

EFEITO DO BENOMYL E IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS EM MEIO MS PARA CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Anacardium humile* (Anacardiaceae)

EFFECTS OF BENOMYL AND IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENS IN MS MEDIUM IN ORDER TO CONTROL CONTAMINATION IN MICROPROPAGATION OF *Anacardium humile* (Anacardiaceae)

Luciana Nogueira LONDE¹; Cristina Soares de SOUSA¹; Carlos Ueira VIEIRA¹; Ana Maria BONETTI²; Warwick Estevam KERR²

1. Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Genética, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia - MG. llonde@pop.com.br; 2. Professor, Doutor, Instituto de Genética e Bioquímica – UFU.

RESUMO: A contaminação é um dos principais problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento *in vitro* de explantes e a utilização de fungicidas no meio de cultura é uma maneira de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. O Benomyl é um fungicida sistêmico utilizado em cultura de tecido vegetal, que é absorvido pelas raízes e translocado para outras partes da planta. Esse trabalho teve por objetivo identificar os fungos em meio MS na micropropagação do *Anacardium humile* e analisar os efeitos da adição de Benomyl em meio de cultura, para controle da contaminação, *in vitro*. A identificação dos patógenos foi realizada em lâminas com esporos dos fungos, sob microscópio óptico. O fungo de maior prevalência foi o *Aspergillus niger* sendo responsável por 67% da contaminação enquanto que em 33% das amostras o fungo encontrado foi do gênero *Penicilium*. Os esporos foram colocados em meio MS com diferentes concentrações de benomyl. Concentrações acima de 12,0 g L⁻¹ foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, embora, as concentrações utilizadas não impediram a proliferação do *Penicilium*.

PALAVRAS-CHAVE: *Anacardium humile*, Micropropagação, Benzimidazoles

INTRODUÇÃO

Anacardium humile St. Hill., conhecido como cajuzinho-do-cerrado ou cajuí é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae, de ocorrência natural em Campo Sujo e no Cerrado do Brasil, distribuídos na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo e Tocantins. A espécie é conhecida com outras denominações, tais como, cajú, cajueiro-do-campo, caju-de-árvore-do-cerrado e cajuhy (LÓPEZ-NARANJO; PERNÍA, 1990; CEMIG, 2001).

Por ser uma espécie rasteira, o cajuzinho-do-cerrado concorre, com outras espécies, ao título de espécie em extinção sendo, no momento, considerada rara e protegida por lei (CEMIG, 2001). O porte baixo da planta torna-a, quando comparada ao cajueiro comum, mais susceptível à ações antrópicas e ao fogo.

O cajuzinho-do-cerrado tem grande importância alimentar, industrial, medicinal e econômica e a castanha tem as mesmas características e usos do cajueiro comum (*Anacardium occidentale*) com ampla utilização para o consumo. Como a grande maioria das espécies do cerrado, o *Anacardium humile* St. Hill., tem importância biológica e socioeconômica, interesses antagônicos que

umentam a necessidade de gerar informações, na tentativa de adequar a exploração econômica, de modo que não haja a utilização predatória ou até mesmo a extinção da espécie.

Um problema enfrentado na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* é a contaminação bacteriana e fúngica, principalmente, na superfície dos explantes, além da contaminação endógena.

Segundo DEBERGH; ZIMMERMAN (1991) o índice de contaminação pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório. HERMAN (1996) detectou, identificou e caracterizou contaminantes na cultura de tecidos vegetais, tentando controlá-los e, até mesmo, discutir a influência de microrganismos no estabelecimento da cultura. A interação entre plantas e microrganismos pode estimular o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis, ocasionando benefício às plantas (ARRUDA, 2000).

Os antibióticos e fungicidas são, ocasionalmente, utilizados para o controle *in vitro* de patógenos. POLLOCK et al. (1983) demonstraram que o uso de certos antibióticos é eficiente no controle de bactérias, entretanto, o uso deles para o controle *in vitro* de bactérias

contaminantes, tem sido limitado devido a toxicidade para as plantas (ARRUDA, 2000).

Uma das maneiras de se controlar as contaminações fúngicas, segundo THOMSON (1993), é o uso de benomyl, nome comercial benlate (metil -1 butilcarbomoil - 2 - benzimidazol - carbamato, C₁₄H₁₈N₄O₃) que é um fungicida foliar sistêmico e não apresenta problemas de fitotoxicidade, desde que as recomendações de uso sejam respeitadas.

