OCORRÊNCIA DE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea* PERS. EX FR.
RESISTENTES A BENOMYL EM MORANGOS (*Fragaria* spp.)
NO ESTADO DE SÃO PAULO

HELOISA MARIA CABRINI

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, 1985

A
meus pais e
meus irmãos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela segura orientação, apoio, estímulo e amizade durante a realização e redação deste trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela possibilidade de participação no Curso de Pós-Graduação e realização do presente trabalho.

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

Ao Professor Dr. Keigo Minami, pelo fornecimento de morango doente do campo experimental do Setor de Horticultura da ESALQ, pela colaboração e estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Juarez Betti do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelo envio de morango doente.

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

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia 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
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Resistência de Fungos a Fungicidas	4
2.2. Adaptabilidade dos Mutantes Resistentes	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Isolamento	18
3.2. Técnica de Isolamento	18
3.3. Preservação do Fungo	20
3.4. Preparo dos Meios de Cultura com Fungicidas	21
3.5. Experimentos Realizados	21
3.5.1. Frequência de isolados de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes ao fungicida benomyl, em condi- ções de campo	21
3.5.2. Resposta <i>in vitro</i> de isolados de <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> sensíveis e resistentes ao beno- myl, a doses crescentes do fungicida	22
3.5.3. Nível de resistência dos mutantes ao be- nomyl	24
3.5.4. Avaliação da esporulação de um isolado de <i>Botrytis cinerea</i> sensível e de quatro re- sistentes, em meio de cultura isento de benomyl	25

3.5.5. Sensibilidade colateral <i>in vitro</i> de quatro isolados de <i>Botrytis cinerea</i> resistentes e um sensível ao benomyl, a quatro fungicidas	26
3.5.6. Competição <i>in vitro</i> entre um isolado de <i>Botrytis cinerea</i> sensível e outro resistente ao benomyl	26
4. RESULTADOS	32
4.1. Frequência de Isolados de <i>Botrytis cinerea</i> Resistentes ao Fungicida Benomyl, em Condições de Campo	32
4.2. Resposta <i>in vitro</i> de Isolados de <i>Botrytis cinerea</i> Sensíveis e Resistentes ao Benomyl, a Doses Crescentes do Fungicida	34
4.3. Nível de Resistência dos Mutantes ao Benomyl	36
4.4. Avaliação da Esporulação de Um Isolado de <i>Botrytis cinerea</i> Sensível e de Quatro Resistentes, em Meio de Cultura Isento de Benomyl	38
4.5. Sensibilidade Colateral <i>in vitro</i> de Quatro Isolados de <i>Botrytis cinerea</i> Resistentes e Um Sensível ao Benomyl, a Quatro Fungicidas	40
4.6. Competição <i>in vitro</i> entre Um Isolado de <i>Botrytis cinerea</i> Sensível e Outro Resistente ao Benomyl	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	57
LITERATURA CITADA	59

LISTA DE TABELAS

Tabela nº		página
1	Relação dos isolados de <i>Botrytis cinerea</i> utilizados durante a execução do presente trabalho	19
2	Fungicidas utilizados nos experimentos	27
3	Procedência dos dois isolados de <i>Botrytis cinerea</i> utilizados para se fazer a suspensão de esporos	29
4	Frequência de isolados de <i>Botrytis cinerea</i> de morango resistentes a 100 ppm de benomyl	33
5	Crescimento micelial de sete isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos três dias de incubação, em meio de BDA contendo diferentes concentrações de benomyl	35
6	Crescimento micelial de cinco isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de benomyl	37
7	Capacidade de esporulação de quatro isolados benomyl-resistentes em comparação com um benomyl-sensível de <i>Botrytis cinerea</i> , em meio de BDA	39
8	Crescimento micelial de cinco isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de captafol	41

Tabela nº

página

9	Crescimento micelial de cinco isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de iprodione	42
10	Crescimento micelial de cinco isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de captan	43
11	Crescimento micelial de cinco isolados de <i>Botrytis cinerea</i> aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de procymidone	44
12	Efeito da competição em meio de cultura na frequência relativa de isolados de <i>Botrytis cinerea</i> resistente e sensível ao fungicida benomyl	46

OCORRÊNCIA DE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.
RESISTENTES A BENOMYL EM MORANGOS (*Fragaria* spp.)
NO ESTADO DE SÃO PAULO

Heloisa Maria Cabrini

Orientador: Prof.Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Foram feitos levantamentos do agente do mofo cinzento de morangos, provenientes de Atibaia, Campinas, Piedade, Valinhos e Piracicaba (S.P.). Dos 52 isolados conseguidos, 12, procedentes de Atibaia, se mostraram resistentes a 100µg/ml de benomyl. Desses 12, 4, testados a 1000µg de benomyl/ml, apresentaram algum crescimento. Comparações *in vitro* desses 4 com 1 isolado sensível a benomyl evidenciaram que, de um modo geral, os resistentes esporulam e crescem menos do que o sensível em meio de BDA. Comparações desses mesmos isolados em relação a sensibilidade aos fungicidas captafol, captan, iprodione e procymidone não evidenciaram diferenças muito marcantes entre os isolados resistentes, como um grupo, e o sensível. Todos os isolados testados foram altamente sensíveis ao procymidone e ao iprodione.

BENOMYL-RESISTANT ISOLATES OF *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.
OCCURRING ON STRAWBERRIES (*Fragaria* spp.) IN
THE STATE OF SÃO PAULO

Heloisa Maria Cabrini

Adviser: Prof.Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Gray mold surveys were made on strawberries from Atibaia, Campinas, Piedade, Valinhos and Piracicaba (S.P.). Of the 52 isolates obtained, 12, from Atibaia were resistant to 100 µg/ml of benomyl. Of these 12, 4 were tested at 1000 µg of benomyl/ml, and showed some growth at this concentration. *In vitro* comparisons of these 4 isolates with benomyl-sensitive showed that, in general, the resistant ones sporulate and grow less than the benomyl-sensitive isolate in PDA medium. Comparisons of the same isolates in relation to sensitivity to the fungicides captafol, captan, iprodione and procymidone have not showed evident differences between resistant isolates, as a group, and the sensitive one. All isolates tested, irrespective of being benomyl-resistant or benomyl-sensitive, were highly sensitive to procymidone and iprodione.

1. INTRODUÇÃO

O plantio comercial de morango (*Fragaria* spp.) no Brasil foi iniciado há cerca de 50 anos, tendo sido ampliado nos últimos 25 anos. Atualmente é produzido nos estados de São Paulo (Atibaia, Valinhos, Piedade e Jundiaí), Minas Gerais (sul do estado) e Rio Grande do Sul (região de Pelotas). Entretanto, o cultivo de morango está sujeito a vários fatores que contribuem para a redução da produtividade, e dentre eles, a ocorrência de um número considerável de doenças se sobressai como um dos mais significativos.

Dentre essas doenças, o mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.) se destaca como uma das mais importantes (PESSANHA *et alii*, 1970). Trata-se de uma podridão do fruto bastante comum, ocorrendo em todas as regiões do mundo onde se cultiva o morango, sempre determinando graves prejuízos, pela redução do produto comerciável (CARDOSO, 1980).

Os frutos podem ser afetados em qualquer estágio de desenvolvimento e tanto em condições de campo como pós-colheita.

Os fatores ambientais que mais favorecem a incidência dessa doença são alta umidade e temperatura ao redor de 20°C. Tais condi-ções podem ser alcançadas durante o inverno no estado de São Paulo, principalmente em relação a umidade relativa, pois, embora seja uma estação seca, são feitas irrigações quase que diariamente.

Um dos mais indicados métodos para o controle desta podridão de fruto, constitui-se na aplicação de fungicidas; neste sentido, a partir de 1969, no estado de São Paulo, fungicidas convencionais como captan, que vinham sendo usados no controle dessa e outras doenças do morangueiro (mancha de micosferela, antracnose) foram gradualmente substituídos por benomyl, pertencente ao grupo dos benzimidazóis (REMIRO e KIMATI, 1974). Apesar da alta eficiência deste produto, alguns anos após a sua introdução, tem se observado falhas no controle do mofo cinzento e isso é atribuído ao desenvolvimento de linhagens de *B. cinerea* resistentes a esse fungicida.

O presente trabalho, visando obter maiores esclarecimentos em relação ao problema apontado acima, tem por objetivos:

1. Fazer um levantamento dos isolados de *Botrytis cinerea* resistentes e sensíveis ao benomyl, que ocorrem na cultura de morango, em condições de campo.
2. Determinar o nível de resistência dos mutantes.
3. Comparar a adaptabilidade *in vitro* entre isolados sensíveis e resistentes ao benomyl, através de parâmetros como: crescimento

micelial, capacidade de esporulação e competição em meio de cultura.

4. Testar a ocorrência de sensibilidade colateral entre isolados benomyl-resistentes e benomyl-sensíveis, em relação aos fungicidas captafol, captan, iprodione e procymidone.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência de Fungos a Fungicidas

O fenômeno de perda de eficiência de drogas tem causado considerável dificuldade ao homem moderno em seus esforços para controlar organismos nocivos pelo uso de compostos tóxicos (GEORGOPOULOS, 1969). Realmente, desde os primórdios da quimioterapia se observou que, submetendo-se camundongos a pequenas doses de arsenicais, desenvolvia-se progressivamente uma resistência do protozoário, não só em relação ao arsenical usado, mas também a outros compostos de constituição química semelhante e, no campo da medicina humana e veterinária, já há algum tempo se tem observado o fenômeno em bactérias com relação a sulfas e aos antibióticos (BIER, 1965). Estudos intensivos têm sido feitos nesse campo, principalmente com relação aos antibióticos e as revisões de BRYSON e SZYBALSKI (1955), SCHNITZER e GRUNBERG (1957), NEWTON (1965), GURGEL e AZEVEDO (1969) e WATANABE (1971) mostram a complexidade do assunto.

No campo da Agronomia, resistência de insetos aos inseticidas datam de 1950, pouco depois do emprego de novos

produtos orgânicos, tornando-se um problema no controle de pragas. Segundo BROWN (1961), até 1960 pelo menos 137 espécies de insetos, ácaros, etc., já tinham desenvolvido resistência a vários grupos de inseticidas.

Familiarizados com tais experiências, eram surpreendentemente poucos os casos em que doenças de plantas, causadas por fungos, apresentassem problemas semelhantes e isso foi atribuído à natureza inespecífica dos fungicidas usados no seu controle (GEORGOPOULOS, 1969). Assim, não houve preocupação neste sentido, por parte dos pesquisadores, até por volta de 1967, já que até essa época, problemas de resistência de fungos a fungicidas, em condições de campo, se limitavam a apenas alguns relatos; dentre eles, se destacavam o de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* em relação ao bifenil e ao ortofenilfenato de sódio; de *Tilletia foetida* em relação ao BHC, ao quintozene (ou PCNB) e ao tetracloronitroanisol; e de *Pyrenophora avenae* em relação aos organomercúriaes (KIMATI, 1978).

Em 1967 mesmo, GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) concluíram que o aparecimento de formas resistentes, exceto em relação aos hidrocarbonetos, não apresentavam dificuldades, mas alertavam para o fato da resistência tornar-se mais comum na medida que os fungicidas alcançassem maior especificidade.

De fato, por volta de 1970 começaram a ser introduzidos em escala comercial, fungicidas seletivos, e resistência a tais fungicidas tem despertado muito maior interesse prático, na busca de soluções mais acertadas para o problema (KIRBY, 1972).

