

**DANIEL ANACLETO DA COSTA LAGE**

**FUMIGAÇÃO DE SOLO COM ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA  
PARA O CONTROLE DA MURCHA DE FUSÁRIO EM TOMATEIRO**

Dissertação 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  
2009

DANIEL ANACLETO DA COSTA LAGE

FUMIGAÇÃO DE SOLO COM ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA  
PARA O CONTROLE DA MURCHA DE FUSÁRIO EM TOMATEIRO

Dissertação 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: 12 de fevereiro de 2009.

---

Prof.<sup>ª</sup> Rosângela D'Arc de L. Oliveira  
(Co-orientadora)

---

Prof. Olinto Liparini Pereira  
(Co-orientador)

---

Prof. José Rogério de Oliveira

---

Pesq. Trazilbo José de Paula Junior

---

Prof. Onkar Dev Dhingra  
(Orientador)

*“O essencial não é o que foi feito do homem, mas aquilo que  
ele fez do que fizeram dele.”*

**Jean-Paul Sartre**

Aos meus pais Heloisa e Hercilio,  
Ao meu padrasto Evanildo, e  
A toda a minha família

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre acompanhou a minha caminhada, me oferecendo oportunidades e desafios que permitiram que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, Heloisa Anacleto, ao meu pai, Hercilio Junior, ao meu padrasto, Evanildo Nogueira, à minha irmã, Carolina, aos meus avós, tios e primos, pelo carinho, apoio e incentivo constante.

À minha namorada Anali, pelo carinho, companheirismo, incentivo e compreensão em todos os momentos que passamos juntos e naqueles em que estive ausente.

Ao Prof. Onkar Dev Dhingra pela orientação, amizade, discussões científico-filosóficas e principalmente pelos ensinamentos, que com certeza vão muito além da fitopatologia.

Ao Prof. José Rogério de Oliveira, pela amizade, pelo acompanhamento, pelos ensinamentos e pelo interesse desde o momento que cheguei ao departamento.

Aos professores Olinto Liparini Pereira e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela co-orientação, apoio e sugestões.

Ao Dr. Trazilbo José de Paula Junior pela participação na banca de defesa e pelas sugestões.

Ao Cupertino, pela cessão do isolado fúngico utilizado nesta pesquisa.

Aos companheiros de república, Alexandre Capucho, Alessandro Nicoli, Henrique Duarte e Thiago Maia, pela amizade sincera, apoio, conselhos, discussões científicas e pelos momentos de descontração, que permitiram que vivêssemos como uma verdadeira família.

Aos amigos, Alessandro Fortunato, Fernanda Abreu e Patrícia Gonçalves, pela grata convivência e amizade sempre presente.

Aos colegas de curso, em especial ao Nadson Pontes e à Míriam Fumiko, pela amizade, companheirismo e pelos momentos agradáveis nestes dois anos de mestrado.

Ao amigo Geraldo José da Silva Junior, que me ajudou muito quando cheguei ao laboratório, pelos ensinamentos, pelas discussões científicas e filosóficas e pelos momentos de descontração durante o mestrado.

Aos colegas da Clínica de Doenças de Plantas, Bruno, Dartanhã, Davi, Douglas, Fabiano, Janaina, Aline, Brenda, Diogo, Felipe, Mariana, Mayumi, Meiriele, pelo agradável convívio e pelas trocas de experiências.

Aos funcionários, Célio, Henrique, José Orlando e Oswaldo (Ponês), pelo auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa e pelo agradável convívio na Clínica de Doenças de Plantas.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e contribuição para a minha formação profissional

Ao Dr. Nilton Tadeu Vilela Junqueira pela amizade, acompanhamento, ensinamentos durante a minha iniciação científica, o que me impulsionou a cursar o mestrado permitindo sonhar cada vez mais distante.

Às minhas tias Yvone e Wanda Anacleto, que partiram deixando saudades, mas que continuarão presentes na minha formação.

Aos amigos Leonardo, Brenno, Christiano, Emanuel e Paulo pela amizade de muito tempo, que com certeza é renovada a cada ano.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso de mestrado e deste trabalho de pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de estudos.

Às pessoas que me acompanharam no decorrer dos anos e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste e deixaram lições que me acompanharão por toda a vida.

**Muito Obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

DANIEL ANACLETO DA COSTA LAGE, filho de Heloisa Augusta Anacleto e Hercilio da Costa Lage Junior, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 25 de outubro de 1982.

Em março de 2001, ingressou no curso de Agronomia na Universidade de Brasília, graduando-se em 04 de agosto de 2006.

No período de 2002 a 2006 foi bolsista de iniciação científica (PIBIC/CNPq) no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (Embrapa Cerrados), onde desenvolveu atividades de pesquisa em melhoramento genético de fruteiras visando resistência a doenças.

Em 26 de março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 12 de fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
2.1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> ( <i>FOL</i> ) .....	7
2.2. TESTE DE PATOGENICIDADE, OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS DE <i>F. OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> .....	7
2.3. OBTENÇÃO DE MUTANTE DE <i>F. OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> ( <i>FOL<sub>M</sub></i> ) RESISTENTE AO BENOMIL .....	8
2.4. OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA - ISOTIOCIANATO DE ALILA (ITCA) .....	9
2.5. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO DE ITCA SOBRE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> .....	9
2.5.1. Determinação do efeito de ITCA sobre o crescimento micelial e formação de conídios .....	10
2.5.2. Determinação do efeito de ITCA sobre a germinação de conídios .....	10
2.5.3. Determinação do efeito de ITCA sobre a germinação de clamidósporos .....	11
2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ITCA SOBRE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> NO SOLO .....	12
2.6.1. Produção de clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> mutante para infestação de solo .....	12
2.6.2. Determinação do efeito de doses e tempo de exposição ao ITCA sobre clamidósporos no solo, em laboratório .....	13
2.6.3. Determinação do efeito de doses de ITCA sobre clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , em casa de vegetação .....	13
2.7. ANÁLISE DOS DADOS .....	15
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL .....	17
3.2. FORMAÇÃO DE CONÍDIOS .....	18
3.3. INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS .....	20
3.4. INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS .....	20
3.5. MORTALIDADE DE CLAMIDÓSPOROS EM SOLO TRATADO COM DIFERENTES DOSES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO ITCA .....	23
3.6. MORTALIDADE DE CLAMIDÓSPOROS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>LYCOPERSICI</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	23
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>

## RESUMO

LAGE, Daniel Anacleto da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Fumigação de solo com óleo essencial de mostarda para o controle da murcha de fusário em tomateiro.** Orientador: Onkar Dev Dhingra. Co-Orientadores: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira e Olinto Liparini Pereira.

A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), é um problema comum em campos de produção de tomate, especialmente quando o cultivo é realizado em ambiente protegido. Solos infestados por este patógeno podem inviabilizar a produção em estufas, sendo recomendada a fumigação periódica, visando à manutenção de um baixo nível de inóculo no solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fumigante do óleo essencial de mostarda, que é composto por 90% de isotiocianato de alila (ITCA), na redução de inóculo e no controle da murcha vascular causada por *Fol*. Foram realizados bioensaios *in vitro* de crescimento micelial, formação de conídios e germinação de conídios e de clamidósporos. Para os testes, foram utilizados um isolado selvagem (*Fol<sub>s</sub>*) e um mutante resistente ao benomil (*Fol<sub>m</sub>*), os quais foram fumigados com ITCA, em diferentes doses, dentro de recipientes plásticos vedados, por períodos de 24 ou 48 horas. Após a fumigação, as placas contendo as culturas foram incubadas na ausência dos vapores do produto até a avaliação. Os menores valores de DE<sub>50</sub> foram estimados para o período de 48 horas de exposição, tanto para o bioensaio de crescimento micelial como para os de germinação de conídios e de clamidósporos. Verificou-se que os conídios foram os propágulos de *Fol* mais sensíveis ao produto e os clamidósporos os mais resistentes. O ITCA não afetou significativamente a formação de conídios pelos isolados. Avaliou-se também a eficiência do produto na erradicação de clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* no solo. Inicialmente, foi estudada a interação entre doses (0, 50, 100 e 150µL/L) e tempo de exposição (2, 4, 6 e 8 dias) ao ITCA. Solo infestado com 2000 ±200 clamidósporos/g foi transferido para erlenmeyers, que receberam a dose desejada, sendo, em seguida, hermeticamente vedados. Após exposição, a população do fungo foi determinada por meio de plaqueamento de diluições em série em meio seletivo para *F. oxysporum* acrescido de benomil. A partir da equação de regressão gerada, pôde-se estimar que seria necessária uma fumigação de solo com 125µL/L por períodos superiores a 5,4 dias para erradicação de *Fol<sub>m</sub>* no solo. Para determinar o efeito de ITCA em casa de vegetação, 20L de solo infestado com 4000 ±250 clamidósporos/g foram colocados em sacos de

polietileno de 30L, os quais receberam as doses de 0, 50, 100 ou 150 $\mu$ L/L sendo, posteriormente, vedados, permitindo a fumigação por 7 dias. Decorrido este período, o solo foi transferido para vasos de 4L, os quais receberam uma muda de tomate com 20 dias de idade. As plantas foram cultivadas por 60 dias, sendo retiradas amostras quinzenais de solo para acompanhamento da dinâmica populacional do fungo no solo. Através de análise do conteúdo de clorofila nas folhas, acompanhou-se o desenvolvimento da doença e a severidade final foi avaliada por meio de escala de notas. Foi verificado que a fumigação com 150 $\mu$ L/L de ITCA reduziu em mais de 95% a população de *Fol<sub>m</sub>* no solo e que a severidade da doença aos 60 dias foi inferior a 15%.

## ABSTRACT

LAGE, Daniel Anacleto da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Soil fumigation with mustard essential oil to control fusarium wilt of tomato.** Adviser: Onkar Dev Dhingra. Co-Advisers: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira and Olinto Liparini Pereira.

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), is one of the major problems in tomato cultivation especially in green house crop. The soil infestation with this pathogen can make the green house cultivation unviable, therefore periodic fumigation is recommended to maintain low inoculum level in soil. This study was done to evaluate the fumigant effect of the mustard essential oil (MEO), containing 90% allyl isothiocyanate, to control *Fol*. *In vitro* bioassays were done to determine its effect on mycelial growth, sporulation and germination of conidia and chlamydospores, with use of a wild *Fol* and benomyl resistant mutant (*Fol<sub>m</sub>*). The fungal cultures in Petri plates were fumigated with different concentration of the MEO for 24 or 48 h, and then incubated in MEO free atmosphere. For all fungal propagules, the estimated DE<sub>50</sub> was lowest if the fumigation was done for 48 h. The mycelium and conidia of the *Fol* were more susceptible to MEO than chlamydospores. The MEO did not affect sporulation. Fumigation with MEO was also evaluated for eradication of the chlamydospores of *Fol<sub>m</sub>* in soil. Initially, the interaction between dose (0, 50, 100 or 150µL/L) and exposure time was determined (2, 4, 6 or 8 days). The soil infested with 2000 ±200 chlamydospores/g was placed in flasks, and after adding the requited amount of MEO the flasks were hermetically sealed. After each exposure period, the inoculum density of the fungus was determined by plating the soil dilutions on benomyl enriched galactose-nitrate agar. The regression equation revealed that at dose of 125µL/L an exposure period of 5.4 days was required to eradicate *Fol<sub>m</sub>*. To determine the fumigant effect of MEO in the green house, 20L of soil infested with 4000 ±250 chlamydospores/g was placed in the plastic bags of 30L, and treated with 0, 50, 100 or 150µL/L of MEO. The bags were then sealed and stored. After 7-days exposure period, the soil was distributed into 4L-plastic pots, and one 20-day old tomato seedling was transplanted into each pot. At 15-day interval, soil from each pot was sampled at 15-day interval to follow the population dynamic of the fungus. The disease progress was accompanied by leaf chlorophyll analysis leaves, and the final severity was evaluated by use of a numerical

at the end of 60 days. It was found that the soil fumigation with 150 $\mu$ L/L of MEO reduced the *Fol<sub>m</sub>* inoculum density by 95% and the disease severity was less than 15%.

## 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é cultivado em regiões tropicais e subtropicais do mundo durante todo o ano, produzindo fruto muito apreciado pelo mercado, tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento industrial (Fontes & Silva, 2005).