O benomyl ou benlate pode, também, ser aplicado ao solo, ao redor das plantas, sendo absorvido pelas raízes e translocado para outras partes da planta (ISSAC, 1992).

Esse fungicida suprime o crescimento do micélio pela prevenção da divisão nuclear; inibe a mitose bloqueando a formação de β -tubulina e microtúbulos quando os cromossomos estão se separando (HAMMERSACHLAG; SISLER, 1973; HOWARD; AIST, 1980; DAVIDSE, 1986; ISSAC, 1992).

Na micropropagação, o benomyl além da proteção do material vegetal e do meio de cultura (PAIVA et al., 1999) possui alguns efeitos de regulador de crescimento [BECKER, apud YANG (1976)], o que se deve, provavelmente, a mudanças no ingrediente ativo do fungicida em função da autoclavagem do meio de cultura ou de outros componentes do produto comercial, os quais podem interferir no efeito hormonal do fungicida (SKENE, 1972). THOMAS (1973) sugere que a atuação hormonal do benomyl possa ser consequência de sua semelhança estrutural com as citocininas, entretanto, alguns trabalhos mostram que o fungicida tem efeito inibitório da sobrevivência, multiplicação e crescimento de explantes (WATT, GAUNTLETT; BLAKEWAY, 1995; WU, 1996). O benlate tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal em várias concentrações, 50 mg L⁻¹ (HAUPTMANN et al, 1985), 0,6 g L⁻¹ (YANG, 1976) e 2 g L⁻¹ (HALDEMANN et al., 1987).

O objetivo desse trabalho foi identificar fungos de ocorrência na micropropagação de *Anacardium humile* St. Hill. e analisar os efeitos da adição de *benomyl* ao meio de cultura MS para controle da contaminação, no cultivo *in vitro* da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Devido aos altos índices de contaminação encontrados nos testes de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* do cajuí, o material contaminado foi analisado para identificação dos

patógenos. Foram preparadas lâminas com azul de algodão acrescidos de esporos dos fungos encontrados. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico, aumento de 100x.

Os fungos encontrados no cultivo *in vitro* do cajuí foram identificados, isolados e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com diferentes concentrações de benomyl (nome comercial: benlate 50% de princípio ativo - Dupont): 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 11,0; 13,0 e 14,0 g L⁻¹.

O meio foi esterilizado em autoclave vertical à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos. O pH do meio foi ajustado para 5,8 \pm 1 e foram distribuídos 10 mL de solução em cada placa de Petri, sendo o fungicida acrescido ao meio de cultura, antes da autoclavagem. Os esporos dos fungos foram isolados e inoculados, em câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 repetições.

Após 7 dias, o crescimento dos fungos em meio MS foi avaliado a partir dos pontos de crescimento dos fungos com Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas SANEST com aplicação do teste de F a 1 e 5% de probabilidade, sendo transformados em $\sqrt{x+1/2}$, onde X = média das variáveis analisadas, pois não foi observado normalidade e homogeneidade nos dados originais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cultura de tecidos de cajuí, os principais fungos encontrados foram o *Aspergillus niger*, responsável por 67% da contaminação e o outro do gênero *Penicilium* observado em 33% das amostras contaminadas. Verificou-se, também, a presença de ambos.

O meio MS é um meio que contém concentrações relativamente altas de macronutrientes, o que favorece e explica os elevados índices de contaminação considerando a pequena exigência nutricional desses patógenos [CLUTTERBUCK (1974), ROCHA (1997) e JABOR et al. (2003)].

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa para as concentrações de benomyl testadas: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 13,0; 14,0 g L⁻¹ para o *Penicilium*, no entanto, estas mesmas concentrações foram significativas (P<0,01) para o controle de *Aspergillus niger* (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância para as concentrações de benomyl suplementados em meio MS para o controle do crescimento de *Penicilium* e *Aspergillus niger* no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2007.

Fonte de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		<i>Penicilium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Benomyl	7	0,0923 ^{ns}	0,3219 ^{**}
Resíduo	48	0,0622	0,0303

ns: não significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$); **: significativo pelo teste de *F* ($P < 0,01$); GL : grau de Liberdade.

A concentração de 2,0g L⁻¹ do fungicida foi ineficiente no controle do crescimento de colônias dos fungos, que foi encontrado em todas as placas de Petri inoculadas. O aumento das concentrações de benomyl provocou oscilação na formação das

colônias entre as concentrações de 4,0 até 10,0 g L⁻¹, sendo a concentração de 12,0 g L⁻¹ a mais eficiente no controle fúngico, quando se observou, em média, 0,23 colônias por placa de Petri (Tabela 2).

