

DANIEL AUGUSTO SCHURT

POTENCIAL DO ISOTILCIANATO DE ALILO NO CONTROLE DE
Sclerotium rolfsii e Sclerotinia sclerotiorum

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

DANIEL AUGUSTO SCHURT

**POTENCIAL DO ISOTILCIANATO DE ALILO NO CONTROLE DE
Sclerotium rolfsii e *Sclerotinia sclerotiorum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 20 de março de 2006

Prof.^a Rosângela D’Arc de Lima
(Conselheira)

Prof. Gulab Newandram Jahm
(Conselheiro)

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Prof. José Rogério de Oliveira

Prof. Onkar Dev Dhingra
(Orientador)

**Minha Família
Meu bem mais precioso.
Queridos pais, Odilon e Edite
E irmão, Leonardo.**

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em nome do Departamento de Fitopatologia, por possibilitar a realização deste curso.

Ao meu orientador, Professor Onkar Dev Dhingra, pela paciência e compressão.

À Professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela amizade e apoio.

Ao Professor Gulab Newandram Jahm, pelo apoio em química.

Ao Professor Robert Weingart Barreto, pela amizade e apoio.

Aos companheiros e colegas, Rogério Fürst, Délcio Rocha, André Lima, Ulisses Bremer e Melchior Nascimento.

Aos colegas da clínica de doenças de plantas, Olinto, Dartanhã, Bruno, Davi, Henrique, Ronaldo, Fabiano, Janaina, Meiriele, em especial a Geraldo e Priscila pelo auxílio técnico-científico e amizade.

Aos colegas da química, Carolina, Rosemeire, em especial a Eduardo pelo auxílio técnico-científico e amizade.

Ao Secretario do Curso de Pós-Graduação Fitopatologia, Délio.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DANIEL AUGUSTO SCHURT, filho de Odilon Schurt e Edite Stolf Schurt, nasceu na cidade de Rio dos Cedros, Santa Catarina, em 14 de janeiro de 1981.

Ingressou no curso de Agronomia no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Unidade de Pato Branco em 1999.

Iniciou o mestrado em março de 2004 no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> :	3
2.2 <i>Sclerotium rolfsii</i>	4
2.3 BRÁSSICAS	6
2.4 GLUCOSINOLATOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Obtenção do óleo essencial de mostarda (ITCA).	10
3.2 Determinação das análises físicas e químicas do solo.....	10
3.3 Determinação da difusão descendente do ITCA no solo.....	10
3.4 Obtenção de isolados de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	11
3.5 Produção dos escleródios de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	11
3.6 Determinação in vitro do efeito do vapores de ITCA sobre a viabilidade de escleródios.	12
3.7 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i> e na atividade microbiana do solo.....	12
3.8 Determinação do efeito do ITCA, via irrigação do solo, sobre a viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	14
3.9 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> em condições de campo.....	14
3.10 Análise Estatística.	15
4. RESULTADOS	16
4.1 Determinação da difusão descendente do ITCA no solo.....	16
4.2 Efeito in vitro dos vapores de ITCA sobre a viabilidade de escleródios.....	17
4.3 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i> no solo.	20
4.4 Determinação do efeito do ITCA aplicado via irrigação na viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	23
4.5 Determinação do efeito do ITCA na viabilidade de escleródios de <i>S. rolfsii</i> no campo.	26
4.6 Determinação do efeito do ITCA na microbiota do solo.....	26
4.6.1 Atividade Microbiana	26
4.6.2 População de Microrganismos	29
4.7. Determinação do efeito do ITCA na microbiota do solo em condições de campo ...	33
4.7.1 Atividade microbiana	33
4.7.1 População de Microrganismos	33
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

RESUMO

SCHURT, Daniel Augusto. M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Potencial do isotiocianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Orientador: Onkar Dev Dhingra. Conselheiros: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira e Gulab Newandram Jahm.

As perdas causadas por fungos nas sementeiras e nos viveiros de produção de mudas são altas se o substrato não sofrer tratamento para a sua erradicação. O transplântio de mudas infectadas provoca doença além de infestar o solo com patógenos transportados pelas mudas, tornando-se economicamente inviável o controle do patógeno. O objetivo foi avaliar o efeito do isotiocianato de alilo (ITCA), para o tratamento de solo, visando ao controle de patógenos (*Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*) e avaliar seu efeito na microbiota geral do solo. Estudando a difusão descendente do ITCA no solo em tubos de PVC, coletou-se os vapores de ITCA na massa do solo em diferentes umidades e profundidades. Foi observado que o ITCA difundiu-se melhor em solos secos (15 cm de profundidade) que em solos com 17% (10 cm) e 22% (7,5 cm) umidade. A utilização do ITCA na água da irrigação diminuiu a viabilidade dos escleródios de *S. rolfii* e *S. sclerotiorum* na profundidade de 7,5 cm em 95 % com ITCA na concentração de 150 µL/kg de solo. Em condições *in vitro* o ITCA na concentração de 150 µL/L matou 80% dos escleródios de *S. rolfii* e *S. sclerotiorum* com 4 dias de exposição aos vapores de ITCA. O efeito do ITCA provocou um atraso na germinação dos escleródios, na concentração de 50 µL/L nas primeiras 48 horas, a germinação dos escleródios foram de 3,7 e 10% para *S. rolfii* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. No solo seco ao ar, foi observado um maior efeito do ITCA na mortalidade dos escleródios, que em solos úmidos (17 e 22% umidade) a mudança de umidade ou temperatura influenciaram na viabilidade dos escleródios. Em condições de campo, sem a lona a dose utilizada de 8,86 ml/m² de ITCA controlou os escleródios de *S. rolfii*, mas com a utilização de lona a mortalidade dos escleródios foi de

98%. Foi observado que a utilização de ITCA no solo diminuiu a atividade microbiana dependendo das condições de solo. A comunidade microbiana no solo, actinomicetos, bactérias e fungos sofreram mudanças com a adição do ITCA no solo. As unidades formadoras de colônias (ufc's) de actinomicetos e bactérias diminuíram, dependendo das condições do solo e ufc's de fungos também diminuíram com a adição do ITCA. A utilização no campo do ITCA aumentou o número de ufc's de bactérias e actinomicetos e diminuiu o ufc's de fungos.

ABSTRACT

SCHURT, Daniel Augusto. M.S., Universidade Federal de Viçosa, march, 2006.
Potential do allyl isothiocyanate to control *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Advisor: Onkar Dev Dhingra. Committee members: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira and Gulab Newandram Jahm.

The losses caused by fungi in the nursery of seedling production are high if the planting substrate is not treated for their eradication. Transplanting infected seedlings to field causes disease in the field besides infesting the soil with pathogens transported by the disease seedling, where the disease control becomes economically unviable. The objective of this study was evaluate the effect of the, allyl isothiocyanate (AITC) for the soil treatment, to control *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* and also to evaluate its effect on the general soil microbiota. The study about diffusion of AITC vapors in the soil showed that AITC diffused downwards better in dry soils (detected up to 15 cm of depth) than in moist soils, where it was detected up to 10 and 7,5 cm depth at soil moisture of 17 % and 22% respectively. Irrigating soil with water containing AITC to provide 150 µL/kg soil reduced the viability of the sclerotia of *S. rolfsii* and *S. sclerotiorum* to a depth of 7,5 cm. In vitro, AITC vapors in the concentration of 150 µL/L killed 80% of concentration of AITC, in vitro or in soil, delayed sclerotial germination in the first 48 hours, and full germination potential was observed only after 120 h. The AITC effect on sclerotia viability was slightly greater the air-dry soil compared to the soils, however from the practical point of view the soil moisture up to 20% and the high temperature did not affect the influence of AITC on sclerotial viability. In field conditions the used AITC at the rate of 8,86 ml/m² killed 98% sclerotia of *S. rolfsii* when the plots were covered with a plastic mulch after the application. Soil treatment with AITC also reduced the microbial activity, changed significantly depending upon the soil conditions, but in general, the populations of actinomycetes, bacteria and fungi decreased.

1. INTRODUÇÃO

Uma agricultura mais racional visa, entre outras coisas, obtenção de uma maior produtividade por unidade de área e a sanidade do produto. O uso de defensivos químicos, como os fungicidas, difundiram-se enormemente pela sua capacidade de controle, no entanto, apresentam aspectos negativos, como a poluição do ambiente, alterando o complexo biótico da natureza, afetando as plantas, animais e o próprio homem.

Numerosas estratégias têm sido investigadas para modificar as comunidades microbianas do solo. Práticas culturais, rotação de cultura, aração e fertilização entre outras, que afetam ecologicamente as comunidades microbianas, envolvendo a supressão de patógenos do solo. Principalmente melhorando o crescimento das comunidades benéficas e suprimindo microrganismos que causam doenças em plantas.

As perdas causadas por patógenos do solo, principalmente por *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* e nematóides são altas, se o substrato ou mudas não sofrerem algum tratamento. O transplante de mudas infectadas por esses patógenos torna o controle praticamente inviável economicamente.

Os patógenos *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* atualmente são controlados por fumigação com brometo de metila, o qual está sendo proibido no mundo inteiro. No Brasil, a partir de 2006, será proibida a sua utilização em viveiros e sementeiras (MAPA, 2002), pois o produto é altamente tóxico, poluente e danifica a camada de ozônio.

Com a proibição do uso do brometo de metila para fumigação de solo, outros meios alternativos estão sendo estudados, como a incorporação de tecidos de *Brassica* spp. Estas apresentam o potencial para suprimir patógenos do solo, como a utilização das folhas de *Brassica* sp. no controle de *Helminthosporium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, *F. oxysporum* f. sp. *conglutians* e *R. solani* (RAMIREZ-VILLAPUDUA & MUNNECKE, 1988; SUBBARAO & HUBBARD, 1996;

CHARRON & SAMS, 1999; LODHA & SHARMA, 2002; MAWAR & LODHA, 2002; DHINGRA et al., 2004).

O mecanismo de controle da doença ou supressão de patógenos no solo com adição de folhas ou farinha de grãos de *Brassica* spp. tem sido relacionado com a liberação de isotiocianatos (ITCs), pois o grau de inibição de crescimento de fungos, "in vitro" correlaciona-se diretamente com a produção desses compostos durante a decomposição dos tecidos (MAYTON et al. 1996, OLIVER et al., 1999).

A mostarda preta *Brassica nigra* e a mostarda indiana *B. juncea* produzem compostos voláteis fungitóxicos, depois da hidrólise enzimática do glucosinolato de alilo. Segundo DAXENBICHLER et al. (1991) esse glucosinolato geralmente é convertido para o composto volátil isotiocianato de alilo (ITCA), o qual apresenta potencial para suprimir patógenos, sendo um dos mais potentes componentes antimicrobianos formados pelas *Brassica* spp. (MACLEOD, 1976; FENWICK & HEANEY, 1983; MARI et al., 1993; KIRKEGAARD et al., 1996; VAUGHN & BOYDSTON, 1997; MORRA & KIRKEGAARD 2002).

O ITCA é um aromatizante comercial obtido do macerado de folhas e sementes secas de *Brassica* spp. É produzido quimicamente para utilização na indústria alimentícia. O composto apresenta uma certa segurança atestada pela 'Food and Drug Administration of the United States' (FURIA, 1972). E possui a propriedade anticancerígena (KIRLIN et al., 1999).

No laboratório da Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia vem-se estudando desde 2001. Extratos de crucíferas para controle de fungos nas sementes e grãos armazenados. Estudos demonstraram que o ITCA extraídos de algumas espécies de crucíferas protegem os alimentos processados, sementes e grãos secos nas embalagens, contra crescimento de fungos deterioradores destes produtos (várias espécies de *Aspergillus*) através do efeito vaporífico. Resultados destas pesquisas deram origem a uma formulação, um produto de baixo custo, que foi patenteado no Brasil (DHINGRA et al., 2004c). Também, foi descoberto mais recentemente seu efeito no controle de insetos dos grãos armazenados.

Pesquisas realizadas no exterior e também no departamento de fitopatologia justificam e fornecem forte indício da possibilidade de testar o ITCA para o tratamento de substrato para produção de mudas, visando erradicação de patógenos, em substituição ao brometo de metila, quando este for proibido a partir de dezembro de 2006.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*:

Esse fungo é de ampla ocorrência, tanto em locais de clima tropical quanto temperado, em regiões úmidas e secas. O fungo possui uma ampla faixa de hospedeiros incluindo principalmente as famílias solanáceas, crucíferas, umbelíferas, compostas, quenopodiáceas e leguminosas (WILLETS & WONG, 1980). Cerca de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas já foram relatados como hospedeiras. (BOLAND & HALL, 1994). Pelo grande número de plantas hospedeiras, esse fungo é considerado um dos principais fungos fitopatogênicos (WILLETS & WONG, 1980).

No Brasil, o primeiro registro de ocorrência deste patógeno foi feito em 1921, em batata (*Solanum tuberosum*), no Estado de São Paulo (CHAVES, 1964). *Sclerotinia sclerotiorum* é hoje um importante patógeno de diversas espécies de plantas em vários locais do Brasil. Nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, devido à expansão da irrigação por pivô central, a ocorrência desse patógeno e a severidade nas plantas têm sido crescentes. As perdas ocasionadas pela doença atingem, em média, 30 %, mas pode alcançar até 100 % se medidas efetivas de controle não forem tomadas (VALE et al., 1997).

Em condições favoráveis, o fungo cresce rapidamente invadindo os tecidos do hospedeiro, ocasionando uma podridão aquosa, na qual se desenvolve um micélio branco cotonoso, sobre os tecidos infectados. Com o crescimento micelial, estruturas pequenas e compactas são formadas na superfície e interior do hospedeiro, estruturas estas chamadas de escleródios. Com o avançar da doença, um grande número de escleródios são formados, e, à medida que o hospedeiro se decompõe, estes ficam no solo, onde podem permanecer dormentes por longos períodos ou germinarem após um curto período de dormência (PURDY, 1979; WILLETTTS & WONG, 1980; DOW et al., 1988).

