**SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA, PATOGÊNICA E SEROLÓGICA DE
Colletotrichum spp. DO MORANGO (*Fragaria* spp.)**

SEIJI IGARASHI
Eng^o Agr^o - IAPAR

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
Julho de 1984

A

meus pais,

minha esposa,

meus filhos e

meus irmãos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos às instituições e às pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, em especial às relacionadas a seguir:

Ao Profº Dr. Hiroshi Kimati, pela sugestão do assunto e valiosa orientação, e também pela amizade, interesse e incentivo, durante o Curso de Pós-Graduação.

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

Ao Instituto Agronômico do Paraná, que possibilitou a participação do Curso de Pós-Graduação e a realização do presente trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela concessão da Bolsa de Estudos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela complementação da Bolsa de Estudos.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo.

Aos colegas da Área Técnica de Fitopatologia do IAPAR, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização do presente trabalho.

ÍNDICE

1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1 Nomenclatura e Taxonomia	7
4.2 Resistência de Fungos a Fungicidas	12
4.3 Serologia	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 Local e Época de Investigação	15
5.2 Isolados Utilizados	15
5.3 Técnica de Isolamento	15
5.4 Obtenção e Padronização de Inóculo	16
5.5 Preparo dos Meios de Cultura com Fungicidas	16
5.6 Experimentos Realizados	17
5.6.1 Frequência de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do morango sensíveis e resistentes ao benomil e nível de resistência ao benomil.	17
5.6.2 Sensibilidade "in vitro" de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do morango resistentes e sensíveis ao benomil, a sete fungicidas.	17
5.6.3 Variabilidade morfológica dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. e formação de setas ..	21
5.6.4 Provas de patogenicidade e Resistência va rietal	22
5.6.4.1 Preparo de mudas	22
5.6.4.2 Método de inoculação	22
5.6.4.3 Delineamento experimental	23
5.6.4.4 Critério de avaliação	23
5.6.5 Caracterização serológica de <i>Colletotri chum</i> spp. de morango	23
5.6.5.1 Antígenos empregados para obten ção de anti-soros	24

5.6.5.2	Obtenção e preparo dos anti-soros	24
5.6.5.3	Preparo de antígeno para reações serológicas	24
5.6.5.4	Testes serológicos	25
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.1	Frequência de Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do morango Sensíveis e Resistentes ao benomil e Nível de Resistência ao benomil	26
6.2	Sensibilidade "in vitro" de Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do Morango, Resistentes e Sensíveis ao benomil, a sete fungicidas	30
6.3	Variabilidade Morfológica dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do Morango e Formação de Setas	37
6.4	Prova de Patogenicidade	41
6.5	Reação de Três Cultivares de Morango a Sete Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	42
6.6	Comparação Serológica dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. do Morango	42
6.6.1	Testes serológicos	42
6.7	Discussão geral	50
7.	CONCLUSÕES	52
8.	LITERATURA CITADA	53

SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, PATO
GÊNICA E SEROLÓGICA DE *Colletotrichum* spp. DO MORANGO (*Fragari
a* spp.)

SEIJI IGARASHI

Orientador: HIROSHI KIMATI

1. RESUMO

De um total de 33 isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes cultivares de morango e regiões do Estado de São Paulo, 27 se mostraram resistentes e seis foram sensí
veis a 100 ppm do benomil em meio de cultura (BDA). Dois isola
dos sensíveis escolhidos ao acaso não se desenvolveram em 10 ppm, ao passo que cinco dos isolados resistentes cresceram até em 1000 ppm de benomil. Isolados sensíveis e resistentes ao be
nomil não mostraram diferenças marcantes em sua suscetibili
dade a diferentes concentrações de sete outros fungicidas, dos
quais, o mais eficiente foi o propiconazole, seguido de capta
fol e chlorothalonil.

Estudos morfológicos, serológicos e de patogeni
cidade, evidenciaram a ocorrência de pelo menos duas espécies
de *Colletotrichum*: uma, que corresponde ao *C. fragariae* Brooks
e a outra, não identificada, semelhante a *C. acutatum* Simmonds.
As duas espécies pertencem ao *C. gloeosporioides* sensu ARX
(1957).

Quando comparados com isolados de *C. fragariae*, os isolados semelhantes a *C. acutatum* foram menos patogênicos a pecíolos de três variedades de morango, apresentaram menor dimensão de conídios, coloração mais clara, crescimento mais lento em BDA, maior resistência a benomil e foram antigenicamente semelhantes entre si.

SENSITIVITY TO FUNGICIDES, AND MORPHOLOGICAL, PATHOGENICAL AND
SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* spp OF
STRAWBERRIES (*Fragaria* spp).

SEIJI IGARASHI

ADVISER: Hiroshi Kimati

2. SUMMARY

Out of 33 isolates of *Colletotrichum* spp. collected from different strawberry cultivars and regions of state of São Paulo, 27 were resistant and six were sensitive to benomyl at 100 ppm in PDA culture. Two isolates randomly taken among the six sensitive isolates did not grow at 10 ppm concentration, whereas five resistant isolates were resistant to benomyl did not show marked differences in their response to different concentration of seven other fungicides. Among these fungicides propiconazol was the most efficient, followed by captafol and chlorothalonil.

Morphologic, serologic and pathogenicity studies among the isolates revealed that at least two species of *Colletotrichum* were present: one corresponding to *C. fragariae* Brooks, and the other yet unidentified, similar to *C. acutatum* Simmonds. Both species belong to *C. gloeosporioides* sensu ARX (1957), when compared with *C. fragariae* isolates pathogenic to three strawberry cultivars. They also had smaller conidia, lighter color, grew slower on PDA, were more

resistant to benomyl and were antigenically similar.

3. INTRODUÇÃO

A cultura do morango é prejudicada economicamente, devido à incidência de um número considerável de doenças. Entre essas doenças, a antracnose é considerada na atualidade, um dos fatores limitantes na produção, tanto causando perdas nos frutos afetados, bem como, provocando morte das plantas.

No tocante ao controle químico, os fungicidas mais comumente usados são pertencentes ao grupo dos benzimidazóis. Entretanto, há informações dos produtores e técnicos ligados a essa cultura, sobre a dificuldade de controle do referido patógeno, nas diferentes regiões do Estado de São Paulo.

A revisão de literatura mostra claramente que a introdução de produtos químicos cada vez mais específicos, tem propiciado ao aparecimento mais rápido de mutantes do patógeno resistentes a fungicidas, em diferentes regiões do mundo (GEORGOPOULOS e ZARACOVIT, 1967 e CARRENO e TORRES, 1979), indicando assim a possibilidade de estar ocorrendo em nossas condições o mesmo fato.

O presente trabalho, visa trazer alguns esclarecimentos ao problema apontado, bem como efetuar estudos ligados a caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Colletotrichum* spp. patogênicas ao morango, obti

dos de diferentes variedades e regiões do Estado de São Paulo, a fim de esclarecer se isolados de *Colletotrichum* spp. que atacam os frutos, rizomas e as hastes, pertencem a mesma espécie.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Nomenclatura e Taxonomia

A antracnose de morango foi constatada pela primeira vez por Brooks na Flórida, em 1926, e relatada pelo mesmo autor em 1931, que denominou o organismo causal de *Colletotrichum fragariae* Brooks (BROOKS, 1931). Descrito inicialmente como patógeno de uma doença que afetava mais comumente os estolões e raramente os pecíolos, (BROOKS, 1931), foi mais tarde observado, pelo mesmo autor (BROOKS, 1935), como agente causador também de podridão de rizoma e murchamento de mudas, durante períodos de altas temperaturas e umidade. Esse fato foi confirmado posteriormente por diversos autores como: HORN e CARVER (1962 e 1963) e CARVALHO e CARDOSO (1964).

Apesar desses últimos autores CARVALHO e CARDOSO, 1964) terem conseguido sintomas típicos de antracnose em frutos verdes e maduros, inoculados com *C. fragariae* isolado do rizoma, o primeiro a relacionar esse fungo com sintomas de antracnose em fruto nas condições de campo foi HOWARD (1972). Esse pesquisador encontrou que isolados de *C. fragariae* tanto de lesões do fruto como de estolões podiam causar podridão de fruto e antracnose em estolões e pecíolos. Concluiu, ainda, que esses isolados cultivados em BDA produziram esporos dentro do espectro de dimensões originalmente descrito para *C. fragariae*. Antracnose dos frutos

causada por *C. fragariae* foi observada também na Argentina (MENA *et alii*, 1975).

Mais recentemente (HOWARD e ALBREGTS, 1983) *C. fragariae*, citado como sinônimo de *C. gloeosporioides*, foi descrito como agente da mancha foliar preta do morango. Para identificação do fungo foram feitos estudos morfológicos e testes de inoculação cruzada com isolados típicos causadores de murcha.

A descrição original de *C. fragariae*, segundo BROOKS (1931) é a seguinte: acêrvulo globoso, elevado, dispersos e algumas vezes formando abundante quantidade de setas, acêrvulo esse com dimensões variando de 70 a 140 μm de comprimento por 30 a 60 μm de espessura (média de 110 x 40 μm); setas sinuosas e uniseptadas medindo 97 a 142 μm de comprimento por 3,8 a 5,8 μm de espessura (média de 115 x 4,3 μm); conídio fusiforme com extremidades arredondadas medindo 14 a 21 μm de comprimento por 3,9 a 6,3 μm de espessura (média de 16,4 x 4,8 μm e conidióforo hialino sem septos, medindo 5 a 10 μm de comprimento por 3,0 a 5,0 μm de espessura (média de 7,0 x 3,5 μm).

