba talvez seja devido a um maior nível de resistência deste cultivar do que o apresentado por Pira Ouro. Entretanto, como as folhas de cebola foram coletadas em campos distintos, outros fatores podem ter influído.

De especial interesse para o controle da Queima das Pontas da cebola é a obtenção das respostas dos diferentes cultivares a *B. squamosa*, visto ser a espécie de *Botrytis* de maior frequência de ocorrência e patogenicidade, como mostram os resultados do presente trabalho. Para atingir esse objetivo convém lembrar que *Botrytis* spp. é um parasita necrotrófico, e como tal, pouco especializado (McNEW, 1960), tendo-se necessidade, portanto, de se pesquisar a resistência quantitativa. Essa, especialmente, depende, para sua manifestação, do controle de certos fatores ambientes, como temperatura, umidade e concentração de inóculo (WALKER, 1965). Ênfase deverá ser dada no efeito da concentração de inóculo do agente patogênico, visto que há indicações de que espécies de *Botrytis* podem ser diferenciadas pelo limiar numérico de infecção (HANCOCK e LORBEER, 1963).

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1 - As espécies de *Botrytis* mais constantemente associadas à Queima das Pontas e Crestamento de Inflorescências da cebola foram, respectivamente, *B. squamosa* e *B. allii*. *B. cinerea* apareceu, com pequena frequência, associada a ambos os sintomas.

2 - *B. allii*, *B. cinerea* e *B. squamosa* podem ser distinguidas morfológicamente e serologicamente.

3 - *B. squamosa* foi a espécie mais patogênica em teste de inoculação de disco de folha.

7. LITERATURA CITADA

AQUINO, Maria de L.N. de e L.J. da G. WANDERLEY. 1966. O "Mal de Sete Voltas" nos cebolais do São Francisco. Boletim Técnico nº 16. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio. Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco, 42p.

AMOS, R.E. e R.G. BURRELL. 1967. Serological differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology*. St. Paul, 57:32-34.

BAJUNGU, H.E. 1979. Caracterização patogênica, serológica e fisiológica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.(sensu ARX, 1957) f. sp. *cepae* n.c. Piracicaba, ESALQ/USP, 35p. (Dissertação de Mestrado).

BARNETT, H.L. e B.B. HUNTER. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a. edição. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 241p.

- BERGQUIST, R.R., R.K. HORST e J.W. LORBEER. 1972. Influence of Polychromatic light, carbohydrate source, and pH on conidiation of *Botryotinia squamosa*. *Phytopathology*. St. Paul, 62:889-895.
- BERGQUIST, R.R. e J.W. LORBEER. 1973. Genetics of variation in *Botryotinia squamosa*. *Mycologia*. New York, 65:36-47.
- CAMPACCI, C.A. 1961. Doenças das plantas hortícolas. *Olericultura*. Viçosa, 1:68-79.
- CAMPACCI, C.A. 1962. "Cachorro Quente" da cebola. *O Biológico*. São Paulo, 28:51-55.
- CARDOSO, Rosa M.G. 1976. Diferenciação serológica entre espécies de *Ceratocystis*. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP, 49p. (Tese de Doutorado).
- CAMARGO Fº, W.P. 1983. Produção e comercialização de cebola (*Allium cepa*, L.) no Brasil. Piracicaba, ESALQ/USP, 84p. (Dissertação de Mestrado).
- CHAVES, G.M. e H.T. ERICKSON. 1960. *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, J.C. Walker e Larson, um novo fungo da cebola (*Allium cepa* L.) em Minas Gerais. *Revista Ceres*. Viçosa, 11:112-114.
- COSTA, A.S., E.W. KITAJIMA e H. NAGAI. 1966. Ocorrência do Mosaico em faixas na cebola no Brasil. *Revista de Olericultura*. Campinas, 6:67-74.

CURRAH, Lesley. 1982. A leaf segment test for resistance in onions to *Botrytis squamosa* and *B. allii*. *Seventh Botrytis Symposium*. Aberdeen.