Atrás apenas da batata inglesa, o tomate é hoje a segunda hortaliça mais produzida no mundo, onde a China e os EUA se destacam como os maiores produtores. O Brasil foi, no ano de 2006, o nono maior produtor de tomate com uma produção de 3,27 milhões de toneladas e uma produtividade média de 57,6 ton/ha (FAO, 2008). O Sudeste é a principal região produtora do país, representando 47% da produção nacional (IBGE, 2008). Por se tratar de uma cultura muito exigente em manejo e tratamentos culturais, a tomaticultura possui importante papel social, gerando muitos empregos diretos e indiretos ao longo da cadeia produtiva (Figueira, 2003).

Em termos econômicos, é uma cultura na qual se consomem muitos insumos na produção, mas conseqüentemente apresenta alto retorno financeiro (Pereira & Mello, 2002). Apesar disso, a produtividade média mundial (27,3 ton/ha) e até mesmo a nacional está muito abaixo do potencial genético da cultura.

O tomateiro pode ser cultivado em campo ou em ambiente protegido, entretanto, é crescente o emprego deste último sistema, devido ao acréscimo em produtividade e à maior qualidade de frutos produzidos, especialmente pela maior eficiência no controle de pragas e doenças e pela redução na aplicação de defensivos (Vida *et al.*, 2004a). Entre outros fatores que contribuem para a redução da produtividade da cultura em campo, estão as doenças, principalmente aquelas que incidem na parte aérea. Por outro lado, no cultivo em estufas, as doenças que atacam o sistema radicular se tornam mais relevantes, em virtude da dificuldade de controle, sobretudo quando o nível de infestação desses patógenos no solo é alto, o que pode muitas vezes inviabilizar o cultivo (Vida *et al.*, 2004b).

Vários patógenos habitantes de solo acometem o tomateiro, com destaque àqueles que causam murchas vasculares, como *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, que há muito tempo é problema nos campos de produção em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil (Arruda, 1941). Até o momento, três raças fisiológicas deste patógeno foram relatadas (Alexander & Tucker,

1945; Gerdemann & Finley, 1951; Conway & Machardy, 1978; Elias & Schneider, 1987; Gordon & Martyn, 1997; Cai *et al.*, 2003), apresentando grande variabilidade genética dentro de cada uma delas (Marlatt *et al.*, 1996).

Os primeiros sintomas da murcha de fusário ou fusariose, em tomateiro, são caracterizados por um leve clareamento externo às nervuras dos folíolos mais jovens (Foster, 1946). Posteriormente, observa-se sintoma de epinastia nas folhas mais velhas a partir da curvatura do pecíolo (Wellman, 1941). Plantas infectadas na fase de mudas, geralmente, manifestam um amarelecimento nas folhas, evoluindo para uma murcha irreversível que conduz a morte (Grattidge & O'Brien, 1982; De Cal *et al.*, 1997). Internamente, pode-se observar uma descoloração vascular do xilema na região do caule próxima a raiz (Gerdemann & Finley, 1951). No campo, plantas adultas infectadas comumente apresentam clareamento de nervuras e epinastia nas folhas, que são seguidos pela redução de crescimento das plantas, amarelecimento das folhas baixas, formação ocasional de raízes adventícias, murcha em folhas e caules mais jovens, desfolhamento, necrose marginal das folhas remanescentes e, finalmente, a morte da planta (Agrios, 2004). É comum observar sintomas de murcha inicialmente em apenas um dos lados da planta, devido à colonização dos vasos não ocorrer em todo o perímetro do caule (Vale *et al.*, 2000; Kurozawa & Pavan, 2005).

A doença manifesta-se no campo em qualquer época do cultivo (Foster & Walker, 1947), sendo mais comum em plantas adultas no início do florescimento até a colheita (Kurozawa & Pavan, 2005). Cortes na base do caule de plantas doentes revelam um anel escurecido muito evidente na região vascular, no entanto, a medula das plantas não sofre qualquer alteração na sua coloração (Agrios, 2004; Kurozawa & Pavan, 2005). Plantas mais velhas podem murchar e morrer subitamente se a infecção for severa e se as condições forem favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Agrios, 2004).

Vários fatores ambientais contribuem para a predisposição das plantas de tomateiro à doença. Muitas destas condições, por sua vez, são também ótimas para o desenvolvimento da planta. Os fatores que favorecem o desenvolvimento de uma típica murcha vascular são: temperatura do solo próxima a 28 °C, baixa umidade no solo, baixo pH, dias curtos, baixa intensidade luminosa, baixos níveis nutricionais de N e P e altos de K (Foster & Walker, 1947; Jones & Woltz, 1972).

A transmissão a longa distância de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) pode ocorrer por meio de sementes (Besri, 1978) e mudas contaminadas, e a curtas

distâncias através do vento, água ou solo infestado (Booth, 1971). Katan *et al.* (1997) observaram esporulação, principalmente na forma de macroconídios do fungo, na base do caule de plantas de tomateiro em condição de alta umidade relativa do ar. Os macroconídios possuem um importante papel epidemiológico no que tange a disseminação do patógeno por meio do vento. Entretanto, são os microconídios e, especialmente, os clamidósporos produzidos pelo fungo, os maiores responsáveis pela sobrevivência de *Fol* no solo, pela infecção do sistema radicular e pela dificuldade de controle da doença. A comparação entre microconídios e clamidósporos quanto à virulência e à quantidade de inóculo capaz de causar sintomas mais severos de murcha, é muito relevante em estudos que abordam a epidemiologia e o controle do patógeno. Vários trabalhos mostraram que os microconídios são menos infecciosos no solo do que os clamidósporos (Marois & Mitchell, 1981; Couteaudier & Alabouvette, 1990). Segundo De Cal *et al.* (1997), essa maior capacidade infecciosa dos clamidósporos se deve à maior atividade heterotrófica destes, sendo capazes de produzir hifas mais hábeis à penetração, mesmo em baixas concentrações no solo. Os estudos com *Fusarium oxysporum* em tomateiro indicam que são necessários de 1000 a 4000 clamidósporos/g de solo para que se possam reproduzir os sintomas da doença (Marois & Mitchell, 1979; Marois & Mitchell, 1981; De Cal *et al.*, 1997).

Por ser uma estrutura de resistência, os clamidósporos podem permanecer viáveis no solo por muitos anos. Por este motivo, a doença dificilmente é controlada no campo em níveis desejáveis. O fungo pode também sobreviver, em períodos de entressafra, através da colonização de restos culturais e/ou na forma endofítica, colonizando plantas daninhas dos gêneros *Oryzopsis*, *Digitaria*, *Amaranthus* e *Malva* (Katan, 1971).

As estratégias de controle deste patógeno se baseiam principalmente nos princípios da exclusão e da imunidade. Em uma área livre do patógeno deve-se impedir a entrada e o conseqüente estabelecimento deste, uma vez que o seu controle após estabelecimento não é muito eficiente. Esta estratégia torna-se mais imprescindível quando a área de cultivo está sob ambiente protegido (Vale *et al.*, 2000; Vida *et al.*, 2004b).

Nos locais onde o patógeno já se encontra estabelecido, o que é fato em praticamente todas as regiões de produção de tomate no mundo, o manejo é realizado por meio da integração de estratégias de controle, entre elas o cultivo de variedades resistentes. Inicialmente, a raça 1 de *Fol* predominava em todo o mundo. As primeiras

variedades resistentes à raça 1 foram obtidas a partir de hibridação entre *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. (resistente) x *L. esculentum* (suscetível) (Bohn & Tucker, 1939). Foi constatado que a herança da resistência do tomateiro a *Fol* era monogênica ou qualitativa (resistência raça-específica), comandada pelo gene *I*. Entretanto, foi observado que variedades resistentes à raça 1 começaram a sucumbir novamente no campo e de uma forma mais severa. Uma nova especialização fisiológica do patógeno, caracterizada como raça 2, havia sido selecionada. (Gerdemann & Finley, 1951; Cirulli & Alexander, 1966). Investimentos em melhoramento genético impulsionaram o desenvolvimento de novas variedades resistentes à raça 2, com o gene de resistência *I-2* (Huang & Lindhout, 1997). Em menos de 10 anos, focos de uma nova raça (raça 3) foram relatados em diversos países, como EUA, Austrália, México (Scott & Jones, 1989; Marlatt *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2003; Holguin-Pena, 2005) e, mais recentemente, no Brasil (Reis *et al.*, 2005), o que demonstra que as estratégias de controle não podem se basear em apenas uma medida fitossanitária, como uso de cultivares resistentes.

Como alternativa para convivência com o patógeno de modo a reduzir os danos provocados por este à cultura em níveis economicamente aceitáveis, destaca-se o controle biológico, no qual muitas pesquisas têm obtido resultados promissores seja pela utilização de microrganismos antagonistas, como *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Penicillium oxalicum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia* (Alabouvette *et al.*, 1993; De Cal *et al.*, 1995; De Cal *et al.*, 2000; Larena *et al.*, 2003; Larkin & Griffin, 2007), ou por formas não patogênicas de *Fusarium oxysporum* (Jakubikova *et al.*, 2005; Shishido *et al.*, 2005; Dhingra *et al.*, 2006; Olivain *et al.*, 2006). Contudo, estas medidas possuem limitada aplicação na prática até o momento.

Outra alternativa que vem sendo aplicada na prática (Gonzalez-Torres *et al.*, 1993; Tamietti & Valentino, 2006) é a solarização do solo, que consiste na colocação de um filme de polietileno transparente (mulching) sobre o solo úmido, com o objetivo de elevar a sua temperatura, permitindo o controle de fitopatógenos, plantas daninhas e pragas, durante os períodos de maior radiação solar (Katan *et al.*, 1976; Jones & Overman, 1987). Essa técnica tem se mostrado eficiente no controle de muitos fungos, bactérias e nematóides fitopatogênicos, todavia necessita de um longo período de tratamento, sendo aplicável apenas em regiões e épocas do ano onde ocorrem prolongada insolação e altas temperaturas (Katan, 1981; Souza, 1994).

Em virtude da dificuldade de estabelecimento de outras medidas e devido à facilidade de aplicação e eficiência, o controle químico por meio da fumigação do solo

com brometo de metila foi, por mais de 60 anos, utilizado em campo, ambiente protegido e para tratamento de substrato para mudas. Este produto é altamente eficiente, com amplo espectro de ação, proporcionando resultados satisfatórios em poucos dias de tratamento, inclusive na erradicação de *F. oxysporum* (Jones *et al.*, 1966; Jones & Overman, 1978; Marois & Mitchell, 1981). Devido a essas características, o produto passou a ser comercializado em vários países como um dos defensivos mais aplicados na agricultura durante muito tempo (Ristaino & Thomas, 1997), apesar da sua elevada toxicidade ao homem e ao meio ambiente (Agrofit, 2008).

De acordo com Gullino *et al.* (2003), mais de 80% do consumo global de brometo no ano de 1991 foi devido às operações de desinfestação de solo, tanto em campo quanto em viveiro. Isto representou um consumo de mais de 60 mil toneladas do produto como fumigante de solo (Ristaino & Thomas, 1997). Em 1992, o produto foi adicionado à lista de substâncias que degradam a camada de ozônio e que deveria ter seu consumo reduzido no mundo, de acordo com o Protocolo de Montreal de 1987 (UNEP, 2000).

A partir da proibição do uso do brometo de metila como fumigante na agricultura, pesquisadores em todo o mundo procuram por novas alternativas para a sua substituição, visando a prática de uma agricultura mais sustentável e permitindo um controle eficiente de patógenos (Gullino *et al.*, 2003).

Os estudos atuais visam à obtenção de um fumigante versátil para o controle de um amplo espectro de organismos, que possa substituir, ao menos parcialmente, o brometo de metila proporcionando, além de uma ampla atividade de controle, um baixo impacto ao meio ambiente (Ghini, 2001). Muitos compostos estudados no passado e novas moléculas desenvolvidas foram testados ou novamente avaliados como possíveis substitutos, entre eles: a cloropicrina, a cianamida de cálcio, o dazomete (tetrahydro-3-5-dimetil-2h-1,3,5-tiadiazino-2-tiona), o 1,3-dicloropropeno, o iodeto de metila e o metam-sodium (Minuto *et al.*, 2000; Bletsos, 2005; Minuto *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum destes conseguiu, até o momento, agregar todas as características desejáveis a um fumigante de amplo espectro de ação.