O fungo *S. sclerotiorum* produz escleródios negros com 2 a 6 mm de diâmetro, redondos a semi-esféricos que atuam como estruturas de resistência. Em placas de Petri formam-se anéis com 20 a 60 escleródios (WILLETTTS & WONG, 1980). Sobrevivem em

restos culturais e no solo por cerca de oito anos. Em regiões de temperaturas amenas, em condições de alta umidade, sob a superfície do solo, e até no máximo 5 cm de profundidade, os escleródios podem germinar carpogenicamente, dando origem a apotécios. Estes irão produzir ascósporos, que serão disseminados pelo vento, infectando a planta hospedeira (PURDY, 1979).

O longo período de sobrevivência no solo, associado ao grande número de espécies hospedeiras, dificulta o controle deste fungo. Uma das formas de diminuir o inóculo no solo é mantê-lo inundado por um período de 20 a 45 dias, reduzindo a viabilidade dos escleródios. Esta técnica na maioria das vezes é economicamente inviável (CHAVES, 1964).

A aplicação de fungicidas tem controlado parcialmente o patógeno, exigindo um grande número de aplicações durante o cultivo (WILLETTS & WONG, 1980). Na maioria das vezes os produtos químicos devem ser aplicados antes que a infecção ocorra para prevenir a colonização do patógeno (STEADMAN, 1979).

Mais de 30 espécies de fungos e bactérias já foram relatados como antagonistas de *Sclerotinia sp.* (STEADMAN, 1979). O controle biológico ainda não tem sido amplamente utilizado no campo. O controle biológico de *S. sclerotiorum* tem sido estudado em associação com diversas estratégias. Medidas isoladas de controle biológico, porém não têm sido eficientes na prática. (ZHOU & BOLAND, 1998). A integração de diferentes estratégias como práticas culturais, controle biológico, físico e químico, parece ser a mais eficiente e economicamente viável forma de controle.

2.2 *Sclerotium rolfsii*

O fungo é um importante fitopatógeno habitante do solo, sendo responsável por podridão de raízes, do colo, de bulbos e frutos, causando, murcha, tombamento de plântulas e podridões. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 500 espécies botânicas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas (PUNJA & RAHE, 1992).

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. (telimórfico *Athelia rolfsii*) caracteriza-se por produzir pequenos escleródios marrons escuros a pretos com diâmetro de 0,5 a 2 mm, produzidos principalmente nas hifas laterais (PUNJA, 1985). *S. rolfsii* prevalece em regiões quentes com temperaturas altas em torno de 27 a 30°C para o crescimento e a formação de escleródios e diminui com temperaturas abaixo de 15°C. A flutuação na temperatura pode

afetar a forma e o tamanho dos escleródios (MATHUR et al., 1976). A abundância na produção de escleródios na superfície do solo ocorre em resposta à luz e a maior demanda por oxigênio (MILLER et al., 1977).

O crescimento micelial e a formação de escleródios são inibidos a baixas concentrações de oxigênio e alta concentração de dióxido de carbono na faixa de 15 % e 3 % respectivamente. A taxa de germinação no solo é baixa em profundidades maior que 2,5 cm comparada com a superfície do solo. Com o aumento da umidade, o crescimento micelial é progressivamente menor. A incidência da doença é maior em solos arenosos e bem drenados com umidade a baixos da capacidade de campo. (PUNJA et al., 1984).

O controle para desse patógeno tem freqüentemente um sucesso limitado, devido à uma por uma extensa gama de hospedeiros, um crescimento prolífico e pela habilidade de produzir um grande número de escleródios que persistem no solo por vários anos. Fungicidas foliares tendem a diminuir os níveis de antagonismo de *Trichoderma* spp. no solo favorecendo assim o crescimento do *S. rolfsii* (BACKMAN et al., 1975). A presença de material orgânico favorece o crescimento micelial, pois o fungo apresenta habilidade saprofítica (BEUTE et al., 1981). Práticas culturais, densidade de plantio e a proximidade das raízes são uns dos maiores fatores que influenciam o progresso da doença (PUNJA, 1985). Outros fatores importantes são a rotação contínua de culturas suscetíveis o que aumenta a incidência e o inóculo do patógeno ano após ano, e à predisposição da planta a estresses biológicos, físicos e condições ambientais favorece a infecção por *S. rolfsii* (RODRIGUEZ-KABANA et al, 1974).

Numerosos fungicidas inibem a germinação e o crescimento micelial de *S. rolfsii*, mas as maiores limitações são a eficácia que depende da cultura e da época de aplicação (PUNJA et al., 1985). Fumigantes de solo, como brometo de metila, cloropicrina e “sodium-methan” são tóxicos aos escleródios (MUNNECKE et al., 1982). A aplicação de biocidas e “potassium azide” resulta numa diminuição do inóculo, mas estes componentes são economicamente inviáveis na prática (RODRIGUEZ-KABANA et al., 1972). Aplicações de fertilizantes amoníacais como uréia e bicarbonato de amônia tem diminuído a incidência da doença. Estes fertilizantes inibem a germinação e retardam o crescimento micelial (PUNJA e at., 1982). Aplicação de fertilizantes à base de cálcio também diminuem a incidência da doença (PUNJA e at., 1982).

Muitos estudos têm sido feitos com bactérias, actinomicetos e fungos para suprimir *S. rolfii*, mas poucos estudos têm demonstrado a eficácia destes agentes no campo (PUNJA et al., 1985).

Uma das formas de controle é a exposição do escleródio a temperaturas acima de 50°C por extensos períodos. Temperaturas subletais não matam o escleródio, mas favorece o antagonismo microbiano. Altas temperaturas com alta umidade são desfavoráveis a sobrevivência do escleródio (MIHAIL et al., 1984).

A solarização associado com aplicação de *T. harzianum* resulta numa diminuição da doença. Outro método efetivo é a aração na profundidade superior a 12 cm (MIHAIL et al., 1984). A adição de resíduos orgânicos como aveia e milho, possibilita a liberação de NH₃ aumentando também microrganismos antagonistas (GAUTUM et al., 1979). Esta pode ser uma forma de controle econômica para um sistema de agricultura sustentável.

2.3 BRÁSSICAS

A família *Brassicaceae* também é conhecida por *Cruciferae* ou vulgarmente por crucíferas. Dependendo dos critérios de classificação, pode-se chegar a 350 gêneros e 3.000 espécies nessa família. Está dispersa amplamente pelo mundo, em regiões de climas temperado e subtropical. Em alguns casos é uma planta infestante com grande capacidade de competição, principalmente em culturas de cereais como trigo e cevada (KISSMANN et al., 1997).

A mostarda preta (*Brassica nigra*) e a mostarda indiana (*B. juncea*) produzem compostos voláteis fungitóxicos, depois da hidrólise enzimática dos glucosinolatos. Segundo DAXENBICHLER et al., (1991), o glucosinolato geralmente é convertido para o composto volátil isotiocianato de alilo (ITCA), o qual apresenta potencial para suprimir patógenos, e pode ser produzido em grandes quantidades, sendo um dos mais potentes componentes antimicrobianos formados pelas *Brassica* spp. (MACLEOD, 1976; FENWICK & HEANEY, 1983; MARI et al., 1993; KIRKEGAARD et al., 1996; VAUGHN & BOYDSTON, 1997; MORRA & KIRKEGAARD 2002).

Mais de 100 tipos de glucosinolatos tem sido identificados em plantas (Koritsas et al., 1991). A magnitude da supressão de patógenos por *Brassica* spp. está ligada a composição e a concentração de glucosinolatos, a qual varia grandemente com a espécie de planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecido (KJAER, 1973; FENWICK e HEANEY, 1983 SANG et al., 1984). Tecidos de plantas de *B. juncea* são mais supressivos

para patógenos de cereais quando as plantas estão entre o florescimento e a maturação das sementes (KIRKEGAARD et al., 1996).

Reduções de patógenos do solo com a incorporação das folhas de *Brassica* sp. tais como: *Helminthosporium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, *F. oxysporum* f. sp. *conglutians* e *R. solani* tem sido relatadas na literatura (RAMIREZ-VILLAPUDUA & MUNNECKE, 1988; SUBBARAO e HUBBARD, 1996; CHARRON & SAMS, 1999; LODHA & SHARMA, 2002; MAWAR & LODHA, 2002). A redução de *P. ultimum* e de *S. rolfsii* no solo usando folhas secas de repolho, juntos com a solarização está correlacionada com a liberação de ITCA (GAMLIEL & STAPLETON, 1993). Os tratamentos utilizando sementes de *Brassica* sp. também controlaram *R. solani* em plantios de repolho (CHUNG et al., 2002).

As Brássicas apresentam diferentes concentrações de glicosinolatos, e possuem potencial para suprimir a germinação de sementes de trigo (BIALY et al., 1990). Entretanto, PAPAVIDAS (1966) reportou que a emergência de ervilhas não foi afetada por mostardas com alto nível de ITCA quando plantadas 7 semanas depois da incorporação de tecidos de *Brassica* sp. KIRKEGAARD et al. (1996) demonstraram que a emergência de trigo também não foi afetada depois de 4 semanas da incorporação de tecidos de *Brassica* sp. no solo. Segundo BROWN & MORRA (2005) a biomassa para ter uma eficiência aceitável, deve produzir acima de 100 nmol de ITC g⁻¹ de solo, comparando-se com os pesticidas sintéticos a base de ITCs já disponíveis comercialmente.

2.4 GLUCOSINOLATOS

Os glicosinolatos são ânions orgânicos contendo a β -D-tioglicosídeos, oxime sulfonado e um alifático aromático, ou uma cadeia heterocíclica, distinguindo-se um do outro por meio de diferenças nas cadeias orgânicas laterais destes (grupo R) (ZANADA & FERRIS, 2003). Estão distribuídos predominantemente nas plantas da ordem Capparales, na qual a plantas cultivadas são principalmente da família das *Brassicaceae* (KJAER, 1974; CRISP, 1976). A incorporação de material orgânico de plantas contendo glicosinolatos no solo tem demonstrado promissora redução em patógenos do solo (BROWN et al., 1991). Os glicosinolatos possuem limitada atividade biológica, embora eles são hidrolisados por uma enzima endógena chamada mirosinase (β -tioglucosídeo glucohidrolase) (POULTON & MOLLER 1993). A hidrólise enzimática do glicosinolato produz D-glicose, SO₄²⁻ e uma

grande quantidade de potenciais aleloquímicos dependendo da especificidade da cadeia, estrutura e das condições das reações, que segundo DUNCAN (1991) são influenciadas pelo pH, concentração de íons metálicos e disponibilidade de água. Os produtos da hidrólise enzimática do glicosinolato geralmente são tóxicos, antinutricionais e com efeitos aleloquímicos (CHEW, 1988; BROWN & MORRA, 1997; FOO et al., 2000).

A formação de isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos e epitionitrilas, oxazolidinotiones, e outros produtos dependem da estrutura da cadeia e, particularmente, dos glucosinolatos e das condições de reações (UDA et al., 1986). Os isotiocianatos e nitrilas são dois grupos que são produzidos pela decomposição enzimática do glucosinolato. Isotiocianato está ligado com a maioria dos nematicidas, fungicidas e inseticidas e outros aleloquímicos, efeitos da degradação do glucosinolato (BOREK et al., 1995).

A meia vida do isotiocianato de alilo é de aproximadamente 2 dias e para o alilo nitrila de 4 dias no solo, incubados a uma temperatura de 20°C (BOREK et al., 1995). É relativamente rápida a dissipação de ambos os componentes no solo tendo importantes implicações para o controle de patógenos do solo usando tecidos de plantas do gênero *Brassica* sp. A atividade dos glucosinolatos contidos em tecidos de plantas pode ser de vida curta, com pouca atividade residual, como vários fumigantes de solo (BOREK et al., 1995).

Quando a umidade do solo é aumentada, a vida útil do ITCA diminui, sendo o inverso para o alilo nitrila. Com o aumento da temperatura do solo, a vida útil do ITCA é diminuída, mas para o alilo nitrila o aumento da temperatura aumenta a vida útil. O ITCA desaparece quando o solo está seco, com temperaturas elevadas e altas concentrações de carbono (BOREK et al., 1995).

Em solos com grande quantidade de carbono orgânico, ocorre uma rápida dissipação do ITCA, pois o grupo funcional do ITCA pode reagir com o grupo nucleofílico comumente encontrado em material orgânico. O mesmo não ocorre com alilo nitrila com o aumento do carbono orgânico no solo. A vida útil do ITCA no solo diminui com o aumento do nitrogênio total do solo, pois o nitrogênio no solo está na forma orgânica e integrada na parte da matéria orgânica, a qual possibilita reações do ITCA com o grupamento amino. Como o solo é heterogêneo com diferentes quantidades de matéria orgânica, o ITCA pode sofrer reações, implicando em uma menor efetividade no controle de patógenos do solo (BOREK et al., 1995).

Os trabalhos de SMOLINSKA et al., (2003) demonstram que os ITCs apresentam um efeito predominante fungistático e não fungitóxico. O efeito fungitóxico pode ser

induzido somente com aumentos na concentração de $3\mu\text{L}/330\text{cm}^3$ e mais pressão de vapor, este resultado pode variar conforme o isolado do fungo (SARWAR et al., 1998).

Para os patógenos de pós-colheita de frutas, *Monilinia laxa*, *Penicillium expansum*, *Mucor piriformis*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, a presença de ITCA inibiu a germinação dos conídios e retardou, de 3 a 6, o crescimento micelial (MARI et al., 1993).

O tratamento *in vitro* com ITCA inibiu totalmente o crescimento de *R. solani* em concentrações abaixo de $50\mu\text{L}/\text{L}$ e reduziu drasticamente a $25\mu\text{L}/\text{L}$ (DHINGRA et al., 2004). O solo tratado com ITCA nas concentrações de 150 e $200\mu\text{L}/\text{L}$ do volume do solo, permitiu aproximadamente 90% de controle de *R. solani* com alto inóculo inicial, independente da textura do solo (DHINGRA et al., 2004). Segundo GILARDI et al., (2000) concentrações baixas, de ITCA erradicou *R. solani*, *Phytophthora nicotianae* e *F. oxysporum* f. sp. *basilici*. Já em seus trabalhos HARVEY et al., (2002) reportou que a concentração mínima para inibir a germinação dos escleródios de *S. rolfsii* foi de $57,3\mu\text{L}/\text{L}$.