Outras espécies de *Colletotrichum* descritas em morango são o *C. acutatum* (SIMMONDS, 1965), isolado de folhas de morango e provado ser patogênico em inoculações no fruto, e o *C. dematium* (BERAHA e WRIGHT, 1973), isolado de frutos de morango, e que se mostrou fracamente patogênico em inoculações no fruto, quando comparado com *C. fragariae*. Essas duas espécies de *Colletotrichum* são fáceis de serem distinguidas de *C. fragariae* uma vez que a primeira apresenta esporos de menor tamanho com uma de suas extremidades aguçadas e, a segunda pelo formato acanoado dos esporos.

Além das de *Colletotrichum*, espécies muito semelhantes, pertencentes ao gênero *Gloeosporium fragariae* (Lib.) Mont., isolado de folhas de morango e descrito por SACCARDO

(1884), STURGESS (1958), WRIGHT *et alii* (1960), MARTINEZ *et alii* (1962) e MAAS (1978). STURGESS (1958) na Austrália, descreveu uma espécie de *Gloeosporium* causando podridão de fruto maduro de morango, porém não lhe atribuiu um epíteto específico pois achou necessário maior número de trabalhos comparativos com outras espécies do mesmo gênero; essa espécie quando patogenicamente comparada em frutos maduros de mamão e morango com isolados de *Gloeosporium* do mamoeiro não se mostrara diferente. O tamanho dos conídios dessa espécie variou de 12,9 a 13,9 μm de comprimento x 3,2 a 3,9 μm de espessura, e a colônia em BDA, branca e compacta, quando jovem, desenvolve mais tarde, um crescimento cinzento.

WRIGHT *et alii* (1960) foram os primeiros a relatarem podridão de *Gloeosporium* de frutos de morango nos Estados Unidos. Também, esses pesquisadores não atribuíram epíteto específico, aventando apenas para a possível similaridade de com o fungo descrito por STURGESS (1958). As dimensões dos esporos variaram de 9 a 19 μm de comprimento x 3 a 5 μm de espessura (média de 14 por 4,8 μm). O fungo inoculado, com ferimento, em maçã, laranja, melancia e uva silvestre foi patogênico; porém não causou doença quando inoculado sem ferimento, exceto em uva silvestre.

MARTINEZ *et alii* (1962) ao descreverem a "podridão da antracnose do fruto", pela primeira vez no Estado de São Paulo, isolaram o agente patogênico, provaram sua patogenicidade e classificaram-no como *Gloeosporium fragariae*. Entretanto, o trabalho não mostra se foram feitos estudos morfológicos comparativos. Não obstante, a descrição sintomatológica coincide com a que, atualmente, se observa com bastante frequência em plantações de morango nesse Estado, ou seja, lesões de coloração marron clara, no início, depois escuras, nos frutos em formação e sintomas de antracnose tanto em frutos verdes como maduros.

MAAS (1978) descreveu uma "nova e destrutiva"

antracnose de frutos de morango, causada por uma espécie não determinada de *Gloeosporium*, a qual "parece diferir dos outros fungos da antracnose do morango pela ausência de setas de acérvulos e presença de pigmentação vermelha em cultura". Em testes de patogenicidade com fermento reproduziu sintomas em frutos de 19 cultivares de morango e em estolões da cultivar Blakemore (8 isolados). As dimensões dos conídios variaram de 12,7 a 17,0 μm de comprimento x 4,7 a 6,8 μm de espessura (média de 14,78 x 5,34 μm). O autor não atribuiu nenhum epíteto ao fungo, pois, encontrou similaridade com um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* e achou necessário um estudo mais amplo, incluindo *C. gloeosporioides* de diversos hospedeiros antes de concluir a que grupo desse fungo o *Gloeosporium* poderia se encaixar. É interessante notar, entretanto, que pelas dimensões dos conídios, coloração dos esporos e ausência de setas, o *Gloeosporium* descrito por MAAS (1978) é muito semelhante aquele descrito por WRIGHT *et alii* (1960). A única distinção feita por MAAS (1978) é que a coloração da colônia do fungo descrito por WRIGHT *et alii* (1960) é cinza; cinza escuro.

Toda essa perplexidade pode ter sido gerada pela revisão taxonômica de ARX (1957) que, desprezando a produção de setas, amalgamou o gênero *Gloeosporium* junto ao *Colletotrichum*, e dentro desse gênero, delimitou morfologicamente a espécie *C. gloeosporioides* numa ampla variação de tamanho de conídios (12 a 19 μm de comprimento x 1 a 6 μm de espessura), colocando em sinonímia mais ou menos 600 nomes, entre os quais *C. fragariae*. Entretanto, como já chamava a atenção SIMMONDS (1965), se bem que o trabalho de ARX (1957) tenha efetuado uma simplificação útil e tenha chamado a atenção para a necessidade de uma drástica redução do número de espécies, é inevitável que dentro dos sinônimos listados hajam espécies ou grupos de espécies que, em investigação adicional, mereçam "status" separado.

No caso dos fungos dos gêneros *Colletotrichum*

e *Gloeosporium* do morango, parece evidente, pela revisão que existem pelo menos dois grupos de fungos: o do *C. fragariae*, que além dos frutos afeta também outros órgãos, inclusive o rizoma, e o que corresponde ao *Gloeosporium* sp. que afeta predominantemente os frutos.

4.2 Resistência de Fungos a Fungicidas

A resistência ou tolerância de fungicidas em condições naturais, era de pouca importância até o início da década de 1970, se limitando a poucos relatos, como o caso de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* em relação ao bifenil e ao ortofenilfenato de sódio, *Tilletia foetida* em relação a BHC, ao quintozene (ou PCNB) e ao tetracloronitroanizol e de *Pyrenophora avenae* em relação aos organomercuriais (KIMATI, 1978). Entretanto, GEORGIOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) e GEORGIOPOULOS (1969) já se preocupavam na época, com o agravamento dos problemas inerentes a resistência de fungos a fungicidas, na medida que estes fossem alcançando maior especificidade.

Efetivamente, com o uso de fungicidas sistêmicos, o que vale dizer de fungicidas mais seletivos, a partir da década de 1970, surgiram linhagens de fungos, anteriormente sensíveis, que se tornaram resistentes a benomil, tiofanato metílico, thiabendazol, ethirimol, metalaxil e outros (WICKS, 1974; WILD e RIPPON, 1975; KURAMOTO, 1976; WICKS, 1977 e PEPIN e MacPHERSON, 1982).

O maior número de relatos de resistência de fungos a fungicidas, na atualidade, se prende aos benzimidazóis, envolvendo mais frequentemente os fungos *Botrytis fuckeliana* (POLACH e MOLIN, 1975); *Venturia inaequalis* (TATE e SAMUELS, 1976); *Verticillium dahliae* (WUEST et alii, 1974); *Botrytis cinerea* (PEPIN e MacPHERSON, 1982), *Penicillium digitatum* (SMOOT e BROWN, 1974 e WILD e RIPPON, 1975); *Cercospora beticola* (RUPPEL, 1975 e WILD e RIPPON, 1975); *Colletotrichum*

chum musae (Griffiee, citado por PORTO, 1978).

Segundo CARRENO e TORRES (1979, o fungicida benomil foi utilizado pela primeira vez com sucesso no controle de *V. inaequalis*, na Austrália, em 1968. No entanto, três anos mais tarde, WICKS (1974) detectou surgimento de linhagens deste mesmo fungo, resistentes a benomil. A partir de então, vêm aumentando gradativamente os relatos de resistência não só deste, mas também de outros benzimidazóis, envolvendo diferentes patógenos.

Nas condições brasileiras, em especial, no Estado de São Paulo, o benomil vem sendo empregado na cultura de morango, desde 1969, no controle de mancha de folhas causadas por *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. Surpreendentemente, em 1973, já foi observado um controle ineficiente do referido patógeno, em condições de campo. Em condições de laboratório, o patógeno não foi inibido até 100 ppm deste produto, enquanto que a linhagem era inibida a 1 ppm (REMIRO e KIMATI, 1974).

Isto equivale dizer que, embora o fungicida benomil, não tenha sido empregado inicialmente para o controle da antracnose de morango, é possível que o mesmo venha mantendo contatos com esta doença há mais de 15 anos. Considerando, ser este produto de alta especificidade, e a sua perda de efetividade ocorrer em 2 - 3 anos após uso consecutivo (WICKS, 1974), é possível que também a antracnose, mostre resistência a este e outros produtos do mesmo grupo, embora não existam citações na literatura brasileira ou estrangeira a esse respeito.

