

ADAPTABILIDADE DE LINHAGENS DE *Botrytis squamosa* RESISTENTES A FUNGICIDAS DO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS E DICARBOXIMIDAS¹

R. GHINI² & H. KIMATI³

¹ Parte do trabalho de tese do primeiro autor, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Depto de Fitopatologia, ESALQ/USP.

² EMBRAPA/CNPDA, Caixa Postal 69, 13820 - Jaguariúna - SP. Bolsista do CNPq.

³ Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP, Caixa Postal 9, 13400 - Piracicaba - SP.

Aceito para publicação em: 20/08/1990.

RESUMO

A adaptabilidade de linhagens resistentes a benomyl, iprodione, duplo-resistentes e sensíveis de *Botrytis squamosa*, causador da Queima das Pontas da cebola, foi estudada através do crescimento micelial, produção de conídios, patogenicidade e competição *in vitro* e *in vivo*. 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.

As resistências a benomyl e a benomyl + iprodione mostraram-se estáveis, visto que permaneceram inalteradas após cinco gerações de transferências monospóricas na ausência dos fungicidas.

Isolados tanto sensíveis quanto resistentes aos fungicidas benomyl e iprodione se anastomosaram livremente, exceto o isolado Pd 64, 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 apresentaram até 20 núcleos/conídio.

Palavras-chaves: *Botrytis squamosa*, resistência, benomyl, iprodione.

ABSTRACT

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

The adaptability of *Botrytis squamosa* strains, causing agent of onion blast, resistant and sensitive to benomyl, iprodione, benomyl + iprodione was studied through mycelial growth, conidial production, pathogenicity and *in vitro* and *in vivo* competition. Benomyl-resistant strains can be as adapted as the sensitive ones, whereas those resistant to iprodione were less adapted.

The resistance to benomyl and benomyl + iprodione are stable, since they were unaltered after five monosporic transfersences in absence of fungicides.

Except for the isolate Pd 64, a benomyl resistant strain, all the other, sensitive and resistant to benomyl and iprodione anastomosed freely between themselves. Number of nuclei/conidium was determined for two strains (one sensitive and one resistant). There were no differences between themselves as both of them showed up to 20 nuclei/conidium.

Key words: *Botrytis squamosa*, resistant, benomyl, iprodione.

INTRODUÇÃO

O surgimento de linhagens de fungos resistentes a fungicidas, inicialmente eficientes, tem se tornado um sério problema para o controle químico de diversos patógenos. Segundo DELP (1980), até 1970, devido à predominância de fungicidas convencionais ou inespecíficos, os casos de resistência relatados em condições de campo limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos, ao passo que, em 1988, com o intensivo e extensivo uso de fungicidas sistêmicos, esse número era de, aproximadamente, 64 gêneros (DELP, 1988).

O grupo dos benzimidazóis é particularmente vulnerável desde que várias espécies de fungos desenvolveram resistência a estes fungicidas, causando sérios prejuízos (DEKKER, 1976). A adaptabilidade das linhagens resistentes a benzimidazóis parece variar largamente, mas a maioria dos relatos indica que a resistência não está ligada a uma redução da adaptabilidade e se mantém estável em vários patógenos, por longos períodos, mesmo na ausência do fungicida (JORDAN & RICHMOND, 1974; DOVAS et al., 1976; MILLER & JEVES, 1979; RUPPEL et al., 1980; SHUEPP & KUNG, 1981 e DAVIDSE, 1982).

Por outro lado, segundo BEEVER & BYRDE (1982), linhagens resistentes a dicarboximidazóis têm sido obtidas, tanto em condições de campo quanto de laboratório, todavia, são poucos os exemplos de falha no controle de doenças devido à resistência de patógenos a estes fungicidas. Um dos motivos parece estar relacionado com a reduzida adaptabilidade dos mutantes resistentes (LE-ROUX et al., 1977; DAVIS & DENNIS, 1981a; HISADA et al., 1981; KATAN, 1982; POMMER & LORENZ, 1982; BEEVER & BRIEN, 1983).