Infelizmente, a descoberta científica que trouxe produtos químicos mais eficientes no controle de doenças, também propiciou o aparecimento de resistência. Esse paradoxo pode ser explicado em termos do modo de ação e mecanismos de resistência (DELP, 1980).

Os novos biocidas são tóxicos para determinados patógenos mas não afetam mamíferos, a cultura ou outros organismos, ou seja, eles têm um limitado espectro de toxicidade, de forma que os organismos a que se destinam podem frequentemente escapar da sua ação tóxica por uma simples mutação (UESUGI, 1978).

De acordo com DELP (1980), fungicidas convencionais são chamados inibidores multi-sítios, pois interferem em numerosos processos metabólicos vitais do patógeno, permitindo pouca chance para o desenvolvimento de resistência, já que são requeridas múltiplas modificações no genoma do patógeno, para impedir a sua ação. Tais produtos como os ditiocarbamatos, os mercuriais, os compostos de cobre e outros, têm tido poucos problemas de resistência na prática. Inibidores de sítios específicos, por outro lado, atuam em um ou dois locais metabólicos e resistência neste caso é mais comum, desde que alteração em apenas um gene do fungo é suficiente para induzir uma modificação no sítio de ação. Assim, a aquisição de resistência pelo fungo, aos fungicidas protetores, implica em mutação poligênica, enquanto que a mutação em um ou poucos genes confere resistência a fungicidas mais específicos (seletivos) (UESUGI, 1978).

Devido ao modo de ação característico para cada tipo de fungicida, apesar do longo período durante o qual os convencionais tem

estado em uso comercial, o número de casos de desenvolvimento de resistência é relativamente pequeno e de pouca importância prática (DEKKER, 1977). Em contraposição, atualmente, o número de relatos de fungos resistentes a fungicidas sistêmicos, mesmo levando-se em consideração somente a ocorrência em condições de campo, é bem grande e está em constante ascensão. Assim, já se conhecem linhagens de fungos, antes sensíveis, que se tornaram resistentes a benomyl, tiofanato metílico, thia-bendazol, ethirimol, dimethirimol, kasugamicina, entre outros (KIMATI, 1978).

OGAWA *et alii* (1977) fizeram uma lista de somente 17 de 62 fungicidas orgânicos de contacto de uso geral, para os quais foi desenvolvida resistência, apesar de muitos deles estarem sendo utilizados há mais de 50 anos. Em contraste, uma ampla variedade de organismos tinham se tornado resistentes a 9 dos 10 sistêmicos em uso em 1977, embora o início da utilização do primeiro sistêmico, benomyl, tivesse sido há menos de 10 anos.

De acordo com GEORGOPOULOS (1977), a aplicação de produtos químicos em grandes áreas e anos seguidos tem o efeito de forçar mudanças evolucionárias e apressá-las, então, as drogas atuam como peneiras, separando e concentrando os mutantes resistentes. Quanto maior for a pressão de seleção mais rápida será a mudança. O tempo durante o qual esta pressão é mantida é determinado pela persistência da droga, a frequência e o tipo de aplicação. O desenvolvimento de mutantes resistentes ocorre mais rapidamente no caso de produtos tóxicos inibidores de sítios específicos, sendo que muitas vezes eles se tornam ineficientes

dentro de 2-3 anos após sua primeira aplicação no campo. DOVAS *et alii* (1976), comparando uma linhagem benomyl-sensível e uma benomyl-resistente de *Cercospora beticola*, observaram que a frequência de isolamento da linhagem resistente aumentou de 3,5% para 91,5%, com apenas duas aplicações em um mês. WICKS (1974) constatou que depois de um período de 3 anos de uso regular de benomyl no controle da sarna da macieira, já foram observadas linhagens benomyl-resistentes de *Venturia inaequalis*, numa evidência de que resistência aos fungicidas benzimidazóis aparece após uso regular e exclusivo destes produtos.

Com drogas atuantes sobre múltiplos sitios, a perda da efetividade não sobrevêm com a mesma rapidez. Fungicidas organo-mercuriais vêm sendo usados desde 1920 e casos de resistência a estes compostos só foram observados a partir de 1966, em *Pyrenophora avenae* (SHERIDAN *et alii*, 1968). Somente após 9 anos de uso intensivo de dodine é que surgiram os primeiros relatos de linhagens resistentes em *Venturia inaequalis* (SZKOLNIK e GILPATRICK, 1969).

Nos últimos anos, numerosos casos de aquisição de resistência têm sido registrados de muitas partes do mundo, principalmente em relação aos compostos benzimidazóis e tiofanatos (DEKKER, 1977). Realmente, dentre os fungicidas sistêmicos, o grupo dos benzimidazóis são os que apresentam mais dramaticamente, sérios problemas de resistência (DELP, 1980). Juntamente com os tiofanatos, eles são, sem dúvida, os compostos mais amplamente conhecidos, devido às suas excelentes propriedades sistêmicas e sua grande eficiência no controle de importantes doenças de plantas; mas, infelizmente, também causam desapontamento quando

problemas de resistência se desenvolvem no fungo que pretendem controlar (DAVIDSE, 1982). Esse grupo de fungicidas envolve casos mais frequentes de resistência entre os fungos *Botrytis cinerea*, *Cercospora* spp., oídios, *Venturia inaequalis*, *Verticillium* spp. e *Penicillium* spp. (KIMATI, 1978).

Deve-se acrescentar aqui a afirmação de DELP (1980), segundo o qual, até 1979, resistência aos compostos benzimidazóis foi encontrada em fungos pertencentes a 16 gêneros diferentes.

Frequentemente a resistência a fungicidas é de um alto nível. Em experimentos realizados por BOLLEN e SCHOLTEN (1971), onde se utilizou benomyl para o controle de *Botrytis cinerea* em viveiro de cíclamem, a aplicação deste fungicida foi satisfatória por várias semanas; contudo, após curto período de uso, a eficiência do produto decaiu e das plantas doentes puderam ser isoladas linhagens do fungo que resistiram a concentrações muito mais altas de benomyl do que o tipo selvagem. Mesmo a 1000ppm do produto não houve uma completa inibição no crescimento, enquanto que o tipo selvagem foi eliminado a 0,5ppm de benomyl no meio. As linhagens resistentes mostraram resistência cruzada em relação a thiabendazol, fuberidazol e tiofanato metílico.

Em condições naturais foram obtidos isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a benomyl em sementeiro de alface e tomate, e que também apresentaram resistência cruzada a metil-tiofanato, thiabendazol e BAS 3460 F (MILLER e FLETCHER, 1974).

Outros autores têm relatado a aquisição de resistência de *B. cinerea* em relação aos compostos benzimidazóis (DEKKER, 1976;

FLETCHER e GRIFFIN, 1981; PEPIN e Mac PHERSON, 1982).

Segundo IIDA (1975), isolados de *Venturia inaequalis* de pomares não tratados foram inibidos a concentrações de 10ppm de tiofanato metílico; em contraste, isolados provenientes de pomares tratados suportaram até 1000ppm.

Em moranguinhos tratados com benomyl, foram isoladas formas resistentes de *Mycosphaerella fragariae* que suportaram até 100ppm da droga, enquanto a forma selvagem, 1 ppm (REMIRO e KIMATI, 1974), como também foram constatadas duas classes de linhagens resistentes a este fungicida em *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, as quais mostraram resistência cruzada em relação a tiofanato metílico (KURAMOTO, 1976). Resistência cruzada em relação a tiofanato metílico e thiabendazol também foi encontrada em uma linhagem de *P. expansum* resistente a benomyl, isolada de peras que tinham sido tratadas com este fungicida (WICKS, 1977).

De uma casa de vegetação de pepino da Holanda, onde benomyl tinha sido aplicado para controlar oídio, foi obtida uma linhagem de *Sphaerotheca fuliginea* que, em teste de disco de folha, tolerou concentrações de benomyl de 100 a 1000 vezes mais elevadas do que aquela suportada pela linhagem sensível do fungo (DEKKER, 1977).

Mais recentemente, foram introduzidos comercialmente os fungicidas dicarboximidas (dichlozoline, iprodione, procymidone, vinclozolin), como substitutos dos benzimidazóis, onde o controle de doenças de plantas já não se mostrava satisfatório devido à presença de linhagens benzimidazóis-resistentes. Assim, os dicarboximidas começaram a

ser amplamente empregados para controlar doenças causadas por patógenos taxonomicamente relacionados como *Sclerotinia*, *Monilinia* e *Botrytis*, sendo particularmente eficientes contra mofo cinzento da uva, morango e tomate (causados por *Botrytis cinerea*) e doenças de podridão parda do fruto (causadas por *Monilinia* spp.) (BEEVER e BYRDE, 1982).

Linhagens de fungos resistentes a esse grupo de fungicidas, inicialmente eram de ocorrência ocasional e não causavam maiores problemas; entretanto, recentemente tem sido relatadas falhas na eficiência destes produtos no controle de doenças, que foram associadas à presença de formas resistentes (BEEVER e BYRDE, 1982).

Os mutantes de fungos resistentes aos dicarboximidas apresentam geralmente resistência cruzada em relação aos fungicidas do grupo dos hidrocarbonetos aromáticos. Neste sentido, BEEVER e BRIEN (1983), constataram o desenvolvimento de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a iprodione que mostraram resistência cruzada em relação a dichlozoline, procymidone, vinclozolin e dicloran. Tal fato também foi observado por HARTILL *et alii* (1983), onde os mutantes de *B. cinerea* além destes produtos, também apresentaram resistência cruzada em relação a quintozene e a maioria foi também resistente aos fungicidas benzimidazóis.

O desenvolvimento de linhagens de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas dicarboximidas, tanto em condições naturais, como *in vitro*, tem sido relatado por outros pesquisadores (KATAN, 1981; HISADA *et alii*, 1981; GULLINO e GARIBALDI, 1981; PANAGIOTAKU e MALATHRAKIS, 1981; FLETCHER e GRIFFIN, 1981; KATAN, 1982).

2.2. Adaptabilidade dos Mutantes Resistentes

Normalmente, linhagens resistentes surgem espontaneamente na população de sensíveis (DEKKER, 1977), em pequeno número, provavelmente menos do que 1 propágulo em 10^8 . Desde que essas linhagens resistentes raramente têm uma vantagem adaptativa sobre as formas selvagens, elas permanecem em níveis indetectáveis. Mas quando um agente de controle de doença seletivamente reduz ou elimina as populações selvagens sensíveis, formas resistentes que têm razoável adaptabilidade e são patogênicas aumentam na população (DELP, 1980). Enquanto a porcentagem de indivíduos resistentes for baixa, não haverá nenhum decréscimo detectável na eficiência do fungicida. Falhas no controle de doenças apenas ocorrerão quando, sob o efeito seletivo do fungicida, uma parte substancial da população de patógenos se tornar resistente (DEKKER, 1981). Mas a ocorrência ou não de tal fato depende de vários fatores, como as propriedades dos mutantes resistentes, o tipo de fungicida utilizado, o tipo de doença, a persistência e método usual do fungicida e as condições ambientais (DEKKER, 1977; 1981). Assim, o uso sucessivo de um fungicida ou de fungicidas pertencentes a um único grupo de resistência cruzada pode promover o desenvolvimento de resistência, sendo igualmente importantes a taxa de crescimento e reprodução do organismo em questão. Fungos que crescem rapidamente como *Botrytis* e oídio frequentemente causam problemas de resistência na prática (UESUGI, 1978).