Outro composto com potencial para utilização como fumigante é o isotiocianato, que é naturalmente formado a partir de glucosinolatos presentes em muitas espécies da família Brassicaceae, com destaque para algumas espécies de mostarda, tais como *Brassica nigra*, *B. juncea* e *B. rapa* (Kirkegaard *et al.*, 1996; Morra & Kirkegaard, 2002; Smith *et al.*, 2004; Njoroge *et al.*, 2008). Os glucosinolatos são compostos

sulfúricos formados por um grupo  $\beta$ -D-tioglicosídico e uma cadeia de radicais carbonos variável (grupo -R). Da reação de hidrólise dos glucosinolatos, catalisada por uma enzima endógena conhecida por mirosinase ( $\beta$ -tioglicosideo glicohidrolase, EC 3.2.3.1), resultam vários compostos (Zanada & Ferris, 2003; Rouzaud *et al.*, 2004), dentre os quais o isotiocianato de alila (ITCA). O ITCA é um composto volátil com atividade fungicida e nematicida, mostrando eficiência contra os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* (Schurt, 2006), *Rhizoctonia solani* (Dhingra *et al.*, 2004), *Verticillium dahliae* (Olivier *et al.*, 1999) e nematóides do gênero *Heterodera* (Ellenby, 1945), *Meloidogyne* (Goulart, 2007) e *Tylenchulus* (Zasada & Ferris, 2003). Smolinska *et al.* (2003) compararam o efeito de diversos isotiocianatos (isotiocianato de 2-propenila, etila, butila, feniletila, benzila e fenila) quanto à mortalidade de *F. oxysporum*, entretanto, o conhecimento do efeito do ITCA sobre fungos do gênero *Fusarium* ainda é incipiente.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ITCA na redução de inóculo e no controle da murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no laboratório da Clínica de Doenças de Plantas e em casa de vegetação, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, no período de fevereiro de 2008 a fevereiro de 2009.

### 2.1. Obtenção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

Culturas de *Fol* foram obtidas por meio de isolamento em Batata-Sacarose-Ágar – BSA, a partir de plantas de tomateiro que apresentavam sinais do patógeno e/ou sintomas da doença. Ao todo foram utilizados quatro isolados, que foram identificados como *Fol*-01, obtido da coleção de fungos da Clínica de Doenças de Plantas/UFV; *Fol*-02, da coleção do Laboratório de Genética e Melhoramento de Soja/UFV; *Fol*-03 e *Fol*-04, coletados em lavoura de tomate-mesa nos municípios de Ervália-MG e Coimbra-MG, respectivamente.

### 2.2. Teste de patogenicidade, obtenção e armazenamento de culturas monospóricas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

A patogenicidade dos isolados foi testada sobre mudas de tomateiro pertencentes ao cultivar Santa Clara, do grupo Santa Cruz, que possui alta susceptibilidade a todas as raças do fungo. As mudas foram inoculadas seguindo metodologia adaptada de Reis *et al.* (2005). Sementes deste cultivar foram semeadas em bandejas de poliestireno de 128 células, preenchidas com vermiculita esterilizada. Decorridos 21 dias da semeadura, as mudas, com um par de folhas verdadeiras, foram removidas das bandejas e tiveram suas raízes lavadas em água para eliminação do substrato. Posteriormente, as raízes foram cortadas a cerca de 2 cm abaixo da região do coleto, com auxílio de uma tesoura e, em seguida, mergulhadas em suspensão de conídios ( $10^7$  conídios/mL). Os conídios foram produzidos em BSA a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Mudanças com raízes cortadas e mergulhadas em água destilada foram utilizadas como testemunha. Após 5 minutos em suspensão, as mudas foram transferidas para vasos de 1L contendo substrato preparado com solo de barranco, esterco bovino e areia (4:2:1; v:v:v), corrigido com 1,8 kg/m<sup>3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,25 kg/m<sup>3</sup> de K<sub>2</sub>O e 0,4 kg/m<sup>3</sup> de N, e foram cultivadas em câmaras de crescimento com temperatura de 30 ± 2°C e UR de 55 ± 15%. Após 21 dias, a doença

foi avaliada utilizando a escala proposta por De Cal *et al.* (1995): 1 = plantas saudias com ausência de sintomas externos; 2 = folhas baixas amareladas; 3 = folhas baixas mortas e algumas folhas superiores amareladas; 4 = folhas baixas mortas e superiores murchas; 5 = planta morta.

Foi realizado o reisolamento do fungo e, posteriormente, foram preparadas culturas monospóricas de acordo com metodologia proposta por Toussoun & Nelson (1976) e Booth (1977). As culturas obtidas foram armazenadas em frascos com sílica-gel e mantidas em geladeira a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  (Dhingra & Sinclair, 1995). O isolado *Fol*-02, por ser o mais agressivo, foi selecionado para se proceder à etapa de obtenção de mutante.

### **2.3. Obtenção de mutante de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol<sub>m</sub>*) resistente ao benomil**

Um mutante resistente ao benomil foi desenvolvido de acordo com a técnica proposta por Postma & Luttikholt (1993), com o objetivo de distinguir o patógeno em estudo de outras formas de *F. oxysporum*. Para tanto, suspensão de conídios foi obtida a partir da lavagem da cultura de *Fol*-02, cultivada durante 8 dias em BSA. Essa suspensão foi filtrada, em dupla camada de gaze, calibrada para  $1 \times 10^7$  conídios/mL, sendo, posteriormente, retiradas alíquotas de 100 $\mu\text{L}$ , que foram espalhadas sobre placas de Petri contendo BSA acrescido de 10mg/L de benomil (Benlate, 50% i.a.) – BSA-b. Os conídios foram expostos por 1 minuto à luz ultra-violeta fornecida por lâmpada Toshiba Germicidal GL 30, localizada a 40cm de altura (Kroon & Elgersma, 1991). Decorrido este período, as placas foram mantidas a  $25^{\circ}\text{C}$ , no escuro, durante 8 dias. Foram selecionadas, ao acaso, 42 colônias do fungo, as quais foram transferidas para BSA-b em placa de Petri, para preparo de culturas monospóricas.

A seleção final do mutante foi baseada no aspecto da colônia em BSA, na sobrevivência de conídios em BSA-b e na patogenicidade a tomateiros, como proposto por Coelho Netto (1997). Um mutante (*Fol<sub>m</sub>*-17), considerado o mais semelhante ao isolado selvagem em termos de patogenicidade, morfologia da colônia e sobrevivência de conídios em BSA-b, foi selecionado, armazenado em sílica-gel e mantido a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Para avaliar a estabilidade da mutação do isolado selecionado, foram realizadas ao longo de 6 meses, 20 repicagens sucessivas em BSA e a cada 5 repicagens foi verificado se este mantinha a capacidade de crescer em BSA-b.

O crescimento micelial do *Fol<sub>m</sub>* selecionado foi determinado em diferentes concentrações de benomil. Discos de micélio de 10mm de diâmetro foram transferidos para o centro de placas contendo BSA-b em diferentes concentrações, as quais foram mantidas a 25°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram constituídos pelas doses de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 50 e 100mg/L de benomil, com quatro repetições e uma placa por parcela. O diâmetro médio das colônias foi mensurado diariamente, a partir do segundo dia após a repicagem, até que o micélio do fungo atingisse a borda da placa na testemunha. Os resultados foram ajustados para uma curva de regressão relativa ao crescimento da colônia do *Fol<sub>m</sub>* em diferentes concentrações de benomil.

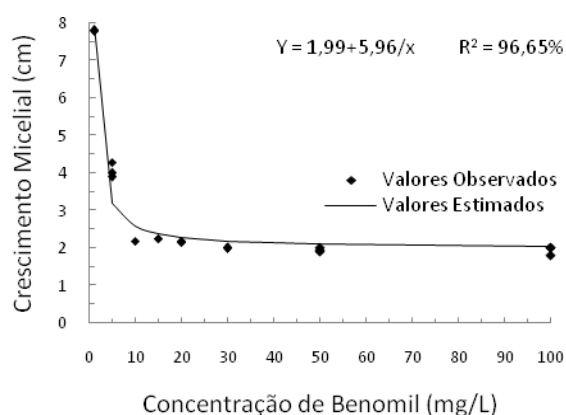


Figura I – Curva de crescimento da colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mutante em diferentes concentrações de benomil acrescidas ao meio BSA, após 7 dias de incubação.

#### 2.4. Obtenção de óleo essencial de mostarda - Isotiocianato de alila (ITCA)

O óleo essencial de mostarda (OEM) com 90% de ITCA foi obtido da Bpar Química Ltda.

#### 2.5. Avaliação *in vitro* do efeito de ITCA sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Foram realizados bioensaios de crescimento micelial, formação e germinação de conídios, e germinação de clamidósporos, empregando metodologia modificada de Smolinska *et al.* (2003), utilizando um isolado selvagem (*Fol<sub>s</sub>*) e um isolado mutante (*Fol<sub>m</sub>*). O delineamento experimental para todos os testes foi inteiramente casualizado,

em esquema fatorial, com dois isolados, sete doses de ITCA (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 $\mu$ L/L) e três repetições por tratamento. Para confirmação dos resultados, todos os bioensaios foram repetidos uma vez.

### **2.5.1. Determinação do efeito de ITCA sobre o crescimento micelial e formação de conídios**

Os isolados *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* foram cultivados em meio Czapek-Dox Ágar – CDA (Dhingra & Sinclair, 1995) durante 8 dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Discos de cultura (5mm de diâmetro) foram retirados dessas placas, os quais foram transferidos para o centro de novas placas contendo o referido meio. As placas abertas foram distribuídas dentro de um recipiente plástico de 2,4L. Para determinar o efeito fumigante de ITCA, a dose desejada foi colocada em um pequeno frasco localizado entre as placas dentro do recipiente plástico, o qual foi imediatamente vedado com parafilme, de forma a evitar a dissipação dos vapores de ITCA para o ambiente. Após 24 ou 48 horas de fumigação, a 25°C, no escuro contínuo, as placas foram retiradas dos recipientes, tampadas e incubadas por 7 dias, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi avaliado diariamente em dois sentidos perpendiculares. Os resultados foram expressos na forma de percentual de inibição do crescimento micelial em relação à testemunha. Foram estimados os valores de dose efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (DE<sub>50</sub>) a partir da regressão.

Para avaliar a formação de conídios, discos de meio de cultura foram retirados das margens das colônias de todas as placas do bioensaio anterior. Foram avaliados dois discos por placa. Cada disco (10mm de diâmetro) foi retirado a aproximadamente 1cm da margem da colônia, sendo, em seguida, colocado em um tubo de ensaio contendo 2mL de água destilada estéril acrescida de 0,01% de Tween 20. Após agitação em vortex por 10 segundos para deslocar os conídios, a densidade conidial foi determinada usando hemacitômetro. Os resultados foram expressos em número de conídios produzidos por cm<sup>2</sup> de disco, sem distinção entre macro e microconídios.

### **2.5.2. Determinação do efeito de ITCA sobre a germinação de conídios**

Alíquotas de 100 $\mu$ L de suspensão de conídios (1,5 x 10<sup>6</sup> conídios/mL) obtida a partir de culturas de *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* cultivados durante 8 dias em CDA, foram espalhadas sobre Ágar - Água em placas de Petri. As placas sem as tampas foram então transferidas

para os recipientes de plástico de 2,4L. Os conídios foram fumigados com ITCA como descrito no item 2.5.1. Após 24 ou 48 horas de fumigação, as placas foram retiradas dos recipientes, tampadas e incubadas por 24 horas, a 25°C e em escuro contínuo. A germinação de conídios foi avaliada após 24 horas, contando-se 100 conídios em três pontos distintos de cada placa, para determinar o percentual de conídios germinados. Não foi feita distinção entre macro e microconídios. Os resultados foram expressos na forma de percentual de inibição da germinação de conídios em relação à testemunha e, os valores de DE<sub>50</sub> foram estimados a partir da regressão.