Fungicidas pertencentes ao grupo dos benzimidazóis e dos dicarboximidazóis têm sido utilizados para o controle de *Botrytis squamosa*, causador da Queima das Pontas da

cebola. Entretanto, alta frequência, de isolados resistentes a benomyl foi observada por GHINI & KIMATI (1989), sendo que todos apresentaram-se sensíveis a iprodione, isto é, a maioria dos isolados apresentava crescimento micelial em meio de cultura de BDA contendo 1000 ppm de benomyl. Entretanto, foram inibidos por 10 ppm de iprodione incorporado ao meio de cultura. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo estudar a adaptabilidade de linhagens de *B. squamosa* resistentes a benomyl, iprodione e duplo-resistentes, através do crescimento micelial, esporulação, patogenicidade, competição *in vitro* e *in vivo* e a estabilidade da resistência a benomyl e a benomyl + iprodione, sendo também observada a ocorrência de anastomose *in vitro* e o número de núcleos por conídio.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Origem dos isolados

Os isolados de *B. squamosa* foram obtidos a partir de folhas de cebola, com sintoma de queima das pontas, 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. Após 24 horas de incubação, os conidióforos e conídios de *B. squamosa* foram transferidos para o meio de cultura de cebolinha (folhas de *Allium fistulosum* L-100 g; ágar-20 g; água destilada -q.s.p. 1000 ml). Dessa forma, foram obtidos: o isolado P4, sensível a benomyl e iprodione (crescimento micelial inibido por 1 ppm de benomyl ou 10 ppm de iprodione, incorporados em meio de cultura de BDA), e os isolados Pd27, Pd44, Pd46, Pd64, Pd65 e Pd67, resistentes a benomyl e sensíveis a iprodione (apresentando crescimento micelial até 1000 ppm de benomyl e inibidos por 10 ppm de iprodione, incorporados em meio de cultura de BDA).

A linhagem P4BSIR, sensível a benomyl e resistente a iprodione, foi obtida a partir de semeadura densa de conídios de P4 em meio de cultura contendo 500 ppm de iprodione.

As linhagens com dupla-resistência (IUV1 e IUV2) foram obtidas a partir de Pd44, através de irradiação ultravioleta e transferências sucessivas em meios de cultura com gradiente de iprodione até a concentração de 1000 ppm.

2. Crescimento micelial

Discos de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio das linhagens P4, Pd27, Pd67, P4BSIR e IUV1 foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, em 4 repetições, e incubados a 20°C, no escuro. A avaliação foi feita através de medição diária do diâmetro médio das culturas.

3. Esporulação

Discos de meio de cultura (diâmetro de 0,7 cm) contendo micélio das linhagens P4, Pd27, Pd67, P4BSIR e IUV1 foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura de cebolinha, em 4 repetições, e incubados em câmara de crescimento com temperaturas 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 a avaliação através da contagem, em hemocítmetro, dos conídios produzidos por placa de Petri.

4. Patogenicidade

A patogenicidade das linhagens P4, Pd27, Pd67, P4BSIR e IUV1 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 4 repetições, totalizando 16 discos por isolado. A inoculação foi feita ferindo-se o lado externo do disco de 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.

5. Competição *in vitro*

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

Para tanto, foram preparadas suspensões de conídios da linhagem P4, Pd27 e Pd67, 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 câmara de crescimento, em condições semelhantes as utilizadas no teste de esporulação.

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 a eliminação de uma das linhagens.

Para avaliar a proporção de conídios resistentes e sensíveis a benomyl, a cada transferência foram feitas repicagens monospóricas e a seguir foi testado, de forma qualitativa, o crescimento dessas linhagens em meio de BDA contendo 500 ppm de benomyl.

6. 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, sendo que 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 Baía Periforme foram semeadas em vasos plásticos,

com capacidade de 300 ml, contendo solo esterilizado. 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 de linhagem sensível e 50% da resistente a benomyl.

No primeiro experimento foram feitas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída 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 constitui-se por um vaso com, aproximadamente, 25 plântulas inoculadas com 3 ml de suspensão de conídios.

Como testemunha, plântulas foram pulverizadas de forma semelhante aos demais tratamentos, com água destilada. Para confirmar a viabilidade dos conídios, as linhagens foram inoculadas separadamente.

A incubação foi realizada em câmara de crescimento, nas condições utilizadas para o teste de esporulação. 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, 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 foram feitas repicagens monospóricas e testadas, qualitativamente, quanto ao crescimento em meio de cultura de BDA contendo 500 ppm de benomyl.

7. Estabilidade de resistência a benomyl

A estabilidade da resistência a benomyl

foi avaliada através de sucessivas transferências monospóricas *in vitro* do isolado Pd44, durante cinco gerações na ausência do fungicida.

Cada geração monospórica 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 mantidas no escuro a 20°C, sendo a avaliação feita após 48 horas, através da medição do diâmetro médio das culturas.

8. 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 IUVI, durante cinco gerações na ausência do fungicida.