O aromatizante comercial é hidro-destilado do macerado de folhas e sementes secas de mostarda e pode ser produzido (sintetizado) quimicamente. O seu uso é vasto na indústria alimentícia. O preço para sintetizar o ITCA é menor que destilar o óleo natural. O composto ITCA apresenta uma certa segurança pela 'Food and Drug Administration of the United States' (FURIA, 1972). O composto tem propriedade anticancerígena (KIRLIN et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ITCA no tratamento de solo visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* e o seu efeito na microbiota do solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no Laboratório da Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química, ambos na Universidade Federal de Viçosa, no período de Fevereiro de 2005 à Dezembro de 2005.

3.1 Obtenção do óleo essencial de mostarda (ITCA).

O ITCA sintético líquido, de uso na indústria alimentícia, encontra-se no laboratório, na concentração de 90 %.

3.2 Determinação das análises físicas e químicas do solo.

O solo utilizado no experimento continha 41 % de areia, 23 % de silte e 36 % de argila, e pertence a classe textural, Franco-Argilosa. O solo continha 2,45 % de matéria orgânica, 39,4 mg/dm³ de fósforo, 224 mg/dm³ de potássio, 4,9 cmolc/dm³ de cálcio e pH 6,5. O conteúdo de água no solo, quando ajustado, foi de 17 % ou 22 % p/p, que correspondem ao potencial matricial de - 410 kPa e - 278 kPa, respectivamente, e a 50 e 64,7 % da capacidade de campo respectivamente.

3.3 Determinação da difusão descendente do ITCA no solo.

Para estudar a difusão descendente do ITCA no solo, utilizaram-se tubos de PVC com 1 cm diâmetro e 25 cm de comprimento. Os tubos foram furados em sete pontos, com 2,5 cm de distância entre cada furo. Cada furo continha em seu interior um tubo fino perfurado para a coleta de vapores de ITCA difundidos na massa de solo. Todos os furos foram vedados com borracha de silicone. Em cada tubo, com fundo tampado e vedado, colocaram-se 80 gramas de solo seco ao ar peneirado (2,5% de umidade) ou solos com umidades ajustadas para 17 ou 22% (p/p). Na superfície do solo foi depositada uma gota de ITCA na dosagem equivalente a 197 µg/kg. Tubos com solos sem ITCA serviram de testemunha. Os tubos com solo foram guardados a 25 °C por 24 horas.

A difusão de ITCA foi determinada analisando o ar intergranular do solo. Com o auxílio de uma seringa, retirou-se uma amostra de 2 ml de ar de cada furo que foi injetado num aparelho de cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5000), nas seguintes condições: coluna Equity-5 (J&W Scientific) (30m x 0,25mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura iniciando a 40°C (permanência: 5 minutos), taxa de crescimento de 8°C/min até 260°C (permanência: 30 minutos). A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260°C. Hélio foi usado como gás de arraste (30 kPa, vazão 0,8 mL/min), injeção em modo splitless. O espectrômetro de massas (70 eV) foi operado no modo scan, com faixa m/z 40-300.

Para a construção da curva padrão foram injetadas amostras do padrão de ITCA a 12,34; 16,39 e 47,61 ng/µL de uma solução 0,1 mg/mL de diclorometano. Após quantificação, o teor de ITCA foi expresso em ng/µL de ar intragranular.

3.4 Obtenção de isolados de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*

Os fungos *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* foram isolados de plantas de feijão com os sintomas das respectivas doenças. Os fungos foram mantidos em batata- dextrose – ágar (BDA) até a sua utilização.

3.5 Produção dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Para a produção *in vitro* de escleródios, os fungos foram cultivados em substrato de uma mistura autoclavada de areia e farinha de milho (15:1) (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Após 30 a 40 dias de incubação a 25°C, a cultura foi seca em temperatura ambiente e após a secagem, os escleródios de *S. rolfsii* foram separados do substrato em mesa de gravidade. Os escleródios de *S. sclerotiorum* foram separados por peneiras.

Para a produção de escleródios naturais de *S. sclerotiorum*, várias cabeças de repolho foram inoculadas em vários pontos com discos de micélio do fungo. Os repolhos inoculados foram incubados em câmara úmida até aparecimento de micélio na parte superficial do repolho, os repolhos então foram transferidos para solo úmido em caixas plásticas, onde permaneceram até sua total decomposição, quando os escleródios foram coletados. Para produção de escleródios de *S. rolfsii* utilizaram-se de bulbos de cebola como substrato. Os escleródios foram extraídos pelo método da flutuação. O solo foi colocado em um liquidificador, ao qual era adicionado aproximadamente 2 litros de água para 1 kg de solo, agitou-se por 2 minutos na potência máxima, posteriormente, o solo

permaneceu sem agitação por 2 minutos em erlenmeyers de 250 ml e os escleródios flutuantes foram coletados na peneira de abertura de 0,85 mm (20 mesh). Os escleródios coletados foram secados em papel absorvente à temperatura ambiente.

3.6 Determinação *in vitro* do efeito do vapores de ITCA sobre a viabilidade de escleródios.

Para a determinação *in vitro* do efeito de vapores de ITCA sobre a viabilidade de escleródios utilizaram-se, aqueles produzidos *in vitro* e naturalmente. Cem escleródios de *S. rolfsii* e cinquenta escleródios de *S. sclerotiorum* foram colocados em frascos de vidro de 500 ml de capacidade e foi depositado ITCA na dosagem correspondente a 50, 100, 150 e 200 µL/L de volume. Os frascos com escleródios sem ITCA serviram como testemunha. Os frascos foram fechados hermeticamente com rolha de borracha e guardados à temperatura de 25°C. Os escleródios foram retirados dos frascos após 4 ou 7 dias, e sua viabilidade foi testada pelo teste de germinação. Cinquenta escleródios de *S. rolfsii* foram colocados no papel umedecido com água esterilizada em caixas de plástico tipo "gerbox" e incubadas a 25°C. A germinação de escleródios foi avaliada a partir de 48 h de incubação, a cada 24 h, até 120 h. A viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* foi testada, plaqueando-se 25 escleródios em BDA (pH 4.7) contendo 150 mg/L de azul de bromofenol em placas de Petri. O escleródio foi considerado viável quando houve formação de halo amarelo ao redor dele (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

3.7 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* e na atividade microbiana do solo.

Determinou-se efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios em solo franco argiloso, peneirado, seco ao ar (2,5% p/p de umidade) ou com umidades ajustadas para 17 ou 22% p/p. Os escleródios produzidos *in vitro* foram uniformemente misturados com solo (± 8 escleródios de *S. rolfsii* /g de solo e $\pm 0,5$ escleródios de *S. sclerotiorum* /g de solo). ITCA foi misturado com 300 g solo (base seca) nas doses 150 ou 200 µl/kg. O solo foi colocado em potes de plástico de 500 ml de capacidade. Solos sem ITCA serviram de testemunha. Os potes foram fechados hermeticamente e guardados a temperatura de 25, 35 ou 45°C. Após 7 ou 14 dias, os solos foram amostrados para determinação de viabilidade de escleródios e efeito do ITCA na população microbiana do solo. Com um furador de rolha de 1cm de diâmetro, retirou-se de cada frasco três sub-amostras de solo até o fundo do pote,

que foram misturadas para obter uma amostra do solo. Os escleródios foram extraídos pelo método da flutuação e peneiramento úmido. O solo foi colocado em erlenmeyers de 250 ml, ao qual era adicionado aproximadamente 100 ml de água para cada 50 gramas de solo. Agitou-se manualmente por 2 minutos. Posteriormente o solo permaneceu sem agitação por 2 minutos e os escleródios flutuantes foram coletados em peneira de 0,85 mm de abertura (20 mesh). A viabilidade dos escleródios foi testada como descrito anteriormente, exceto que os escleródios passaram por uma desinfestação superficial (imersão em etanol 30% por 20 segundos, em seguida em uma solução de hipoclorito de cálcio (1% de cloro ativo) por 30 segundos e lavados com água destilada esterilizada).

Efeito do ITCA na atividade microbiana e a população de fungos, bactérias e actinomicetos foi determinado só em solo tratado com ITCA na concentração de 150 µl/kg. As amostras para estes fins foram secas em geladeira a 4°C, por um período de 10 dias. Foi utilizada a técnica de hidrolização de diacetato de fluoresceína (DAF) descrita por SCHNÜRER & ROSSWALL (1982) para determinação de atividade microbiana. Utilizou-se 3g de solo seco da amostra, em erlenmeyers 15 ml de tampão de fosfato de Sódio a 60 mM com pH 7,6 e 75 µl de solução de diacetato de fluoresceína (DAF) em acetona (2 mg/ml). Posteriormente agitou-se a 125 rpm por 30 minutos a 25°C. Em seguida, acrescentaram-se 15 ml de acetona, e centrifugou-se a 4000 rpm por 7 minutos. As soluções foram filtradas em Millipore 0,22 µm e a absorbância desta solução foi determinada em um espectrofotômetro (Bausch & Lomb, modelo spectronic 70), com comprimento de onda de 490 nm.

Foi feita a curva padrão de DAF para determinar a relação entre absorbância e a concentração de DAF hidrolisado (fig.10). Para isso utilizaram-se tubos de ensaio com 5 ml de tampão de fosfato de sódio, com concentrações de 16, 33, 50, 66, 83, 100 e 116 µg de DAF. Para a hidrólise do DAF, os tubos de ensaio contendo as soluções foram colocados em água quente por 60 minutos, acrescentou-se o DAF hidrolisado em erlenmeyers juntamente com 3 gramas de solo e 10 ml de tampão de fosfato de sódio. Posteriormente agitou-se os erlenmeyers a 125 rpm por 30 minutos a 25°C. Após este procedimento acrescentou 15 ml de acetona, para paralisar a reação e centrifugou-se a 4000 rpm por 7 minutos. As soluções foram filtradas em Millipore e a absorbância foi determinada como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em µg DAF hidrolisado/g solo.

Para a quantificação de unidades formadoras de colônia (ufc) de actinomicetos e bactéria, um grama de solo seco, foi diluído em série até 10^{-5} em solução salina (0,85% de

NaCl). Uma alíquota de 0,5 ml das diluições 10^{-4} e 10^{-5} foi espalhada na superfície de meio dextrose-nitrato-ágar (DHINGRA & SINCLAIR, 1995) para actinomicetos, ou no ágar-nutriente para bactéria, acrescido de 80 mg de ciclohexamida em um litro de meio, para inibir crescimento de fungos, em placas de Petri de 9cm. Foram utilizadas 5 placas para cada diluição. As colônias de bactérias e de actinomicetos foram contadas após 2 ou 7 dias, respectivamente, de incubação a temperatura de 25°C. Para a determinação de ufc de fungos, misturou-se 0,1 ml de suspensão de solo (1:9) em 100 ml de meio fundente (45 a 50°C) de Martin (DHINGRA & SINCLAIR, 1995) e a mistura foi distribuída em 10 a 12 placas de Petri de 9cm diâmetro. As colônias de fungos foram contadas após 5 dias de incubação a temperatura de 25°C. Os resultados foram expressos em números de ufc/ grama de solo seco.

3.8 Determinação do efeito do ITCA, via irrigação do solo, sobre a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Para determinar o efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios, simulando a irrigação do solo, utilizaram-se tubos de PVC descritos anteriormente. Foi colocado 80 gramas de solo peneirado, seco ao ar (2,5% de umidade) em cada tubo fechado no fundo com tela de náilon. Aproximadamente 100 escleródios de *S. rolfsii* e 10 escleródios de *S. sclerotiorum* foram adicionados em sachês de náilon nas profundidades de 1,5; 7,5; 12,5 e 17,5 cm. O solo foi irrigado até capacidade de retenção com água (40 ml) contendo ITCA emulsificado para fornecer as doses de 150 ou 200 $\mu\text{l}/\text{kg}$ de solo. O solo irrigado somente com água serviu de testemunha. Após irrigação, os tubos foram tampados e guardados a 25°C. Após 7 dias os escleródios foram retirados e sua viabilidade foi determinada como descrito anteriormente.

3.9 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* em condições de campo.

Para se determinar o efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e seu efeitos na atividade microbiana e populações de fungos, bactéria, e actinomicetos sob condições de campo, utilizou-se parcelas de 2m^2 . Antes do tratamento com ITCA, cada parcela foi sub amostrada em 10 pontos, até a profundidade de 10 cm com uso de um tubo de 2 cm de diâmetro. As sub-amostras de cada parcela foram misturadas para obter uma amostra representativa da parcela. Estas amostras foram secas a 4°C para determinação da

atividade microbiana e das populações de fungos, bactéria e actinomicetos, utilizando as técnicas descritas anteriormente.

Os escleródios de *S. rolfii* produzidos *in vitro* foram espalhados e incorporados ao solo (± 1 escleródio de *S. rolfii* /g de solo) a uma profundidade de aproximadamente 5 cm. Os tratamentos constituíram de aplicação de ITCA emulsificado na dosagem de 8,86; 11,82 e 17,73 ml /m², misturado na água a taxa de 7,5 L/m². As parcelas testemunha receberam somente a água. Para determinar o efeito de cobertura após o tratamento, as parcelas tratadas ou não, foram cobertas com uma lona plástica preta imediatamente após a aplicação de ITCA. O experimento foi conduzido com três repetições. Após sete dias o solo de cada parcela foi amostrado como descrito anteriormente para determinar viabilidade de escleródios, para determinar a atividade microbiana, e as populações de fungos, bactérias e actinomicetos. Os resultados da atividade microbiana e populações de microrganismos foram expressos como porcentagem relativa ao pré-tratamento.

3.10 Análise Estatística.

Os experimentos em laboratório foram montados em delineamento inteiramente causalizados e o experimento no campo no delineamento de blocos ao acaso. Em todos os experimentos utilizaram-se a média de 3 repetições, sendo feito arranjo em fatorial. Com teste Tukey a nível de 5 % de probabilidade. Para isso utilizou-se o programa SAEG 9.0 da Universidade Federal de Viçosa.

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da difusão descendente do ITCA no solo.