4.3 Serologia

Como foi visto, a não ser a tentativa de ARX (1957) em esclarecer a posição das espécies dentro do gênero *Colletotrichum* com base na morfologia, muitas dúvidas existem e, particularmente, no presente trabalho, com os a

gentes da antracnose do morango. Neste contexto, a serologia é uma ferramenta útil, adicional, que vem socorrer os taxonomistas. Efetivamente, no âmbito da serologia aplicada à Micologia Fitopatológica, a análise de alguns trabalhos mostra a sua utilidade na distinção taxonômica, ao nível de espécies, por exemplo, de *Fomes roseus* e *F. subroseus* (MADHOSING, 1964); de seis espécies heterotáticas de *Phytophthora* (MERZ *et alii*, 1969); de oito espécies de *Ceratocystis* (AMOS e BURRELL, 1967); de três espécies de *Cronartium* (GOODING Jr. e POWERS Jr., 1965); de duas espécies de *Verticillium* (TERANISHI, *et alii*, 1973); de duas espécies de *Ceratocystis* (CARDOSO, 1976); de 10 espécies de *Pythium* (KRYWIENCZKI e DÖRWORTH, 1980); de três espécies de *Fusarium* (MADHOSING, 1964).

A serologia também tem se mostrado útil na distinção de *formae speciales*: de *Fusarium oxysporum lupini* e *F. oxysporum pisi* (TEMPEL, 1957); de *F. oxysporum cubense* e *F. oxysporum pisi* (BUXTON *et alii*, 1961). Ainda a serologia pode ajudar na distinção de raças fisiológicas, como no caso das raças 1 e 2 de *F. oxysporum lycopersici* (MORTON e DUKES, 1966).

Com relação a serologia de fungos do gênero *Colletotrichum graminicola*, KIMATI (1975) demonstrou a existência de diferenças antigênicas de isolados de cana-de-açúcar (*formae speciales sacchari*), do milho (*formae speciales zae*) e do sorgo (*formae speciales sorghi*) do referido patógeno.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Épocas de Investigação

O presente estudo foi realizado no Laboratório e Casa de Vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, de Outubro de 1983 a Junho de 1984.

5.2 Isolados Utilizados

Utilizaram-se 33 isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de rizomas e frutos de morango, com sintomas típicos de antracnose, procedentes de várias regiões do Estado de São Paulo (Tabela 1).

5.3 Técnica de Isolamento

Com a finalidade de se obterem culturas puras do patógeno, fizeram-se isolamentos a partir de esporos que se formaram em frutos e rizomas, em condições de umidade elevada. Com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma parte desses conídios para o centro de uma placa de Petri contendo meio de Ágar-água e incubou-se à temperatura ao redor de 27°C, em condições de laboratório.

Eliminaram-se contaminações bacterianas por re

picagens sucessivas dos bordos da colônia obtida de discos de micélio em meio Ágar-água. Micélios livres de contaminantes forneceram conídios para novas repicagens em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As culturas assim obtidas foram conservadas em tubos de ensaio contendo BDA, inclinado à temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.4 Obtenção e Padronização de Inóculo

Os conídios foram inoculados em placas de Petri contendo meio de farinha de Aveia-Ágar (KIMATI, 1976 modificado por MENTEN, 1977) e o período de incubação foi de seis dias à temperatura de 27°C .

As suspensões de esporos foram preparadas colocando-se 10 ml de água destilada esterilizada em placas de Petri, contendo as culturas fúngicas, e estas friccionadas, levemente, com o auxílio de uma alça de "Drigalski" e a suspensão filtrada através de uma camada dupla de gaze, para eliminar os resíduos. O número de conídios existentes em 10 ml de suspensão foi determinado na primeira vez com auxílio de um hemacitômetro. Para facilitar neste e em outros experimentos, as determinações subsequentes das concentrações de esporos nas suspensões, foi estabelecida a relação entre contagem em hemacitômetro e densidade ótica por 5" (Colorímetro BAÜSCH LOMB & SPECTRONIC 20, a $625\ \mu\text{m}$) (Figura 1). A seguir, por meio de diluição determinou-se a concentração desejada de conídios.

Para os experimentos "in vitro", nos quais as avaliações foram feitas através de medidas de crescimento radial da colônia, o inóculo usado foi o de um disco de micélio, medindo 0,5 cm de diâmetro, obtido da periferia da colônia, com seis dias de idade.

5.5 Preparo dos Meios de Cultura com Fungicidas

No preparo dos meios de cultura com os fungici

das, seguiu-se, Técnica de EDGINGTON *et alii* (1971), modificada por MENTEN *et alii* (1976), cujo procedimento consiste em: dissolver o fungicida em 5,0 ml de acetona; a seguir, completar o volume com água destilada esterilizada para 100 ml. Desta solução estoque, foram feitas diluições em série, de tal forma que, adicionando-se 1,0 ml de uma destas suspensões em 99 ml de meio de cultura BDA fundente (45 a 50°C), se obtenha concentração desejada.

5.6 Experimentos Realizados

5.6.1 Frequência de Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango Sensíveis e Resistentes ao Benomil e Nível de Resistência ao Benomil

Para se determinar a frequência de isolados de *Colletotrichum* spp. sensíveis e resistentes ao benomil foi primeiramente testada a concentração de 100 ppm. Para isso 33 isolados (Tabela 1) foram cultivados em BDA e em BDA com 100 ppm de benomil, conforme metodologia descrita no item 5.4. O inóculo consistiu de um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro, obtido da região periférica da colônia, em BDA, a 27°C com seis dias de idade. O experimento contou com 6 repetições.

A avaliação do crescimento micelial foi feita no 5º dia, após a instalação do experimento, tomando-se o diâmetro da colônia em duas direções perpendiculares entre si.

5.6.2 Sensibilidade "in vitro" de Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango, Resistentes e sensíveis ao Benomil, a Sete Fungicidas

Quatro isolados (Jun-1, Bot-23, Val-24 e Pie-28) que se mostraram resistentes, dois (Pir-21 e Pir-32), que se mostraram sensíveis, ao benomil no experimento anterior, foram comparados quanto a sua sensibilidade "in vitro" frequ

Tabela 1 - Relação dos Isolados Utilizados Durante a Execução do Presente Trabalho

ISOLADOS	VARIETADES	PROCEDÊNCIA	HISTÓRICO
Jun-1	Campinas	Jundiaí-SP	Pulverização semanal com
Jun-2	Campinas	Jundiaí-SP	benomil e captafol alter
Jun-3	Campinas	Jundiaí-SP	nadamente
Jun-4	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-5	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-6	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-7	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-8	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-9	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-10	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-11	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-12	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-13	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-14	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-15	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-16	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-17	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-18	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-19	Campinas	Jundiaí-SP	"
Jun-20	Campinas	Jundiaí-SP	"
Pir-21	Campinas	Piracicaba-SP	Sem uso de fungicidas
Pir-22	-	Piracicaba-SP	Isolado de Jilô
Bot-23	Reiko	Botucatu-SP	Pulverização semanal com
			cupravit (total de 28 a
			plicações)
Val-24	Campinas	Valinhos-SP	Pulverização semanal com
Val-25	Campinas	Valinhos-SP	benomil, captan, cercobin,
Val-26	Campinas	Valinhos-SP	ronilan, tecto, orthocide
Val-27	Campinas	Valinhos-SP	alternadamente
Pie-28	Reiko	Piedade-SP	Aplicação semanal com di
Pie-29	Reiko	Piedade-SP	folatan, captan, cercobin,
Pie-30	AGF-80	Piedade-SP	benomil e mancozeb alter
Pie-31	AGF-80	Piedade-SP	nadamente
Pir-32	Campinas	Piracicaba-SP	Sem uso de fungicidas di
Pie-33	Reiko	Piedade-SP	folatan + manzate (semanal
			mente e a cada duas sema
			nas foi adicionado benla
			te ou cercobin)

Fig. 1 — Correlação entre densidade ótica (Colorímetro Bauch & Lomb-spectronic 20 a 625 mm) e n.º de esporos de *Colletotrichum* do morango em suspensão na água destilada.

Tabela 2 - Fungicidas Utilizados nos Experimentos

NOME TÉCNICO	NOME QUÍMICO	NOME COMERCIAL
Benomil	Metil 1 (Butil-carboil) 2-Benzimidazol - Carbamato	Benlate 50 Pm
Captafol	Cis-N-(1,1, 2,2 - Tetracloroetiltiltio) 4 Cicloexeno-1.2 - Dicarboxida	Difolatan 480
Chlorothalonil	Tetracloroisofталonitrila	Daconil 2728 75 PM
Mancozeb	Produto de coordenação do íon Zn Etileno Bis-Ditiocarbamato de Manganês	Dithane M-45
Iprodione	Isopropilcarbamoil-1 (Dicloro-3,5 fenil)-3 hidantina	Rovral
Captan	N(Triclorometiltio) 4- Cicloexeno 1-2 Dicarboximida	Orthocide 50PM
Procimidone	N-(3'-5' diclorofenil) - 1,2 - dimetil ciclopropano - 1,2 - Dicarboximida	Sumilex 50%
Propiconazol	1, (2-(2,4-Diclorofenil)- 4 - propil-1-3-Dioxalan-2-il-metil) - 1H 1,2,4-Triazol	Tilt 250 EC

te a sete fungicidas (Tabela 2) nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ppm. Tais fungicidas, com exceção do propiconazole, foram testados devido ao seu uso na cultura comercial do mungo.

A metodologia de inoculação e avaliação foram as mesmas do experimento anterior.

O delineamento estatístico, foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (isolados) e três repetições.

No caso do experimento com benomil, as concentrações de 500 e 1000 ppm foram utilizadas uma vez que os quatro isolados resistentes crescem a 100 ppm e, no campo, concentrações mais altas podem ser atingidas.