### **2.5.3. Determinação do efeito de ITCA sobre a germinação de clamidósporos**

Os clamidósporos de *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* foram produzidos de acordo com metodologia descrita por Muniz (1990) e Coelho Netto (1997). Para preparar o extrato de solo, autoclavou-se, por 20 minutos, uma mistura de solo e água (1:2; p:v), a qual foi filtrada em dupla camada de papel filtro por duas vezes. O extrato filtrado teve o pH ajustado para 6,5 com CaCO<sub>3</sub>. Aliquotas de 50mL desse extrato foram transferidas para erlenmeyers de 250mL, que foram autoclavados por 15 minutos, duas vezes, durante dois dias consecutivos. Após resfriamento, adicionou-se 10 mg de cloranfenicol em cada erlenmeyer. O extrato de solo foi semeado com três discos de cultura (10mm de diâmetro) retirados das margens de colônias com 7 dias de crescimento em BSA. Os erlenmeyers foram incubados por 25 dias, a 25°C e em escuro contínuo. O crescimento fúngico obtido, constituído predominantemente de clamidósporos e micélio, foi separado do extrato utilizando-se uma peneira de 400 mesh. A massa fúngica foi então lavada com água destilada, recolhida para um béquer e triturada, durante 5 minutos, em sonicador Marconi MA-102 para separar os clamidósporos do micélio. Em seguida, a massa triturada foi misturada com caulim e colocada para secar a 40°C até se obter peso constante. Após a secagem, a mistura foi armazenada a ± 5°C.

A concentração de clamidósporos por grama de caulim foi determinada através de diluições em série, utilizando método padrão e plaqueamento em meio seletivo Galactose-Nitrato-Ágar – GNA (Dhingra & Sinclair, 1995).

Para determinar o efeito da fumigação com ITCA na germinação de clamidósporos, alíquotas de 100µL de uma suspensão de caulim e clamidósporos (1,5 x 10<sup>3</sup> clamidósporos/mL) foram espalhadas em placas de Petri contendo GNA e os procedimentos restantes foram similares aos descritos anteriormente. Decorrida a

fumigação, as placas foram incubadas por 7 dias, a 25°C e em escuro contínuo. Cada colônia desenvolvida em cada placa foi assumida como representante da germinação de um único clamidósporo. Os resultados foram expressos na forma de percentual de inibição da germinação de clamidósporos em relação à testemunha e os valores de DE<sub>50</sub> foram estimados a partir da regressão.

## **2.6. Avaliação do efeito de ITCA sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* no solo**

Foram realizados dois ensaios para avaliar o efeito de ITCA sobre clamidósporos adicionados ao solo. O primeiro ensaio foi realizado em laboratório com o objetivo de se determinar a melhor dose e o melhor tempo de exposição aos vapores do produto para, posteriormente, avaliar o efeito de doses de ITCA em casa de vegetação.

### **2.6.1. Produção de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mutante para infestação de solo**

Clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* foram produzidos em vermiculita seguindo metodologia proposta por Dhingra *et al.* (2006). A vermiculita, previamente secada em estufa, foi enriquecida com caldo de Batata-Sacarose - BS (1,5mL de BS/g de vermiculita) sendo então transferida para erlenmeyers de 2L. Estes foram autoclavados por 1 hora, seguido por 30 minutos após 24 horas. O substrato foi semeado com 10mL de suspensão de conídios do fungo, produzida em BS, acrescida de cloranfenicol (200mg/L), sob agitação contínua (130rpm) por 7 dias. Após o semeio, o substrato foi incubado a 25°C e misturas ocasionais foram realizadas para se obter uma colonização mais uniforme. Decorridos 30 dias, o substrato colonizado foi transferido para bandejas, as quais foram cobertas com folhas de papel absorvente, para permitir uma lenta secagem, por 20 dias em condições ambiente e, então, por 2 dias a 40 °C. Após a secagem, a vermiculita contendo clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* foi triturada em moinho Marconi MA-090 utilizando peneira fina, e em seguida foi armazenada em geladeira ( $\pm$  5°C) até ser utilizada. O número de clamidósporos/g de substrato foi determinado pelo método de diluição seriada, em placas contendo GNA acrescido de 10mg/L de benomil – GNA-b.

### **2.6.2. Determinação do efeito de doses e tempo de exposição ao ITCA sobre clamidósporos no solo, em laboratório**

Foi preparado substrato para mudas a partir de mistura de solo de barranco, esterco bovino e areia lavada (4:2:1; v:v:v), corrigido com 1,8 kg/m<sup>3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,25 kg/m<sup>3</sup> de K<sub>2</sub>O e 0,4 kg/m<sup>3</sup> de N. Este substrato foi peneirado e, em seguida, homogeneizado com inóculo contendo clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>*, em misturador rotativo de solo, por um período de 24 horas. Após a infestação do solo, foi determinado o número de clamidósporos/g, por meio de diluição seriada em placas com GNA-b.

Para fumigação com ITCA, 120g do substrato (2000 ±200 clamidósporos/g) foi transferido para erlenmeyers de 125mL. O ITCA na quantidade desejada (50, 100 ou 150µL/L) foi embebido em tira de papel filtro (3,0 x 1,5cm) que, em seguida, foi colocada no meio do solo contido em erlenmeyer, de modo que ficasse completamente coberta. O mesmo procedimento foi adotado para a testemunha que, no entanto, recebeu uma tira de papel sem o produto. Cada erlenmeyer foi hermeticamente fechado, para impedir a dissipação dos vapores, e incubado a 25°C em escuro contínuo. Após a fumigação por 2, 4, 6 ou 8 dias, a população do fungo foi determinada por meio de plaqueamento de diluições em série do substrato. Para isso, amostras de 1g do substrato foram colocadas em tubos de ensaio com 9mL de água destilada estéril, acrescida de 0,01% de Tween 20. Os tubos foram agitados em vortex por 20 segundos e alíquotas de 100µL desta suspensão foram espalhadas em placas com GNA-b. A contagem de colônias de *Fol<sub>m</sub>* foi feita após 10 dias de incubação a 25°C em escuro contínuo. Os resultados foram expressos na forma de percentual de inibição da germinação de clamidósporos em relação à testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, constituído por 4 doses de ITCA, 4 períodos de exposição e três repetições por tratamento.

### **2.6.3. Determinação do efeito de doses de ITCA sobre clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em casa de vegetação.**

O efeito da fumigação com ITCA no controle da doença e na dinâmica populacional de *Fol<sub>m</sub>* foi determinado em casa de vegetação. O inóculo de clamidósporos do fungo foi misturado ao substrato descrito no item 2.6.2, utilizando uma betoneira por um período de 30 minutos. Após a infestação, 20L deste substrato foram colocados em sacos de polietileno de 30L, os quais foram mantidos em câmara a

22°C, até que fosse determinada a concentração média de clamidósporos/g. Para isto, amostras foram coletadas em cada saco, secadas em estufa a 40°C até peso constante, sendo, em seguida, determinada a concentração de clamidósporos por meio de diluição e plaqueamento em GNA-b. A densidade de clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* no substrato foi estimada em 4000 ±250 clamidósporos/g. O substrato em saco de polietileno foi fumigado com as doses de 0, 50, 100 ou 150µL/L de ITCA. A quantidade de ITCA desejada para cada saco foi embebida em quatro tiras de papel filtro (10 x 3cm) que foram colocadas em cada saco, sendo distribuídas em 4 pontos equidistantes, a uma profundidade de 15cm dentro do substrato. Os sacos foram imediatamente vedados com fita adesiva, de modo a impedir a dissipação dos vapores do produto, e foram acondicionados a 22°C. Decorridos 7 dias de fumigação, os sacos foram abertos e o substrato foi distribuído em vasos de 4L, que receberam, após uma semana, uma muda de tomate, cultivar Santa Clara, com 20 dias (2 a 4 folhas verdadeiras). Os vasos foram distribuídos aleatoriamente em bancadas na casa de vegetação. A temperatura máxima e mínima dentro da casa de vegetação foi de 33±3 e 19±2°C, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 4 doses de ITCA, 6 repetições e 5 plantas por parcela.

O experimento foi conduzido por 60 dias, sendo realizados tutoramento de mudas e desbrota quando necessário, adubações quinzenais com sulfato de amônio (aproximadamente 750mg/vaso), e pulverizações semanais para controle de mosca-branca. Semanalmente, os vasos foram rotacionados nas bancadas com objetivo de reduzir possíveis efeitos ambientais que interferissem nos resultados.

Determinou-se a densidade de clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* no substrato logo após a fumigação do solo e a dinâmica populacional foi acompanhada em intervalos de 15 dias durante 45 dias. Para isso, amostras de solo foram retiradas em dois pontos de cada vaso a uma profundidade de 5cm, colocadas em sacos de papel tipo Kraft e secadas em estufa a 40°C até obtenção de peso constante. Após a secagem, as amostras foram homogeneizadas manualmente e 10g deste substrato foram diluídas em 90mL de água destilada estéril, acrescida de 0,01% de Tween 20. As amostras foram agitadas por 5 minutos, em agitador magnético e, em seguida, alíquotas de 100µL foram distribuídas em placas contendo GNA-b. As placas foram incubadas a 25°C, por 7 dias e o número de colônias formadas foi determinado.

A severidade da doença foi avaliada 60 dias após o transplante. Neste estágio, as plantas testemunhas negativas haviam atingido mais de 2 metros de altura, lançado o terceiro conjunto de flores e os frutos da primeira florada já estavam se desenvolvendo. Para avaliação da severidade foi utilizada a escala proposta por De Cal *et al.* (1995): 1 = plantas sadias com ausência de sintomas externos; 2 = folhas baixas amareladas; 3 = folhas baixas mortas e algumas folhas superiores amareladas; 4 = folhas baixas mortas e superiores murchas; 5 = planta morta. Para análise dos dados, as notas foram transformadas em valores percentuais de severidade através do índice de McKinney (Cirulli & Alexander, 1966), cuja equação geral é:

$$ID = \frac{\sum(f \cdot v)}{n \cdot x} \cdot 100$$

Em que, ID = índice de doença; f = número de plantas com determinada nota de severidade; v = nota observada; n = número de plantas inoculadas; e x = a maior nota da escala. Ajustou-se um modelo de regressão, a partir da variação da severidade média em função das doses de ITCA.

Paralelamente, a severidade da doença foi acompanhada semanalmente, através da medição do conteúdo de clorofila na terceira folha verdadeira, utilizando o equipamento SPAD 502 Chlorophyll Meter. A análise do conteúdo de clorofila nas folhas baixas do tomateiro permite acompanhar o estabelecimento da doença na planta, antes que os primeiros sintomas de amarelecimento sejam visíveis, assim como fizeram Shaner & Finney (1977) e Dhingra *et al.* (2006). Foi escolhida uma planta em cada parcela, que teve a folha marcada. Utilizou-se a testemunha negativa (planta cultivada em solo não infestado) como controle do conteúdo normal de clorofila. Foram retiradas 10 medidas para cada folha marcada, de modo que para cada um dos cinco primeiros folíolos desta folha fossem realizadas duas aferições. Os resultados foram expressos na forma de variação do conteúdo de clorofila na folha ao longo do tempo e, posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva do conteúdo de clorofila (AACCC) para cada tratamento.

## 2.7. Análise dos dados

Os dados obtidos nos ensaios foram testados quanto à normalidade e quanto à homogeneidade de variância por meio do teste de Lilliefors e do teste de Cochran e Bartlett, respectivamente, sendo em seguida, submetidos à análise de variância. Para os

dados dos testes *in vitro* foram ajustadas curvas de regressão a partir de cada isolado, conforme as variações na resposta de inibição em função do aumento da dose de ITCA. A partir dos dados dos testes em solo, foram ajustadas superfícies de resposta para o ensaio de doses x períodos de exposição de clamidósporos ao ITCA e curvas de regressão para a severidade média da doença e para a mortalidade de clamidósporos no solo em função das crescentes doses do produto. Para os ensaios de dinâmica populacional e conteúdo de clorofila nas folhas, os dados foram representados graficamente seguidos de desvio-padrão. Teste de média foi realizado para comparação da AACCC entre os tratamentos. Foram utilizados para as análises os softwares SAEG versão 9.1 e SAS versão 9.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Inibição do crescimento micelial

Os dados observados de inibição do crescimento micelial foram ajustados segundo o modelo de regressão do tipo raiz quadrada, no qual se tem como equação geral:  $Y = \beta_0 + \beta_1 x^{0,5} + \beta_2 x$ . Este foi o modelo que melhor se adequou aos dados, uma vez que neste estudo definiu-se doses de ITCA crescentes, de acordo com uma progressão geométrica, o que permitiu obter valores significativos de  $\beta$  e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) elevados.