DESLANDES, J.A. 1944. Doenças da cebola. Publicação nº 19. Serviço de Informação Agrícola. Ministério da Agricultura. 49p.

ELLERBROCK, L.A. e J.W. LORBEER. 1977. Etiology and control of onion flower blight. *Phytopathology*. St. Paul, 67:155-159.

FIGUEIREDO, M.B. 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*. São Paulo, 33:9-13.

FIGUEIREDO, M.B. 1972. Estudos fisiológicos e serológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc, e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 130p. (Tese de Doutorado).

FIGUEIREDO, M.B. e Cybelle P.V. PIMENTEL. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 1:299-302.

GOODING Jr., G.V. e H.R. POWERS Jr. 1965. Serological comparison of *Cronartium fusiforme*, *C. quercuum*, and *C. ribicola* by immunodiffusion tests. *Phytopathology*. St. Paul, 55:670-674.

- HANCOCK, J.G. e J.W. LORBEER. 1963. Pathogenesis of *Botrytis cinerea*, *B. squamosa*, and *B. allii* on onion leaves. *Phytopathology*. St. Paul, 53:669-673.
- HANSEN, H.N. e R.E. SMITH. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. St. Paul, 22:953-964.
- HICKMAN, C.J. e D. ASHWORTH. 1943. The occurrence of *Botrytis* spp on onion leaves with special reference to *B. squamosa*. *Transactions British Mycological Society*. London, 26:153-157.
- JARVIS, W.R. 1980. Taxonomy. In: COLEY-SMITH, J.R., K. VERHOEFF e W.R. JARVIS, Ed. *The Biology of Botrytis*. London - New York - Toronto - Sydney - San Francisco, Academic Press, p.1-18.
- KIMATI, H. 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (*Sensu* Arx, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 103p. (Tese de Livre-docência).
- KIMATI, H. 1980. Doenças do alho e da cebola (*Allium sativum* L. e *Allium cepa* L.). In GALLI, F., Coord., *Manual de Fito-patologia. Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. vol. 2, cap. 5, p.49-64.
- KOGUISHI, C.; K. NAGUMO, K. MATSUOKA e G.M. CHAVES. 1971. Patogenicidade de *Pyrenochaeta terrestris* em cebola (*Allium cepa* L.). *Seiva*. Viçosa, 31(72):58-73.

- KRITZMAN, G. e D. NETZER. 1978. A selective medium for isolation and identification of *Botrytis* spp from soil and onion seed. *Phytoparasitica*. Bel Dagan, 6(1):3-7.
- LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA. 1975. Furagar. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 1:143-146.
- LIMA, A.C., F.A.A. COUTO e G.M. CHAVES. 1962. Ensaios comparativos da eficiência de fungicidas, associados a espalhantes adesivos no controle ã Mancha Púrpura da cebola. *Olericultura*. Viçosa, 2:168-175.
- LUZ, N.K. 1961. Controle de *Peronospora destructor* e *Botrytis* sp. em cebola. *Olericultura*. Viçosa, 1:89-96.
- MADHOSINGH, C. 1964 a. A serological comparison of three *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany*. Ottawa, 42:1143-1146.
- MADHOSINGH, C. 1964b. A serological comparison of isolates of *Fomes roseus* and *Fomes subroseus*. *Canadian Journal of Botany*. Ottawa, 42:1677-1683.
- MADHOSINGH, C. e V.R. WALLEN. 1967. Serological differentiation of the *Ascochyta* species on peas. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, 14:449-451.
- McNEW, G.L. 1960. The nature, origin, and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G. e A.E. DIMOND, Ed. *Plant Pathology*. New York - London, Academic Press, Vol. 2, p. 22-66.