5.6.3 Variabilidade Morfológica dos Isolados de *Colletotrichum* spp. e formação de setas

Com a finalidade de observar morfologicamente os diversos isolados, multiplicaram-se em placas de Petri, 19 isolados de *Colletotrichum* spp. procedentes de diferentes variedades e regiões do Estado de São Paulo, em meio de cultura contendo Aveia-ágar, incubados a 27°C.

As medições dos conídios, foram realizadas cinco a seis dias após inoculações, tomando-se três amostras de cada isolado, perfazendo um total de 30 leituras das dimensões dos conídios (comprimento e largura), com auxílio de Filar Micrometer Eyepiece "BAUSCH & LOMB, previamente calibrado para a objetiva 40X.

Calcularam-se as médias das leituras, o coeficiente de variação (CV), desvio padrão (s) e o erro da média $s(\bar{m})$.

Com a finalidade de auxiliar na caracterização do *Colletotrichum* spp., todos os isolados submetidos a inoculações em pecíolos foram coletados e colocados em câmara úmida.

da, para determinar a presença ou não de setas. Em meio de cultura, tanto em BDA como em farinha de Aveia-ágar, encontrou-se dificuldade de obtenção dessas estruturas.

5.6.4 Provas de Patogenicidade e Resistência Varietal

5.6.4.1 Preparo de mudas

As mudas de morango da variedade Campinas, utilizadas no teste de patogenicidade, foram obtidas do Instituto Agrônomo de Campinas, da seção de Virologia, as quais estavam plantadas em sacos plásticos. Após a sua obtenção, foram mantidas em condições de casa de vegetação, até a data da inoculação.

As mudas utilizadas no teste de resistência varietal foram plantadas em vasos plásticos, contendo solo argiloso (terra roxa) peneirado, esterco de curral curtido e peneirado. Esterilizou-se este substrato em autoclave, a 127°C por duas horas, utilizando-o depois de um período de 20 dias após a esterilização.

No experimento de resistência varietal, foram transplantadas mudas de três variedades mais comumente utilizadas comercialmente (Variedade AGF-80, Campinas e Reiko). Estas foram mantidas em condições de casa de vegetação à temperatura de $22 - 28^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa alta, sob a aspersão contínua.

5.6.4.2 Método de Inoculação

Os isolados Jun-17, Pir-21, Pir-32 e Pie-33 foram preparados do mesmo modo descrito no item 5.4.

Para inoculação, seguiu-se a técnica de BROOKS (1931), porém modificada: os pecíolos foram feridos com auxílio de uma agulha fina, acopladas em seringa hipodérmica, contendo suspensão de inóculo. Depositou-se sobre a ferida, uma

gota de água destilada esterilizada. As plantas assim inoculadas foram mantidas em câmara úmida, à temperatura que variou de 22 a 28°C, por 96 horas. A seguir, foram removidas e deixadas em condições de casa de vegetação à temperatura média de 26°C, até o final da avaliação para teste de patogenicidade e 20°C para o experimento de resistência varietal.

5.6.4.3 Delineamento experimental

O delineamento deste experimento foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela era constituída de quatro plantas, e o número de pecíolos inoculados variou de 21 a 35 por tratamento.

No experimento de comprimento de cultivares de morango, adotou-se a mesma metodologia anteriormente utilizada, conforme descrito no item 5.6.4, porém utilizando-se maior número de variedades e isolados (Jun-1, Jun-17, Pir-21, Bot-23, Pie-28, Pir-32 e Pie-33). Todavia, o número de repetições variou de dois a quatro.

5.6.4.4 Critério de avaliação

A reação do hospedeiro do teste de patogenicidade foi avaliada no 5º e 15º dias após a inoculação, sendo a primeira, medindo-se a extensão da lesão contida no pecíolo e a segunda, avaliando-se o número de pecíolos mortos, número de lesões acima de 1 cm de comprimento, número de pecíolos com pequenas pontuações e finalmente o número de pecíolos sadios, para determinar a agressividade de cada isolado.

A reação do hospedeiro no experimento de comportamento de cultivares foi avaliada no 5º e 10º dia após a inoculação, determinando na primeira leitura, a extensão da lesão contida no pecíolo inoculado e na segunda apenas o número de pecíolos mortos.

5.6.5 Caracterização serológica de *Colletotrichum*

spp. de morango

5.6.5.1 Antígenos empregados para obtenção de anti-soros

O antígeno do isolado Jun-17 foi preparado a partir de suspensão de conídios produzidos em meio de farinha de Aveia-ágar com seis dias de idade. Esta suspensão foi filtrada em gase dupla e lavada com água destilada por centrifugação (Centrífuga Sorvall SS4) sucessiva a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo a suspensão final feita em solução salina (Na Cl a 0,85%). Suspensões contendo aproximadamente 10^6 conídios por ml, foram obtidas e conservadas em congelador.

5.6.5.2 Obtenção e preparo dos anti-soros

Aos antígenos previamente preparados e conservados em congelador, foram misturados em volume iguais, adjuvantes incompletos de Freud (DIFCO), seguindo-se as inoculações em número de duas vezes por semana por via intramuscular na coxa de um coelho da raça Nova Zelândia, de aproximadamente 3 kg. O volume do material inoculado foi de 1 ml por aplicação, totalizando 15 aplicações.

Antes da primeira injeção, fez-se uma sangria (aproximadamente 20 ml) para a obtenção do soro normal (SN), utilizados como controle nas reações serológicas.

A partir da 7.^a injeção, iniciou-se uma série de sangrias, para obtenção de anti-soro, no total de 10 sangrias. Para a separação do soro, o sangue foi coagulado em condições de 5°C por uma noite e, em seguida, centrifugado, utilizando a mesma metodologia empregada no caso do antígeno. Ao soro assim obtido, foi adicionado merthiolate (etilmercuritiosalicilato de sódio) na proporção de 1/100 (V/V), e mantidos no congelador.

5.6.5.3 Preparo de antígeno para reações se

rológicas

Os antígenos para reações serológicas foram obtidos a partir de esporos produzidos em meio de farinha de Aveia-ágar, os quais foram lavados sucessivamente por centrifugação, os esporos foram suspensos em salina tamponada numa concentração de $\pm 10^9$ conídios/ml,, e macerados em almofariz, com auxílio de areia lavada (malha 40) e sob baixa temperatura (Nitrogênio líquido). O macerado foi submetido a centrifugação (Centrífuga Sorvall SS4 a 4000 rpm por cinco minutos) e o sobrenadante, após adição de merthiolate, numa proporção de 0,01% do volume final, foi conservado em congelador a aproximadamente 20°C negativos.

5.6.5.4 Testes serológicos

Os testes serológicos foram feitos seguindo-se técnicas de dupla difusão em Gel-Ágar, de Ouchterlony, em lâminas.

O meio em gel constituído de 1% de Ágar (Ágar difico) KH_2PO_4 - KH_2PO_4 e Merthiolate 1%, foi vertido em lâminas de microscopia (4 ml/lâmina), seguindo os trabalhos de FIGUEIREDO (1972) e KIMATI (1975).

Os reagentes foram distribuídos em orifícios feitos sobre o ágar com o auxílio do Furagar, constituindo-se o esquema num hexágono inscrito em uma circunferência de 0,8 cm de raio, tendo em cada vértice um orifício de 0,4 cm de diâmetro.

A titulação do anti-soro e do antígeno foi feita também pela técnica de dupla difusão em Ágar, fazendo-se as diluições até 1:32 em salina tamponada.

Os anti-soros obtidos foram testados contra preparações antigênicas dos isolados Jun-1, Jun-17, Pir-21, Bot-23, Val-24, Pie-28, Pir-32 e Pie-33.

6. RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1. Frequência de Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango Sensíveis e Resistentes ao Benomil e Nível de Resistência ao Benomil.

Dentre os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos e rizomas procedentes de Botucatu, Jundiaí, Piedade, Piracicaba e Valinhos (Tabela 1) a ocorrência de resistência foi relativamente alta (Tabela 3). Isto vem confirmar a expectativa de ocorrência de resistência de *Colletotrichum* spp. ao benomil nestas regiões, à medida em que os fungicidas fossem alcançando maior especificidade, (GEORGIOPOULOS e ZARACOVITIS, 1967 e GEORGIOPOULOS, 1969).

Na cultura de morango na região de Atibaia o benomil vem sendo empregado desde 1969 (PESSANHA *et alii*, 1970), e a partir de 1973 observou-se a ineficiência no controle de manchas de folhas causadas por *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. Isolados do patógeno obtidos nessa região cresceram em meio de cultura com até 100 ppm de benomil (REMIRO e KIMATI,

1974). Considerando que a antracnose do morango era observada frequentemente a partir de 1960, nos morangais de Piedade e Ibiuna (MARTINEZ *et alii*, 1962), Jundiá, Cabriúva, Atibaia e Monte Alegre do Sul (CARVALHO e CARDOSO, 1964), é provável que a efetividade do benomil em relação à antracnose tenha diminuído ao longo destes anos naquelas condições. Igualmente, observou-se a perda da efetividade no controle de *V. inaequalis* na Austrália, com apenas três anos de uso consecutivo de benomil (WICKS, 1974).