Pelo exposto acima, é evidente que a adaptabilidade de mutantes resistentes a fungicidas, comparada àquela da linhagem selvagem,

é de suprema importância para o estabelecimento de uma população de patógenos resistentes. Adaptabilidade é um conceito comparativo: um organismo é mais ou menos adaptável do que outro sob condições *in vitro*, em viveiro de plantas ou no campo. Parâmetros de adaptabilidade *in vitro* são: germinação de esporos, crescimento do micélio em agar ou em meio líquido e esporulação em meio de agar. Parâmetros de adaptabilidade sobre a planta hospedeira são: a possibilidade de infecção, a velocidade de colonização do tecido do hospedeiro e o grau de esporulação. Linhagens com adaptabilidade mais elevada são mais competitivas (DEKKER, 1982a).

Se os indivíduos apresentarem um grau de adaptabilidade igual ou não muito menor do que aquele do patógeno sensível, uma população resistente ao fungicida poderá se desenvolver, mesmo se a pressão de seleção for somente moderada ou baixa. Por outro lado, a aquisição de resistência também pode estar associada com decréscimo de adaptabilidade; em tais casos, quanto maior a diferença da linhagem resistente em relação à sensível, mais dificultado será o desenvolvimento de uma população de patógenos resistentes, podendo haver um atraso ou mesmo um impedimento do seu estabelecimento (DEKKER, 1981; 1982a).

Os relatos de literatura descrevem uma certa diversidade no comportamento dos isolados das várias espécies de fungos fitopatogênicos, em relação aos produtos químicos usados no seu controle. Assim, enquanto um isolado de *Venturia inaequalis* que adquiriu resistência ao antibiótico antimicina-A por irradiação U.V., perdeu completamente sua patogenicidade (LEBEN *et alii*, 1955), isolados de *V. pirina* resistentes

a carbendazim foram todos patogênicos, desenvolvendo lesões típicas (SHABI e KATAN, 1979).

A população de mutantes resistentes pode atingir altos níveis enquanto o produto químico é aplicado e declinar quando cessa a aplicação, dependendo da adaptabilidade das formas resistentes para sobreviver sob condições de ausência da pressão de seleção. Miura e Takahashi (1976) citados por UESUGI (1978), observaram que embora nenhum fator impróprio para sobrevivência fosse encontrado nos mutantes kasugamicina-resistentes de *Pyricularia oryzae*, sua população decresceu após cessar a aplicação do antibiótico e praticamente desapareceu depois de 4 anos. Um comportamento similar ocorreu com linhagens de *Puccinia horiana* resistentes a oxycarboxin, segundo Abiko e Kishi (não publicado) citados por UESUGI (1978). Por outro lado, linhagens de *Botrytis* resistentes a benomyl e tiofanato-metil algumas vezes sobreviveram, mesmo depois que a aplicação desses fungicidas foi suspensa (UESUGI, 1978).

Em experimentos de laboratório foram obtidas linhagens de *Cladosporium cucumerinum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi* resistentes a pimaricin, que mostraram redução na esporulação *in vitro* e na patogenicidade (DEKKER, 1982a).

A adaptabilidade de linhagens resistentes aos benzimidazóis parece variar extensamente. Algumas vezes tem sido relatada ser igual àquela dos patógenos sensíveis, como foi mostrado para resistência a benomyl e thiabendazol em *Penicillium digitatum*, cujo mutante resistente não apresentou redução na patogenicidade (WILD e RIPPON, 1975). Também os experimentos de RUPPEL (1975) levaram a interpretações semelhantes,

desde que as formas benomyl-resistentes de *Cercospora beticola* não diferiram das sensíveis em crescimento e esporulação *in vitro* nem em virulência e esporulação *in vivo*. Além disso, DOVAS *et alii* (1976) constataram que a frequência de linhagens resistentes na população natural de *C. beticola* na Grécia, não declinou, mesmo 3 anos após a interrupção no uso de benomyl. E mesmo 10 anos depois que os benzimidazóis foram retirados na Holanda, resistência de *Sphaerotheca fuliginea* (oídio do pepino) a eles, tem sido persistente (SCHEPERS, 1984).

Mas há casos em que a habilidade competitiva dos indivíduos resistentes aos benzimidazóis se torna prejudicada. Assim, verificou-se que dois isolados de *Monilinia laxa* de damasco, resistentes a benomyl, se tornaram menos patogênicos e produziram menor quantidade de conídios em meio de cultura sem fungicida (OGAWA *et alii*, 1984).

Enquanto as evidências têm comprovado que resistência aos benzimidazóis é estável e particularmente em relação a benomyl, em quase todos os casos, não parece estar absolutamente ligada à redução de adaptabilidade (DEKKER, 1982a; BEEVER e BRIEN, 1983), a estabilidade da resistência aos dicarboximidas é aparentemente muito baixa (LORENZ e POMMER, 1982) e os mutantes dicarboximida-resistentes apresentam um decréscimo na habilidade competitiva (BEEVER e BYRDE, 1982; BEEVER e BRIEN, 1983).

Em experimentos conduzidos por PANAGIOTAKU e MALATHRAKIS (1981), observou-se que o crescimento das linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a dicarboximidas em meio de BDA, foi mais lento do que o das linhagens sensíveis, mas os esporos germinaram igualmente bem em ambos

os casos; além disso, plantas tratadas com vinclozolin foram facilmente infectadas quando inoculadas com uma suspensão de esporos resistentes.

Para se avaliar a habilidade competitiva *in vitro* e *in vivo* de linhagens de *B. cinerea* sensíveis e resistentes a dicarboximidas, foi utilizada uma mistura de conídios sensíveis e resistentes para inocular placas com meio de cultura isento de fungicida. A proporção de esporos resistentes e sensíveis foi então determinada durante 4 ciclos de gerações; constatou-se que, de uma forma geral, houve o desaparecimento dos mutantes resistentes, e em apenas um caso a linhagem resistente foi tão competitiva quanto a sensível. Essa mesma linhagem, quando inoculada em plantas tratadas e não tratadas com vinclozolin, foi reisolada após 2-3 meses, mas somente a uma frequência muito baixa (GULLINO e GARIBALDI, 1981).

HISADA *et alii* (1981) também empregaram uma mistura de esporos de *B. cinerea* sensíveis e resistentes a procymidone para inocular plantas, e constataram que as linhagens resistentes desapareceram depois de um certo tempo, na ausência da pressão de seleção. Todavia, com aplicações de procymidone a população resistente aumentou gradualmente, voltando a diminuir quando o fungicida foi novamente retirado. E mesmo nos casos em que a população resistente foi alta, o tratamento com procymidone foi ainda eficiente no controle da doença.

Quando uma mutação torna o mutante mais resistente do que o tipo selvagem a um produto químico e mais sensível do que o tipo selvagem a outro produto químico, tal fenômeno é conhecido como resistência

cruzada correlacionada negativamente, ou seja, sensibilidade colateral (GEORGOPOULOS, 1982). Assim, observou-se que mutantes de *Pyricularia oryzae* resistentes a fosforotiolates (Kitazin P), mostraram um aumento de sensibilidade a fosforamidades, e vice-versa (UESUGI *et alii*, 1974). A ocorrência de sensibilidade colateral também foi verificada por LAMBERT e WUEST (1975), ao constatarem que conídios de 4 isolados de *Verticillium malthousei* resistentes a benomyl foram mais sensíveis a zineb do que conídios de 4 isolados sensíveis a benomyl. Além disso, constatou-se que um isolado benomyl-resistente de *Monilinia fructicola* cresceu tão rápido quanto um isolado sensível sobre um meio sem fungicida, mas cresceu mais lentamente do que o tipo selvagem sobre um meio contendo captan ou prochloraz (DIJKHUIZEN *et alii*, 1983).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento

Foram obtidos 52 isolados do fungo *Botrytis cinerea* a partir de frutos de morango apresentando sintomas típicos de mofo cinzento, provenientes de 5 localidades do estado de São Paulo (Tabela 1).

3.2. Técnica de Isolamento

Para se proceder ao isolamento do fungo foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura de BDA (extrato de 200g de batata; dextrose - 20g; ágar - 18g; água destilada - q.s.p. - 1000 ml), procurando-se transferir para as placas apenas os esporos do fungo e quando isto não foi possível, o próprio micélio foi utilizado como inóculo, utilizando-se um estilete. As placas foram mantidas sob condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III, Lab-Line Instruments), com temperatura ao redor de 21°C e luminosidade constante. A luminosidade foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 40 watts,

Tabela 1. Relação dos isolados de *Botrytis cinerea* utilizados durante a execução do presente trabalho

Isolados	Procedência	Variedade de morango	Histórico	Ano de isolamento	Observações
Mor At-1	Atibaia-SP	Morango de variedade de Campinas ^{a/}	No começo da cultura: Cercobin e Benlate (4 vezes), sendo que a última aplicação havia sido feita há 4 meses Atualmente: Difolatan, Orthocid, Fungisan e Antracol, aplicados alternadamente, 1 vez por semana ^{d/}	1978	Cultura comercial
Mor At-2	Atibaia-SP	Morango de variedade de Campinas ^{a/}	"	1978	Cultura comercial
Mor At-3	Atibaia-SP	Morango de variedade de Campinas ^{a/}	"	1978	Cultura comercial
Donner	Campinas-SP	Morango de variedade Donner	Pulverizado com Benlate e Captan	1978	De plantas de estufa do IAC ^{b/}
Torrey	Campinas-SP	Morango de variedade Torrey	Pulverizado com Benlate e Captan	1978	De plantas de estufa do IAC
SH-2	Campinas-SP	Morango de variedade SH-2	Pulverizado com Benlate e Captan	1978	De plantas de estufa do IAC
Botr-Pied	Piedade-SP	Morango de variedade Campinas ^{a/}	Não foram obtidas informações sobre os tratamentos recebidos	1978	Cultura comercial
Mor At-4 até Mor At-20	Atibaia-SP	Morango de variedade Campinas e Lassen	Pulverizado com Difolatan, Antracol, Ronilan e Dithane M-45 ^{d/}	1983	Cultura comercial
Mor Val.-1 até Mor Val-7	Valinhos-SP	Morango de variedade Campinas ^{a/}	Não foram obtidas informações sobre os tratamentos recebidos	1983	Cultura comercial
Mor Pira-1 até Mor Pira-21	Piracicaba-SP	Morango de variedade Campinas	Sem uso de fungicidas	1983	De plantas do campo experimental do Setor de Horticultura da ESAIQ ^{c/}

a/ Morango obtido de mercado, onde a maioria dos frutos pertence à variedade Campinas

b/ IAC - Instituto Agrônomo de Campinas

c/ ESAIQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

d/ Informação obtida de lavrador

colocadas aproximadamente a 34cm acima das placas. Três a quatro dias após o isolamento, o fungo já tomava praticamente dois terços das placas, tendo as colônias atingido um diâmetro ideal para se dar início aos experimentos.

3.3. Preservação do Fungo

A preservação dos 52 isolados de *Botrytis cinerea* inicialmente foi feita através de repicagens sucessivas utilizando-se o meio de BDA, e posteriormente empregou-se o método de Castellani, descrito por FIGUEIREDO (1967). De acordo com este método, discos de micélio do fungo foram transferidos para vidros de penicilina, com capacidade de 6ml, contendo 4 a 5ml de água destilada esterilizada; a seguir, os vidros foram tamponados com rolhas de borracha, lacrados com tampas herméticas de alumínio (usando-se para isso, máquina cravadora especial) e mantidos sob temperatura ao redor de 10°C.