O tempo de retenção (tR) do padrão ITCA foi de 10,01 minutos (Fig. 1) e no solo com umidade de 17 % foi de 9,99 minutos (Fig. 2). A presença do ITCA foi confirmada através do espectrômetro de massa. Em 24 horas o ITCA foi detectado até 15 cm às profundidades em solo seco, enquanto no solo com 17 % ou 22 % umidade (Tabela 1) foi detectado na profundidade de 10 e 7,5 cm a partir do ponto de aplicação. A concentração de ITCA foi diminuindo com a profundidade, embora houve grande variabilidade entre as médias do mesmo tratamento. Com aumento da umidade do solo, tanto a profundidade de difusão quanto a quantidade de ITCA difundida diminui.

Tabela 1. Média da difusão descendente, de isotiocianato de alilo na concentração de 197 µg/kg de solo, em 24 horas no solo seco ao ar e com umidades de 17 e 22 %.

Profundidades (cm) a partir da superfície	Umidade do Solo		
	Solo Seco	17 %	22 %
1,5	75,79 ¹ ± 51,0 ²	12,86 ± 1,85	7,98 ± 6,68
4,5	69,07 ± 61,7	8,69 ± 11,13	2,81 ± 2,67
7,5	19,14 ± 18,9	5,42 ± 7,66	1,03 ± 1,29
10	4,18 ± 4,6	0,53 ± 0,75	-
12,5	0,86 ± 1,5	-	-
15	0,15 ± 0,3	-	-
17,5	- ³	-	-

¹ Concentração de ITCA em ng/µL, ² Desvio padrão, ³ - ausência de ITCA.

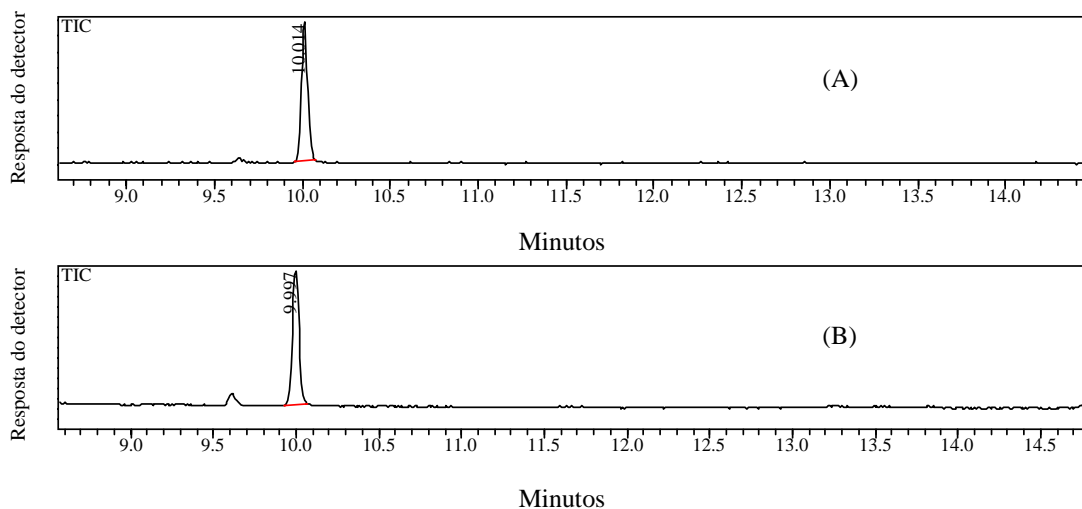


Figura 1. Tempo de retenção (tR) do padrão ITCA, em minutos (A). Tempo de retenção (tR) do ITCA no solo com umidade de 17 % em minutos solo (B).

4.2 Efeito *in vitro* dos vapores de ITCA sobre a viabilidade de escleródios.

Os resultados obtidos na avaliação do efeito *in vitro* dos vapores de ITCA na germinação de escleródios encontram-se descritos nas tabelas 2 e 3 e nas figuras 3 e 4. Na testemunha não houve diferença na germinação dos escleródios de *S. rolfsii* ou *S. sclerotiorum* produzidos naturalmente ou *in vitro* (Figuras 3 e 4). Os escleródios de *S. rolfsii* apresentaram uma maior viabilidade quando produzidos naturalmente. Nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{L/L}$ de ITCA, a germinação foi de 70 e 17%, respectivamente, enquanto os produzidos *in vitro* a germinação foi de 52 e 1%, com tempo de exposição de 4 dias (Tabela 2). Já para os escleródios de *S. sclerotiorum* tratados com ITCA, não foi observada diferenças na germinação quando produzidos naturalmente ou *in vitro*. Foi observado que ocorreu uma mortalidade de 80 % dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* em atmosfera de ITCA na concentração de 150 $\mu\text{L/L}$, enquanto na concentração de 200 $\mu\text{L/L}$ ocorreu a mortalidade de todos os escleródios (Tabelas 2 e 3).

Com o aumento do tempo de exposição de 4 para 7 dias, foi observado um aumento na mortalidade de escleródios de *S. rolfsii*. Para os escleródios produzidos naturalmente de *S. rolfsii* expostos à concentração de 100 $\mu\text{L/L}$ de ITCA, a mortalidade aumentou para 91% no período de sete dias (Tabela 2).

Exposição de escleródios aos vapores de ITCA causou um atraso na germinação de escleródios. Na testemunha do fungo *S. rolfsii* com 48 horas foi observado uma germinação de 82%, mas para a concentração de 50 $\mu\text{L/L}$ de ITCA a germinação foi de 3,7% nas

primeiras 48 horas, usando o escleródios de *S. rolfii* produzidos naturalmente com 4 dias de exposição (Fig. 3). A mesma tendência observada com escleródios de *S. sclerotiorum* onde na testemunha a germinação foi de 70% e com 50 µL/L de ITCA a germinação foi de 10 % com 48 horas usando escleródios produzidos naturalmente com 4 dias de exposição (Fig. 4).

Tabela 2. Porcentagem de germinação dos escleródios de *Sclerotium rolfii*, após 120 horas de incubação, produzidos naturalmente ou *in vitro*, e expostos por 4 ou 7 dias, nas diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentração ITCA	Fonte de Escleródios			
	Natural		<i>In vitro</i>	
	Dias de exposição			
	4	7	4	7
0µL/L (Testemunha)	90A a	92 A a	93 A a	95 A a
50µL/L	86 A a	73 B a	78 B a	47 B b
100µL/L	70 B a	9 C b	52 C a	1 C b
150µL/L	17 C a	0 D b	0 D a	0 C a
200µL/L	0 D a	0 D a	0 D a	0 C a

Médias de 3 repetições seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, entre as diferentes concentrações de ITCA e letras minúsculas na linha, comparando 4 e 7 dias, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (CV. 16,23 %).

Tabela 3. Porcentagem de germinação dos escleródios de *Sclerotinia Sclerotiorum*, após 120 horas de incubação, produzidos naturalmente ou *in vitro*, e expostos por 4 ou 7 dias, nas diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentração ITCA	Fonte de Escleródios			
	Natural		<i>In vitro</i>	
	Dias de exposição			
	4	7	4	7
0µL/L (Testemunha)	91 A a	85 A a	92 A a	86 A a
50µL/L	39 B a	33 B a	36 B a	32 B a
100µL/L	15 C a	9 C a	11 C a	11 C a
150µL/L	0 D a	0 D a	0 D a	0 D a
200µL/L	0 D a	0 D a	0 D a	0 D a

Médias de 3 repetições seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, entre as diferentes concentrações de ITCA e letras minúsculas na linha, comparando 4 e 7 dias, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (CV. 14,84 %).

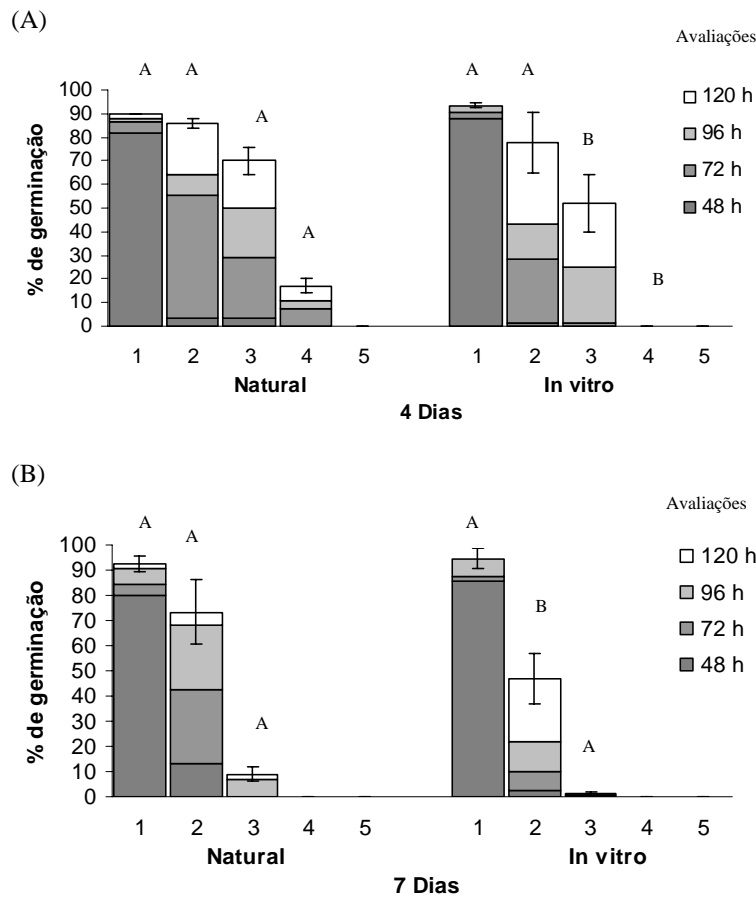


Fig.3. Média da porcentagem da germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*, produzidos naturalmente ou *in vitro* expostos a 4 (A) e 7 (B) dias em atmosfera sem isotiocianato de alilo (1) ou contendo isotiocianato de alilo, nas concentrações de 50 (2), 100 (3), 150 (4) e 200 (5) $\mu\text{L/L}$. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas. Médias seguidas das mesmas letras entre escleródios produzidos naturalmente ou *in vitro*, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

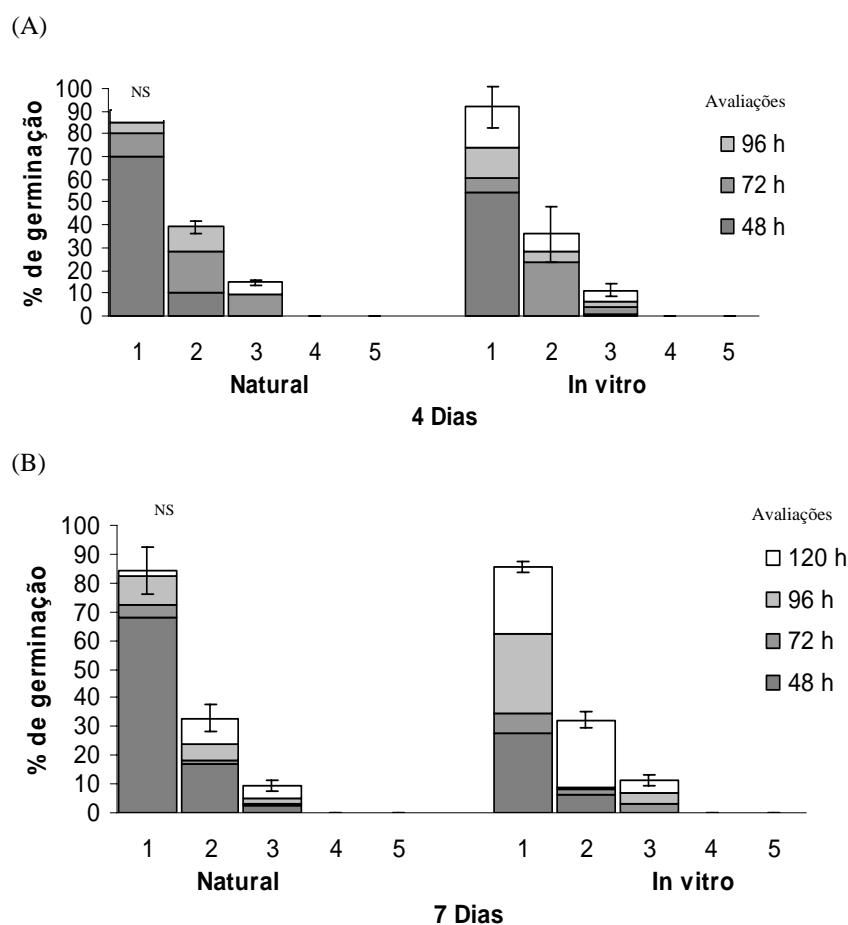


Fig.4. Média da porcentagem da germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, produzidos naturalmente e *in vitro* expostos a 4 (A) e 7 (B) dias em atmosfera sem isotiocianato de alilo (1) ou contendo isotiocianato de alilo, nas concentrações de 50 (2), 100 (3), 150 (4) e 200 (5) $\mu\text{L/L}$. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas. Comparadas usando Tukey a 5 %. A comparação das médias entre natural e *in vitro* com 120 horas. NS. não significativo. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

4.3 Determinação do efeito do ITCA sobre a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* no solo.

No solo tratado com ITCA nas concentrações de 150 ou 200 $\mu\text{L/kg}$ de solo foi observada a mortalidade de todos os escleródios de ambos os fungos, sem ocorrer diferença significativa entre essas concentrações (Fig. 5 e 6). O efeito de ITCA na mortalidade de escleródios de ambos fungos não foi afetado pela umidade e nem pela temperatura do solo. Entretanto, para escleródios de *S. sclerotiorum* não houve diferença entre o solo tratado com ITCA na dose de 150 $\mu\text{L/kg}$ na temperatura de 25°C com umidade de 22% (Fig. 6).

Para *S. sclerotiorum*, mais de 97% dos escleródios perderam a viabilidade na temperatura de 45°C em solo seco, enquanto que nos solos com umidade de (17 e 22%) houve mortalidade de escleródios entre 80 a 74 %. A viabilidade em geral foi diminuindo com o aumento da temperatura (Tabela 4).

Para o fungo *S. rolfsii*, em condições de solo seco independente da temperatura e nos teores de umidade de 17 a 22%, nas temperaturas de 25 e 35°C a viabilidade dos escleródios não foi afetada. Entretanto, não ocorreu germinação de escleródios na temperatura de 45°C nos teores de umidade de 17 e 22%, nas condições em ITCA (Fig. 5).