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 mantidas no escuro, a 20°C, sendo a avaliação realizada após 3 dias, através da medição do diâmetro médio das culturas.

9. Anastomose de hifas

A formação de anastomose entre hifas dos isolados de *B. 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 (0,7 cm de diâmetro) contendo micélio, nas extremidades de fitas de membrana de diálise

(0,8 x 4,0 cm), previamente esterilizadas 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 água - água, em 8 placas.

As placas foram mantidas 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.

10. 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).

RESULTADOS

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 IUVI, que foram obtidas em condições de laboratório. Entre os isolados obtidos em condições de campo, Pd27 apresentou maior taxa de crescimento diário, assim como maior produção de conídios (Quadro 1).

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 e maior número de discos com sintomas (Quadro 1).

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 (Quadro 2). Resultado semelhante foi obtido na competição *in vivo*

Quadro 1. Crescimento micelial, produção de conídios e patogenicidade de linhagens de *Botrytis squamosa*.

Linhagens	Taxa de crescimento micelial diário (cm/dia) ^{1/}	Conídios produzidos/placa de Petri ^{1/}	Folhas com queima das pontas (%) ^{2/}	Patogenicidade			
				Disco de escama de bulbos de cebola			
				3 dias após a inoculação		6 dias após a inoculação	
				discos com sintomas	discos com crescimento micelial	discos com sintomas	discos com crescimento micelial
P4	1,80 b ^{3/}	6,211.10 ⁵ b	81,6 a	16	0	16	16
Pd27	2,04 a	14,712.10 ⁵ a	89,8 a	16	0	16	15
Pd67	1,79 b	1,458.10 ⁵ b	25,4 b	5	5	16	5
P4BSIR	1,15 c	5,727.10 ⁵ b	41,8 b	12	12	16	12
IUVI	1,14 c	2,292.10 ⁵ b	51,8 b	3	3	16	3
Testemunha				0	0	0	0
CV%	4,94	45,77	8,86				

^{1/} Média de 4 repetições.

^{2/} Média de 2 repetições. Para a análise estatística, os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x}$.

^{3/} Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

onde no primeiro experimento 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 subculturas foi testado, apesar de uma redução em sua frequência na população.

Quadro 2. Competição entre isolados de *Botrytis squamosa* resistentes (Pd27, Pd64, Pd65, Pd67) e sensível (P4) a benomyl através de transferências sucessivas de inóculo *in vitro* e *in vivo* (plântulas de cebola), na ausência do fungicida.

Isolados e misturas (1 + 1) de <i>B. squamosa</i>	1ª transferência		2ª transferência	
	Total de linhagens monospóricas testadas	Linhagens monospóricas resistentes a benomyl (%)	Total de linhagens monospóricas testadas	Linhagens monospóricas resistentes a benomyl (%)
Competição <i>in vitro</i>				
P4	3	0		
Pd27	3	100		
Pd67	3	100		
Pd27 + P4	36	100		
Pd67 + P4	38	11	42	0
Competição <i>in vivo</i> (Experimento 1)				
P4	4	0		
Pd27 + P4	25	68	32	100
Pd64 + P4	28	0		
Pd65 + P4	32	19		
Pd67 + P4	3	0		
Competição <i>in vivo</i> (Experimento 2)				
P4	5	0		
Pd27	5	100		
Pd67	5	100		
Pd27 + P4	15	67	12	100
Pd67 + P4	22	45	16	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. Da mesma forma, a li-

nhagem duplo-resistente IUVI permaneceu resistente a benomyl e iprodione após sucessivas transferências monospóricas *in vitro*.

A observação da presença de anastomose entre hifas de diferentes linhagens de *B. squamosa* está apresentada no Quadro 3. Houve formação de anastomose em todas as combinações de linhagens testadas, exceto nas que continham o isolado Pd64.

Quadro 3. Formação de anastomose entre hifas de linhagens de *Botrytis squamosa*.

Linhagens	Formação de anastomose de hifas
Pd27 - Pd27	+ ^{1/}
Pd27 - Pd65	+
Pd27 - IUV2	+
Pd67 - Pd67	+
Pd67 - Pd46	+
Pd67 - Pd64	-
P4 - P4	+
P4 - Pd27	+
P4 - Pd46	+
P4 - Pd64	-
P4 - Pd65	+
P4 - Pd67	+
P4 - IUV2	+

^{1/} + = Formação de anastomose.

- = Não formação de anastomose.

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

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

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 constatada em condições de campo por GHINI & KIMATI (1989).