A eficiência do método de Castellani na conservação da viabilidade das culturas de fungos e bactérias mantidas em água destilada por longos períodos de tempo, sem necessidade de repicagens, tem sido ressaltada em vários trabalhos (FIGUEIREDO, 1967; 1971; PEREIRA *et alii*, 1970; FIGUEIREDO e PIMENTEL, 1975; BOESEWINKEL, 1976 e HECKLY, 1978). Além da preservação da viabilidade, esporulação e características morfológicas, há relatos de que também as características patogênicas dos microorganismos podem ser mantidas em muitos casos. Este fato foi revelado através dos trabalhos conduzidos por PIMENTEL *et alii* (1980),

onde foi observado que de 9 culturas de fungos inoculadas em seus respectivos hospedeiros, após terem sido submetidas ao processo de conservação em água destilada por mais de 7 anos, 6 mantiveram sua patogenicidade inalterada.

3.4. Preparo dos Meios de Cultura com Fungicidas

Para o preparo dos meios de cultura com os fungicidas seguiu-se a técnica de EDGINGTON *et alii* (1971), modificada por MENTEN *et alii* (1976), dissolvendo-se os produtos inicialmente em acetona (5,0ml) e completando-se o volume para 100ml com água destilada esterilizada. Desta solução estoque foram feitas diluições em série e tomada uma alíquota de 1,0ml de cada suspensão e transferida para 100ml de meio de cultura BDA fundente (45 a 47°C), de tal forma a se obter as concentrações desejadas.

3.5. Experimentos Realizados

3.5.1. Frequência de isolados de *Botrytis cinerea* resistentes ao fungicida benomyl, em condições de campo

Os 52 isolados de *Botrytis cinerea* foram testados em relação à ocorrência de possíveis mutantes resistentes, em condições de laboratório.

Este ensaio foi realizado em duas épocas diferentes, ou seja, em 1978 foram testados os isolados Mor At-1, Mor At-2, Mor At-3, Donner, Torrey, SH-2 e Botr-Pied, e posteriormente, em 1983, foram

testados os isolados restantes, de acordo com a Tabela 1.

Os isolados foram primeiramente cultivados em meio de BDA e após 6 dias de incubação, uma pequena porção de inóculo de cada isolado foi transferida para placas contendo meio de BDA suplementado com 100ppm de benomyl, usando-se um estilete. Para cada placa foram repicados 4 isolados diferentes, tendo sido a mesma previamente dividida, no verso, em 4 compartimentos (usando-se caneta hidrocor) e colocando-se cada isolado no local correspondente à sua referência.

Cada ensaio contou com 2 repetições e a incubação das placas se deu sob luz contínua, fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia, de 40 watts, colocadas a uma altura entre 24 e 34cm e temperatura ao redor de 21°C, em condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III, Lab-Line Instruments).

As placas foram observadas diariamente até 6 dias após a repicagem, procurando-se notar se havia crescimento dos isolados ou não.

3.5.2. Resposta *in vitro* de isolados de *Botrytis cinerea* sensíveis e resistentes ao benomyl, a doses crescentes do fungicida

O presente experimento foi instalado com o intuito de se obter informações mais detalhadas sobre o comportamento de isolados sensíveis e resistentes ao benomyl, frente a concentrações de 1, 10 e 100ppm do fungicida.

Na execução deste ensaio, realizado em 1978, foram utilizados 4 isolados sensíveis (Donner, Torrey, SH-2 e Botr-Pied.) e 3 resistentes (Mor At-1, Mor At-2 e Mor At-3).

Após 4 dias de crescimento em meio de BDA, quando os 7 isolados já haviam atingido aproximadamente dois terços das placas, foram retirados inóculos do fungo, utilizando-se para isso um furador de rolhas para que tivessem o mesmo diâmetro (1,0cm). Tais inóculos foram retirados dos bordos das colônias, pois as pontas hifálicas apresentam taxa de crescimento superior a do micélio mais velho e, em seguida colocados no centro de placas contendo meio de BDA suplementado com 3 crescentes concentrações de benomyl, a saber: 1, 10 e 100ppm, havendo, naturalmente, para cada isolado a placa-controle contendo apenas BDA (testemunha). Foram feitas 3 repetições para cada concentração do fungicida, incluindo-se também as testemunhas, num total de 84 placas. Tais placas foram mantidas sob as mesmas condições citadas no experimento descrito no item 3.5.1., sendo que o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

O desenvolvimento dos isolados do fungo foi acompanhado detalhadamente, sendo que a 1^a avaliação foi feita 24 horas após a instalação do experimento, colocando-se cada placa em um contador de colônias (Darkfield Quebec Colony Counter), marca Spencer, e medindo-se o crescimento diametral da colônia com régua, pelo verso das placas de Petri; esta operação foi repetida a cada 24 horas até o 5º dia, quando o fungo atingiu os bordos das placas-testemunha.

3.5.3. Nível de resistência dos mutantes ao benomyl

Este ensaio foi conduzido em 1983 com o objetivo de se descobrir o grau de resistência de alguns dos 12 isolados de *B. cinerea* resistentes ao benomyl, além de novamente se estabelecer comparações entre o crescimento de isolados sensíveis e resistentes, na ausência do fungicida e em doses crescentes do mesmo. Neste sentido, foram testados os isolados resistentes: Mor At-5, Mor At-7, Mor At-9 e Mor At-10 e o sensível Mor At-20.

Os 5 isolados de *B. cinerea* foram inicialmente cultivados em meio de BDA e com 4 dias de idade foram retirados da periferia das colônias, discos do micélio do fungo, com o auxílio de um furador de rolhas de 0,7cm de diâmetro. A seguir procedeu-se à inoculação, no centro de placas contendo meio de BDA acrescido de 4 dosagens de benomyl (1, 10, 100 e 1000ppm), além das placas-testemunha. Este experimento contou com 3 repetições para cada isolado nas placas-controle e nas 4 crescentes concentrações do fungicida, num total de 75 placas.

As placas assim inoculadas foram incubadas sob as mesmas condições já citadas em ensaios anteriores e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A 1ª leitura foi feita 48 horas após a inoculação, colocando-se cada placa no contador de colônias já referido no experimento anterior, e tomando-se 2 medidas do crescimento diametral da colônia em direções perpendiculares entre si, pelo verso de cada placa. Este procedimento foi repetido posteriormente com intervalos de 24 horas até o 6º dia, totalizando 5 avaliações, quando o

crescimento das testemunhas atingiu os bordos das placas.

3.5.4. Avaliação da esporulação de um isolado de *Botrytis cinerea* sensível e de quatro resistentes, em meio de cultura isento de benomyl

Com a finalidade de se comparar a capacidade de esporulação de isolados sensíveis e resistentes a benomyl, na ausência deste, foram testados no ano seguinte, os mesmos isolados de *B. cinerea* empregados no experimento anterior, ou seja, os resistentes Mor At-5, Mor At-7, Mor At-9 e Mor At-10 e o sensível Mor At-20.

Foram utilizadas 5 repetições de cada isolado mencionado acima em meio de BDA, com 8 dias de idade.

As suspensões de esporos foram preparadas colocando-se 20ml de água destilada esterilizada em placas de Petri contendo as culturas fúngicas, e estas friccionadas, levemente, com o auxílio de uma alça de "Drigalski", sendo a suspensão filtrada através de uma camada de gaze e outra de algodão, para eliminar os resíduos.

A avaliação da esporulação foi feita por colorimetria (Colorímetro BAUSCH LOMB & SPECTRONIC 20, a 625nm). Previamente calibrou-se uma suspensão (em hemocitômetro) e suas diluições foram correlacionadas com a densidade óptica, segundo a equação:

$$y = 0,12074 + 8,78850x$$

onde: y = nº de esporos ($\times 10^6$)/ml

x = densidade óptica a 625nm

3.5.5. Sensibilidade colateral *in vitro* de quatro isolados de *Botrytis cinerea* resistentes e um sensível ao benomyl, a quatro fungicidas

Os 4 isolados resistentes ao benomyl (Mor At-5, Mor At-7, Mor At-9 e Mor At-10) e o sensível (Mor At-20), já empregados em ensaios anteriores, foram comparados quanto a sua sensibilidade colateral *in vitro* frente a 4 fungicidas (Tabela 2) nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000ppm. Tais fungicidas foram testados devido ao seu uso na cultura comercial do morango.

A metodologia de inoculação, incubação e avaliação das placas foram as mesmas empregadas no ensaio descrito no item 3.5.3.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (isolados) e 3 repetições, num total de 75 placas em cada ensaio.

3.5.6. Competição *in vitro* entre um isolado de *Botrytis cinerea* sensível e outro resistente ao benomyl

Este experimento, realizado em 1979, teve por objetivo se avaliar em condições de laboratório, a capacidade competitiva entre um isolado resistente e um sensível de *B. cinerea*, na ausência de benomyl.

Tabela 2. Fungicidas utilizados nos experimentos

Nome Técnico	Nome Químico	Nome Comercial	Classificação
Benomyl	Metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol-carbamato	Benlate 50 PM	Curativo Sistêmico (benzimidazol)
Captafol	N-(1,1,2,2-tetracloroetil)-4-cicloexeno-1,2-dicarboximida	Difolatan 480g/l	Protetor ou Residual de folhagem
Iprodione	Isopropilcarbamoil-1-(dicloro-3,5-fenil)-3-hidantina	Rovral 50 PM	Curativo Sistêmico (dicarboximida)
Captan	N-(triclorometiltio)-4-cicloexeno-1,2-dicarboximida	Orthocide 50 PM	Protetor ou Residual de folhagem
Procymidone	N-(3',5'-diclorofenil)-1,2-dimetilciclopropano-1,2-dicarboximida	Sumilex 50%	Curativo Sistêmico (dicarboximida)

3.5.6.1. Obtenção de uma suspensão constituída pela mistura de esporos de um isolado de *B. cinerea* sensível e de outro resistente ao benomyl

Para se proceder à mistura de esporos de ambos os isolados, foram escolhidos, dentre os 7 isolados obtidos em 1978, 2 que apresentavam características bem marcantes em relação à sensibilidade e resistência ao fungicida benomyl, ou seja, os isolados SH-2 e Mor At-1, respectivamente, conforme mostram os dados da Tabela 5 (Capítulo 4, Resultados).

A procedência dos dois isolados utilizados está descrita na Tabela 3.

A suspensão de esporos de cada isolado de *B. cinerea* foi obtida colocando-se, com auxílio de alça de platina, esporos dos isolados Mor At-1 e SH-2, independentemente, em 2 tubos de ensaio contendo 99,9ml de água destilada esterilizada mais 0,1ml de solução de Tween 80. A seguir foi feita a leitura em hemocitômetro, sendo que a concentração de esporos do isolado resistente ao benomyl foi quase o dobro do sensível, ou seja, 53×10^4 esporos/ml para o isolado resistente e 28×10^4 esporos/ml para o sensível.

Posteriormente foi feita a mistura dos esporos de ambos os isolados, colocando-se 2ml de cada suspensão em um tubo de ensaio (volume final de 4ml).