No tempo de exposição dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* ao ITCA, não houve diferenças tanto para 7 dias como para 14 dias. Entretanto, nas testemunhas de solo úmido, a viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* diminuiu de 99% para 40% em 14 dias na temperatura de 45°C. A mesma tendência foi observada para escleródios de *S. sclerotiorum*, sendo que a viabilidade de escleródios diminuiu para 0% na temperatura de 45°C independente da umidade solo.

Tabela 4. Porcentagem de germinação, após 120 horas de incubação, dos escleródios de *Sclerotinia Sclerotiorum* expostos a 7 dias, em solo seco ao ar, 17 e 22 % de umidades e diferentes temperaturas do solo.

	Umidade do solo		
	Solo seco	17 % umidade	22 % umidade
Temperaturas			
25 °C	100 ±0 Aa	53 ±6 ABb	50 ±10 ABb
35 °C	100 ±0 Ab	77 ±25 Ab	70 ±26 Ab
45 °C	3 ±6 Bb	20 ±0 Bb	26 ±38 Bb

Médias de 3 repetições, seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e letras minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

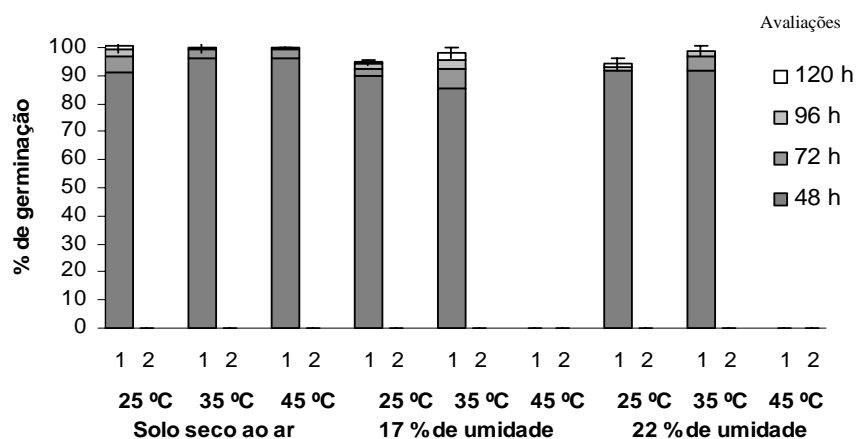


Fig. 5. Média da porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*, expostos por 7 dias, com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade, com temperaturas de 25, 35 e 45°C, em atmosfera sem isotiocianato de alilo (1) ou contendo isotiocianato de alilo na concentração de 150 ou 200 (2) $\mu\text{L}/\text{kg}$ de solo. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas, comparadas usando Tukey a 5 % com 120 horas. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

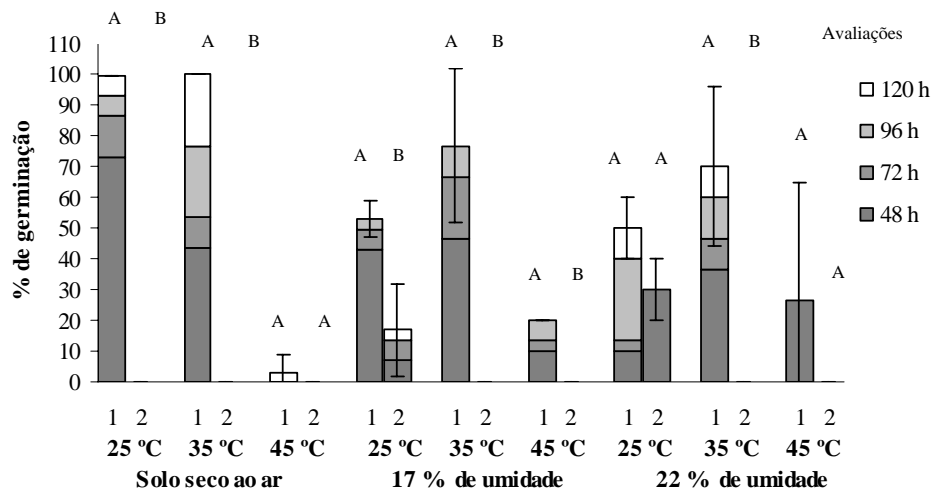


Fig. 6. Média da porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, expostos por 7 dias, com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade, com temperaturas de 25, 35 e 45°C, em atmosfera sem isotiocianato de alilo (1) ou contendo isotiocianato de alilo na concentração de 150 ou 200 (2) $\mu\text{L}/\text{L}$. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, comparadas usando Tukey a 5% com 120 horas. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas (CV. 36,30 %).

4.4 Determinação do efeito do ITCA aplicado via irrigação na viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

Os dados da porcentagem de germinação de escleródios de *S. rolfsii* influenciados pelo ITCA sob condições simulando irrigação por gotejamento encontram-se representados nas figuras 7 e 8. O aumento da temperatura de 25 para 35°C na testemunha apresentou uma redução na viabilidade dos escleródios. Sendo que os escleródios não viáveis de *S. rolfsii* foram de 17 e 46% em 25 e 35°C respectivamente. Já para os escleródios não viáveis de *S. sclerotiorum* não houve diferenças de 49 e 55% a 25 e 35°C na profundidade 1,5 cm.

No solo irrigado com ITCA na concentração de 150 µL/kg, os escleródios de ambos os fungos apresentaram uma mortalidade de 95% até a profundidade de 7,5 cm na temperatura de 25°C. Já para concentração de 200 µL/kg de solo houve 100% da mortalidade até 17,5 cm de profundidade para os escleródios de *S. rolfsii* e 7,5 cm para os escleródios de *S. sclerotiorum* (Fig. 7 e 8).

Na temperatura de 25°C a mortalidade dos escleródios de ambos os fungos diminuiu a partir de 12,5 cm de profundidade na concentração de 150 µL/kg de solo, o que não ocorre na concentração de 200 µL/kg no caso de *S. rolfsii*. Entretanto para *S. sclerotiorum* a mortalidade diminuiu drasticamente com o aumento da profundidade. Na temperatura de 35°C, houve mortalidade de quase todos os escleródios de ambos os fungos até na profundidade de 17,5 cm, em ambas as dosagens.

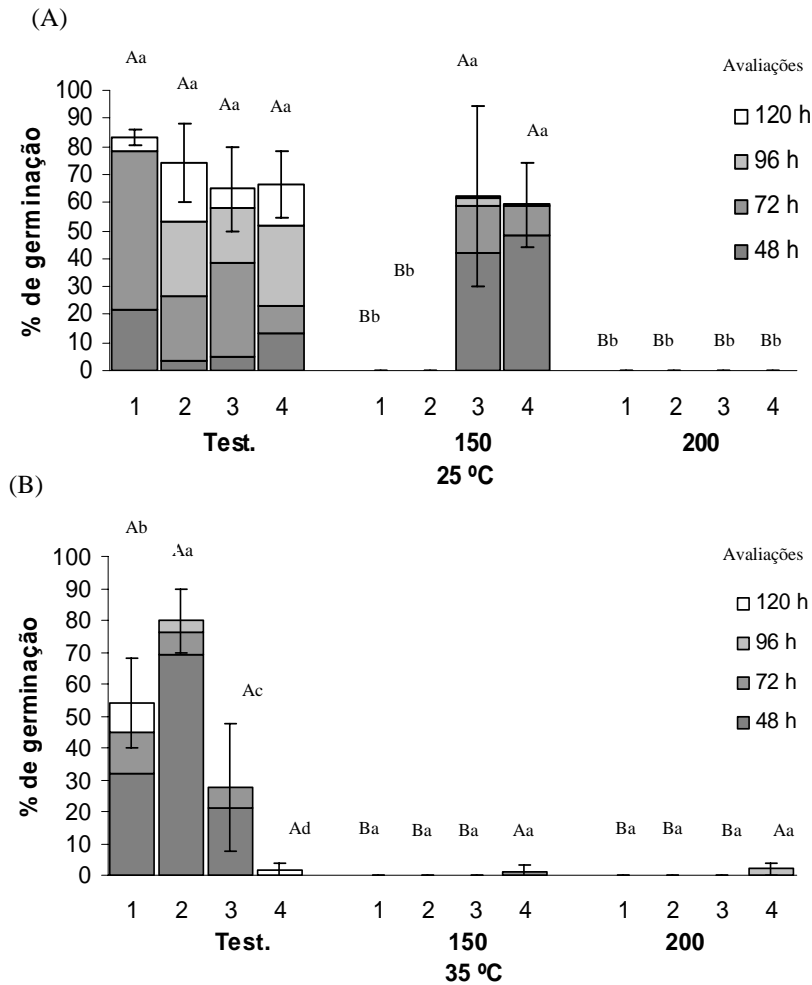


Fig. 07. Média da porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*, expostos a 7 dias, nas profundidades de 1,5 (1) 7,5 (2), 12,5 (3) e 17,5 (4) cm. Sem isotiocianato de alilo (Testemunha) ou contendo isotiocianato de alilo nas concentrações de 150 e 200 µL/kg de solo. Com temperaturas de 25 (A) e 35 (B) °C. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas. As médias, seguidas pela mesma letra maiúscula é a comparação entre com e sem isotiocianato de alilo. A letra minúscula é a comparação entre as diferentes profundidades, usando o teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV. 35,75 e 54,07% 25 e 35°C respectivamente. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

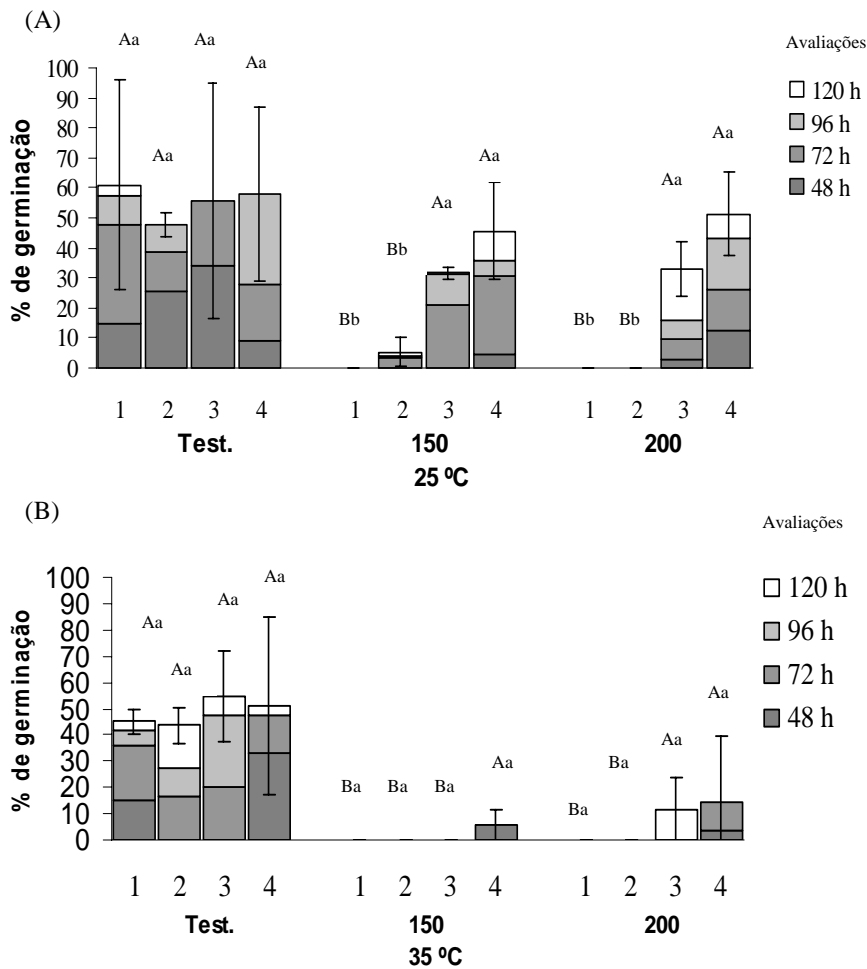


Fig.08. Média da porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, expostos a 7 dias, nas profundidades de 1,5 (1) 7,5 (2), 12,5 (3) e 17,5 (4) cm. Sem isotiocianato de alilo (Testemunha) ou contendo isotiocianato de alilo nas concentrações de 150 e 200 µL/kg de solo. Com temperaturas de 25 (A) e 35 (B) °C. Média de 3 repetições, com 48, 72, 96 e 120 horas. As médias, seguidas pela mesma letra maiúscula é a comparação entre com e sem isotiocianato de alilo. A letra minúscula é a comparação entre as diferentes profundidades, usando o teste Tukey, a 5% de probabilidade. CV. 56,69 e 76,16 % 25 e 35°C respectivamente. As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

4.5 Determinação do efeito do ITCA na viabilidade de escleródios de *S. rolfsii* no campo.

A viabilidade de escleródios foi similar, variando entre 93 a 99% na parcela testemunha, com ou sem a cobertura com lona plástica (Fig. 9).

A aplicação de ITCA diminuiu a viabilidade dos escleródios, e a diminuição da viabilidade foi acentuando-se com o aumento na dose de ITCA aplicada, e com a cobertura após a aplicação. Na dose de 8,86 ml de ITCA/m² sem a cobertura foi observados uma mortalidade dos escleródios de 32% que aumentou para 85% com o aumento na dose para 17,73 ml/m². Entretanto, com a cobertura a mortalidade foi de 98% na dose de 8,86 ml/m². Por outro lado, na dose de 17,73 ml de ITCA/m² não houve diferença significativa na mortalidade de escleródios com ou sem cobertura. A aplicação de ITCA em qualquer dose resultou em atraso na germinação de escleródios no campo. Na testemunha sem cobertura, 85% de escleródios germinaram em 48 horas em contraste aos 44% dos escleródios recuperados de parcelas tratadas com dose de 8,86 ml/m². Por um outro lado, os escleródios recuperados da parcela coberta a germinação foi de apenas 2% em contraste ao 75% dos escleródios recuperados da parcela testemunha com a cobertura.