Por outro lado, os isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos na região de Piracicaba de morangais sem nenhum tipo de tratamento com fungicidas, mostraram ser sensíveis ao benomil, possivelmente em função da falta de pressão de seleção. (Tabela 3).

Entretanto, os isolados obtidos de podridão de rizomas procedentes de Piedade (Pie-33) vulgarmente conhecido por Coração Vermelho ou Chocolate, apesar do uso de fungicida (Tabela 1), foi sensível ao benomil, ao contrário dos isolados de frutos, obtidos da mesma região. Isso talvez possa ser explicado pelo fato de que nos rizomas os fungicidas sistêmicos são pouco acumulados redundando em baixa pressão de seleção sobre o patógeno.

A diferença entre isolados resistentes e sensíveis se manifesta também em concentrações mais baixas ao benomil, os sensíveis não desenvolvendo nada a 10 ppm (Tabela 4) e os resistentes crescendo até a 1000 ppm (Tabela 5). É interessante observar que os isolados sensíveis ao benomil são os que apresentam maior crescimento absoluto em meio de BDA sem o fungicida. (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Ocorrência de Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango Resistentes a 100 ppm de Benomil em BDA.

Isolados Nº	Diâmetro (cm) da co- lônia em BDA		Isolados Nº	Diâmetro (cm) ^{1/} da co- lônia em BDA	
	C/Benomil	S/Benomil		C/Benomil	S/Benomil
Jun-1	1,0	2,2	Jun-17	1,1	3,0
Jun-2	1,1	2,6	Jun-18	1,0	3,1
Jun-3	1,1	2,5	Jun-19	1,8	3,2
Jun-4	1,0	2,5	Jun-20	0,0	4,6
Jun-5	0,0	4,7	Pir-21	0,0	4,8
Jun-6	0,0	4,8	Pir-22 ^{2/}	1,7	3,4
Jun-7	1,2	3,0	Bot-23	2,6	2,8
Jun-8	1,2	3,2	Val-24	2,3	2,7
Jun-9	1,2	3,3	Val-25	2,3	2,6
Jun-10	1,3	3,4	Val-26	2,2	2,6
Jun-11	1,1	2,8	Val-27	2,3	2,6
Jun-12	1,0	3,0	Pie-28	2,1	2,6
Jun-13	1,1	2,9	Pie-29	2,4	2,6
Jun-14	1,2	3,6	Pie-30	2,4	2,5
Jun-15	0,8	1,8	Pie-31	2,1	2,5
Jun-16	1,1	3,0	Pir-32	0,0	4,2
			Pie-33	0,0	4,6

1/ Média de quatro repetições, de uma placa cada, inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Medida tomada no quinto dia após a inoculação.

2/ Isolado obtido de jiló.

Tabela 4 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango, aos Cinco Dias de Incubação, em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Benomil.

Isolados	Diâmetro (em cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de Benomil (em ppm)								Média
	0	1,0	10,0	100,0					
Jun-1	3,76 bcd A	1,96ab B	1,61a B	1,93a B					2,31
Bot-23	3,16 d A	2,18a B	2,00a B	1,98a B					2,33
Val-24	3,66 cd A	1,86ab B	1,68a B	1,73a B					2,23
Pie-28	4,21 bc A	1,93ab B	1,73a B	1,78a B					2,41
Pir-21	4,56 b A	1,50ab B	0,00 b C	0,00 b C					1,51
Pir-32	6,93a A	1,21 b B	0,00 b C	0,00 b C					2,03
Média	4,38	1,77	1,17	1,24					

^{1/} Média de três repetições, de uma placa cada, inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Crescimento Radial de Micélio de Cinco Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango, em Meio de Cultura BDA Contendo 500 e 1000 ppm de Benomil.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{3/} da colônia nas concentrações de benomil (ppm)			
	500	0 ^{1/}	1000	0 ^{2/}
Bót-23	2,33	6,47	1,34	4,84
Jun-1	2,32	6,40	1,28	5,25
Jun-17	2,30	6,75	1,39	4,53
Val-24	2,25	6,32	1,21	5,32
Pie-28	2,10	6,52	1,26	4,98

1/ Avaliação ao oitavo dia.

2/ Avaliação ao sexto dia.

3/ Média de quatro repetições, cada uma representada por uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro.

6.2. Sensibilidade "in vitro" de Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango, Resistentes e Sensíveis ao benomil, a sete Fungicidas.

Não obstante dois dos isolados sensíveis ao benomil terem-se mostrado consistentemente melhor crescimento micelial do que os quatro resistentes ao benomil em BDA, sem fungicida, confirmando os resultados dos experimentos anteriores, não se observou nenhuma relação patente de sensibilidade aumentada a outros fungicidas devido à resistência ao benomil (Tabelas 6 a 12). De um modo geral, os fungicidas utilizados normalmente em cultura de morango são pouco eficientes contra isolados de *Colletotrichum* spp., pelo menos "in vitro", tendo melhor desempenho o captafol e o chlorothalonil (Tabelas 6 a

11). O produto propiconazol, ainda não registrado para cultura de morango, parece promissor, de vez que mesmo a 1 ppm já inibe consideravelmente o crescimento dos diferentes isolados de *Colletotrichum* spp.

Tabela 6 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango, aos Cinco Dias de Incubação, em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Captafol.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de captafol (ppm)								Média
	0		1,0		10,0		100,0		
Jun-1	4,83	d A	3,43	c A	2,28	c B	1,86	b D	2,75
Bot-23	5,21	c A	4,23	b B	3,86a	B	2,50a	C	3,95
Val-24	4,25	d A	2,98	d B	1,81	d C	1,26	c D	2,58
Pie-28	4,46	d A	3,28	cd B	2,21	cd C	1,20	c D	2,79
Pir-21	6,18	b	4,45ab	B	3,50ab	C	1,51	bc D	3,91
Pir-32	6,88a		4,78a	B	3,30	b C	1,33	c D	4,07
Média	5,07		3,86		2,83		1,61		

1/ Média de três repetições, cada uma constando de uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango, aos Cinco Dias de Incubação, em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Chlorothalonil.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de chlorothalonil (ppm)								Média
	0		1,0		10,0		100,0		
Jun-1	4,38	de A	3,90	d B	3,30	d C	1,96	c D	3,39
Bot-23	4,83	c A	4,25	c B	3,60	c C	2,20	dB	3,72
Val-24	4,20	e A	3,80	d B	2,93	e C	1,56	dB	3,12
Pie-28	4,40	d A	3,73	d B	2,85	e C	1,53	dD	3,13
Pir-21	6,08	b A	5,80	b B	4,96a	C	2,56a	dD	4,85
Pir-32	7,05a	A	6,53a	B	4,18	b C	1,95	c D	4,93
Média	5,16		4,67		3,64		1,96		

^{1/} Média de três repetições, cada uma constando de uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 8 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango, aos Cinco Dias de Inoculação em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Mancozeb.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de mancozeb (ppm)												Média
	0		1,0		10,0		100,0						
Jun-1	4,21	c A	4,03	d AB	3,88	d B	2,83	c C				3,74	
Bot-23	4,40	c A	4,66	c A	4,35	c B	3,25	b C				4,17	
Val-24	4,31	c A	4,03	d B	4,06	d B	2,65	cd C				3,77	
Pie-28	4,13	c A	4,06	d A	3,80	d B	2,53	d C				3,63	
Pir-21	5,75	b A	5,70	b A	5,55	c A	4,45a		B			5,36	
Pir-32	6,93a		6,78a		6,53a		4,61a		C			6,22	
Média	4,96		4,88		4,70		3,39						

^{1/} Média de três repetições, cada uma constando de uma placa com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango, aos Cinco Dias de Inoculação em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes concentrações de Captan.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de captan (ppm)								Média
	0	1,0	10,0	100,0					
Jun-1	4,36 b A	4,15 b A	3,70 c B	6,63 bc B					3,96
Bot-23	4,61 b A	4,36 b A	4,21 b AB	3,80 b B					4,25
Val-24	4,38 b A	4,15 b A	4,21 b A	3,45 bc B					4,05
Pie-28	4,18 b A	4,01 b AB	3,73 c B	3,26 c C					3,80
Pir-21	5,88a A	5,75a A	5,30a B	4,46a C					5,35
Pir-32	6,06a A	5,78a AB	5,40 b B	4,46a C					5,43
Média	4,92	4,70	4,42	3,85					

^{1/} Média de três repetições, cada uma constando de uma placa com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 10 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango, aos Cinco Dias de Inoculação, em Meio de cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Procimidone.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de procimidone (ppm)				Média
	0	1,0	10,0	100,0	
Jun-1	4,98	4,91	2,48	2,35	3,68 d
Bot-23	5,60	5,46	3,25	3,23	4,39 c
Val-24	4,60	5,35	2,48	2,46	3,72 d
Pie-28	4,50	4,93	2,46	2,23	3,53 d
Pir-21	6,71	6,55	4,35	4,30	5,48 b
Pir-32	7,36	7,31	4,31	4,68	5,92a
Média	5,63 A	5,75 A	3,22 B	3,21 B	

^{1/}Média de três repetições, cada uma constando de uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 11 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango aos Cinco Dias de Inoculação em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Iprodione.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de iprodione (ppm)								Média
	0		1,0		10,0		100,0		
Jun-1	5,01	c A	5,18	d A	3,35	cd B	2,98	bc B	4,13
Bot-23	5,06	c A	4,95	cd A	4,01	bc B	3,33	ab C	4,34
Val-24	4,55	c A	4,41	d A	3,00	d B	2,45	c B	3,60
Pie-28	4,80	c A	4,76	cd A	2,98	d B	2,33	c C	3,72
Pir-21	6,48	b A	6,05	b A	4,83	a B	3,91	a C	5,32
Pir-32	7,55	a A	7,31	a A	4,66	ab B	2,93	bc C	5,62
Média	5,58		5,44		3,80		2,99		

^{1/} Média de três repetições, cada uma constando de uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 12 - Crescimento Radial de Micélio de Seis Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango, aos Cinco Dias de Inoculação em Meio de Cultura BDA, Contendo Diferentes Concentrações de Propiconazol.