A exposição de *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* aos vapores de ITCA por 24 horas resultou em baixa inibição do crescimento micelial (< 50%) na faixa de 0,25 a 2,0 $\mu$ L/L (Figura 1). Os valores de DE<sub>50</sub> estimados para ambos os isolados ficaram acima de 2,64 $\mu$ L/L, chegando até próximo a 4,0 $\mu$ L/L. Este período de exposição dos discos de micélio ao ITCA não foi suficiente para causar a mortalidade do fungo em nenhuma das doses testadas, ou seja, nem a 8,0 $\mu$ L/L o ITCA promoveu a morte do micélio fúngico. No entanto, o produto mostrou-se eficiente quando se aumentou o período de exposição para 48 horas, uma vez que não houve crescimento dos isolados durante 7 dias de incubação na ausência de ITCA, a partir de concentrações em torno de 4,0 $\mu$ L/L.

Este bioensaio mostrou a importância de se aumentar o período de exposição do micélio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* aos vapores de ITCA, objetivando uma maior eficiência de controle. Os valores de DE<sub>50</sub> corroboram esta conclusão, visto que comparando os valores estimados para o período de exposição de 24 e de 48 horas, notou-se evidente decréscimo à medida que se aumentou o tempo de exposição ao ITCA. Os valores de DE<sub>50</sub> para o período de 24 horas ficaram entre 2,64 e 3,98 $\mu$ L/L, enquanto que para o período de 48 horas, ficaram entre 1,74 e 2,24 $\mu$ L/L.

Os isolados *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* se comportaram de maneira semelhante quanto à sensibilidade do micélio ao ITCA, quando estes foram expostos por 24 e 48 horas ao produto. Os maiores valores de DE<sub>50</sub> estimados para o isolado selvagem no período de 24 horas de exposição, se deveu à pequena diferença em velocidade de crescimento micelial dos isolados. O isolado selvagem obteve diâmetros de colônia maiores, quando comparado ao isolado mutante para ambos os períodos de exposição.

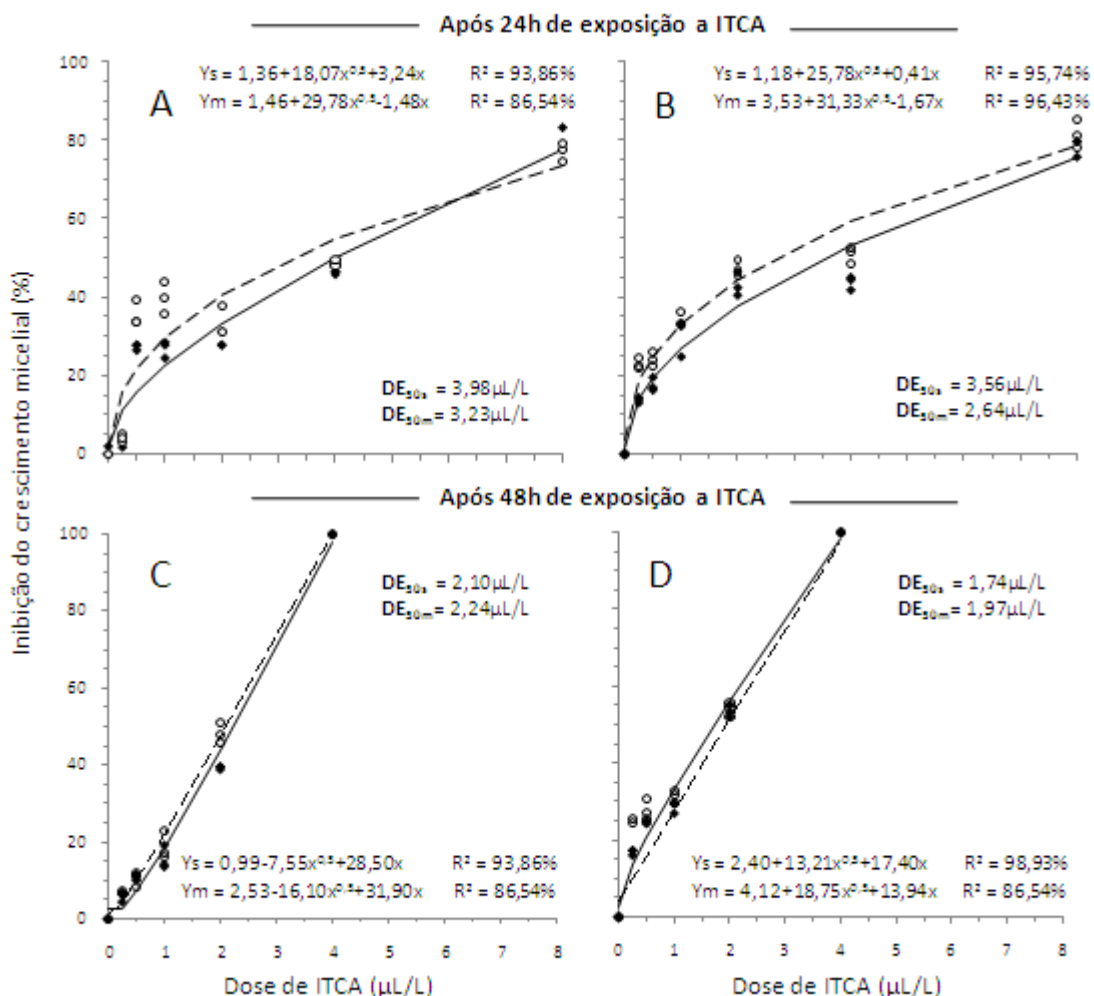


Figura 1 – Percentual de inibição do crescimento micelial de isolados selvagem (—●—) e mutante (—○—) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, devido à exposição a vapores de ITCA em diferentes doses, por períodos de 24 e 48 horas, com posterior incubação por 7 dias na ausência do produto. **AB** – Resultados de dois experimentos para o período de 24 horas de fumigação. **CD** – Resultados de dois experimentos para o período de 48 horas de fumigação.

### 3.2. Formação de conídios

Os vapores de ITCA não afetaram significativamente a formação de conídios por nenhum dos isolados (Figura 2). Os dados obtidos não permitiram o ajuste de um modelo de regressão que explicasse o comportamento observado, sugerindo que a variação da formação de conídios observada não se deve ao efeito das doses do produto sobre o fungo. Com relação à produção de conídios, *Fol<sub>s</sub>* produziu de  $2 \times 10^6$  a  $8,3 \times 10^6$

conídios/cm<sup>2</sup> e de 2,8x10<sup>6</sup> a 4,9x10<sup>6</sup> conídios/cm<sup>2</sup>, após 24 e 48 horas de exposição ao ITCA, respectivamente. Os resultados observados para *Fol<sub>m</sub>* variaram de 2,1x10<sup>6</sup> a 6,7x10<sup>6</sup> conídios/cm<sup>2</sup> e de 2,6x10<sup>6</sup> a 5,9x10<sup>6</sup> conídios/cm<sup>2</sup> para os mesmos períodos, diferenças que não foram significativas entre os isolados.

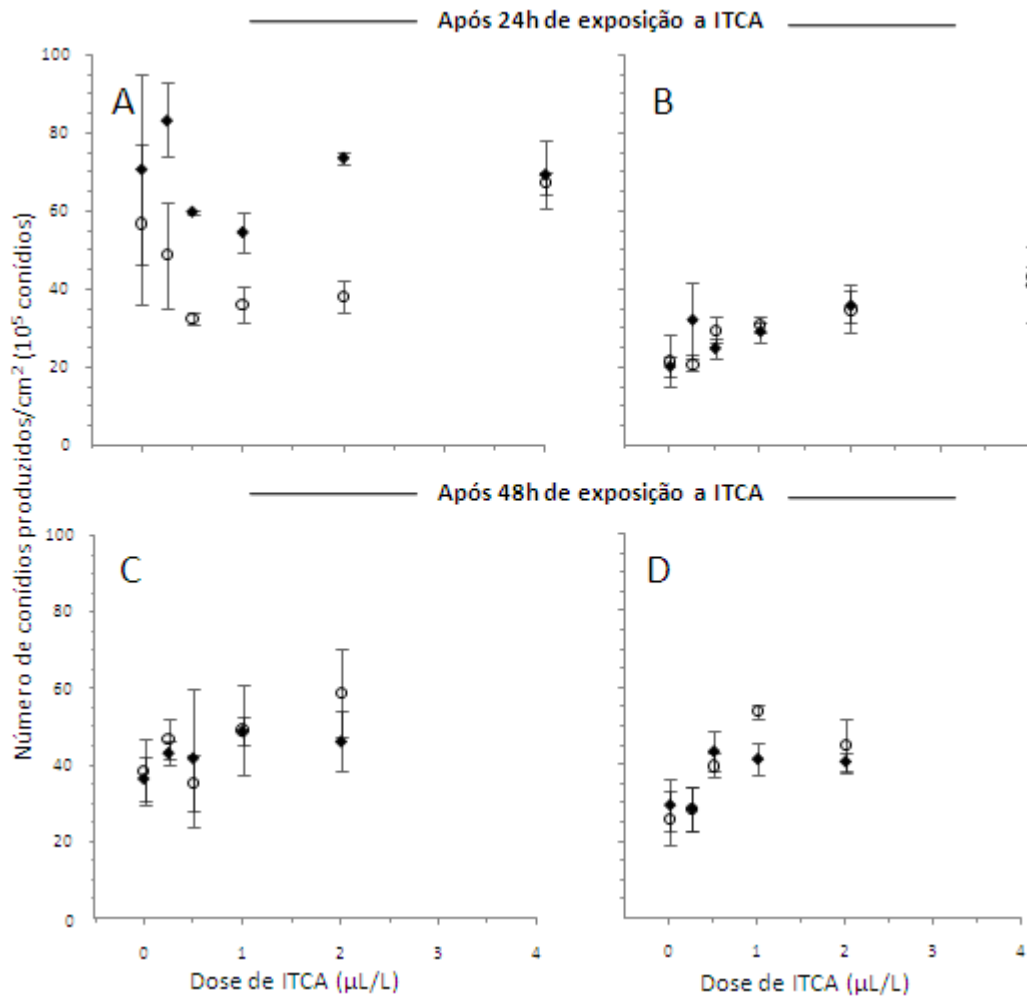


Figura 2 – Número de conídios formados pelos isolados selvagem (◆) e mutante (○) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, devido à exposição a vapores de ITCA em diferentes doses, por períodos de 24 e 48 horas, com posterior incubação por 7 dias na ausência do produto. Os marcadores escuros e claros representam as médias dos valores observados e as barras verticais representam o desvio padrão de cada média. **AB** – Resultados de dois experimentos para o período de 24 horas de fumigação. **CD** – Resultado de dois experimentos para o período de 48 horas de fumigação.

### 3.3. Inibição da germinação de conídios

Os conídios de ambos os isolados mostraram-se extremamente sensíveis aos vapores de ITCA, tanto para o período de exposição de 24 horas quanto para o período de 48 horas (Figura 3). Doses superiores a 2,0 $\mu$ L/L foram suficientes para inibir 100% da germinação de conídios expostos por 24 e 48 horas ao produto. Foi possível ajustar um modelo linear de regressão ( $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ ) para o comportamento observado, uma vez que os intervalos entre as doses se tornaram mais reduzidos (de 0 a 2,0 $\mu$ L/L).

A inibição da germinação de conídios foi pouco afetada pelo período de exposição dos conídios ao produto. Isto fica evidente, quando se compara os valores estimados de DE<sub>50</sub> para cada intervalo de tempo. Observaram-se valores de DE<sub>50</sub> variando entre 1,31 e 1,33 $\mu$ L/L e entre 1,08 e 1,15 $\mu$ L/L para os períodos de 24 e 48 horas de exposição, respectivamente.

A sensibilidade de  $Fol_s$  e  $Fol_m$  quanto à inibição da germinação de conídios foi semelhante, o que se evidencia pela sobreposição das respectivas curvas de regressão dos isolados para ambos os períodos de exposição.

### 3.4. Inibição da germinação de clamidósporos

Ajustou-se o modelo de regressão do tipo raiz quadrada para os dados de inibição da germinação de clamidósporos. Observou-se que o maior período de exposição de clamidósporos aos vapores de ITCA, para ambos os isolados, conduziu a maior inibição da germinação destes clamidósporos (Figura 4). Comparando-se os valores de DE<sub>50</sub>, verificou-se que menores doses foram necessárias para inibir 50% da germinação dos clamidósporos à medida que se aumentou o período de exposição ao produto de 24 para 48 horas. Observou-se DE<sub>50</sub> variando de 5,55 a 7,26 $\mu$ L/L, quando os clamidósporos foram expostos por 24 horas aos vapores de ITCA. Com o aumento do período de exposição para 48 horas, os valores de DE<sub>50</sub> reduziram em mais de 65% variando entre 1,63 e 2,42 $\mu$ L/L.