O isolado Pd27 apresentou alta capacidade de crescimento, esporulação, patogenicidade e competição, demonstrando que as 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. Entretanto, o isolado Pd67 mostrou-se menos adaptado, evidenciando uma possível variação na adaptabilidade dos isolados resistentes a benzimidazóis. Por outro lado, as linhagens estudadas de *B. squamosa* resistentes a dicarboximidas apresentaram menor adaptabilidade do que os isolados sensíveis, sendo esta, possivelmente, a razão da não ocorrência de tais isolados em condições de campo.

Os benzimidazóis, segundo DELP (1980), representam o início de graves problemas com o surgimento de resistência na história dos fungicidas. Isto não somente porque estes fungicidas foram extensiva e intensivamente utilizados, mas também porque são inibidores de um sítio específico do metabolismo do patógeno, acarretando, de modo geral, pouca redução na adaptabilidade dos mutantes resistentes.

O benomyl, que é transformado em carbenazim (CLEMONS & SISLER, 1969), se liga à tubulina e impede a reunião desta proteína para formar o fuso mitótico, conseqüentemente impedindo a divisão celular (DAVIDSE & FLACH, 1977). 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, para 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.

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 a redução da eficácia do fungicida e, sob condições favoráveis à ocorrência de epidemias, ao não controle de doença. Além disso, a longo termo, com a exposição de linhagens com baixo nível de resistência à seleção do fungicida, pode ocorrer aumento da adaptabilidade e do grau de resistência.

A estabilidade da resistência a benomyl e a benomyl + iprodione alerta para o fato de que tais resistências são de caráter genético e podem ser responsáveis pela presença de linhagens resistentes mesmo após o uso do fungicida ter sido cessado. Da mesma forma, a ocorrência de anastomose de hifas e células multinucleadas no gênero *Botrytis* fazem com que a rara presença de genes conferindo resistência possa, sob pressão de seleção exercida pelo fungicida, ter sua frequência aumentada na população do patógeno.

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 & GEORGOPOULOS (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 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 ou 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) acompanhando 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.

LITERATURA CITADA

1. BARROS, J.P. de. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidem) Winter. Piracicaba, ESALQ-USP, 1977. 81p. (Tese-Mestrado).
2. 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.
3. 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.
4. CLEMONS, G.P. & SISLER, H.D. Formation of a fungitoxic derivative from Benlate. *Phytopathology*, St. Paul, 59:705, 1969.
5. 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.
6. DAVIDSE, L.C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol - 2 - yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, New York, 72:174-93, 1977.
 7. DAVIS, R.P. & DENNIS, C. Properties of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, Oxford, 12:521-35, 1981a.
 8. 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.
 9. DEKKER, J. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 14:405-28, 1976.
 10. DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265p.
 11. DELP, C.J. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Disease*, St. Paul, 64(7):652-57, 1980.
 12. DELP, C.J. Fungicide resistance in North America. St. Paul, APS Press, 1988. 133p.
 13. DOVAS, C.; SKYLAKAKIS, G.; GEORGOPOULOS, S.G. The adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in Northern Greece. *Phytopathology*, St. Paul, 66:1452-56, 1976.
 14. GHINI, R. & KIMATI, H. Ocorrência de linhagens de *Botrytis squamosa* resistentes a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, 15(3/4):246-56, 1989.
 15. 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.
 16. 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.
 17. KATAN, T. Persistence of dicarboximide-fungicide resistance in populations of *Botrytis cinerea* in a warm, dry temperate agroclimate. *Phytoparasitica*, Dagan, 10(3):209-11, 1982.
 18. KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. *Agrotécnica*, São Paulo, (1):5-7, 1987.
 19. 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.
 20. MILLER, M.W. & JEVES, T.M. The persistence of benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* in glasshouse tomato crops. *Plant Pathology*, Oxford, 28:119-22, 1979.
 21. POMMER, E.H. & LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. *Crop Protection*, Guildford, 1(2):221-30, 1982.
 22. RUPPEL, E.G.; JENKINS, A.D.; BURCH, L.M. Persistence of benomyl tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of benomyl. *Phytopathology*, St. Paul, 70(1):25-6, 1980.
 23. SHUEPP, H. & KUNG, M. Stability of tolerance to MBC in populations of *Botrytis cinerea* in vineyards of northern and eastern Switzerland. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, 3:180-81, 1981.
 24. STAUB, T. & SOZZI, D. Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant Disease*, St. Paul, 68(12):1026-31, 1984.