Tabela 3. Procedência dos dois isolados de *Botrytis cinerea* utilizados para se fazer a suspensão de esporos

Isolados	Procedência	Variedade de morango	Histórico	Ano de isolamento	Observações
Mor At-1: resistente a benomyl	Atibaia-SP	Morango de variedade Campinas ^{a/}	No começo da cultura: Cercobin e Benlate (4 vezes), sendo que a última aplicação havia sido feita há 4 meses. Atualmente: Difolatan, Orthocide, Fungisan e Antracol, aplicados alternadamente, 1 vez por semana ^{c/}	1978	Cultura comercial
SH-2: sensível a benomyl	Campinas-SP	Morango de variedade SH-2	Pulverizado com Benlate e Captan	1978	De plantas de estufa do IACb/

^{a/} Morango obtido de mercado, onde a maioria dos frutos pertence à variedade Campinas

^{b/} IAC - Instituto Agrônômico de Campinas

^{c/} Informação obtida de lavrador

3.5.6.2. Diluições da suspensão obtida e plaqueamento dos esporos

A partir da suspensão constituída pela mistura de esporos dos dois isolados, sensível e resistente, foi feita uma série de diluições, das quais foram plaqueadas apenas as 3 últimas, ou seja, aquelas com concentrações de esporos estimadas em $4,05 \times 10^3$, $4,05 \times 10^2$ e $4,05 \times 10^1$ conídios/ml.

Os esporos foram semeados em placas contendo 2 tipos de meios de cultura, a saber, BDA e BDA suplementado com 100ppm de benomyl. O plaqueamento dos conídios se deu colocando-se, com o auxílio de uma pipeta, 0,1ml da suspensão em cada placa e espalhando-se com alça de "Drigalski". Para a diluição mais concentrada, ou seja, a que continha aproximadamente $4,05 \times 10^3$ conídios/ml, foram feitas 5 repetições em meio de BDA e 5 em meio de BDA mais 100ppm de benomyl, enquanto que para as outras duas restantes, foram feitas 10 repetições em cada tipo de meio.

As 50 placas foram mantidas sob condições idênticas às já citadas em experimentos anteriores.

Foram feitas avaliações após 48, 72 e 96 horas da instalação do ensaio, quando já não havia mais possibilidade de aparecerem novas colônias, contando-se o número de esporos pelo verso das placas de Petri.

A segunda fase do experimento foi montada 7 dias após a instalação da primeira. Da mesma forma, foram montadas outras fases sucessivamente até a quinta, com intervalo de aproximadamente 7 dias entre cada uma delas. Todo o procedimento empregado para estas demais fases que se sucederam, foi idêntico ao da primeira, ou seja, foram utilizadas diluições de esporos dos isolados resistente e sensível contidos em placas com BDA, sendo as contagens de viáveis feitas após 48, 72 e 96 horas da instalação de cada ensaio.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de Isolados de *Botrytis cinerea* Resistentes ao Fungicida Benomyl, em Condições de Campo

Dentre os 52 isolados de *Botrytis cinerea* obtidos de frutos de morango procedentes de Atibaia, Campinas, Piedade, Valinhos e Piracicaba, pode-se notar, de acordo com a Tabela 1, que 23 foram provenientes de frutos de morango tratados com benomyl e/ou outro(s) fungicida(s), 21 foram obtidos de frutos que não receberam qualquer tratamento e de 8 não foi possível se obter informações sobre a aplicação ou não de algum produto químico. Observando-se a Tabela 4, verifica-se que dos 23 isolados acima citados, foram encontrados 12 resistentes a 100ppm de benomyl (sendo todos obtidos de morangos procedentes de Atibaia), e que nenhum caso de resistência foi constatado entre os 21 isolados provenientes de frutos não tratados procedentes de Piracicaba, o mesmo acontecendo com os 8 isolados restantes.

Tabela 4. Frequência de isolados de *Botrytis cinerea* de morango resistentes a 100 ppm de benomyl

Procedência	Ano de isolamento	nº de isolados		
		Testados	Sensíveis	Resistentes
Atibaia-SP (cc) ^{a/}	1978	3	0	3
Campinas-SP (IAC) ^{b/}	1978	3	3	0
Piedade-SP (cc) ^{a/}	1978	1	1	0
Atibaia-SP (cc) ^{a/}	1983	17	8	9
Valinhos-SP (cc) ^{a/}	1983	7	7	0
Piracicaba-SP (H) ^{c/}	1983	21	21	0
Total		52	40	12

^{a/} cc - Cultura comercial

^{b/} IAC - Instituto Agronômico de Campinas

^{c/} H - De plantas do campo experimental do Setor de Horticultura da ESALQ

Obs.: O critério empregado para se designar os isolados como sensíveis ou resistentes a benomyl, foi o crescimento ou não em meio de BDA mais 100 ppm do fungicida. Os que não cresceram foram considerados sensíveis e os que cresceram foram considerados resistentes.

4.2. Resposta *in vitro* de Isolados de *Botrytis cinerea* Sensíveis e Resistentes ao Benomyl, a Doses Crescentes do Fungicida

Os resultados obtidos com a realização deste ensaio, revelaram que não houve diferença significativa no comportamento de isolados de *B. cinerea* sensíveis e resistentes, quando em meio de BDA; mas em presença de doses crescentes de benomyl, a vantagem dos isolados resistentes foi nitidamente evidenciada (Tabela 5).

Embora em meio de cultura isento de fungicida, isolados resistentes e sensíveis não tenham diferido estatisticamente, foi possível se observar, dentro destas limitações, um crescimento diametral um pouco mais acentuado dos isolados sensíveis em relação aos resistentes. Neste sentido, verificou-se que os isolados cujas colônias apresentaram maior desenvolvimento em meio de BDA após 3 dias de incubação, foram os sensíveis SH-2, seguido por Torrey e Botr - Pied., sendo que este último teve crescimento idêntico ao do isolado resistente Mor At-3.

Foi constatada uma certa uniformidade no comportamento dos isolados resistentes, nas 3 crescentes concentrações do fungicida. Assim, observou-se que o isolado que apresentou maior crescimento micelial foi, nas 3 situações, Mor At-1, seguido por Mor At-2 e Mor At-3, o que resultou na mesma sequência em relação às médias de crescimento diametral das colônias.

Verificou-se também que, apesar dos isolados resistentes terem tido capacidade para crescerem a 1, 10 e 100ppm do fungicida, esta última concentração teve influência mais acentuadas sobre eles.

Tabela 5. Crescimento micelial de sete isolados de *Botrytis cinerea* aos três dias de incubação, em meio de BDA contendo diferentes concentrações de benomyl

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de benomyl indicadas (em ppm)				Média
	0	1,0	10,0	100,0	
Mor At-1 (R)	6,20a A	6,00a A	6,20a A	3,80a B	5,55a
Mor At-2 (R)	5,80a A	5,10a A	5,16a A	2,53a B	4,64b
Mor At-3 (R)	6,56a A	4,76a B	4,93a B	2,23a C	4,62b
Donner (S)	5,40a A	0,40b B	0,13b B	0b B	1,48c
Torrey (S)	6,63a A	0,36b B	0,36b B	0,33b B	1,92c
SH-2 (S)	6,83a A	0,73b B	0,26b B	0b B	1,95c
Botr-Pied (S)	6,56a A	0,50b B	0,16b B	0,43b B	1,91c
Média	6,28 A	2,55 B	2,45 B	1,33 C	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 1,0cm de diâmetro. Avaliação no terceiro dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

Outro fato a ser ressaltado é que não obstante 2 isolados sensíveis (Torrey e Botr-Pied.) terem apresentado um pequeno crescimento em presença de 100ppm de benomyl, isto não quer dizer que ambos difiram efetivamente dos outros dois sensíveis, já que estatisticamente eles comprovaram serem iguais.

4.3. Nível de Resistência dos Mutantes ao Benomyl

De acordo com os dados da Tabela 6, constatou-se que na ausência de benomyl, os isolados resistentes tiveram um desenvolvimento um pouco mais reduzido do que o do isolado sensível. Mas a comparação do crescimento diametral dos 5 isolados nas 4 crescentes dosagens do fungicida, evidenciou claramente a aptidão dos isolados resistentes de se desenvolverem em tais condições adversas, ao contrário do sensível, o qual teve seu crescimento drasticamente reduzido, já a 1ppm de benomyl.

Desta forma, verificou-se que os 4 isolados resistentes manifestaram ter capacidade de crescimento em situações de até 1000ppm de benomyl. Excluindo-se Mor At-9, os demais isolados resistentes tiveram uma redução gradativa no seu crescimento micelial, à medida que as concentrações do fungicida foram se tornando mais elevadas; isto só não foi observado em relação à dosagem mais alta, de 1000ppm, onde a diminuição no diâmetro das colônias de tais isolados foi bastante significativa, quando comparado com o ocorrido na concentração anterior.

Dentre os isolados resistentes, o Mor At-5 foi o que apresentou o mais intenso crescimento, tanto em BDA como em BDA acrescido

Tabela 6. Crescimento micelial de cinco isolados de *Botrytis cinerea* aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de benomyl

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de benomyl indicadas (em ppm)					Média
	0	1,0	10,0	100,0	1000,0	
Mor At-5 (R)	7,55a AB	7,76a A	7,40a AB	6,65a B	1,08a C	6,08a
Mor At-7 (R)	6,23bc A	6,65b A	6,56ab A	6,18ab A	0,78ab B	5,28b
Mor At-9 (R)	6,71ab A	6,25b A	4,35c B	1,71c C	0,88ab C	3,98d
Mor At-10 (R)	5,50c A	5,83b A	5,71b A	5,15b A	0,91ab B	4,62c
Mor At-20 (S)	7,68a A	1,06c B	0,45d BC	0d C	0b C	1,83e
Média	6,73 A	5,51 B	4,89 C	3,93 D	0,73 E	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,7cm de diâmetro. Avaliação no quarto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

de diferentes concentrações do fungicida benomyl, além de ter sido o isolado que dos 5, alcançou a maior média de crescimento diametral.

4.4. Avaliação da Esporulação de Um Isolado de *Botrytis cinerea* Sensível e de Quatro Resistentes, em Meio de Cultura Isento de Benomyl

Os resultados deste experimento, feito com o intuito de se avaliar a esporulação dos 5 isolados de *B. cinerea* revelaram, como já se supunha anteriormente, que em meio de BDA, ou seja, na ausência de fungicida, o isolado sensível (Mor At-20) levou grande vantagem quanto à produção de esporos, principalmente em comparação com 3 isolados resistentes ao benomyl (Tabela 7). Assim, em todas as repetições, Mor At-20 apresentou número mais elevado de esporos em comparação com os isolados resistentes, o que consequentemente fez com que tivesse a maior média em relação ao número de esporos/placa, presente nas várias repetições.

Com referência aos isolados resistentes, observou-se uma certa oscilação quanto à frequência de esporos, havendo muitas vezes consideráveis diferenças no número de esporos produzidos, tanto entre os diferentes isolados, como nas várias repetições de cada um deles. Desta forma, verificou-se que o isolado Mor At-9 apresentou número bem baixo de esporos em comparação com os demais isolados resistentes, em contraste com Mor At-10, o qual além de sobrepujar os outros resistentes, teve uma contagem de esporos bastante significativa.