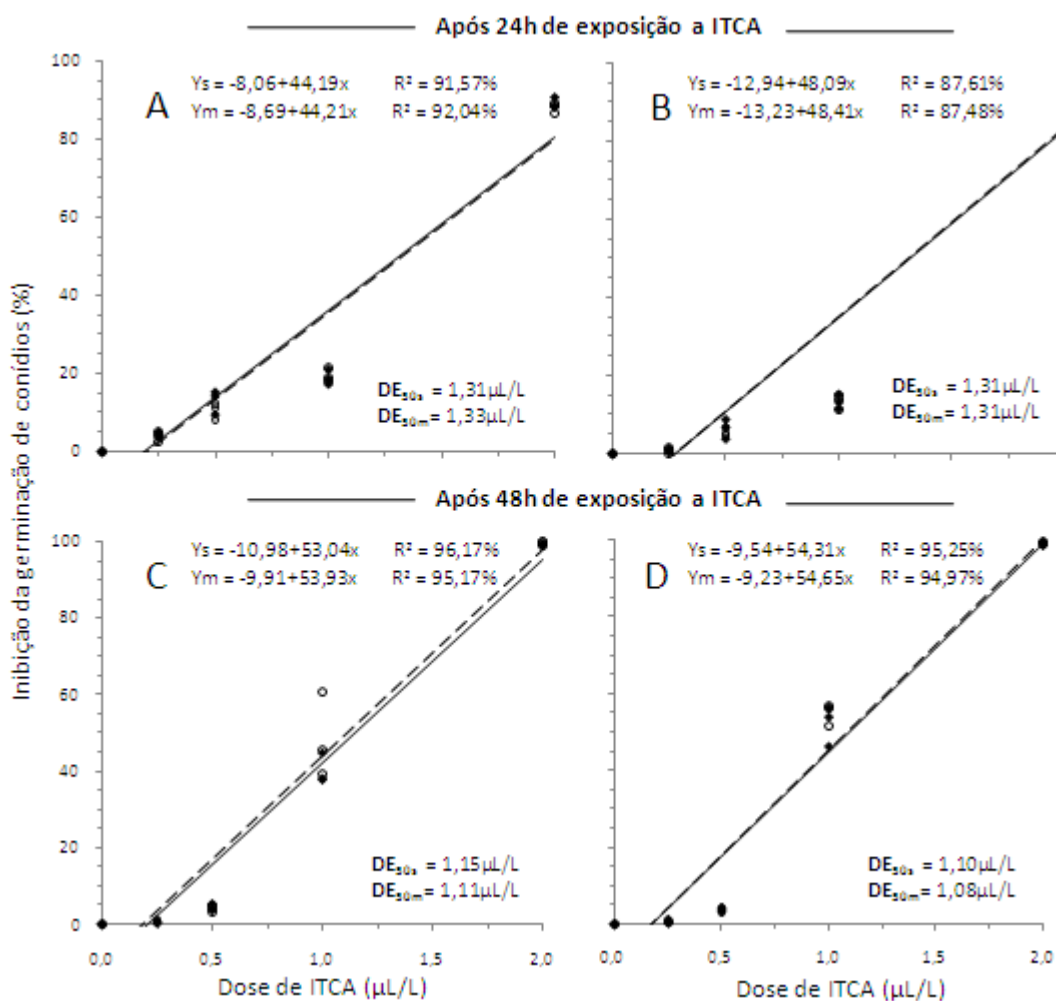


Figura 3 – Percentual de inibição da germinação de conídios de isolados selvagem (—◆—) e mutante (—◊—) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, devido à exposição a vapores de ITCA em diferentes doses, por períodos de 24 e 48 horas, com posterior incubação por 24 horas na ausência do produto. **AB** – Resultados de dois experimentos para o período de 24 horas de fumigação. **CD** – Resultados de dois experimentos para o período de 48 horas de fumigação.

O ITCA não foi capaz de causar a mortalidade de clamidósporos de ambos os isolados, quando estes foram fumigados pelo período de 24 horas. Mesmo nas doses mais altas (8,0μL/L), obteve-se menos de 60% de inibição. Observou-se que o produto se comportou como fungistático nas doses mais elevadas, o que só foi possível verificar, a partir de observações diárias do desenvolvimento das colônias. Por esta razão, a avaliação final foi realizada 7 dias após a exposição dos clamidósporos ao ITCA.

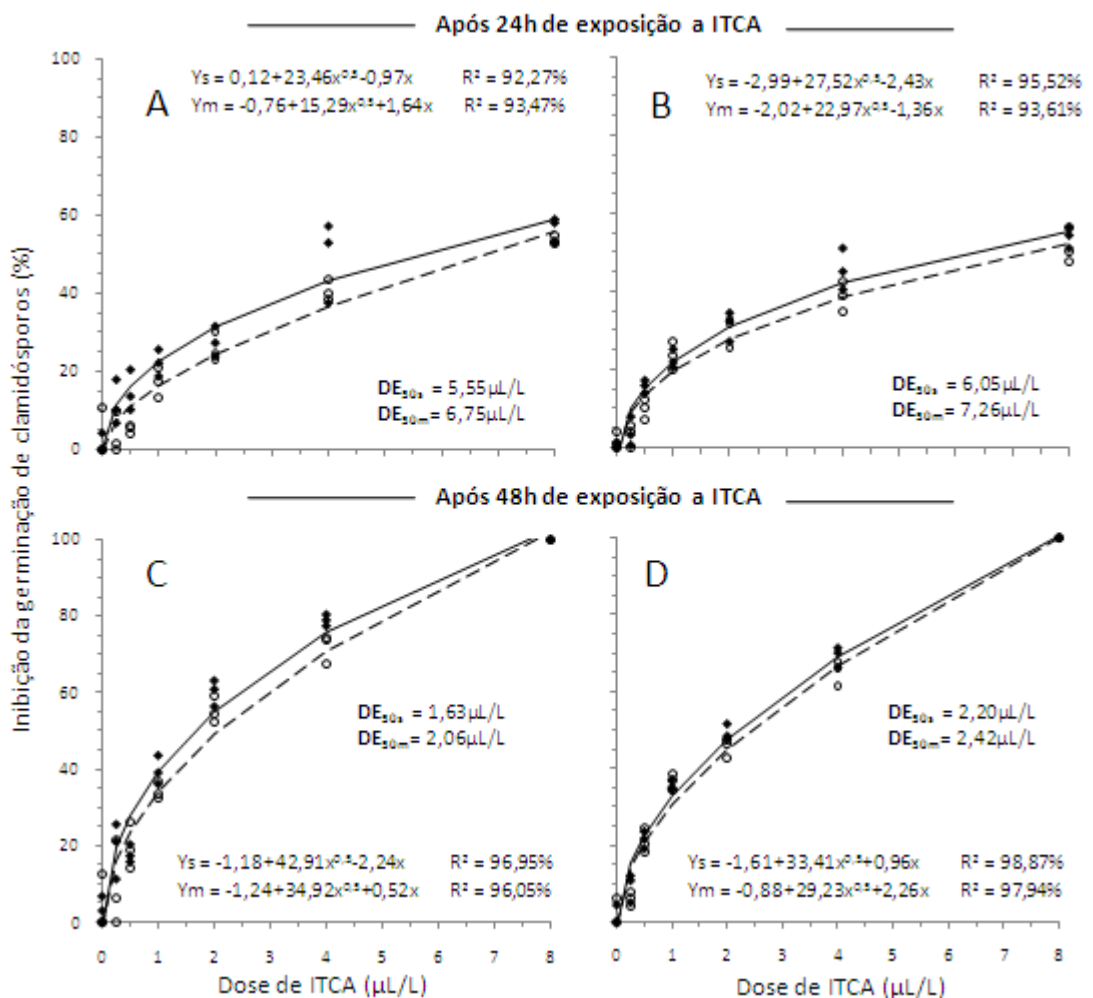


Figura 4 – Percentual de inibição da germinação de clamidósporos de isolados selvagem (—◆—) e mutante (---○---) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, devido à exposição a vapores de ITCA em diferentes doses, por períodos de 24 e 48 horas, com posterior incubação por 7 dias na ausência do produto. **AB** – Resultados de dois experimentos para o período de 24 horas de fumigação. **CD** – Resultados de dois experimentos para o período de 48 horas de fumigação.

Os isolados *Fol<sub>s</sub>* e *Fol<sub>m</sub>* se comportaram de maneira semelhante em relação à inibição da germinação de clamidósporos para ambos os períodos de exposição. Considerando cada período de exposição, pode-se observar, a partir das curvas de regressão, a mesma tendência de resposta para os dois isolados seguindo o aumento da dose de ITCA.

### **3.5. Mortalidade de clamidósporos em solo tratado com diferentes doses e tempos de exposição ao ITCA**

Observou-se interação significativa ( $p < 0,01$ ) entre doses de ITCA e período de exposição de clamidósporos de *Fol<sub>m</sub>* no solo. A partir dos dados observados (Figura 5-A), pôde-se propor um modelo de regressão linear para o efeito de tempo de exposição e um modelo quadrático para o efeito de doses de ITCA. Por meio das regressões, foi gerada uma superfície de resposta para a interação entre ambos os fatores, considerando como variável dependente o percentual de mortalidade de clamidósporos do isolado mutante (Figura 5-B).

Analisando cada fator separadamente na Figura 5-AB, verifica-se que o percentual de mortalidade de clamidósporos aumentou à medida que se elevou o tempo de exposição ao ITCA. Analogamente, houve um aumento da mortalidade com as maiores doses do produto. No entanto, quando se considera a interação entre os dois fatores, percebe-se que com o aumento do tempo de exposição de clamidósporos ao ITCA, menor a dose do produto necessária a erradicação total (100%) destes clamidósporos. Da mesma forma, quando se aumenta a dose de ITCA, pode-se reduzir o tempo de exposição aos vapores do produto e obter resposta semelhante.

Torna-se necessário, portanto, definir parâmetros que possam indicar um período de exposição e uma dose de ITCA ideais, a partir da equação de regressão proposta. Para isto, obteve-se a derivada primeira da equação para o tempo de exposição ( $dy/dT$ ) e estimou-se como ideal períodos iguais ou superiores a 5,4 dias. O mesmo procedimento foi realizado para dose de ITCA ( $dy/dD$ ), sendo considerada a dose ótima em torno de  $125\mu\text{L/L}$ .

### **3.6. Mortalidade de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em casa de vegetação**

Após a fumigação do solo com ITCA, determinou-se o percentual de redução na quantidade de clamidósporos que haviam sido adicionados a este, na concentração de 4000 clamidósporos/g (Figura 6). Foi ajustado um modelo de regressão do tipo raiz quadrada para o comportamento observado. Constatou-se uma crescente redução no número de clamidósporos/g de solo à medida que se aumentou a dose de ITCA, com valores de aproximadamente 88% para a dose de  $50\mu\text{L/L}$  e de 99% para as doses de 100 e  $150\mu\text{L/L}$ .