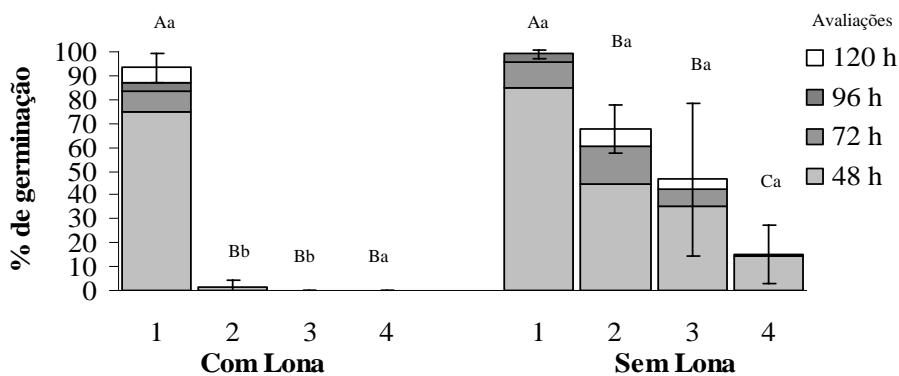


Fig.9. Média da porcentagem de germinação de escleródios de *Sclerotium rolfsii*, expostos a 7 dias no solo sem isotiocianato de alilo (1) ou contendo isotiocianato de alilo, nas concentrações de 8,86 (2), 11,82 (3) e 17,73 (4) ml/m² de solo, com e sem lona. Média de 3 repetições, avaliadas com 48, 72, 96 e 120 horas. As médias com e sem isotiocianato de alilo, seguidos pela mesma letra maiúscula e com e sem lona, seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (CV. 31,59 %). As barras correspondem ao desvio padrão com 120 horas.

4.6 Determinação do efeito do ITCA na microbiota do solo.

4.6.1 Atividade Microbiana

Na figura 10 encontra-se a curva padrão de diacetato de fluoresceína hidrolisada (DAF) /grama de solo seco. Na testemunha, os solos expostos às temperaturas de 25, 35 e 45°C e com o aumento da umidade no solo seco, 17 e 22%, a quantidade de DAF hidrolisado não foi alterada (Tabelas 5,6 e 7).

Não houve diferença significativa quanto à quantidade de DAF hidrolisado entre os tempos de exposição do solo ao ITCA de 7 a 14 dias.

O aumento da umidade nos solos tratados com ITCA nas concentrações de 150 e 200 µL/kg de solo, nas temperaturas de 25 e 45°C, aumentou a quantidade de DAF hidrolisado (Tabela 5 e 7). Somente na temperatura de 35°C na umidade de 17% foi observado um aumento na quantidade de DAF hidrolisado (Tabela 6).

No solo exposto a temperatura de 25°C, o aumento da concentração de ITCA diminuiu a quantidade de DAF hidrolisado nas umidades de 17 e 22% (Tabela 5). No solo com temperatura de 45°C, o aumento da concentração de ITCA ocasionou uma diminuição no DAF hidrolisado, somente na umidade de 22% (Tabela 07). Em solos com temperaturas de 35°C o aumento da concentração de ITCA acarretou um aumento na quantidade de DAF hidrolisado (Tabela 6).

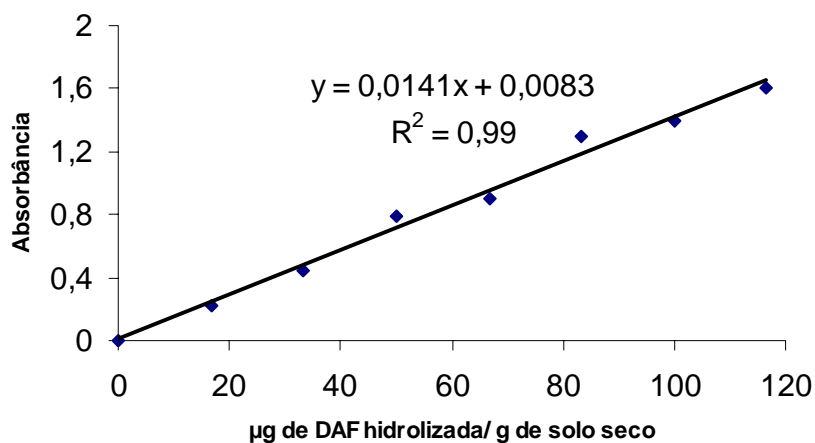


Fig. 10. Curva padrão de Diacetato de Fluoresceína hidrolisada /grama de solo seco.

Tabela 5. Média da quantidade de diacetato de fluoresceína hidrolisada no solo ($\mu\text{g/g}$ solo) com umidades do solo seco ao ar, 17 e 22% e temperatura de 25°C, expostos por 7 dias, as diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %
0 $\mu\text{L/kg}$ (Testemunha)	49,8 ¹ \pm 2 Aa	56,1 \pm 1 Aa	72,5 \pm 7 Aa
150 $\mu\text{L/kg}$	31,3 \pm 3 Aa	28,5 \pm 13 Ba	42,7 \pm 11 Ba
200 $\mu\text{L/kg}$	30,6 \pm 6 Aa	26,4 \pm 10 Ba	20 \pm 5 Ca

Média de 3 repetições. Resultado expresso em $\mu\text{g/}$ grama de solo seco. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 22,96 %).

Tabela 6. Média da quantidade de diacetato de fluoresceína hidrolisada no solo ($\mu\text{g/g}$ solo) com umidades do solo seco ao ar, 17 e 22% e temperatura de 35°C, expostos por 7 dias, as diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %
0 $\mu\text{L/kg}$ (Testemunha)	53,3 \pm 1 Aa	43,4 \pm 11 Ba	59 \pm 9 Aa
150 $\mu\text{L/kg}$	26,4 \pm 7 Ab	98,7 \pm 1 Aa	65,4 \pm 9 Ab
200 $\mu\text{L/kg}$	24,2 \pm 5 Ab	76 \pm 12 ABa	49,8 \pm 7 Aab

Média de 3 repetições. Resultado expresso em $\mu\text{g/}$ grama de solo seco. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 32,07 %).

Tabela 7. Média da quantidade de diacetato de fluoresceína hidrolisada no solo ($\mu\text{g/g}$ solo) com umidades do solo seco ar, 17 e 22% e temperatura de 45°C, expostos por 7 dias, as diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %
0 $\mu\text{L/kg}$ (Testemunha)	39,1 \pm 3 Aa	62,5 \pm 15 Aa	71 \pm 15 Aa
150 $\mu\text{L/kg}$	22,1 \pm 7 Aa	43,4 \pm 16 Aa	26,4 \pm 19 Ba
200 $\mu\text{L/kg}$	25,7 \pm 6 Aa	24,2 \pm 6 Aa	15,7 \pm 5 Ba

Média de 3 repetições. Resultado expresso em $\mu\text{g/}$ grama de solo seco. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 43,82 %).

4.6.2 População de Microrganismos

4.6.2.1 Actinomicetos

Na testemunha, a elevação da umidade do solo para 17% e 22% quando exposto a temperatura de 25 e 35°C, respectivamente, propiciou um aumento na população de actinomicetos (Tabelas 8 e 9). Já para a temperatura de 45°C, o aumento da umidade não resultou em diferença significativa quanto ao número de ufc actinomicetos (Tabelas 10).

A aplicação do ITCA reduziu o número de ufc's de actinomicetos nos solos com umidade de 17 e 22 %, quando expostos a 25 °C e solos com umidade de 22 %, expostos a 35 °C (Tabelas 08 e 09). Na temperatura de 45 °C o número de ufc de actinomicetos não modificou com aplicação de ITCA (Tabela 10).

4.6.2.2 Bactérias

No solo da testemunha, o aumento da umidade na temperatura de 25°C, ocasionou uma elevação no número de ufc de bactérias (Tabela 11). Com o solo seco e 17% de umidade na temperatura de 35°C o número de ufc bactérias diminuiu o mesmo ocasionou com solo a 22% umidade na temperatura de 45°C (Tabelas 12 e 13).

No solo tratado com ITCA exposto a 25°C, o aumento da umidade foi observado uma elevação no número de ufc bactérias, sendo mais significativo com umidade de 17% (Tabela 11). Quando o solo exposto a 35°C, o aumento da umidade do solo seco para 17% também ocorreu um aumento no número de ufc bactérias (Tabela 12).

A aplicação do ITCA diminuiu o número de ufc's, no solo com alta umidade (22%) na temperatura de 35°C (Tabela 12). Já na temperatura de 45°C tanto o solo seco e com a umidade 17% o ITCA diminuiu o número de ufc's (Tabela 13).

4.6.2.3 Fungos

Na testemunha o solo exposto a 25, 35 e 45°C, o aumento da umidade, foi observado uma diminuição do número de ufc's de fungos. Somente a diminuição não ocorreu com a temperatura de 25°C na umidade de 17 % (Tabelas 14, 15 e 16).

Nos solos tratados com ITCA e expostos a temperatura de 25, 35 e 45°C o aumento da umidade não modificou o número de ufc's de fungos. Somente na temperatura de 35°C com umidade de 17 % ocorreu um aumento no número de ufc fungos.

O solo tratado com ITCA reduziu o número de ufc's de fungos em todas as umidades, exceto nas umidades de 22% com temperatura de 35°C e umidades de 17 e 22% na temperatura de 45°C (Tabelas 15 e 16).

Tabela 8. Números de unidades formadoras de colônias (ufc) de actinomicetos, por grama de solo, incubado a temperatura de 25°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade, após 7 dias de exposição ao isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17% Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	5 ±2 Ac	41 ±10 Aa	28 ±5 Ab
150µL/kg	5 ±1 Aa	2 ±2 Ba	1 ±1Ba

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 37,49 %).

Tabela 9. Números de unidades formadoras de colônias (ufc) actinomicetos, por grama de solo, incubado a temperatura de 35°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade, após 7 dias de exposição ao isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 % Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	4 ±2 Ab	9 ±5 Ab	20 ±6 Aa
150µL/kg	4 ±1Aa	4 ±4 Aa	3 ±2 Ba

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 38,16 %).

Tabela 10. Números de unidades formadoras de colônias (ufc) actinomicetos, por grama de solo, incubados a temperatura de 45°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade, após 7 dias de exposição ao isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)		
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 % Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	6 ±1 Aa	8 ±6 Aa	2 ±1 Aa
150µL/kg	1 ±1 Aa	4 ±3 Aa	2 ±1 Aa

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 48,59 %).

Tabela 11. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias, por grama de solo, incubados a temperatura de 25°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	13 ±11 Ab	43 ±10 Ba	37 ±12 Aa	
150µL/kg	17 ±5 Ac	115 ±17 Aa	43 ±3 Ab	

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 24,71 %).

Tabela 12. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias, por grama de solo seco. Incubados a temperatura de 35°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	22 ± 4 Ab	21 ±8 Bb	67 ±15 Aa	
150µL/kg	24 ±7 Ab	59 ±5 Aa	24 ±12 Bb	

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 21,74 %).

Tabela 13. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias, por grama de solo seco. Incubados a temperatura de 45°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁵)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)	28 ±4 Aa	32 ±7Aa	9 ±6Ab	
150µL/kg	14 ± 2 Ba	5 ±1Ba	4 ±5Aa	

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 36,11 %).

Tabela 14. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos, por grama de solo seco. Incubados nas temperaturas de 25°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁴)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)		131 ±18 Ab	187,5 ±13 Aa	95,6 ±9 Ac
150µL/kg		2,9 ±1 Ba	3,2 ±2 Ba	1,5 ±1 Ba

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 14,48 %).

Tabela 15. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos, por grama de solo seco. Incubados nas temperaturas de 35°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁴)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)		145,3 ±12 Aa	32,2 ±4 Ab	5,2 ±1 Ac
150µL/kg		1,5 ±1 Bb	23,5 ±3 Ba	1,1 ±0,4 Ab

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 14,14 %).

Tabela 16. Número de unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos, por grama de solo seco. Incubados nas temperaturas de 45°C. Com solo seco ao ar, 17 e 22% de umidade e exposto a 7 dias com isotiocianato de alilo.

Concentração	Umidade do solo (ufc x 10 ⁴)			
	ITCA	Solo Seco	Solo 17 %	Solo 22 %
0µL/kg (Testemunha)		67,8 ±23 Aa	5,1 ±6 Ab	3,1 ±2 Ab
150µL/kg		0,7 ±1 Ba	5,3 ±3 Aa	4,0 ±1 Aa

Média de 3 repetições. As médias entre as concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre as diferentes umidades, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 65,77 %).

4.7. Determinação do efeito do ITCA na microbiota do solo em condições de campo

4.7.1 Atividade microbiana

Não se observaram diferenças na atividade microbiana quando foram utilizados os tratamentos com e sem lona na testemunha. Conforme a tabela 17, não foram observadas diferenças significativas na redução da atividade microbiana com a aplicação do ITCA com e sem lona.

Tabela 17. Média da porcentagem de mudanças da quantidade de diacetato de fluoresceína hidrolisado no solo exposto a 7 dias, com e sem lona, em diferentes concentrações de isotiocianato de alilo.

Concentrações de ITCA	Com Lona	Sem Lona
0 (Testemunha)	- 23 ±12 NS	- 20 ± 8
8,86 ml/m ²	- 24 ± 6	- 26 ±10
11,82 ml/m ²	- 38 ± 8	- 27 ± 9
17,73 ml/m ²	- 36 ± 7	- 40 ± 9

Média de 3 repetições, comparadas usando Tukey a 5 %. NS. não significativo (CV. 35,02 %).
Obs. - Diminuição da quantidade hidrolisada de diacetato de fluoresceína no solo.

4.7.1 População de Microrganismos

4.7.1.1. Actinomicetos

No campo, a utilização de doses crescentes do ITCA, aumentou as ufc's de actinomicetos. No solo da testemunha a utilização da lona, apresentou um aumento de 55% no número de ufc actinomicetos em relação à testemunha sem lona. A utilização da lona conjuntamente com ITCA na concentração de 17,73 ml/m² também apresentou um aumento de 62% número de ufc de actinomicetos em relação ao solo sem lona (Tabela 18).

4.7.1.2. Bactérias

A utilização da lona no solo não alterou o número de ufc's de bactérias. A utilização do ITCA no solo com a lona aumentou, mas sem a lona ocorreu uma diminuição do número de ufc's de bactérias. Nos solos com lona em relação ao sem lona, tratado com ITCA ocorreram um aumento no número de ufc's de bactérias (Tabela 19).