Tabela 7. Capacidade de esporulação de quatro isolados benomyl-resistentes em comparação com um benomyl-sensível de *Botrytis cinerea*, em meio de BDA

Isolados	nº de esporos ($\times 10^6$)/placa ^{a/} nas repetições					Média
	1	2	3	4	5	
Mor At-5 (R)	136,00	107,00	144,84	110,00	44,29	108,42b
Mor At-7 (R)	63,00	137,50	116,65	89,50	32,64	87,85b
Mor At-9 (R)	41,00	71,50	181,50	46,00	46,00	77,20b
Mor At-10 (R)	120,00	159,50	185,00	159,50	124,50	149,70ab
Mor At-20 (S)	216,50	181,50	186,00	190,50	186,00	192,10a

^{a/} Aos oito dias de idade das culturas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

4.5. Sensibilidade Colateral *in vitro* de Quatro Isolados de *Botrytis cinerea* Resistentes e Um Sensível ao Benomyl, a Quatro Fungicidas

Confirmando os resultados anteriores, constatou-se que em meio de cultura isento de fungicida, o isolado sensível Mor At-20 apresentou crescimento micelial um pouco mais intenso do que os 4 resistentes ao benomyl, em pelo menos dois ensaios. Além disso, foi observado um certo aumento de sensibilidade em relação aos 4 fungicidas testados, por parte dos isolados resistentes, devido à resistência ao benomyl. Assim, notou-se que em todas as concentrações de captafol, o isolado sensível mostrou uma certa tendência a um desenvolvimento mais acentuado em comparação com os 4 resistentes, o que se tornou mais evidente nas dosagens de 1 a 10ppm de captan. E mesmo nas concentrações mais elevadas (de 100 e 1000ppm) deste último fungicida, a colônia de Mor At-20 teve diâmetro maior do que a de 3 isolados resistentes, só sendo superada por Mor At-5.

Com os outros 2 fungicidas, essa propensão a um crescimento mais acentuado por parte do isolado sensível, foi verificada em relação a apenas alguns isolados resistentes e mesmo assim, com pouca evidência.

Quanto ao desempenho dos 4 fungicidas testados, verificou-se que os que manifestaram melhor eficiência, pelo menos *in vitro*, no controle de *Botrytis cinerea* foram os dicarboximidas iprodione e procymidone, pois todos os isolados foram totalmente inibidos já a 10ppm de procymidone e a 100ppm de iprodione (Tabelas 8, 9, 10 e 11).

Tabela 8. Crescimento micelial de cinco isolados de *Botrytis cinerea* aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de captafol

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de captafol indicadas (em ppm)					Média
	0	1,0	10,0	100,0	1000,0	
Mor At-5 (R)	7,55a A	7,70a A	1,23a B	0,93a B	1,10a B	3,70a
Mor At-7 (R)	2,16b A	1,58c AB	0,36a B	0,26a B	0,21a B	0,91c
Mor At-9 (R)	7,25a A	6,93a A	1,28a B	0,90a B	1,08a B	3,48a
Mor At-10 (R)	3,33b A	4,11b A	0,50a B	0,45a B	0,35a B	1,74b
Mor At-20 (S)	7,70a A	7,71a A	1,71a B	1,08a B	1,66a B	3,97a
Média	5,59 A	5,60 A	1,01 B	0,72 B	0,88 B	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,7cm de diâmetro. Avaliação no quarto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

Tabela 9. Crescimento micelial de cinco isolados de *Botrytis cinerea* aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de iprodione

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de iprodione indicadas (em ppm)					Média
	0	1,0	10,0	100,0	1000,0	
Mor At-5 (R)	7,86a A	2,28a B	0,25a C	0 C	0 C	2,07a
Mor At-7 (R)	3,86c A	0,80c B	0,31a B	0 B	0 B	0,99b
Mor At-9 (R)	7,03a A	1,70ab B	0,38a C	0 C	0 C	1,82a
Mor At-10 (R)	5,38b A	1,25bc B	0,21a C	0 C	0 C	1,36b
Mor At-20 (S)	7,76a A	1,65ab B	0,33a C	0 C	0 C	1,94a
Média	6,37 A	1,53 B	0,29 C	0 C	0 C	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,7cm de diâmetro. Avaliação no quarto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

Tabela 10. Crescimento micelial de cinco isolados de *Botrytis cinerea* aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de captan

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de captan indicadas (em ppm)					Média
	0	1,0	10,0	100,0	1000,0	
Mor At-5 (R)	6,33a A	4,86ab A	5,11ab A	6,28a A	0,55a B	4,62a
Mor At-7 (R)	4,11b A	3,95bc A	3,90bc A	3,90bc A	0,23a B	3,21b
Mor At-9 (R)	3,81b A	3,10bc A	1,88c AB	2,48c A	0,11a B	2,27c
Mor At-10 (R)	3,48b AB	2,83c B	5,25ab A	4,91ab A	0,26a C	3,34b
Mor At-20 (S)	6,28a A	6,18a A	6,03a A	6,00a A	0,46a B	4,99a
Média	4,80 A	4,18 A	4,43 A	4,71 A	0,32 B	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,7cm de diâmetro. Avaliação no quarto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

Tabela 11. Crescimento micelial de cinco isolados de *Botrytis cinerea* aos quatro dias de incubação, em meio de cultura de BDA contendo diferentes concentrações de procymidone

Isolados	Crescimento diametral das colônias (em cm) ^{a/} nas concentrações de procymidone indi- cadas (em ppm)					Média
	0	1,0	10,0	100,0	1000,0	
Mor At-5 (R)	7,95a A	0,55a B	0 B	0 B	0 B	1,70a
Mor At-7 (R)	5,75c A	0,28a B	0 B	0 B	0 B	1,20b
Mor At-9 (R)	6,60b A	0,35a B	0 B	0 B	0 B	1,39b
Mor At-10 (R)	6,98b A	0,36a B	0 B	0 B	0 B	1,46ab
Mor At-20 (S)	8,18a A	0,51a B	0 B	0 B	0 B	1,73a
Média	7,09 A	0,41 B	0 C	0 C	0 C	

^{a/} Média de três repetições, sendo que cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,7cm de diâmetro. Avaliação no quarto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

(R): isolado resistente a benomyl

(S): isolado sensível a benomyl

4.6. Competição *in vitro* entre Um Isolado de *Botrytis cinerea* Sensível e Outro Resistente ao Benomyl

Os dados da Tabela 12 nos mostram que, apesar de se ter empregado uma concentração inicial de esporos bem mais elevada para o isolado resistente em relação ao sensível (53×10^4 esporos/ml para o isolado resistente e 28×10^4 esporos/ml para o isolado sensível), na fase 2 esta situação já estava invertida, devido ao declínio no número de esporos do isolado resistente, o qual estava sendo sobrepujado pelo sensível. Mas da fase 3 em diante, a frequência de esporos do isolado resistente foi ficando cada vez mais alta, superando a do sensível. Nas duas últimas fases, foi constatado um número bem mais elevado de esporos nas placas contendo BDA suplementado com 100ppm de benomyl do que naquelas contendo somente BDA, razão pela qual tornou-se impossível fazer uma avaliação do número de esporos resistentes e sensíveis.

Tabela 12. Efeito da competição em meio de cultura na frequência relativa de isolados de *Botrytis cinerea* resistente e sensível ao fungicida benomyl

Fases do experimento	nº ^{a/} e % de esporos ou de colônias de isolados de <i>B. cinerea</i> resistente (R) e sensível (S) ao benomyl			
	nº		%	
	R	S	R	S
0 ^{b/}	53	28	65,44	34,56
1	172	53	76,45	23,55
2	43	61	41,34	58,66
3	157	69	69,47	30,53

^{a/} Total de contagem em diluição e nº de placas variáveis, mas constante dentro da mesma fase.

^{b/} Os nºs da fase 0 correspondem a estimativas de hemocitômetro (nº x 10⁴ conídios/ml).

5. DISCUSSÃO

Relatos de literatura evidenciam o fato de que o uso contínuo de um único fungicida seletivo ou fungicidas seletivos pertencentes ao mesmo grupo de resistência cruzada, poderá promover o desenvolvimento de linhagens de fungos resistentes a ele(s) (DEKKER, 1977; 1981; UESUGI, 1978; DELP, 1980). Assim, a descoberta de que os 3 isolados de *Botrytis cinerea* obtidos em 1978, de frutos de morango procedentes de Atibaia (Mor At-1, Mor At-2 e Mor At-3), se mostraram resistentes ao benomyl não foi inesperada, desde que este produto vinha sendo aplicado em condições de campo, no estado de São Paulo, a partir de 1969 (REMIRO e KIMATI, 1974).

Por outro lado, a constatação de que os isolados Donner, Torrey e SH-2 foram sensíveis ao benomyl, apesar dos frutos terem sido pulverizados com este fungicida, pode ser explicada com base na procedência dos morangos a partir dos quais tais isolados foram obtidos (plantas de estufa do IAC-Instituto Agrônomo de Campinas). Na situação deste estabelecimento, o principal objetivo é se obter mudas sadias, livres

de vírus, não havendo maiores preocupações no sentido de se manter os frutos totalmente isentos de doenças, já que eles não vão ser comercializados. Assim, as aplicações de benomyl não são tão constantes, havendo intervalos de pulverizações relativamente longos. Nestas condições de baixa pressão de seleção, mesmo que linhagens resistentes tenham chance de se desenvolverem durante os períodos de aplicação do produto, nos intervalos das pulverizações, de acordo com DEKKER (1981), as formas sensíveis do patógeno podem competir com as resistentes, e a população tem então a oportunidade de retornar ao equilíbrio, voltando predominantemente a ser sensível. Em relação a esse fenômeno, GEORGOPOULOS (1977) já havia salientado que quanto maior a pressão de seleção, mais rápida será a mudança da população sensível em direção à resistente. Uma maior frequência de aplicações do produto implica em um maior tempo de exposição à droga, favorecendo a proliferação das formas resistentes. Um caso interessante que pode bem ilustrar esta situação foi verificado na Grécia, onde a frequência de uma linhagem benomyl-resistente de *Cercospora beticola* aumentou de 3,5% para 91,5%, com apenas duas aplicações do fungicida em um mês (DOVAS *et alii*, 1976). Em relação a esse fenômeno, HISADA *et alii* (1981) também obtiveram resultados semelhantes, sobre o efeito da pressão de seleção sobre os mutantes resistentes.

Embora 9 isolados resistentes ao benomyl, tenham sido provenientes de frutos que não foram tratados com este fungicida, tal informação, obtida de lavrador, provavelmente estava incorreta. Os resultados obtidos sugerem que o fungicida benomyl deve ter sido empregado na cultura de morango a partir da qual tais isolados foram conseguidos.

A justificativa para tal afirmação está baseada no fato de que, se foram encontrados isolados de *B. cinerea* resistentes ao benomyl, isto é sinal de que os mesmos já haviam tido contacto com este produto anteriormente, pois só assim é que haveria possibilidade de serem selecionados isolados resistentes a ele. Pois graças à pressão de seleção exercida pelo fungicida é que as formas sensíveis são eliminadas, enquanto que as resistentes são selecionadas e têm a chance de se desenvolver. Se benomyl nunca tivesse sido aplicado nesta cultura, logicamente isolados resistentes seriam muito mais difíceis de serem encontrados, pois mesmo que linhagens resistentes surgissem espontaneamente em meio à população sensível do fungo, elas seriam provavelmente logo sobrepujadas pelas originais, fazendo valer os preceitos da seleção natural. Além disso, na ausência de um agente seletivo, segundo DELP (1980), os mutantes podem aparecer naturalmente, mas a uma frequência muito baixa, provavelmente menos do que 1 propágulo em 10^8 . E desde que formas resistentes raramente apresentam uma vantagem adaptativa sobre as selvagens, elas não têm nenhuma chance de se desenvolverem a ponto de atingirem números detectáveis. E mesmo que possuam adaptabilidade igual a das sensíveis, elas não alcançarão números elevados na população, a menos que frequentes aplicações do fungicida, permitam que tal fato aconteça. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de esporos resistentes a benomyl, provenientes de culturas vizinhas onde este fungicida estava sendo aplicado, tenham alcançado o local em que se encontravam os morangos considerados.