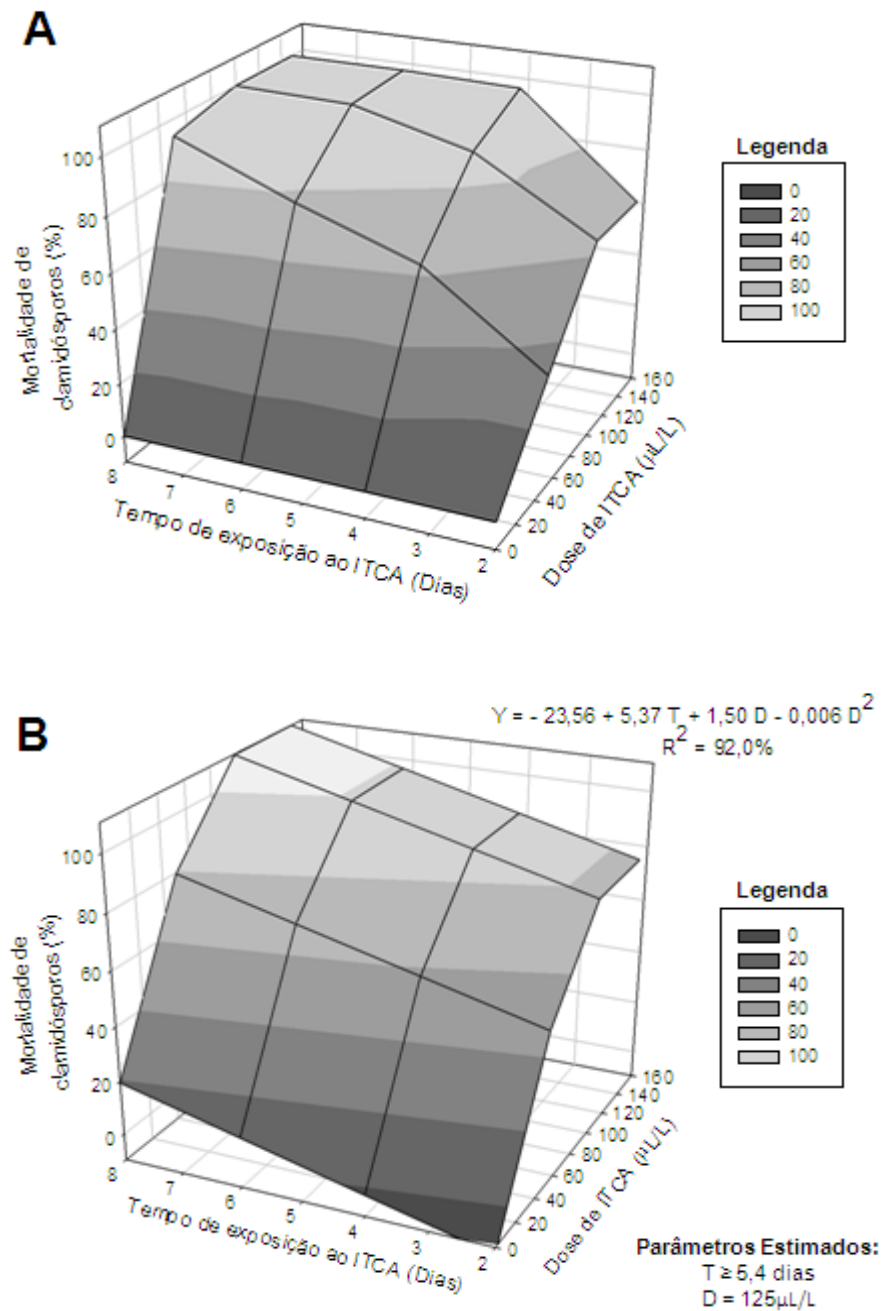


Figura 5 – Percentual de mortalidade de clamidósporos de isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, em solos tratados com diferentes doses e tempos de exposição a vapores de ITCA. **A** – Resultados obtidos a partir dos dados observados no ensaio. **B** – Resposta estimada de acordo com regressões ajustadas a partir dos dados observados. Equação geral:  $Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 D + \beta_3 D^2$ , onde T = tempo de exposição; D = dose de ITCA.

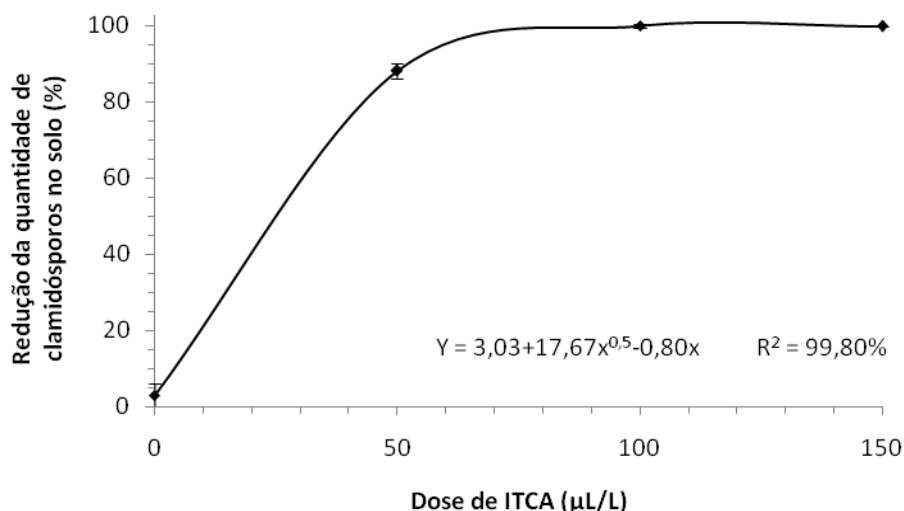


Figura 6 – Percentual de redução da quantidade de clamidósporos de um isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, em solo fumigado por 7 dias com diferentes doses de ITCA. As barras verticais representam o desvio padrão para cada média.

No entanto, quando se acompanhou a dinâmica da população de *Fol<sub>m</sub>* no solo (Figura 7), após transplante de tomateiro, verificou-se um aumento no número de UFC do fungo/g de solo à medida que o tempo de cultivo avançou. Este aumento foi mais pronunciado para o substrato fumigado com 50µL/L de ITCA. Mesmo a fumigação com 150µL/L, promoveu um ligeiro acréscimo de inóculo ao solo. Em 45 dias, a quantidade de inóculo aumentou de cerca de 500 para aproximadamente 1600 UFC de *Fol<sub>m</sub>*/g em solo fumigado com 50µL/L, e de próximo de zero para quase 500 e 100 UFC/g em solos fumigados com 100 e 150µL/L, respectivamente. Apesar disto, estes últimos tratamentos proporcionaram, ao final de 45 dias, uma redução de 87,5 a 97,5% da quantidade inicial de inóculo que havia no solo.

Em substratos não tratados com ITCA, foi observado um decréscimo no número de UFC/g nos primeiros 15 dias, seguido de subsequente aumento durante os demais períodos de avaliação.

Para determinar se a quantidade de inóculo residual no solo, após a fumigação, foi importante no estabelecimento da doença em plantas de tomateiro, acompanhou-se a severidade de sintomas de murcha de fusário, a partir da análise de clorofila nas folhas baixas da planta e por meio de escala de notas. Os valores de conteúdo de clorofila ao longo do tempo estão representados na Figura 8. Nota-se, inicialmente, que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, com valores médios variando entre 22 e

24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Após uma semana, o conteúdo de clorofila aumentou em todos os tratamentos atingindo valores de 28 a 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Neste mesmo período, a testemunha positiva (planta cultivada em solo não fumigado) começou a apresentar diferenças em relação aos demais tratamentos. Ao fim de 26 dias, verificou-se rápido declínio de clorofila, com queda das folhas deste tratamento, em virtude do avanço da severidade da doença. Os sintomas da doença nessas plantas começaram a ser visíveis, a partir do 22º dia, período em que se observaram valores médios de conteúdo de clorofila em torno de 23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , enquanto os demais tratamentos apresentaram valores médios variando entre 27 e 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . As plantas que estavam no solo fumigado com 50 $\mu\text{L}/\text{L}$  de ITCA começaram a manifestar a doença no 26º dia. O conteúdo de clorofila para este tratamento foi determinado como próximo a 26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , ao passo que os demais tratamentos mantiveram-se entre 27 e 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . A quantidade de clorofila na folha foi diminuindo com o tempo até o 30º dia. Após 37 dias, as folhas no tratamento 50 $\mu\text{L}/\text{L}$  haviam caído.

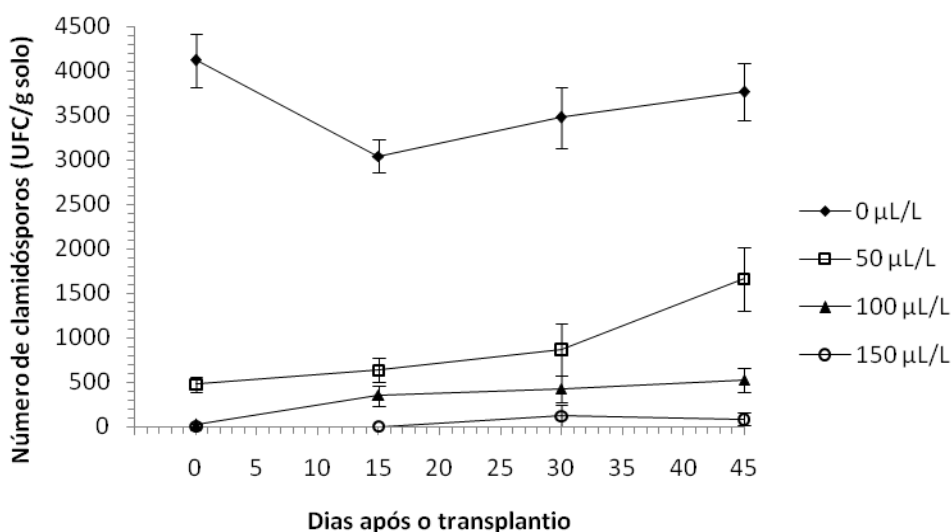


Figura 7 – Número de unidades formadoras de colônias a partir de clamidósporos de um isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, em solo fumigado com diferentes doses de ITCA. As barras verticais representam o desvio padrão para cada média.

Ao final do período de avaliação, determinou-se a área abaixo da curva do conteúdo de clorofila (AACCC) para cada tratamento. Analisando a Figura 9, pode-se verificar que os tratamentos 0 e 50 $\mu\text{L}/\text{L}$  apresentaram menores quantidades de clorofila, quando comparados aos demais tratamentos. Além disso, constatou-se que a AACCC

do controle negativo (solo não infestado) não foi significativamente diferente, quando comparada aos tratamentos de 100 e 150 $\mu$ L/L de ITCA, para o período de avaliação.

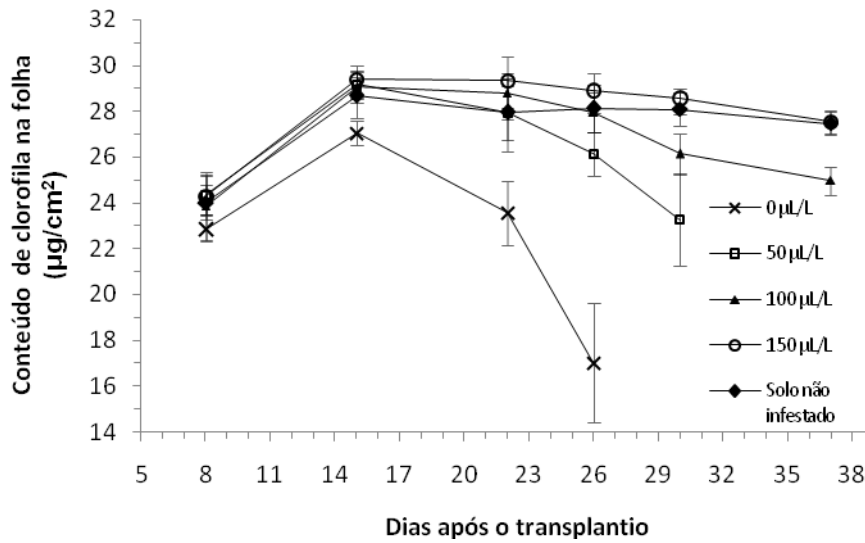


Figura 8 – Conteúdo de clorofila na terceira folha verdadeira de plantas de tomateiro, cultivadas em solo infestado com clamidósporos de um isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, após fumigação com diferentes doses de ITCA. As barras verticais representam o desvio padrão para cada média.

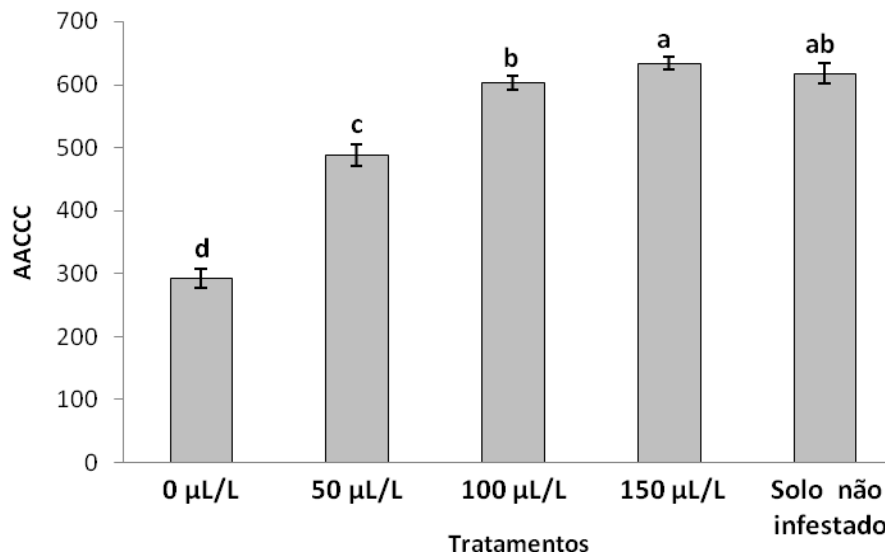


Figura 9 – Área abaixo da curva do conteúdo de clorofila (AACCC) na terceira folha verdadeira de plantas de tomateiro, cultivadas em solo infestado com clamidósporos de um isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, após fumigação com diferentes doses de ITCA. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão para cada média.