Isolados	Diâmetro (cm) ^{1/} da colônia nas concentrações de propiconazol (ppm)								Média
	0	1,0	10,0	100,0					
Jun-1	3,91 c	A 1,91 c	B 1,16 C	0,00 D					1,75
Bot-23	3,53 cd	A 1,60 c	B 1,08 C	0,00 D					1,55
Val-24	3,65 c	A 1,65 c	B 1,18 C	0,00 D					1,62
Pie-28	3,11 d	A 1,51 c	B 1,25 B	0,00 C					1,47
Pir-21	6,76 c	A 3,06 b	B 0,91 C	0,00 D					2,68
Pir-32	7,50a	A 4,18a	B 1,28 C	0,00 D					3,24
Média	4,74	2,32	1,15	0,00					

1/ Média de três repetições, cada uma constando de uma placa inoculada com um disco de micélio de 0,5cm de diâmetro. Avaliação ao quinto dia após a inoculação. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.3. Variabilidade Morfológica dos Isolados de *Colletotrichum* spp. do Morango e Formação de Setas.

Comparações morfológicas de 17 isolados de *Colletotrichum* spp., dos quais 6 (Jun-5, Jun-6, Jun-20, Pir-21, Pir-32 e Pie-33) tinham se mostrado sensíveis e 12 (Jun-1, Jun-2, Jun-3, Jun-4, Jun-8, Jun-9, Jun-12, Jun-17, Bot-23, Val-24 e Pie-28) resistentes a benomil (Tabela 3), demonstraram variação contínua do comprimento dos conídios (Tabela 13). Entretanto, excetuando o isolado Jun-6B, todos os sensíveis ao benomil tenderam a se agrupar entre os que apresentaram maior

comprimento. Em termos de largura não houve essa relação (Tabela 13). Pela delimitação morfológica de *C. gloeosporioides* de ARX (1957) todos os isolados aqui testados se enquadram nessa espécie. Ademais, observações de formação de setas (Tabela 14) evidenciaram essa capacidade em seis dos sete isolados testados: destes, quatro eram resistentes e três sensíveis ao benomil.

Tabela 13 - Dimensões Médias dos Conídios de *Colletotrichum* spp. do Morango, Cultivados em Meio de Farinha de Aveia-água, a 27°C, a Luz Contínua, com seis Dias de Idade e Respectivas Medidas de Dispersão da Média.

Isolados	Comprimento (μm)			Largura (μm)		
	$\bar{m}$	s	CV(%)	$\bar{m}$	s	CV(%)
Jun-5	18,91 a	2,38	12,59	5,50 a	0,69	10,61
Pie-33	18,07 ab	2,09	11,57	5,30	0,50	9,43
Jun-6	17,68 ab	2,86	16,18	5,55	0,46	8,29
Jun-6-A	17,49 ab	1,28	7,32	5,84 bc	0,37	6,34
Pir-32	16,40 bc	1,72	10,5	6,24 ab	0,33	5,29
Pir-21	16,31 bc	1,94	11,9	5,68 bcdef	0,41	7,22
Jun-20	16,13 bcd	2,44	15,13	4,54	0,66	14,53
Jun-1	15,01 cde	2,65	17,16	4,56	0,56	12,28
Val-24	14,87 cde	2,07	13,9	5,79 bcde	0,75	12,95
Bot-23	14,64 cde	3,36	22,9	5,85 bcd	0,92	15,73
Jun-9	14,60 cde	1,67	11,44	5,21	0,27	5,18
Pie-28	14,50 cde	1,96	13,5	5,70 bcdef	0,79	13,86
Jun-8	14,22 de	1,62	11,29	5,73	0,45	7,85
Jun-17	13,94 e	2,46	17,62	5,44 cdef	0,77	14,15
Jun-3	13,92 e	1,74	12,50	4,55	0,56	12,31
Jun-6-B	13,83 e	1,72	12,44	5,18	0,61	11,78
Jun-12	13,64 e	2,36	17,30	4,81	0,87	18,08
Jun-2	13,37 e	1,72	12,86	4,19	0,57	13,60
Jun-4	13,21 e	2,45	18,55	4,61	0,77	16,70

$\bar{m}$ = média de 30 medições (em μm)

s = desvio padrão

s($\bar{m}$) = erro da média

CV(%) = coeficiente de variação.

Tabela 14 - Formação de Setas de Diferentes Isolados de *Colletotrichum* spp., Quando Submetidos a Inoculação Artificial em três Cultivares de Morango.

Isolados	Variedades			
	AGF-80 ^{1/}	Campinas ^{1/}	Campinas ^{2/}	Reiko ^{1/}
Pie-33	+ ^{3/}	+	+	+
Pir-21	+	+	+	+
Bot-23	+	+	NA	NA
Jun-1	-	+	NA	-
Pie-28	+	NA	NA	NA
Pir-32	+	-	+	+
Jun-17	-	-	-	-

1/ Resultados obtidos do experimento de resistência varietal

2/ Resultados obtidos da prova de patogenicidade

3/ + Presença de seta; - Ausência de seta; NA - não avaliado.

6.4 Prova de Patogenicidade

Os resultados de inoculação, apresentados pela medida do comprimento da lesão e número de pecíolos mortos (DELP e MILLHORAND, 1980), tomada aos cinco e quinze dias após inoculação, respectivamente, encontram-se na Tabela 15.

Pelos dados obtidos pode-se caracterizar em três níveis de patogenicidade. O isolado Pie-33 mostrou maior agressividade em termos de tamanho de lesão, apresentando também alta taxa de mortalidade. Os isolados Pir-21 e Pir-32 apresentaram agressividade intermediária, porém o isolado Pir-32 baixa taxa de mortalidade e o isolado Jun-17 baixa agressividade sem causar a morte dos pecíolos. Estes resultados demonstram que os agentes causais da antracnose tanto dos frutos e como dos rizomas afetam os pecíolos.

Tabela 15 - Reação de Cultivar Campinas a quatro Isolados de *Colletotrichum* spp., Inoculados em Pecíolos^{1/}.

Isolados	Número de pecíolos inoculados	Comprimento ^{2/} da lesão (cm)	Reação no pecíolo 15º dia			

			Mortos	Lesão >1cm	Lesão <1cm	Sadios
Pie-33	33	2,02	22	1	0	0
Pir-21	35	0,87	28	3	2	2
Pir-32	23	0,47	2	15	6	0
Jun-17	21	0,10	0	0	21	0
Testemunha	23	0	0	0	0	23

^{1/} Média de quatro repetições

^{2/} Média de comprimento tomada no 5º dia.

6.5 Reação de três cultivares de morango a sete isolados de *Colletotrichum* spp.

A Tabela 16 mostra o comprimento e o número de lesões causadas em pecíolos de três cultivares de morango, cinco e dez dias após a inoculação. As avaliações para diferenciação das reações entre cultivares e isolados foram aquelas reportadas por DELP e MILLHORAND (1980), que consideraram plantas resistentes a *C. fragariae* aquelas com pequenas manchas e susceptíveis as com manchas necróticas envolvendo o pecíolo com posterior morte.

O isolado Pie-33 apresentou alta agressividade e alta taxa de mortalidade nas cultivares AGF 80 e Reiko e agressividade intermediária e alta taxa de mortalidade dos pecíolos na cultivar Campinas.

O isolado Pir-21 foi altamente agressivo na cultivar Reiko, matando todos os pecíolos inoculados, mas nas cultivares AGF 80 e Campinas apresentou agressividade intermediária com baixa taxa de mortalidade.

Os isolados Bot-23 e Jun-1 apresentou agressividade intermediária na cultivar AGF 80 e baixa agressividade nas cultivares Campinas e Reiko, com baixa taxa de mortalidade para as três cultivares.

Os demais isolados, Pie-28, Jun-17 e Pir-32, demonstraram ser pouco agressivos a todas as cultivares, inclusive dependendo do caso, apresentando número reduzido ou nenhuma morte dos pecíolos. Agressividade menor de mutantes resistentes a benomil foi também constatada em *Botryotinia fuckeliana* (POLACH e MOLIN, 1975) e *Cercospora beticola* (RUPPEL, 1975).

6.6 Comparação Serológica dos Isolados de *Colletotrichum* spp. de Morango

6.6.1 Testes Serológicos

Tabela 16 - Reação de três cultivares de Morango a sete isolados de *Colletotrichum* spp.