Em vista destas argumentações, é evidente que a constatação de que os isolados Mor Pira-1 até Mor Pira-21 foram todos sensíveis a benomyl, já era praticamente esperada, desde que os frutos não haviam sido tratados com este fungicida.

Em relação aos isolados Botr-Pied e Mor Val-1 até Mor Val-7, sobre os quais não foi possível se obter informações sobre os tratamentos recebidos, desde que tais isolados foram todos sensíveis ao benomyl, pode-se alegar duas hipóteses. Assim, como eles foram originários de cultura comercial de morango, ou os frutos não foram tratados com o referido fungicida, ou então as aplicações do mesmo não foram muito frequentes, propiciando, desta forma, uma baixa pressão de seleção, a qual não foi suficiente para promover o desenvolvimento dos mutantes resistentes que porventura possam ter aparecido.

Vários autores têm relatado a ocorrência de linhagens de fungos resistentes a altos níveis de fungicidas sistêmicos, principalmente o benomyl. Assim, os mutantes benomyl-resistentes de *B. cinerea* isolados por BOLLEN e SCHOLTEN (1971), mesmo a 1000ppm de benomyl não apresentaram completa inibição no crescimento, enquanto que o tipo selvagem foi eliminado a 0,5ppm do produto, no meio. Resultados semelhantes foram obtidos com linhagens benomyl-resistentes de *Sphaerotheca fuliginea* (DEKKER, 1977), ao passo que as formas resistentes de *Mycosphaella fragariae*, obtidas por REMIRO e KIMATI (1974), suportaram até 100ppm do referido fungicida e a forma sensível, 1ppm. Já em relação a outro fungicida do mesmo grupo, tiofanato-metílico, IIDA (1975) observou a presença de isolados de *Venturia inaequalis* que resistiram

até 1000 ppm, sendo que a forma sensível foi inibida a 10ppm deste fungicida. Portanto, a constatação de que 4 isolados resistentes de *B. cinerea* alcançaram um grau de resistência tão elevado, ou seja, 1000ppm de benomyl, é mais um caso que se acrescenta aos já mencionados.

Desde que a dose de benomyl recomendada para aplicações em condições de campo, é de 350ppm, a presença de linhagens de *B. cinerea* resistentes a 100ppm deste produto não causaria maiores problemas, mas a ocorrência de formas resistentes a 1000ppm realmente implicaria em falhas no controle. Acontece que muitas vezes são empregadas dosagens de até 1000ppm ou mais deste fungicida, e sendo assim, também não haveria motivo para se preocupar com os mutantes que resistem até 1000ppm do produto. À primeira vista, é provavelmente assim que se veria a situação. Mas, analisando mais profundamente, pode-se concluir que, se tais mutantes resistentes chegaram a atingir um nível tão alto de resistência, foi justamente devido à elevada pressão de seleção (dosagens de 1000ppm ou mais) imposta a eles. Mas tal fato não ocorreu subitamente. Segundo DEKKER (1982a) e BEEVER e BRIEN (1983), sob os efeitos de uma constante pressão de seleção, as linhagens resistentes que porventura tenham um baixo nível de resistência, em consequência do longo tempo de exposição ao fungicida, poderiam, eventualmente, através de trocas genéticas, adquirir uma melhor adaptabilidade e um aumento no grau de resistência. A aquisição de um nível tão alto de resistência ao benomyl (1000ppm) pelos 4 isolados de *B. cinerea* testados, provavelmente deve ter ocorrido desta maneira.

Com base nestas argumentações, poderíamos até questionar se, com dosagens ainda mais altas de benomyl, não estaríamos forçando o desenvolvimento de mutantes ainda mais "aperfeiçoados", com grau de resistência e adaptabilidade ainda mais elevados.

A adaptabilidade de mutantes resistentes a drogas, comparada com aquela da linhagem selvagem do fungo, é um fator primordial para a sobrevivência e estabelecimento de uma população de patógenos resistentes. Nas condições dos experimentos realizados observou-se que, de uma forma geral, houve uma vantagem adaptativa do isolado sensível de *B. cinerea* (Mor At-20) em relação aos 4 resistentes ao benomyl (Mor At-5, Mor At-7, Mor At-9 e Mor At-10), quando em meio sem fungicida, pelo menos em relação a um ou dois dos parâmetros analisados (crescimento micelial e esporulação em meio de BDA). Tais resultados confirmam mais uma vez o fato de que a aquisição de resistência a drogas, geralmente traz como consequência uma menor competitividade para os mutantes que se tornam resistentes a elas, pois, de acordo com DELP (1980), tais mutantes raramente têm uma vantagem adaptativa sobre as formas selvagens. Neste sentido, um dos fatores que contribuem para essa menor adaptabilidade dos mutantes é a alteração na taxa de crescimento, quando comparada com a de suas formas originais sensíveis. Como regra geral, na ausência da droga, essa alteração implica numa menor taxa de crescimento para os mutantes resistentes, havendo, portanto, vantagem seletiva para os indivíduos sensíveis que, após algum tempo, acabarão sobrepujando os resistentes (GURGEL e AZEVEDO, 1969). Assim, em experimentos de competição onde se utilizou uma mistura de esporos de *B. cinerea* sensíveis

e resistentes aos dicarboximidas, GULLINO e GARIBALDI (1981) inoculando em meio de cultura isento de fungicida, e HISADA *et alii* (1981) inoculando em plantas, constataram depois de um certo tempo, o desaparecimento dos mutantes resistentes. Tais resultados concordam com o que ocorreu durante os experimentos de competição a que foram submetidos o isolado sensível (SH-2) e o resistente ao benomyl (Mor At-1), pelo menos até a fase 2. Desta forma, mesmo empregando-se uma concentração inicial de esporos bem maior para o isolado resistente do que para o sensível verificou-se que, até a fase 2, houve uma vantagem seletiva para as formas selvagens, as quais sobrepujaram as resistentes. No entanto, a partir daí ocorreu o inverso, ou seja, houve predominância das formas resistentes, numa indicação de que estas são iguais ou mais competitivas do que as sensíveis (BERGAMIN *et alii*, 1975) ou que convivem heterocarioticamente com as sensíveis (DEKKER, 1982b).

Os ensaios conduzidos por PANAGIOTAKU e MALATHRAKIS (1981) também demonstraram uma menor adaptabilidade das formas resistentes, já que o crescimento das linhagens dicarboximida-resistentes de *B. cinerea* em meio de BDA, foi mais lento do que o das linhagens sensíveis do fungo.

O prejuízo das formas resistentes a fungicidas também pode ser traduzido em termos de menor produção de esporos, como foi verificado com mutantes de *Cladosporium cucumerinum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*, resistentes a pimaricin (DEKKER, 1982a) e mutantes de *Monilinia laxa* resistentes a benomyl (OGAWA *et alii*, 1984). Entretanto, outros autores relatam a ocorrência de formas resistentes aos benzimi-

dazóis, que mostraram possuir adaptabilidade igual a das originais sensíveis em *Penicillium digitatum* (WILD e RIPPON, 1975); *Cercospora beticola* (RUPPEL, 1975; DOVAS *et alii*, 1976); *Sphaerotheca fuliginea* (SCHEPERS, 1984).

De acordo com BÉRGAMIN *et alii* (1975), as diferenças nas taxas de crescimento dos vários mutantes resistentes a drogas, podem ser explicadas em termos da importância do gene mutado. Assim, considerando-se que o gene que confere resistência à droga não foi adicionado ao cromossomo do microorganismo e sim que provém de uma mutação num gene preexistente o qual, a partir do momento em que se deu a mutação, deixou de executar sua antiga função, para desempenhar outra, a taxa de crescimento do mutante poderá ser reduzida ou não, dependendo da importância do gene mutado. Desta forma, se aquele gene preexistente, que foi alterado pela mutação, controlasse uma importante função no metabolismo do microorganismo, o mutante, que não mais o possui, terá sua taxa de crescimento diminuída. Se, porém, esse gene controlasse uma função secundária para a célula como, por exemplo, sua morfologia, o mutante não terá alterada sua taxa de crescimento. E, se porventura, a mutação para resistência à droga trouxer, como efeito colateral, uma aceleração em algum processo importante para a célula, isto poderá ocasionar, consequentemente, um aumento na taxa de crescimento.

Embora um fungicida dicarboximida (Ronilan), tenha sido empregado nas plantações de morango, não se observou o desenvolvimento de resistência de um alto nível em relação aos dois dicarboximidas testados (procymidone e iprodione). Tais resultados concordam com os obtidos nos

ensaios conduzidos por BEEVER e BRIEN (1983), onde foi constatada a presença, em condições de campo, de linhagens de *B. cinerea* apresentando baixo nível de resistência aos dicarboximidas. Além disso, dos 4 fungicidas testados, iprodione e procymidone foram os mais eficientes no controle de *B. cinerea*, pois todos os isolados foram completamente inibidos já a 10ppm de procymidone e a 100ppm de iprodione. Consequentemente, os dicarboximidas poderiam substituir os benzimidazóis onde a ocorrência de linhagens de fungos resistentes a fungicidas deste grupo, tenham causado falhas no controle. Tal sugestão, baseada nos resultados obtidos, também encontra justificativas nas afirmações de BEEVER e BRIEN (1983). Segundo estes autores, duas razões podem ser sugeridas para apontar a diferença na situação entre resistência aos dicarboximidas e aos benzimidazóis. Primeiramente, as linhagens resistentes aos dicarboximidas encontradas no campo, apresentam baixo nível de resistência; a segunda diferença é que enquanto aquisição de resistência aos benzimidazóis não parece conferir qualquer perda de adaptabilidade à linhagem, aquisição de resistência aos dicarboximidas, sim.

Em relação ao fenômeno da sensibilidade colateral, os resultados obtidos não foram tão evidentes como aconteceu em casos já relatados em literatura, como o de mutantes fosforotiolate-resistentes de *Pyricularia oryzae*, os quais apresentaram um aumento de sensibilidade a fosforamidades (UESUGI *et alii*, 1974); o aumento de sensibilidade a zineb por isolados de *Verticillium malthousei* resistentes a benomyl (LAMBERT e WUEST, 1975); e ainda o aumento de sensibilidade a captan e prochloraz por um isolado benomyl-resistente de *Monilinia fructicola* (DIJKHUIZEN

et alii, 1983). Mesmo assim, nas condições dos experimentos realizados, notou-se que 3 dos 4 isolados benomyl-resistentes, mostraram tendência a serem mais sensíveis do que o isolado benomyl-sensível, aos 4 fungicidas testados (captan, captafol, procymidone e iprodione).

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Isolados de *Botrytis cinerea*, agente do mofo cinzento do morango, resistentes ao benomyl, foram obtidos de plantações comerciais de Atibaia.