4.7.1.3. Fungos

Nos solos com e sem lona, na testemunha não foi observado diferenças no número de ufc fungos. Os solos sem lona tratados com ITCA não apresentou diferenças em relação

a testemunha sem lona. O efeito do ITCA no solo com lona nas concentrações de 11,82 e 17,73 ml/m² diminuíram o número de ufc de fungos. Nestas concentrações de ITCA foram observadas diferenças em relação aos solos com e sem lona (Tabela 20).

Tabela 18. Média da porcentagem de mudança nas unidades formadoras de colônias (ufc) de actinomicetos no campo, após exposição de 7 dias ao isotiocianato de alilo.

Concentrações	Actinomicetos	
	ITCA	Sem Lona
0ml/m ² (Testemunha)	+ 222 ±46 Ca	+ 120 ±37 Bb
8,86ml/m ²	+ 285 ±17 Ba	+ 295 ±31 Aa
11,82ml/m ²	+ 320 ±25 Ba	+ 281 ±9 Aa
17,73ml/m ²	+ 406 ±28 Aa	+ 251 ±25 Ab

Média de 3 repetições. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre com e sem lona, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 32,74 %).

Obs. + Aumento no número de ufc's.

Tabela 19. Média da porcentagem de mudança nas unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias no campo, após exposição de 7 dias ao isotiocianato de alilo.

Concentrações	Bactérias	
	ITCA	Sem Lona
0ml/m ² (Testemunha)	- 57 ±5 Ba	- 84 ±14 Aa
8,86ml/m ²	+ 72 ±28 Aa	- 80 ±24 Ab
11,82ml/m ²	+ 73 ±16 Aa	- 80 ±6 Ab
17,73ml/m ²	+ 83 ±40Aa	- 78 ±32 Ab

Média de 3 repetições. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre com e sem lona, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 137,10 %).

Obs. + Aumento no número de ufc's.

- Diminuição no número de ufc's.

Tabela 20. Média da porcentagem de mudança nas unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos no campo, após exposição de 7 dias ao isotiocianato de alilo.

Concentrações	Fungos	
	Com Lona	Sem Lona
ITCA		
0ml/m ² (Testemunha)	- 40 ±15 Aa	- 31 ±9 Aa
8,86ml/m ²	- 40 ±20 Aa	- 44 ±12 Aa
11,82ml/m ²	- 82 ±8 Ba	- 38 ±21 Ab
17,73ml/m ²	- 83 ±13 Ba	- 31 ±30 Ab

Média de 3 repetições. As médias entre as diferentes concentrações de ITCA, seguidos pela mesma letra maiúscula nas colunas. As médias entre com e sem lona, seguidos pela mesma letra minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade (CV. 12,07 %).

Obs. - Diminuição no número de ufc's.

5. DISCUSSÃO

No ensaio de difusão do ITCA, foi observado que com a aplicação na superfície do solo, houve difusão até a profundidade de 15cm em solo seco, o que significa que não há necessidade de mistura uniforme do produto com o solo, facilitando assim a aplicação do produto. Entretanto, com o aumento da umidade do solo foi observado uma diminuição na profundidade da difusão (Tabela 1). Sabendo-se quais são as melhores condições do solo para a difusão do ITCA, menores serão as perdas do produto, diminuindo assim o volume de aplicação e o custo. Segundo BOREK et al., (1995) em solos tratados com ITCA, em solos secos, a elevação da temperatura e concentrações de carbono, diminui-se a difusão de ITCA no solo.

Após 24 horas de incubação a 25°C o ITCA estava presente no solo, mas segundo (BOREK et al., 1995) a meia vida do ITCA é de aproximadamente 2 dias, incubados a uma temperatura de 20°C. É relativamente rápida a dissipação no solo tendo importantes implicações para o controle de patógenos do solo, usando tecidos de plantas do gênero *Brassica*. A atividade dos glucosinolatos contidos em tecidos de plantas pode ser de vida curta, com pouca atividade residual, como vários fumigantes de solo.

Uma forma de se utilizar o ITCA no solo, sem a incorporação é por meio da irrigação. Podendo em muito facilitar aplicação, deixando o produtor menos exposto ao produto, diminuindo o risco de contaminação ao aplicador. No trabalho simulando a irrigação, a viabilidade dos escleródios foi afetada com aumento da concentração de ITCA. Irrigação com água contendo ITCA na dose para fornecer 150 µL/kg de solo matou os escleródios de ambos os fungos a profundidade de 7,5 cm na temperatura de 25°C. Já para a concentração de 200 µL/kg de solo o efeito foi até 17,5 cm de profundidade para *S. rolfsii* e 7,5 cm para *S. sclerotiorum* (Tabelas 7 e 8). Foi demonstrado que a aplicação do ITCA simulando a irrigação é viável para o controle dos dois patógenos. De acordo com PUNJA et al., (1984) quando os escleródios estão abaixo de 8 cm de profundidade, ocorre

diminuição da troca de oxigênio e dióxido de carbono e a germinação é desfavorecida. O aumento da temperatura de 25 para 35 °C nas concentrações de 150 e 200 µL/kg de solo, acarreta uma diminuição na viabilidade dos escleródios (Tabela 7 e 8).

O ITCA utilizado para modificar a atmosfera *in vitro* e no solo, dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* afetou sua germinação, sendo fungitóxico, pois a germinação dos escleródios em atmosfera normal seguiu um comportamento diferente. Os trabalhos de SMOLINSKA et al., (2003) demonstraram que o isotiocianato apresenta um efeito predominantemente fungistático e não fungitóxico. Nos trabalhos de SARWAR et al., (1998) o efeito fungitóxico pode ser induzido somente com aumentos na concentração até 91µL/L. Nas condições *in vitro* para escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* a concentração de ITCA de 50 µL/L reduziu a germinação. Já a concentração de 150 µL/L foi suficiente para matar os escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* em condições *in vitro* e no solo (Tabela 2 e 3) (Fig. 5 e 6). Em seus trabalhos HARVEY et al., (2002) reportou que a concentração mínima para inibir a germinação dos escleródios de *S. rolfsii* foi de 57,3 µL/L. O solo tratado com ITCA nas concentrações de 150 e 200 µL/kg de solo diminuíram a viabilidade dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* em diferentes condições de umidade e temperatura (Fig. 05 e 06).

O manejo de solo seco é muito mais vantajoso que solo úmido, pela facilidade de enchimento de tubetes e vasos. O aquecimento do solo de 25 para 35 ou 45 °C muitas vezes exige um custo adicional ao tratamento. A germinação dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* foi desfavorecida com o aumento da temperatura de 35 para 45° C, associado ao aumento da umidade do solo seco para 22 % umidade (Fig. 05 e 06). Com isso, solos com umidade de 17 e 22 % com a temperatura de 45 °C é letal para os escleródios. Nos trabalhos de MIHAIL et al., (1984) uma das formas de controle é a exposição do escleródio a temperaturas acima de 50 °C por períodos prolongados. Temperaturas subletais não matam o escleródio, mas possibilitam um aumento no antagonismo microbiano. Altas temperaturas com alta umidade desfavorecem à sobrevivência do escleródio. Segundo FERRAZ et al., (2003) a ação da temperatura, acima de 40° C em solos aquecidos em estufa provocou a redução drástica na viabilidade dos escleródios *S. sclerotiorum*. E a dose de ITCA utilizada para escleródios produzidos naturalmente poderia ser maior que para escleródios produzidos *in vitro*. Em função de reproduzir condições naturais que avaliou os escleródios produzidos *in vitro* e naturalmente. No estudo foi observado que os escleródios produzidos naturalmente apresentaram uma maior germinação em relação aos produzidos

in vitro. Os produzidos naturalmente estavam em contato com microrganismos presentes no solo e os produzidos em outro substrato, criando uma maior viabilidade ao escleródio. Segundo PUNJA et al., 1984 a espessura da crosta (camadas melanizadas) que envolve o escleródio é afetada pelo substrato onde o escleródio é produzido. A variação encontrada na germinação dos escleródios produzidos *in vitro* e naturalmente pode estar associada à espessura da crosta que envolve o escleródio.

A diferença encontrada na germinação *in vitro*, com os diferentes tempos de exposição de 4 e 7 dias está envolvida com o efeito tóxico do ITCA, associado com um maior período de contato. Já para o tempo de exposição dos escleródios no solo com ITCA de 7 para 14 dias não houve diferença. Podendo ser utilizado somente 7 dias de exposição dos escleródios no solo com ITCA.

O ITCA reduziu o inóculo inicial *in vitro*, no solo e no campo, retardando a germinação dos escleródios. A redução do inóculo é importante, pois o atraso na germinação do escleródio, atrasa o início da infecção do patógeno, favorecendo culturas de ciclo curto.

No campo as parcelas sem ITCA, não houve diferenças na viabilidade dos escleródios. Sendo assim a lona não influenciou na viabilidade dos escleródios, e as condições climáticas não foram favoráveis para a mortalidade dos escleródios. Segundo trabalhos de MALATHRAKIS et al., (1989) na solarização do solo, foram necessários de 40 a 60 dias, para a erradicação de *S. rolfisii* na temperatura do solo de 42 °C. Nos trabalhos de BEUTE et al., (1981) o efeito da temperatura pode ser alterado em função da umidade. A qual a sobrevivência do escleródio é geralmente menor em solos úmidos que em solos secos. A alta temperatura, juntamente com alta umidade do solo é mais eficaz quando comparada somente com a alta temperatura.

Em condições de campo o aumento na concentração de ITCA no solo, ocasionou uma redução na viabilidade dos escleródios. A utilização da lona juntamente com o ITCA reduziu a viabilidade dos escleródios. A lona foi utilizada no solo para dificultar a saída dos vapores de ITCA. A utilização da lona pode aumentar o acúmulo de CO₂, amônia ou até mesmo de enxofre, que pode afetar a viabilidade de patógenos de solo (KATAN, 1981). Na concentração de 17,73 ml de ITCA/m² sem lona não se observou diferença com a cobertura da lona, pela alta dose utilizada. A lona apresentou vantagem, a dose utilizada de ITCA 8,86 ml/m² com lona foi similar a 17,73 ml/m² sem lona. O custo da utilização da lona é alto, sendo necessário de mais mão de obra na execução do trabalho.

Avaliação do efeito do ITCA na atividade microbiana geral do solo foi utilizada a técnica da hidrólise do DAF. O DAF é hidrolisado por várias enzimas (lípsases, proteases e esterases), presente nos microrganismos e por esse motivo, tem sido usado para avaliar a atividade microbiana no solo (SCHNÜRER & ROSSWALL, 1982).

Nos solos não tratados com ITCA, mesmo com o aumento da umidade, não foi observado um aumento na atividade microbiana (Tabela 05, 06 e 07).

No campo, na testemunha sem lona foi observada uma redução na atividade microbiana, em função das condições climáticas. A utilização da lona na testemunha não influenciou na atividade microbiana. Em trabalhos de GHINI et al., (2002) utilizando o DAF na quantificação da atividade microbiana, não se observou diferença na atividade microbiana do solo com solarização e sem solarização.

O aumento da concentração de ITCA, com temperatura de 25 e 45 °C ocorreu uma diminuição na atividade microbiana do solo (Tabela 05 e 06). Na temperatura de 35 °C ocorreu um aumento na atividade microbiana (Tabela 07). Foi demonstrado que o ITCA tem efeito sobre a microbiota do solo, mas o ITCA não apresentou um efeito esterilizante, e sim um efeito pasteurizante, não provocando um vácuo biológico. Conforme GHINI et al (2002) alguns biocidas promovem a esterilização do solo levando à formação de vácuos biológicos. Solos esterilizados apresentam uma maior facilidade de reinfestação em função da eliminação da sua microbiota.

No estudo do efeito de ITCA na atividade microbiana no campo, não foi observado mudança na atividade microbiana. A testemunha sem lona apresentou uma diminuição na atividade microbiana em função das condições climáticas (Tabela 17).

Para avaliar o efeito do ITCA na população de diferentes grupos de microrganismo, no solo e no campo, foi avaliado o número de ufc's de actinomicetos, bactérias e fungos.

A elevação da umidade em temperaturas de 25 e 35 °C aumentou-se o número de ufc's de actinomicetos (Tabela 08 e 09). Demonstrando que a umidade associada com temperatura ideal é importante para o desenvolvimento dos actinomicetos.

As parcelas no campo com lona, o número de ufc actinomicetos aumentou, em relação ao solo sem lona. A presença da lona favoreceu um microclima, diminuindo a evaporação da água no solo, deixando o solo com maior umidade.

O efeito do ITCA no solo foi tóxico, diminuindo o número de ufc de actinomicetos. No campo o resultado foi diferente, a utilização do ITCA aumentou o número de ufc de actinomicetos, tanto nas parcelas com e sem lona. No campo os demais microrganismos

foram prejudicados com o efeito do ITCA, deixando assim condições favoráveis para o crescimento de colônias de actinomicetos. Segundo COHEN et al., (2005) a população de *Streptomyces* spp. aumentou significativamente em resposta a aplicação da farinha de sementes de *Brassica napus*, tanto no campo como em casa de vegetação. Sendo que a população no campo aumentou, duas semanas após a aplicação.

No solo temperaturas elevadas 45°C com umidade de 22% diminuiram o número de ufc's de bactérias (Tabela 13). Foi observado que as bactérias apresentam dificuldades para se desenvolver com temperaturas elevadas. No campo utilização com e sem lona no solo, sem ITCA apresentou uma menor redução no número de ufc de bactérias. Essa redução ocorreu em função das condições climáticas (Tabela 19).

No solo tratado com ITCA o número de ufc's de bactérias aumentou nas temperaturas de 25 e 35 °C com umidade 17 % (Tabela 11 e 12). Nestas condições os microrganismos (fungos) foram prejudicados pelo efeito do ITCA, a qual as bactérias se favoreceram de tal condição. No solo tratado com ITCA, diminuiu o número ufc de bactérias na temperatura de 35 °C na umidade de 22 % e na temperatura 45 °C com solo seco e umidade de 17 % (Tabela 12 e 13). O ITCA apresentou um efeito seletivo sobre os microrganismos, e dependendo das condições do solo, as bactérias muitas vezes não são afetadas pelo ITCA.