Tabela 2. Médias ajustadas pelas equações de regressão da ocorrência de *Penicilium* e *Aspergillus niger* em meio MS sob ação de benomyl (benlate) no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA). UFU - Uberlândia, MG – 2007.

Fungo	Benomyl (g L ⁻¹)							
	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	13,0	14,0
<i>Penicilium</i>	1,0000	0,6596	0,3630	0,6596	0,3630	0,2310	0,5058	0,5058
<i>A. niger</i>	0,6596	0,8243	0,8243	0,8243	0,2310	0,0000	0,0000	0,0000
CV (%)	24,641							

Os níveis de benomyl até 8,0 g L⁻¹ não foram eficazes para controle da contaminação por *Aspergillus niger*. A dose de 10,0 g L⁻¹ provocou diminuição do número de colônias formadas, encontrando-se 0,23 colônias por placa de Petri e doses a partir de 12 g L⁻¹ foram muito eficazes no combate a esse fungo, não ocorrendo crescimento em nenhuma placa inoculada (Tabela 2).

Aspergillus spp. são organismos que estão associados a um amplo espectro de infecções em diversos hospedeiros (REICHENBERG et al., 2002; SOUBANI; CHANDRASEKAR, 2002) e a seleção de fungos patogênicos está associada à condições ambientais como pH e temperatura (ARAÚJO; RODRIGUES, 2004). A ocorrência de fungos resistentes à substâncias do grupo dos benzimidazóis já é conhecida (FERNANDES et al., 2001), no entanto, não existem pesquisas que relatam a elevada resistência do *Aspergillus niger* e *Penicilium* às concentrações testadas, como as que encontramos em nossos experimentos.

De acordo com a Figura 1, o aumento na concentração de benomyl no meio de cultura até a dose de 4,01 g L⁻¹ proporcionou aumento na formação de esporos, atingindo média de 0,8

colônias do fungo por placa de Petri e a partir dessa dose, a formação de colônias decresceu.

No estabelecimento, *in vitro*, de segmentos nodais de cajueiro, SILVA NETO et al. (1993) utilizaram, no meio de cultura, 50 mg L⁻¹ de benlate, concentração que passou a fazer parte de protocolos de micropropagação de outros autores.

SATO et al. (2001) utilizaram 200 mg L⁻¹ de benlate na micropropagação de *Celtis* sp., verificando que essa concentração inibe o crescimento de fungos sem causar fitotoxicidade aos explantes.

FERNANDES et al. (2001) estudaram o comportamento, *in vitro*, de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela em relação a concentrações de benomyl. Verificaram que 1000µg mL⁻¹ de benomyl não inibiram totalmente o crescimento de micélios desse fungo, sendo que os isolados originários de pimentão apresentaram maior sensibilidade ao fungicida em comparação com os demais, mesmo quando submetidos a baixas concentrações do fungicida.

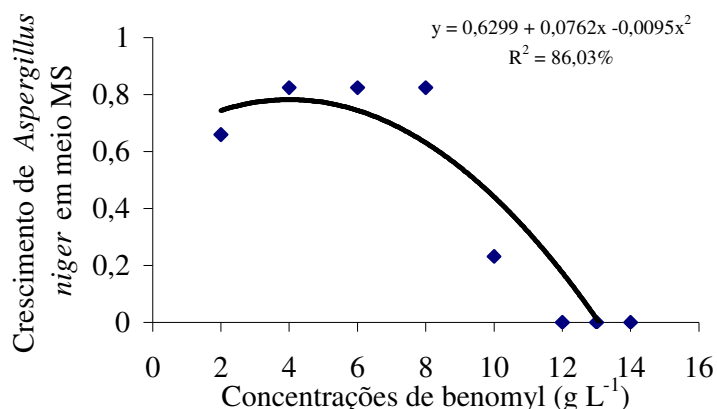


Figura 1. Regressão para o crescimento de *Aspergillus niger* em meio MS com variadas concentrações de fungicida sistêmico benomyl para cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2007.

CHIOCCHIO et al. (2000) estudando *Glomus mosseae* utilizaram 21,25 µg mL de benomyl, concentração que foi capaz de inibir a germinação de esporos, no entanto, para a inibição do crescimento fúngico de *Glomus caledonicum*, a concentração utilizada foi de 10 ng mL do fungicida. Todos os experimentos relatados na literatura, empregaram concentrações de fungicidas muito abaixo das que foram utilizados com *Anacardium humile*, em nossos experimentos.