2. O nível de resistência de 4 isolados resistentes foi ≥ 1000 ppm de benomyl.

3. Um isolado sensível apresentou maior vantagem adaptativa, em termos de crescimento micelial e/ou esporulação em meio de BDA, em relação a 4 isolados resistentes ao benomyl.

4. Dos 4 isolados benomyl-resistentes, 3 mostraram tendência a serem mais sensíveis do que um isolado benomyl-sensível, aos fungicidas captan, captafol, procymidone e iprodione.

5. Todos isolados testados, incluindo 4 resistentes e 1 sensível a benomyl, continuam altamente sensíveis aos fungicidas procymidone e iprodione.

LITERATURA CITADA

- BEEVER, R.E. e R.J.W.BYRDE, 1982. Resistance to the dicarboximide fungicides. *In*: DEKKER, J. e S.G.GEORGOPOULOS, Eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p.101-117.
- BEEVER, R.E. e H.M.R.BRIEN, 1983. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Wellington, 26(3):391-400.
- BERGAMIN FILHO, A.; H.KIMATI e J.L.AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 1(1):31-42.
- BIER, O., 1965. *Bacteriologia e Imunologia*. 12^a ed. São Paulo, Ed.Melhoramentos, 983p.
- BOESEWINKEL, H.J., 1976. Storage of fungal cultures in water. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 66:183-185.
- BOLLEN, G.J. e G.SCHOLTEN, 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of plant pathology*. Wageningen, 77: 83-90.

- BROWN, A.W.A., 1961. Negatively-correlated insecticides, a possible countermeasure for insecticide resistance. *Pest Control*. Cleveland, 29(9):24,26,40-42. Apud *Biological Abstracts*. Philadelphia, 37: 1119, 1962.
- BRYSON, V. e W.SZYBALSKI, 1955. Microbial drug resistance. *Advances in Genetics*. New York, 7:1-46.
- CARDOSO, C.O.N., 1980. Doenças do morangueiro - *Fragaria vesca*. In: GALLI, F., Coord. *Manual de Fitopatologia; Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, v.2, cap.28, p.392-403.
- DAVIDSE, L.C., 1982. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J. e S.G. GEORGOPOULOS, Eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p.60-70.
- DEKKER, J., 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review of Phytopathology*. California, 14:405-428.
- DEKKER, J., 1977. Resistance. In: MARSH, R.W., Ed. *Systemic Fungicides*. 2^a ed. London, Longman, cap.9, p.176-197.
- DEKKER, J., 1981. Strategies for avoiding resistance to fungicides. In: JENKYN, J.F. e R.T.PLUMB, Eds. *Strategies for the Control of cereal disease*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, p.123-133.
- DEKKER, J., 1982a. Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests? In: DEKKER, J. e S. G.GEORGOPOULOS, Eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 128-138.

- DEKKER, J., 1982b. Countermeasures for avoiding fungicide resistance. In: DEKKER, J. e S.G.GEORGOPOULOS, Eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p.177-186.
- DELP, C.J., 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Disease*. St.Paul, 64(7):652-658.
- DIJKHUIZEN, J.P.; J.M.OGAWA e B.T.MANJI, 1983. Activity of captan and prochloraz on benomyl-sensitive and benomyl-resistant isolates of *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*. St.Paul, 67(4):407-409.
- DOVAS, C.; G.SKYLAKAKIS e S.G.GEORGOPOULOS, 1976. The adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in northern Greece. *Phytopathology*. Lancaster, 66:1452-1456.
- EDGINGTON, L.V.; K.L.KHEW e G.L.BARRON, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*. Lancaster, 61:42-44.
- 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., 1971. Resenha de dados obtidos sobre o método de preservação de fungos em água destilada. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*. Mossoró, 4(4):89-91.
- FIGUEIREDO, M.B. e C.P.V.PIMENTEL, 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 1(4): 299-302.

- FLETCHER, J.T. e M.J.GRIFFIN, 1981. The sensitivity of populations of *Erysiphe graminis* to triadimefon and *Botrytis cinerea* to iprodione. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6):239.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1969. The problem of fungicide resistance. *Bio Science*. Washington, 19(11):971-973.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1977. Pathogens become resistant to chemicals. In: HORSFALL, J.G. e E.B.COWLING, Eds. *Plant Disease; an advanced treatise*. New York, Academic Press, v.1, p.327-345.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1982. Cross-resistance. In: DEKKER, J. e S.G. GEORGOPOULOS, Eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 53-59.
- GEORGOPOULOS, S.G. e C.ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. *Annual Review of Phytopathology*. California, 5:109-130.
- GULLINO, M.L. e A.GARIBALDI, 1981. Competition in vitro and in vivo between strains of *Botrytis cinerea* Pers. sensitive and resistant to dicarboximides. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6):243.
- GURGEL, J.T.A. e J.L.AZEVEDO, 1969. Resistência de microorganismos aos antibióticos. In: LACAZ, C.S. *Antibióticos*. 2^a ed. São Paulo, Ed. Sarvier, p.322-347.
- HARTILL, W.F.T.; G.R.TOMPKINS e P.J.KLEINSMAN, 1983. Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*, to acylalazines in *Phytophthora infestans*, and to guazatine in *Penicillium italicum*. *New Zealand journal of Agricultural Research*. Wellington, 26(2):261-269.

- HECKLY, R.J., 1978. Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. New York, 24:1-53.
- HISADA, Y.; H.TAKAKI; T.KATO; T.OZAKI e Y.KAWASE, 1981. Fitness of procymidone-resistant *Botrytis cinerea* strains developed in vitro. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6):243-244.
- IIDA, W., 1975. On the tolerance of plant pathogenic fungi and bacteria to fungicides in Japan. *Japan Pesticide Information*. Tokyo, 23:13-16.
- KATAN, T., 1981. Resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* from cucumbers, tomatoes, strawberries and roses. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6):244.
- KATAN, T., 1982. Persistence of dicarboximide-fungicide resistance in populations of *Botrytis cinerea* in a warm, dry temperate agroclimate. *Phytoparasitica*, Bert Dagan, 10(3):209-211.
- KIMATI, H., 1978. Fungicidas. In: GALLI, F., Coord. *Manual de Fitopatologia; Principios e Conceitos*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. v.1, cap.18, p.325-373.
- KIRBY, A.H.M., 1972. Progress towards systemic fungicides. *PANS*. London, 18(1):1-33.
- KURAMOTO, T., 1976. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in strains of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in Japan. *Plant Disease Reporter*. Washington, 60(2):168-172.
- LAMBERT, D.H. e P.J.WUEST, 1975. Increased sensitivity to zineb for *Verticillium dahliae* strains tolerant to benomyl. *Phytopathology*. Lancaster, 65:637-638.

- LEBEN, C.; D.M.BOONE e G.W.KEITT, 1955. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. IX Search for mutants resistant to fungicides. *Phytopathology*. Lancaster, 45:467-472.
- LORENZ, G. e E.H.POMMER, 1982. Pectolytic and cellulolytic enzymes of dicarboximide-sensitive and resistant strains of *Botrytis cinerea*. *EPPO Bulletin*. 12(2):145-149. Apud *Review of plant pathology*, Kew, 62(1):26, 1983.
- MENTEN, J.O.M.; C.G.MACHADO; E.MINUSSI; C.CASTRO e H.KIMATI, 1976. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, 1(2):57-66.
- MILLER, M.W. e J.T.FLETCHER, 1974. Benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* isolates from glasshouse crops. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 62:99-103.
- NEWTON, B.A., 1965. Mechanisms of antibiotic action. *Annual Review of Microbiology*. California, 19:209-240.
- OGAWA, J.M.; J.D.GILPATRICK e L.CHIARAPPA, 1977. Review of plant pathogens resistant to fungicides and bacteriocines. *FAO Plant Protection Bulletin*. Rome, 25(3):97-111.
- OGAWA, J.M.; B.T.MANJI; R.M.BOSTOCK; V.M.CAÑEZ e E.A.BOSE, 1984. Detection and Characterization of benomyl-resistant *Monilinia laxa* on apricots. *Plant Disease*. St.Paul, 68(1):29-31.
- PANAGIOTAKU, M.G. e N.E.MALATHRAKIS, 1981. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 87(6):242.

- PEPIN, H.S. e E.A.MacPHERSON, 1982. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to benomyl and captan in the field. *Plant Disease*. St. Paul, 66:404-405.
- PEREIRA, A.L.G.; A.G.ZAGATTO e M.B.FIGUEIREDO, 1970. Preservação e virulência de bactérias mantidas em água destilada. *O Biológico*. São Paulo, 36:311-314.
- PESSANHA, B.M.R.; T.IAMAMOTO e H.J.SCARANARI, 1970. Benlate e cercobin-fungicidas novos no controle das manchas foliares do morangueiro (*Fragaria vesca* L.). *O Biológico*. São Paulo, 36(5):121-128.
- PIMENTEL, C.P.V.; G.P.B.PITTA e M.B.FIGUEIREDO, 1980. Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. *O Biológico*. São Paulo, 46(12):281-287.
- REMIRO, D. e H.KIMATI, 1974. Resistência a benomyl e tiofanato em *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. *O Biológico*. São Paulo, 40(1):22-24.
- RUPPEL, E.G., 1975. Biology of benomyl-tolerant strains of *Cercospora beticola* from sugar beet. *Phytopathology*. Lancaster, 65:785-789.
- SCHEPERS, H.T.A.M., 1984. Persistence of resistance to fungicides in *Sphaerotheca fuliginea*. *Netherlands journal of plant pathology*. Wageningen, 90(4):165-171.
- SCHNITZER, R.J. e E.GRUNBERG, 1957. *Drug Resistance of Microorganisms*. New York, Academic Press. 395p.
- SHABI, E. e T.KATAN, 1979. Genetics, Pathogenicity and stability of carbendazin resistant isolates of *Venturia pirina*. *Phytopathology*. Lancaster, 69:267-269.

- SHERIDAN, J.E.; J.H.TICKLE e Y.S.CHIN, 1968. Resistance to mercury of *Pyrenophora avenae* (conidial state *Helminthosporium avenae*) in New Zealand seed oats. *New Zealand Journal of Agriculture Research*. Wellington, 11(3):601-606.
- SZKOLNIK, M. e J.D.GILPATRICK, 1969. Apparent resistance of *Venturia inaequalis* to dodine in New York apple orchards. *Plant Disease Reporter*. Washington, 53(11):861-864.
- UESUGI, Y., 1978. Resistance of phytopathogenic fungi to fungicides. *Japan Pesticide Information*. Tokyo, (35):5-9.
- UESUGI, Y.; M.KATAGIRI e O.NODA, 1974. Negatively correlated cross-resistance and synergism between phosphoramidates and phosphorothiolates in their fungicidal actions on rice blast fungi. *Agricultural and Biological Chemistry*. Tokyo, 38(5):907-912.
- WATANABE, T., 1971. Infectious drug resistance in bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, 56:43-98.
- WICKS, T., 1974. Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. *Plant Disease Reporter*. Washington, 58(10):886-889.
- WICKS, T., 1977. Tolerance to benzimidazole fungicides in blue mold (*Penicillium expansum*) on pears. *Plant Disease Reporter*. Washington, 61(6):447-449.
- WILD, B.L. e L.E.RIPPON, 1975. Response of *Penicillium digitatum* strains to benomyl thiabendazole and sodium O-phenylphenate. *Phytopathology*. Lancaster, 65:1176-1177.