No campo, o solo tratado com ITCA, sem a utilização da lona o número de ufc de bactérias diminuiu e com a lona foi o inverso, aumentou o número de ufc. Sem a lona, as condições de umidade não foram propícias ao crescimento bacteriano. Já com a lona houve o inverso, os demais microrganismos foram desfavorecidos com o ITCA, associada às condições do solo as bactérias foram beneficiadas (Tabela 19). CRUZ, 2003 em seu trabalho utilizando a solarização conjuntamente com tecidos de *Brassica oleraceae* var. *acephala* diminuiu o número de ufc de bactérias e fungos. COHEN et al., 2005 observou que o número total de bactérias diminuiu com aplicação da farinha de sementes de *B. napus*.

Em solos não tratados com ITCA, o aumento da umidade diminuiu o número de ufc de fungos. Alta umidade e temperatura não propiciaram o desenvolvimento dos fungos (Tabela 14, 15 e 16). Acrescentando o ITCA, reduzem ainda mais as condições para o desenvolvimento dos fungos. O ITCA foi tóxico para os fungos do solo, mas em todos os solos tratados com ITCA, encontramos colônias de fungos. O ITCA não provocou uma esterilização e sim uma pasteurização. Em casa de vegetação COHEN et al., (2005) não

observou diferenças na população total de fungos, da testemunha e aplicando farinha de sementes de *B. napus*. Mas com duas semanas após a aplicação de farinha de sementes de *B. napus* no campo, a população total de fungos no solo era menor que na testemunha e ao passar 6 a 8 semanas da biofumigação, a população total de fungos foi aumentando.

No campo a testemunha sem lona, houve uma redução do número de ufc, em função das condições do solo não serem propícias. A utilização da lona mais o ITCA, ocorreu uma diminuição significativa no número de ufc. Sendo necessária a utilização da lona para dificultar a saída de vapores de ITCA do solo (Tabela 20).

6. CONCLUSÕES

O isotiocianato de alilo (ITCA) controlou os patógenos (*Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*), e pode ser utilizado para o tratamento de solo visando à erradicação destes patógenos.

O ITCA difundiu-se melhor em solos secos que em solos úmidos (17 e 22% umidade). A utilização do ITCA na água da irrigação diminuiu a viabilidade dos escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*. Na prática é viável a utilização em irrigação.

Em condições *in vitro* os vapores de ITCA, mataram os escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*. O efeito do ITCA provocou um atraso na germinação dos escleródios. No solo seco ao ar, foi observado um maior efeito do ITCA na mortalidade dos escleródios, que em solos úmidos (17 e 22% umidade). Em condições de campo o ITCA matou os escleródios de *S. rolfsii* e com a utilização lona mais ITCA a mortalidade dos escleródios foi superior. O ITCA é eficiente no solo e no campo para o controle de escleródios de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*.

A utilização de ITCA no solo diminuiu atividade microbiana dependendo das condições de solo. A comunidade microbiana no solo actinomicetos, bactérias e fungos sofreram mudanças com a adição do ITCA no solo. Os números de unidades formadoras de colônias de actinomicetos e bactérias diminuíram, dependendo das condições do solo e ufc's fungos também diminuiu com o efeito do ITCA. A utilização no campo do ITCA aumentou o número de ufc's de bactérias e actinomicetos e diminuiu o número de ufc's de fungos. O ITCA não teve efeito de esterilização do solo e sim de pasteurização não provocando um vácuo biológico no solo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BACKMAN, P. A., RODRIGUEZ-KABANA, R., WILLIAMS, J.C. 1975. The effect of peanut leafspot fungicides on the nontarget pathogen, *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology** 65:773-76.
- BEUTE, M. K., RODRIGUES-KABANA, R. 1979. Effect of volatile compounds from remoistened plant tissue on growth and germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*, **Phytopathology** 69: 802-5.
- BEUTE, M. K., RODRIGUES-KABANA, R. 1981. Effect of soil moisture, temperature, and field environment of survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. **Phytopathology** 71:1293-96.
- BIALY, Z.; OLESZEK, W. LEWIS, J.; FENWICK, G. R.; 1990. Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glycosides) and their degradation products against wheat. **Plant Soil** 129: 277-281.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. J. Plant Pathology**, 16:93-108.
- BOREK, V.; MORRA, M. J.; BROWN, P. D.; McCAFFREY, J. P. 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. **J. Agric. Food Chem.** 43:1935-1940.
- BROWN, P. D.; MORRA, M. J.; McCAFFREY, J. P.; AULD, D. L.; WILLIAMS, L., III. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. **J. Chem. Ecol.** 17:2021-2023.
- BROWN, P. D. MORRA, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. **Adv. Agron.** 61:167-231.
- CHAVES, G. M. 1964. Estudios sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Experimentae**, 4:69133.
- CHARRON, C. S.; SAMS, S. E.; 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 124:462-467.
- CHEW, F. S. 1988. Biological effects of glucosinolates. In Biologically Active Natural Products: Potencial Use in Agriculture; Cutler, H. G. **American Chemical Society.** 155-180.

CHUNG, W. C.; HUANG, J.W.; HUANG, H. C.; Jen, J. F.; 2002. Effect of ground Brassica seed meal on control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. **Can. J. Plant Pathol.** 24:211-218.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M.; 2005 *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. **Soil Biology & Biochemistry** XX:1-13.

CRISP, P. 1976 Trends in the breeding and cultivation of cruciferous crops. In *The Biology and Chemistry of the Crucíferas*; Vaughan, J. G., MacLeod, J. G., Jones, B. M. G., (Eds.) **Academic Press.** 69-74.

CRUZ, J. C. S. Aspectos microbiológicos e químicos em solos submetidos a solarização. Dissertação de mestrado – **Unesp Botucatu / SP** 2003.

DAXENBICHLER, M. E.; VANETTEN, C. H. 1974. 5,5-Dimethyloxazolidine 2-thione formation from glucosinolate in *Limnanthes Alba* Benth. **Seed. J. Am. Oil Chem. Soc.** 51: 449-450.

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L. N.; SILVA Jr. G. J. 2004. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. **J. Phytopathology**, 152: 352-357.

DHINGRA, O. D.; COSTA M. L. N. E.; SILVA, JR G. J.; 2004. Bioprotetor para prevenir e controlar insetos e fungos nos grãos e seus derivados secos. Patente requerido (Protocolo 000269, DE-INPI/BH. 10 de Fevereiro de 2004).

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J.B. 1995. *Basic Plant Pathology Method.* 2nd ed **CRC Lewis Publishers**, Boca Raton, Florida, USA.

DOW, R. L., PORTER, D. M., FOWELL, N. L. 1988. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia* blight of peanut. **Phytopathology** 78:672-6.

DUNCAN, A. J. 1991. Glicosinolates. In: *Toxic substances in crop plant.* Eds. **Felix D'Mello, J. P. Duffus, M.C & Duffus. J. H.**

FENWICK, G. R., AND HEANEY, R. K. 1983. Glucosinolates. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.** 18: 123-201.

FERRAZ, L. C.L.; BERGAMIN, A. F.; AMORIM, L.; NASSER, L. C. B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira** 28:017-026. 2003.

FOO, H. L., GRONNING, L. M., GOODENOUGH, L., BONES, A. M., DANIELSEN, B. E., WHITING, D. A., ROSSITER, J. T. 2000. Purification and characterization of epithiospecifier protein from *Brassica napus* enzymatic intermolecular sulfur addition with alkenyl thio-hydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. **FEBS Lett** 468: 243-246.

- FURIA, T. E. 1972. Handbook of food Additives, 2nd ed., Part III, Regulatory status of direct food additives, **CRC Press**, I:783-966.
- GAMLIEL, A.; STAPLETON, J.J.; 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, 83:899-905.
- GAUTUM, M., KOLTE, S. J. 1979. Control of *Sclerotium* of sunflower through organic amendmens of soil. **Plant and Soil** 53:233-38.
- GHINI, R.; SCHOENMAKER I. A. S.; BETTIOL W.; Solarização do solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium spp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9p. 1253-1261, set. 2002.
- GILARDI, G.; MINUTO, A.; MINUTO, G.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L.; 2000. Activity of natural soil fumigants against soilborne pathogens. **Colture-Protetto**, 29:71-76.
- HARVEY, S. G., HANNAHAN, H. N.; SAMS, C. E.; 2002. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. **J. Am. Soc. Hort.. Sci.** 127:27-31.
- KAJAER, A. 1973. The natural distribution of glucosinolates: an uniform class of sulphur containing glucosides. In Chemistry in Botanical Classification, Benz, G., Santesson, J., (Eds.) **Academic Press**. 229-234.
- KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.19, p.211-236, 1981
- KIRKEGAARD, J. A.; WONG, P. T. W.; DESMARCHELIER, J. M.1996. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. **Plant Pathology**, 45:593-603.
- KIRLIN, V. G.; CAI, J. Y.; DELONG, M. J.; PATTEN, E. J.; JONES, D. P. 1999. Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cell. **J. Nutr.** 129:1827-1835.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D.; 1997 **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo II 2º Ed. 510-514.
- LODHA, S., SHARMA, S. K. 2002. Effect of natural heating and *Brassica* amendments on survival of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**. 55:342-344.
- MACLEOD, A. D. 1976. Volatile flavor compounds of Cruciferae, 307-330, In: Vaughan, J. G.; MacLeod A. D.; and Jones, B. M. C. (Eds.) The Biology and Chemistry of the *Cruciferae*. **Academic Press**.
- MALATHRAKIS, N.E.; LOULAKIS, M.D. Effectiveness of the type of polyethylene sheet on soil solarization. **Acta Horticulturae**, Washington, v.255, p.235-239, 1989.

MAPA. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa conjunta nº 1 de 10 de setembro de 2002.

MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. 1993 *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. **Ann. Appl. Biol.** 123:155-164.

MATHUR, S. B., SARBHOY, A. K. 1976. Physiological studies on *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugarbeet. **Indian Phytopathol.** 29:454-55.

MAWAR, R.; LODHA, S.; 2002. *Brassica* amendments and Summer irrigation for control of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumuni* in hot arid regions. **Phytopathol. Mediterr.** 41:45-54.

MAYTON, H. S, C. OLIVIER, S. F.VAUGHN, E R. LORIA (1996): Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology** 86, 267-271.

MIHAIL, J. D., ALCORN, S. M.1984. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. **Plant Dis.** 68:156-59.

MILLER, R. M., LIBERTA, A. E. 1977. The effects of light and tyrosinase during sclerotium development in *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Can. J. Microbiol.** 23:278-87.

MORRA, M. J., KIRKEGAARD, J. A. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. **Soil Biology & Biochemistry.** 34. 1683-1690.

MUNNECKE, D. E., KOLBEZEN, M. J., BRICKER, J. L. 1982. Effect of moisture, chloropicrin, and methyl bromide singly and in mixture on sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology** 72:1235-38.

OLIVIER, C., S. F. VAUGHN, E. S. G. MIZUBUTI, E R. LORIA (1999): Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. **J. Chem. Ecol.** 25, 2687-2701.

PAPAVIZAS, G. C. 1966. Suppression of *Aphanomyces* root rot of peãs by cruciferous soil amendments. **Phytopathology**, 56: 1071-1075.

POULTON, J.E., AND MOLLER, B.L. 1993. Glucosinolates. **Methods Plant Biochem.** 9:209-237.

PUNJA, Z. K. & RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: Singleton, L. L., Mihail, J. D. & Rush, C. M.(Eds.) 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. **APS Press**, 166-170.

PUNJA, Z. K., GROGAN, R. G. 1982. Effects of inorganic salts, carbonate-bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology** 72:635-39.

PUNJA, Z. K. 1985. The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium rolfsii*. **Ann. Rev. Phytopathology** 23:97-127.

PUNJA, Z. K., JENKINS, S. F. 1984. Influence of temperature, moisture, modified gaseous atmosphere, and depth in soil on eruptive sclerotial germination of sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology** 74:749-54.

PURDY, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology** 69:875-880.

RAMIREZ-VILLAPUDUA, J.; MUNNECKE D. E. 1988. Effects of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutians* and other organisms. **Phytopathology**, 78: 289-295.

RODRIGUEZ-KABANA, R., BACKMAN, P.A., IVEY, H., FARRAR, L.L. 1972. Effect of post-emergence application of potassium azide on nematode populations and development of *Sclerotium rolfsii* in a peanut field. **Plant Dis. Repr.** 56:362-67.

SANG, P. P., MINCHINGTON, L.R. JOHNSTONE, P. K. TRUSCOTT, R.J.W. 1894 Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. **Can. J. Plant. Sci.** 64:77-93.

SARWAR, M.; KIRKEGAARD, J. A., WONG, P. T. W., & DESMARCHELIER, J. M. 1998. Biofumigation potential of brassicas. III. *In vitro* toxicity of isothiocyanates of soil-borne fungal pathogens. **Plant Soil** 201: 103-112.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.1256-1261, 1982.

SMOLINSKA, U. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease**. 87: 407-412.

STEADMAN, J. R. 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69:904-907.

SUBBARAO, K. V. AND HUBBARD, J. C. 1996. Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and on wilt in cauliflower. **Phytopathology**, 86: 1303-1310.

UDA, Y.; KURATA, T.; ARAKAWA, N.; 1986. Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by myrosinase. **Agric. Biol. Chem.** 50: 2735-2740.

VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L) – Controle de doenças – Doenças da parte aérea causadas por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas – Grandes culturas**. Viçosa MG, 1997. v.1, cap.7.

VAUGHN, S F.; BOYDSTON, R. A.; 1997 Volatile allelochemicals released by crucifer green manures. **J. Chem. Ecol.** 23: 2107-2116.

WILLETTS, H. J., WONG, J.A.L. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, 46(2): 101-6.

ZASADA I. A., FERRIS H. 2003 Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**. 93: 747-750.

ZHOU, T.; BOLAND, G. J. 1998. Biological control strategies for *Sclerotinia* diseases. In: Boland, G. J.; Kuykendall, L. D. **Plant-microbe interactions and biological control**. Marcel Dekker, 127-156.