Em algumas espécies, a resistência aos benzimidazoles é devida a mutações no códon 198 ou 200 do gene para a β-tubulina (KOENRAADT et al., 1992). Nesse sentido alguns estudos moleculares foram realizados. Luck et al. (1994) amplificaram fragmentos do gene da β-tubulina contendo os códons 198 e 200 de resistência e sensibilidade ao benomyl a partir de isolados de *Botrytis cinerea* Pers, verificando que quatro isolados não cresceram em presença de 1µM de benomyl.

MAY et al. (1987) estudando *Aspergillus nidulans*, a partir de hibridização de seu DNA, verificaram dois genes (*ben A* e *tub C*) para β-tubulina, que são expressos durante os estágios de desenvolvimento fúngico. Análises por PCR mostraram algumas variações nos produtos do isolado dessa espécie, com produtos de 480 pb para *A.nidulans*. Para o isolado de *Penicillium digitatum* o maior produto foi de 480 pb e o menor de 440 pb.

Quanto à resistência em condições de campo, TU; MCNAUGHTON (1979) determinaram

13 biótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes ao benlate, verificando diferenças quanto à esporulação e crescimento dos diferentes biótipos desse fungo.

CONCLUSÕES

Nos isolados da cultura de tecidos de *Anacardium humile* foram encontrados *Aspergillus niger* e *Penicillium*.

O meio MS foi um substrato adequado para o desenvolvimento e manutenção dos fungos devido às baixas exigências nutricionais desses patógenos.

As concentrações de benomyl testadas foram pouco eficientes no controle da contaminação em meio MS.

Concentrações acima de 12,0 g L⁻¹ de benomyl foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, no entanto, essas concentrações são muito altas e podem causar fitotoxicidade aos explantes no cultivo *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia pelas facilidades concedidas para o desenvolvimento desse trabalho. Ao CNPq e CAPES pelos auxílio financeiro. A CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado.

ABSTRACT:Contamination is one of the most common problems in the initial phase of the *in vitro* explants. The use of fungicides is a way of controlling the development of phytopathogens. Benomyl is a systemic fungicide used in cultures of vegetal tissue, which is absorbed by the roots and directed to other parts of the plant. This work aimed at identifying the existing fungi in the MS environment in the micropropagation of *Anacardium humile* and analyze the effects of the addition of Benomyl for the control of the contamination, *in vitro*. The identification of the pathogens was done with the use of the razor with spores of the fungi under optic microscope. The fungus with the biggest prevalence was *Aspergillus niger* being responsible for 67% of the contamination and the other fungus was identified as *Penicilium*. The spores were put in MS environment with different concentrations of benomyl. Concentrations over 12,0 g L⁻¹ of benomyl were efficient in the control of *Aspergillus niger* in MS environment, however, the concentrations used didn't impede the proliferation of *Penicilium*.

KEYWORDS: *Anacardium humile*. Micropropagation. Benzimidazoles

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R.; RODRIGUES, A. G. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Australia, v. 42, n. 3, p. 4335-4337, april, 2004.
- ARRUDA, S. A. **Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* L. obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida**. 2000. 42p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- CHIOCCHIO, V.; VENEDIKIAN, N.; MARTINEZ, A. E.; MENENDEZ, A.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Internatl Microbiol.**, Barcelona, v. 3, n. 2, p. 173-175, march, 2000.
- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. (Ed). **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Publishing, 1974, p. 447-510.
- COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. Assessoria de coordenação ambiental. **Guia ilustrativo de plantas do Cerrado de Minas Gerais**. São Paulo: Nobel, 2001. 96 p.
- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual review of phytopathology**, London, v. 24, n. 5, p. 43-65, november, 1986.
- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H.; **Micropropagation. Technology and Application**. 1. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. 48p.
- FERNANDES, M.do C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, R. L. D. Sensibilidade ao fungicida benomyl *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 68, n. 6, p. 89-95, setembro, 2001.
- GUTIÉRREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. **Rev. Peru. Biol.**, Peru, v. 10, n. 4, p. 78-87. outubro, 2003.
- HALDEMAN, J. H.; THOMAS, R. L.; McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. Japonica*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 306-307, may, 1987.
- HAUPTMANN, R. M.; WIDHOLM, J. M.; PAXTON, J. D. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. **Plant Cell Report**, Berlim, v. 4, n. 2, p. 129-132, august, 1985.