	Variedades								
	AGF-80			Campinas			Reiko		
	A ^{1/}	B ^{2/}	C ^{3/}	A	B	C	A	B	C
Pie-33	19	1,38	19	14	0,88	11	10	1,14	9
Pir-21	18	0,88	15	13	0,68	9	10	1,06	10
Bot-23	12	0,69	5	19	0,28	5	NA ^{4/}	NA	NA
Jun-1	18	0,54	3	14	0,42	0	10	NA	NA
Pie-28	11	0,39	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Jun-17	10	0,37	0	21	0,10	0	8	0,25	0
Pir-32	13	0,35	2	16	0,11	0	10	0,24	2
Testemunha	15	0,00	0	26	0,00	0	9	0,00	0

1/ Número de pecíolos inoculados

2/ Comprimento da lesão (cm) cinco dias após inoculação

3/ Número de pecíolos mortos 10 dias após inoculação

4/ NA = não avaliado.

Os resultados de dupla difusão em ágar realizados com soros obtidos na primeira sangria (SN) e dez subseqüentes soros (AS-1 a AS-10) contra antígeno homólogo, estão apresentados na Tabela 17. Observou-se que o coelho inoculado com antígeno Jun-17, se mostrou imunizado quatro dias após a primeira injeção, porém as melhores reações verificaram-se a partir dos 42 dias (Figura 2).

Reações de anti-soros (AS-10) com os antígenos obtidos de isolados Jun-1, Jun-17, Pir-21, Bot-23, Val-24, Pie-28, Pir-32 e Pie-33 estão apresentados na Tabela 18, revelando que os antígenos obtidos de isolados sensíveis ao benomil são serologicamente diferentes dos isolados resistentes ao benomil (Figura 3).

Os resultados da titulação dos antígenos (Jun-9, Bot-23, Val-24, Pie-28, Pir-21, Pir-32, Pie-33 e antígeno homólogo (Jun-17) com anti-soro da 10ª sangria (AS-10), realizada pela técnica de dupla difusão em Gel-Ágar, estão apresentados na Tabela 19 e Figura 4, demonstrando reação até a diluição 1:32, porém títulos altos até a diluição 1:4 para os antígenos obtidos de isolados Jun-1, Jun-17 e Bot-23 e título alto até a diluição 1:8 para os antígenos obtidos de isolados Val-24 e Pie-28.

A reação de titulação de anti-soros (AS-6, AS-7, AS-8, AS-9 e AS-10) com antígeno homólogo (AT-17), encontra-se na Tabela 20 e Figura 5. Neste, apenas os anti-soros 9 (AS-9) e 10 (AS-10) reagiram com antígeno homólogo (AT-17), até a diluição 1:16, sendo que o título alto foi observado até a diluição 1:2.

Reações de antígenos obtidos de isolados sensíveis (Pir-21, Pir-32 e Pie-33) e resistentes (Jun-17, Bot-23 e Pie-28) ao benomil com anti-soro da 10ª sangria, demonstraram que os primeiros são diferentes serologicamente do segundo, não apresentando reação.

Tabela 17 - Reações Serológicas Entre SN, AS-1, AS-2, AS-3, AS-4, AS-5, AS-6, AS-7, AS-8, AS-9, AS-10 do Coelho Imunizado com o Isolado e Seu Antígeno

Tempo	Código de soros	Reação serológica*
0	SN	0
21	AS-1	1
24	AS-2	1
28	AS-3	0
31	AS-4	0
35	AS-5	1
38	AS-6	1
42	AS-7	2
45	AS-8	2
49	AS-9	2
52	AS-10	2

*Linhas de precipitação

Figura 2 - Reação do Antígeno Homólogo (AT-7 = Jun-17) com os Anti-soros (AS-1, AS-2, AS-3, AS-4, AS-5, AS-6, AS-7, AS-8, AS-9 e AS-10).

Tabela 18 - Reações Serológicas Entre Antígenos Obtidos de Isolados Jun-1, Jun-17, Bot-23, Val-24, Pie-28, Pir-21, Pir-32 e Pir-33 a Anti-soro Obtido da 10.^a Sangria (AS-10).

Código dos antígenos*	Anti-soro (AS-10)
	Nº de linhas de precipitação
AT-1	1
AT-17	1
AT-23	1
AT-24	1
AT-28	1
AT-21	0
AT-32	0
AT-33	0

*Os números correspondem às dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Figura 3 - Reação de anti-soro (AS-10) com os antígenos obtidos de isolados Jun-1, Jun-17, Pir-21, Bot-23, Val-24, Pie-28, Pir-32 e Pie-33

Tabela 19 - Reação de Titulação dos Antígenos Preparado com Adjuvante Incompleto, Diluído em Salina Tamponada com Anti-soro da 10.^a Sangria

Antígenos	Número de linhas de precipitação nas diluições do antígeno					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Jun-1	2	2	2	1	1	1
Jun-17	2	2	2	1	1	1
Bot-23	2	2	2	1	1	1
Val-24	2	2	2	2	1	1
Pie-28	2	2	2	2	1	1
Pir-21	0	0	0	0	0	0
Pir-32	0	0	0	0	0	0
Pie-33	0	0	0	0	0	0
Soro normal	0	0	0	0	0	0

*Média de duas repetições

Figura 4 - Reação de Titulação do Antígeno (AT-17), Preparado com Adjuvante Incompleto, Diluído em Salina Tamponada, com Anti-soro (AS-10).

Tabela 20 - Reação de Titulação dos Anti-soros (AS-6, AS-7, AS-8, AS-9 e AS-10), Diluído em Salina Tamponada, com Antígeno Homólogo (AT-17) Obtido de *Colletotrichum* spp. de Morango.

Anti-soros	Nº de linhas de precipitação nas diluições de anti-soros*					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AS-6	0	0	0	0	0	0
AS-7	0	0	0	0	0	0
AS-8	1	0	0	0	0	0
AS-9	2	2	1	1	1	0
AS-10	2	2	1	1	1	0

*Média de duas repetições

Figura 5 - Reação de Titulação do Anti-soro (AS-10), Preparado com Adjuvante Incompleto, Diluído em Salina Tamponada com Antígeno Homólogo (Jun-17).

Tabela 21 - Reações Serológicas Entre Antígenos (AT-17, AT-21, AT-23, AT-28, AT-32 e AT-33) e Anti-soro AS-10} do Coelho Imunizado com o Isolado Jun-17

Código dos antígenos*	Reação do AS-10 (número de linhas de precipitação)
AT-17	1
AT-21	1
AT-23	1
AT-28	1
AT-32	1
AT-33	1

*Os números correspondem aos dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Figura 6 - Reações Serológicas Entre Antígenos (AT-17, AT-21, AT-23, AT-28, AT-32 e AT-33) e Anti-soro (AS-10)

6.7. Discussão Geral

Os estudos comparativos a que foram submetidos os isolados de *Colletotrichum* spp. do morango mostraram que existe entre eles diversidade morfo-fisiológica e serológica. Coincidentemente ou não, isolados de frutos que foram resistentes ao benomil tiveram dimensões de esporos, no geral, menores do que os sensíveis; eram de colônias mais claras; de menor taxa de crescimento; apresentaram baixa patogenicidade em pecíolos e eram serologicamente distintos. Por essas diferenças pode-se concluir que tais isolados são bem distintos de *C. fragariae* Brooks, cujo isolado típico (isolado Pie-33) é escuro, de maior taxa de crescimento micelial, de alta patogenicidade e associado a sintomas de "chocolate" em rizomas das plantas afetadas. Visto que, ARX (1957) coloca *C. fragariae* como sinônimo de *C. gloeosporioides*, pode ser tentado a erigir nova espécie baseada em tais diferenças. Fungos morfologicamente semelhantes em frutos de morango foram no passado classificados como *Gloeosporium* (STURGESS, 1954 e 1958; WRIGHT *et alli*, 1960; MARTINEZ *et alli*, 1962; MAAS, 1978). Nesse aspecto é preferível acompanhar o pensamento de ARX (1957), pois, como foi comprovado também aqui no presente trabalho (Tabela 14), a formação de setas não é uma característica fidedigna e, portanto, o gênero *Gloeosporium* deve ser reunido ao *Colletotrichum* spp. Entretanto ARX (1957), ao definir os limites morfológicos da espécie *C. gloeosporioides* em bases tão amplas (12 a 19 μ m de comprimento dos conídios), pode ter agrupado espécies diferentes, como sugere SIMMONDS (1965). Este autor, tendo em mente essas considerações, fez um estudo das espécies de *Colletotrichum* spp. causando podridões de frutos maduros, na Austrália, e comparando dimensões de esporos, características culturais, reações de temperatura e espectro de hospedeiro (por coleção de campo e inoculação artificial) descreveu uma nova espécie, o *C. acutatum* cuja descrição se assemelha a dos isolados de frutos do presente trabalho, exceto com

dimensões levemente menores. O espectro de hospedeiros dessa nova espécie seria *Carica papaya* L., *Fragaria* X *ananassa* Duchesne e *Lycopersicon esculentum* Mill. Entretanto, como tal nomenclatura ainda não está plenamente aceita e estudos comparativos não foram ainda feitos não se pode classificá-los. O mais coerente é aceitar a espécie *C. gloeosporioides* sensu ARX (1957), pelo menos provisoriamente, até que novas informações permitam conclusões mais seguras.