- MERZ, W.G., R.G. BURRELL e M.E. GALLEGLY. 1969. A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology*. St. Paul, 59:367-370.
- MORGAN, D.J. 1971. Numerical taxonomic studies of the genus *Botrytis*. *Transactions British Mycological Society*. London, 56(3):327-335.
- NETZER, D. e Irene DISHON. 1967. Selective media to distinguish between two *Botrytis* species on onion. *Phytopathology*. St. Paul, 57:795-796.
- NODA, H. 1981. Reação da cebola (*Allium cepa*, L.) ao *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker e Larson. Piracicaba, ESALQ/USP, 161p. (Tese de Doutorado).
- OLIVIER, J.M. 1979. Étude sérologique de quelques *Botrytis*. *Phytopathologische Zeitschrift*. Berlin, 95:65-76.
- OWEN, J.H., J.C. WALKER e M.A. STAHMANN. 1950. Variability in onion neck-rot fungi. *Phytopathology*. St. Paul, 40:749-768.
- PAGE, O.T. 1953. *Botrytis* spot of onion leaves in Ontario. *Plant Disease Reporter*. Washington, 37:513-514.
- ROBBS, C.F.; R.L.D. RIBEIRO; F. AKIBA e O. KIMURA. 1972. Novos estudos sobre o "Mal de Sete Voltas" da cebola (*Allium cepa* L.) no Vale do São Francisco. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*. Fortaleza, 5:77-85.

- SATURNINO, Heloísa M. e J. da CRUZ F. 1980. Doenças da cebola. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, 6:47-59.
- SEELIGER, H.P.R. 1968. Serology as an aid to taxonomy. In AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, eds. *The fungi an advanced treatise*, 3, The Fungal Population. New York, Academic Press, cap. 23, p.597 - 624.
- SEGALL, R.H. e A.G. NEWHALL. 1960. Onion blast or leaf spotting caused by species of *Botrytis*. *Phytopathology*. St. Paul, 50:76-82.
- SHATTOCK, P.M.F. 1955. The use of serology in the classification of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*. London, 12:367-374.
- SHERWOOD, R.T. 1957. Physiologic races of the red clover leaf rust fungus. *Phytopathology*. St. Paul, 47:495-498.
- SILVA, N. 1976. Resistência em cebola (*Allium cepa* L.) à *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (*Sensu* Arx, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 67p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVEIRA, A.P. da; B.P.B. CRUZ; H.R. de CAMPOS e Salima G. P. da SILVEIRA. 1971. Resistência de variedades de cebola (*Allium cepa* L.) à queima das folhas (*Alternaria porri* (Ell) Cif). *O Biológico*. São Paulo, 37(6).141-144.

- STALLKNECHT, G.F. e J. GARRISON. 1982. The effects of *Botrytis allii* infection of the seed stock (scape) of yellow sweet spanish onion on seed yield and weight, germination, and seedling vigor. *Phytopathology*. St. Paul, 72:998.
- TERANISHI, J., M.B. FIGUEIREDO, Rosa M.G. CARDOSO e T. NAMEKATA. 1973. The value of serological techniques for the differentiation between *Verticillium albo-atrum* Reink. & Berth. and *V. dahliae* Kleb. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, 40:45-51.
- TUITE, J. 1969. *Plant pathological methods. Fungi and Bacteria*. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 239p.
- WALKER, J.C. 1925. Two undescribed species of *Botrytis* associated with the neck rot diseases of onion bulbs. *Phytopathology*. St. Paul, 15:708-713.
- WALKER, J.C. 1926. *Botrytis* neck rots of onions. *Journal of Agricultural Research*. Washington, 33:893-928.
- WALKER, J.C. 1965. Use of environmental factors in screening for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto, 3:197-208.
- WARD, C.H. 1959. The detached-leaf technique for testing alfalfa clones for resistance to black stem. *Phytopathology*. St. Paul, 49:690-696.

- WYLLIE, T.D. e J.E. DEVAY. 1970. Immunological comparison of isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. nigrescens* pathogenic to cotton. *Phytopathology*. St. Paul, 60:1682-1686.
- YARWOOD, C.E. 1938. *Botrytis* infection of onion leaves and seed stalks. *Plant Disease Reporter*. Washington, 22:428-429.