HAMMERSACHLAG, R. S.; SISLER, H. D. Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): biochemical cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Pestic. Biochem physiol**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 42-54. october, 1973.

HOWARD, R. J.; AIST, J. R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cell. **J.Cell Biol.**, Greece, v. 87, n. 17, p. 55-64, november, 1980.

ISAAC, S. **Plant fungal interactions**. Chapman and Hall. London.1992. 150p.

JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; RODRIGUES, S. B.; MARQUES-SILVA, G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta. Scientiarum. Agonomy**, Maringá, v. 25, n. 8, p. 497-501. julho, 2003.

KOENRAADT, H.; SOMEVILLE, S. C.; JONES, A. L. Characterisation of mutations in the beta tubulin gene of benomyl resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, California, v. 82, n. 6, p. 1348-1354, september, 1992.

LÓPEZ-NARANJO, H.; PERNÍA, N. E. de. Anatomia y ecología de los organos subterráneos de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). **Rev. For. Venez. XXIV**, Venezuela, v. 34, n. 4, p. 55-76. abril, 1990.

LUCK, J. E.; GILLINGS, M. R.; STEEL, C. C. Amplification and cloning of a β -tubulin gene fragment from strains of *Botrytis cinerea* resistant and sensitive to benzimidazole fungicides. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v.22, n. 5, p. 173-179, december, 1994.

MAY, G. S.; TSANG, M. L. S.; SMITH, H.; FIELD, S.; MORRIS, N. R. *Aspergillus nidulans* β -tubulin genes are unusually divergent. **Gene**, Porto Alegre, v. 55, n. 7, p. 231-243, julho, 1987.

PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R. de.; CAMPOS, K. P. de.; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Campinas, v.26, n. 3, p.71-76, maio, 2002.

PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. D. B.; KAWAMURA, M. I.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de BAP, Thidiazuron e Sulfato de Adenina na propagação *in vitro* de abacaxi. **Revista Ceres**, Campinas, v. 46, n. 3, p. 231-237, dezembro, 1999.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reporter**, London, v. 2, n.4, p. 36-39, august, 1983.

SKENE, K. G. M. Cytokinins like properties of systemic fungicide benomyl. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, London, v. 47, n. 9, p. 179-182, may, 1972.

REICHENBERG, F.; HABICHT, J. M.; GRATWOHL, A.; TAMM, M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neurotropic patients. **Eur. Resp. J.**, London, v. 19, n. 2, p. 734-755, september, 2002.

ROCHA, C. L. M. S. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em *Aspergillus nidulans***. 1997. Tese (Doutorado) — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. de; SOUZA, V. C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da Contaminação e Oxidação. **Cerne**, Campinas, v. 7, n. 4, p. 117-123. dezembro, 2001.

SILVA NETO, S. P.; MARUTA, I.; TAKAIWA, F. et al. Indução de calos em tecidos de cajueiro (*Anacardium occidentale*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 5, n. 6, p. 109, outubro, 1993.

SMITH, C.M. History of benzimidazole use and resistance. In: **Fungicide resistance in Northern America**. DELP, C.J. ed. Minnesota, United States, American Phytopathological Society Press. 1998. p. 23-24.

SOUBANI, A. O. & CHANDRASEKAR, P.H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest**. Minnesota, v. 121, n. 52, p. 1988-1999, october, 2002.

THOMSON, W.T. Agricultural chemical. **Book IV – Fungicides**, v.23, p. 303-312, 1993.

THOMAS, T.H.G. Benzimidazole fungicides on the germination of celery seeds. **Annals of Botany**, Boston, v. 65, n. 6, p. 238-239, april, 1973.

TU, J.C & McNAUGHTON, M.E. Isolation and characterization of benomyl-resistant biotypes of the delta race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Can. J. Plant Sci**, London, v. 60, n. 9, p. 585-589, july, 1979.

WATT, M.P.; GAUNTLETT, B. A.; BLAKEWAY, J. Fungal agents in cultures of *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, Africa, v. 37, n. 4, p. 607-610, june, 1995.

WU, W.S. Development and production of biofungicide. **Plant Pathology Bulletin**, Boston, v. 43, n. 3, p. 471-474, may, 1996.

YANG, H.J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. Shoot and root development in culture media. **HortScience**, Alexandria, v. 11, n. 6, p. 473-477, september, 1976.