7. CONCLUSÕES

1. Isolados de *Colletotrichum* spp. de frutos de morango das regiões de Jundiaí, Piedade e Botucatu, com históricos de aplicação de benomil, são resistentes a esse produto, "in vitro".
2. De um modo geral, não há diferenças entre isolados sensíveis a resistentes ao benomil, quanto a sensibilidade a sete outros produtos fúngicos.
3. Isolados resistentes ao benomil são morfológica, patogênica e serologicamente distintos dos isolados sensíveis.

8. LITERATURA CITADA

1. AMOS, R.E. e R.G. BURRELL, 1967. Serological differentiation in *Ceratocystis*. Phytopathology, 57:323-34.
2. ARX, J.A. von, 1957. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathology 2, 29:413-469.
3. BERAHA, L. e W.R. WRIGHT, 1973. A new anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum dematium*. Plant Dis. Repr., 57:445-448.
4. BROOKS, A.N., 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae* n. sp. Phytopathology, 21:739-744.
5. BROOKS, A.N., 1935. Anthracnose and wilt of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. Louisiana State University. 45 p. (Anais). Ph.D. Dissertation
6. BUXTON, E.W.; W. CULBRETH e R.C. ESPOSITO, 1961. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 51:575 (Abstract).
7. CARDOSO, R.M., 1976. Diferenciação serológica entre espécies de *Ceratocystis*. Campinas, Instituto de Biologia, UNICAMP 49p. (Tese de Doutorado).
8. CARRENO, I.I. e A.P. TORRES, 1979. Aislamiento de razas tolerantes de *Venturia inaequalis* (Cke) Wint a fungicidas sistêmicos en la zona de Curicó. Agricultura Técnica, Chile, 39(2):52-58.
9. CARVALHO, P.C.T. e C.O.N. CARDOSO, 1964. Nota sobre antracnose dos estolões e podridão do rizoma do morangueiro, causada por *Colletotrichum fragariae* Brooks. Anaís da ESALQ/USP, 21:275-278.

10. DELP, B.R. e R.D. MILHOLLAND, 1980. Control of strawberry anthracnose with captafol. Plant Dis., 64: 1013-1015.
11. EDGINGTON; L.V.; K.L. KHEW e G.L. BARRON, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, 61:42-44.
12. FIGUEIREDO, M.B., 1972. Estudos fisiológicos e serológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolum* Sacc. e sobre as doenças por elas causada em beringela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 130 p. (Tese de Doutorado).
13. GEORGOPOULOS, S.G. e C. ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. Ann. Rev. Phyt., 5:109 - 130.
14. GEORGOPOULOS, S.G., 1969. The problem of fungicide resistance. Bioscience, 9(11):971-973.
15. GOODING; G.V. Jr. e H.R. POWERS, Jr., 1965. Serological comparison of *Crionortium fusiforme*, *C. quercum* and *C. ribicola* by immunodiffusion test. Phytopathology, 55:670-674.
16. HORN, N.L. e R.G. CARVER, 1962. Anthracnose and powdery mildew on strawberry plants in Louisiana. Plant Dis. Repr., 46:591-592.
17. HORN, N.L. e R.G. CARVER, 1963. A new crown rot of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology, 53:768-770.
18. HOWARD, C.M., 1972. A strawberry fruit rot caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology, 62:600-602.
19. HOWARD, C.M. e E.E. ALBREGTS, 1983. Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*). Plant. Dis. Repr., 67(10):1144-1146.

20. KIMATI, H., 1966. Algumas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn) Scrib., 1888 que ocorrem no Estado de São Paulo. Anais da ESALQ/USP, 23: 247-264.
21. KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957), Piracicaba, ESALQ/USP, 103 p. (tese de livre-docência).
22. KIMATI, H., 1978. Fungicidas. In: GALLI, F. coord. Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1:325-375.
23. KRYWIENCZYK, J. e C.E. DORWORTH., 1980. Serological relationships of some fungi of the genus *Phythium*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 58:1412-1417.
24. KURAMOTO, T. 1976. Resistance to benomyl and thiophanate methyl in strains of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in Japan. Plant Dis. Repr., 60(2):168-172.
25. MAAS, J.L., 1978. Antracnose of strawberry fruit in Maryland. Plant Dis. Repr., 62(6):488-492.
26. MACNEILL, B.H. e J. SCHOOLEY, 1973. The development of Tolerance to Dodine in *Venturia inaequalis*. Can. J. Bot., 51:379-382.
27. MADHOSING, C., 1964. A serological comparison of three *Fusarium* species. Can. J. of B., 42:1143-1146.
28. MARTINEZ, J.A.; L.O.C. REZENDE e M. FAZIO, 1962. Experiência para controle da podridão da antracnose do fruto do morangueiro. O Biológico, São Paulo, 28:296-299.
29. MENA, A.J.; M.A. GONZALES e M.E.P. GARCIA, 1975. Algunas enfermedades de la parte aérea de la frutilla (*Fragaria* sp.) en la provincia de Tucuman. Rev. Agron. del Nordeste Argentino, 12(3,4):309-321.
30. MENTEN, J.O.M.; C.C. MACHADO; E. MINUSSI; C. CASTRO e H. KIMATI., 1976. Efeito de alguns fungicidas no cres-

cimento micelial da *Macrophomina phaseolina* (TASS.)
GOLD. "in vitro". Fitopatologia Brasileira, 1:57-66.

31. MENTEN, J.O.M., 1977. Morfologia, patogenicidade e serologia de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (BERK et Mont.) N. comb. e resistência em melancia (*Citrullus vulgaris* SHARD) e pepino (*Cucumis sativus* L.). Piracicaba ESALQ/USP. 141 p. (Dissertação de Mestrado).
32. MERZ, W.Z.; R.G. BURRELL, e M.E. GALLEGLY, 1969. A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. Phytopathology, 59:367-370.
33. MILLER, M.W. e J.T. FLETCHER, 1974. Benomil tolerance in *Botrytis cinerea* isolates glasshouse crops. Trans. Br. Mycol. Soc., 62:99-103.
34. MORTON, D.J. e P.D. DUKES, 1966. Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Plant. Dis. Repr., 50(6): 444-445.
35. 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, 36(5): 121-8.
36. PEPIN, H.S. e E.A. MACPHERSON, 1982. Strains of *Botrytis cinerea* resistance to Benomyl and Captan in the field. Plant. Dis. Repr., 66:404-405.
37. POLACH, F.J. e W.T. MOLIN, 1975. Benzimidazole resistant mutant derived from a single ascospore of *Botryotinia fuckeliana*. Phytopathology, 65:902-904.
38. PORTO, O.M., 1978. Reação de *Colletotrichum musae* Penz a ethephon ácido giberélico e benomil e tolerância a fungicidas. Piracicaba, ESALQ/USP., 152 p. (Tese de Mestrado).

39. REMIRO, D. e H. KIMATI, 1974. Resistência a benomil e tiofanato em *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. O Biológico, São Paulo, 40:22-4.
40. RUPPEL, E.G., 1975a. A cultural variant of a benomyl-tolerant strain of *Cercospora beticola*. Phytopathology 65:734-735.
41. RUPPEL, E.G., 1975b. Biology of benomyl - tolerant strains of *Cercospora beticola* from sugar beet. Phytopathology, 65:785-789.
42. SACCARDO, P.A., 1884. *Sylloge fungorum* . 3:705-706.
43. SIMMONDS, J.H., 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences. 22:437-459.
44. SMOOT, J.J. e G.ELDON BROWN, 1974. Occurrence of benzimidazole-resistant strains of *Penicillium digitatum* in Florida citrus packinghouses. Plant.Dis.Reptr., 58:933-934.
45. STURGESS, O.W., 1958. A ripe fruit rot of the strawberry caused by a species of *Gloeosporium* . Queensland J. Agric. Sci., 14:241-251.
46. TATE, K.G. e G.J. SAMUELS., 1976. Benzimidazole tolerance in *Venturia inaequalis* in New Zeland. Plant. Dis. Reprtr 60:706-710.
47. TEMPEL, A., 1957. Serological studies on *Fusarium oxysporum* Schl. emend Sen. et H. Nature , Lond., 180:1483.
48. TERANISHI, J.; M.B. FIGUEIREDO; R.M.G. CARDOSO e T. NAMEKATA, 1973. The value of serological techniques for the differentiation between *Verticillium albo-atrum* Reik & Berth. And *Dahliae* Kleb. Arg. Inst. Biol., São Paulo, 40(1):45-51.

49. WICKS, T. , 1974. Tolerance to the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. Plant. Dis. Repr., 58:886-889.
50. WICKS, T., 1977. Tolerance to Benzimidazole fungicides in Blue Mold (*Penicillium expansum*) on pears. Plant. Dis. Repr. 61(6):447-449.
51. WILD, B.L. e L.E. RIPPON, 1975. Response of *Penicillium digitatum* strains to benomyl, thiabendazole, and sodium O-phenylphenate. Phytopathology, 65:1176-77.
52. WRIGHT, W.R.; M.A. SMITH; G.B. RAMSEY e L. BERAHA, 1960. *Gloeosporium* rot of strawberry fruit. Plant. Dis. Repr. , 44:212-213.
53. WUEST, P.J.; H. COLE Jr. e P.L. SANDERS, 1974. Tolerance of *Verticillium dahliae* to Benomyl. Phytopathology 64:331-334.