Na avaliação da severidade final da doença, foi possível ajustar um modelo de regressão do tipo linear ( $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ ) para o resultado observado. Verificou-se que a fumigação do solo com ITCA promoveu uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) na severidade da doença (Figura 10). Pôde-se observar também que os tratamentos com doses de 50 e 100  $\mu\text{L/L}$  permitiram que a doença se estabelecesse com elevada severidade nas plantas (Figura 10), apesar da redução significativa que estes tratamentos produziram sobre a quantidade de inóculo no solo (Figuras 6 e 7). Isto significa que quantidades de 500 a 1600 UFC/g de solo são capazes de reproduzir os sintomas da doença, com severidade média variando entre 35 e 90%. A concentração de 4000 clamidósporos/g de solo foi suficiente para induzir os sintomas mais severos da doença muito rapidamente, após 25 dias do transplântio. Aos 60 dias, as plantas de tomateiro cultivadas em solo fumigado com 150  $\mu\text{L/L}$  de ITCA, apresentaram severidade média abaixo de 15%, sendo que, em algumas repetições, as plantas não manifestaram os sintomas da doença.

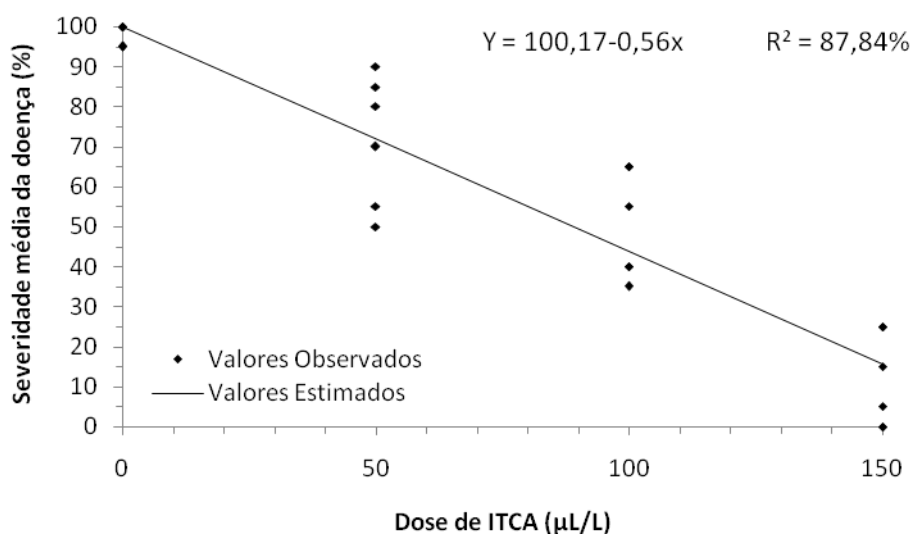


Figura 10 – Severidade média da murcha de fusário em plantas de tomateiro, cultivadas por 60 dias em solo infestado com clamidósporos de um isolado mutante de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resistente ao benomil, após fumigação com diferentes doses de ITCA.

#### 4. DISCUSSÃO

As murchas vasculares causadas por diversas *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, em comparação com as podridões radiculares e com os tombamentos de plântulas apresentam maior dificuldade de controle devido à natureza particular da evolução do parasitismo na relação patógeno-hospedeiro (McNew, 1960). Um dos motivos é que mesmo em baixas concentrações de inóculo, este fungo pode se desenvolver, infectando o hospedeiro e levando-o à morte, se as condições ambientais forem favoráveis (Marois & Mitchell, 1981; Bhatti & Kraft, 1992). Para podridões radiculares e tombamentos de mudas observa-se uma maior relação entre a quantidade de inóculo no solo e a severidade da doença nas plantas (Ferriss, 1982; Bhatti & Kraft, 1992; Keinath, 1995). Apesar disto, a diminuição de propágulos de *F. oxysporum* no solo é uma estratégia que contribui para o atraso da epidemia (Bhatti & Kraft, 1992), muitas vezes permitindo que as plantas possam completar seu ciclo.

A biofumigação com brássicas tem sido estudada como uma alternativa de controle de diversos patógenos (Rosa & Rodrigues, 1999), entre eles *F. oxysporum*, em virtude da grande concentração de glucosinolatos nos tecidos dessas plantas. Porém sua eficiência na redução de inóculo tem sido variável (Mattner *et al.*, 2008; Njoroge *et al.*, 2008). O emprego de isotiocianatos concentrados tem apresentado resultados promissores no controle de patógenos de solo, não apenas pela redução da quantidade de inóculo no solo, mas devido à manutenção de uma microbiota diversificada (Schurt, 2006; Galletti *et al.*, 2008), desfavorecendo ainda mais o patógeno.

Todas as estruturas propagativas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, avaliadas *in vitro*, se mostraram sensíveis ao ITCA. Este, na forma de vapor, age diretamente sobre a permeabilidade da membrana plasmática, conduzindo ao extravasamento de metabólitos celulares (Lin *et al.*, 2000b). Em células cancerígenas, os isotiocianatos podem atuar também sobre a respiração, acionando, paralelamente, um mecanismo de apoptose celular, como resultado de uma reação oxidativa que conduz à perda da integridade da membrana mitocondrial (Jakubikova *et al.*, 2005; Tang & Zhang, 2005; Xu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). A interferência sobre a respiração foi observada também em bactérias, uma vez que bactérias aeróbicas estritas se mostraram mais sensíveis ao ITCA do que as anaeróbicas facultativas (Delaquis & Mazza, 1995).

A ação dos vapores de ITCA sobre microrganismos é influenciada pela espessura da parede celular, de modo que quanto mais espessa for a parede, menor a quantidade de ITCA que chegará à membrana plasmática, menor o extravasamento do conteúdo celular, menor a oxidação da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, maior a dose de ITCA necessária para matar a célula (Delaquis & Sholberg, 1997; Lin *et al.*, 2000a; Lin *et al.*, 2000b). Este comportamento está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, em que foram observadas diferenças quanto à mortalidade entre as estruturas propagativas do fungo, a partir da comparação dos valores de DE<sub>50</sub> estimados nos bioensaios. Verificou-se que os conídios foram mais sensíveis ao ITCA, seguidos do micélio, com sensibilidade intermediária, e dos clamidósporos, que se mostraram os mais resistentes ao produto. A espessura de parede dessas estruturas segue a ordem inversa observada para a sensibilidade ao ITCA (Leslie & Summerell, 2006), de tal forma que os conídios, formados por parede fina, foram mais sensíveis do que os clamidósporos, formados por parede espessa. A maior espessura da parede celular dificulta a penetração dos vapores, reduzindo a quantidade de isotiocianato que chega até a membrana plasmática. O efeito de ITCA sobre o micélio e sobre os escleródios de *Rhizoctonia solani* foi influenciado pela espessura da parede, que conferiu maior proteção aos escleródios à ação do produto (Yulianti *et al.*, 2006). Foi demonstrado que, a resistência de *Alternaria brassicicola* ao ITCA, liberado em folhas de diversas brássicas, se deveu a um mecanismo compensatório de manutenção da integridade da membrana, o que impede a perda do conteúdo celular para o meio externo (Sellam *et al.*, 2007).

O aumento no tempo de exposição ao ITCA de 24 para 48 horas, proporcionou uma maior eficiência na mortalidade de propágulos de *Fol*, mesmo para a germinação de conídios, em que essas diferenças foram menos evidentes. O ITCA foi letal, dentro da faixa de doses testadas, para todas as estruturas do fungo que foram expostas ao produto por um período de tempo mais prolongado (48 horas). Estes resultados corroboram o mecanismo de ação proposto por Lin *et al.* (2000b) para os isotiocianatos, uma vez que quanto maior o período de exposição da membrana plasmática e mitocondrial aos vapores de isotiocianatos, maior o extravasamento de metabólitos que conduzirão à morte celular. O maior tempo de exposição também foi significativo no controle de *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* (Nielsen & Rios, 2000). Foi verificado que o aumento desse tempo, de 24 para 48 horas, permitiu elevar a taxa de mortalidade de *Salmonella*

*typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Delaquis & Sholberg, 1997; Lin *et al.*, 2000a; Weissinger *et al.*, 2001). Estes autores observaram efeito bacteriostático do ITCA para o período de exposição de 24 horas. Efeito fungistático foi observado, no presente trabalho, para propágulos de *Fol* expostos pelo mesmo período de tempo e, por Smolinska *et al.* (2003), para o crescimento micelial de *F. oxysporum*. Efeito similar foi relatado para fungos degradadores de alimentos (Nielsen & Rios, 2000). Isto acontece porque o tempo de exposição curto não proporciona um extravasamento e uma oxidação de membranas suficientes para comprometer a viabilidade celular, e a célula consegue se recuperar, a partir do momento que os vapores forem dissipados.

As doses de ITCA testadas *in vitro* foram capazes de inibir o crescimento fúngico, sendo que algumas destas doses apresentaram efeito fungistático e outras foram letais ao *Fol*. A explicação para este comportamento é que à medida que se aumenta a dose, mais expressivos são os efeitos sobre a integridade de membranas. Muitos trabalhos estimaram doses ótimas para inibição do crescimento micelial de diversos fungos. Foi estimado o valor de 1,9 $\mu$ L/L de ITCA, como DE<sub>50</sub> para crescimento micelial de *Sclerotium rolfii* (Harvey *et al.*, 2002). A dose de 0,35 $\mu$ L/L foi responsável por 45% de inibição sobre o crescimento de *R. solani* e suficiente para inibir completamente *Pythium ultimum* (Charron & Sams, 1999), enquanto que 0,5 $\mu$ L/L foi a DE<sub>50</sub> estimada para *Penicillium* spp. e *A. flavus* (Nielsen & Rios, 2000). No presente trabalho, obtiveram-se valores de DE<sub>50</sub> entre 1,7 e 2,2 $\mu$ L/L para *Fol* fumigado por um período de 48 horas (considerando os isolados, selvagem e mutante, juntos). Estes valores poderiam ter sido mais baixos, se o fungo tivesse sido exposto continuamente ao ITCA, como foi realizado nos trabalhos de Charron & Sams (1999) e Nielsen & Rios (2000). Foi demonstrado que a exposição ininterrupta de *F. oxysporum* a 0,9 $\mu$ L/L retardou o crescimento do fungo, mas não o suficiente para reduzir 50% do crescimento fúngico (Smolinska *et al.*, 2003).

A resposta de maior interesse, quando se avalia o efeito de um composto fungicida *in vitro*, é a inibição completa do crescimento fúngico. No bioensaio de crescimento micelial, foi observado que a fumigação por 48 horas com 4,0 $\mu$ L/L de ITCA causou a mortalidade de *Fol*. Por outro lado, foram necessários 6,0 $\mu$ L/L para inibir *S. rolfii*, após fumigação por 42 horas (Harvey *et al.*, 2002). Outros autores conseguiram obter doses mais baixas, no entanto, os vapores do produto ficaram em

contato contínuo com os fungos durante todo experimento. Foi relatada a completa inibição de *F. oxysporum* após fumigação por 24 horas com a dose de 20µL/L (Furuya *et al.*, 2002). Similarmente, Isshiki *et al.* (1992) estimaram a inibição completa de três espécies de *Fusarium* com doses variando de 16,2 a 34,4µL/L. Para o composto isotiocianato de 2-feniletila, a dose inibitória variou entre 9,4 e 83,9µL/L para as diversas espécies de *Fusarium* avaliadas (Smith *et al.*, 2004).

Neste trabalho, assim como foi relatado por Smolinska *et al.* (2003), não se verificou efeito de ITCA na redução da formação de conídios. Como os sítios de ação do produto são as membranas plasmáticas e mitocondriais, as células que se mantiveram viáveis após fumigação puderam se desenvolver normalmente, formando micélio com capacidade de produção de conídios semelhante ao observado na testemunha.

A germinação de conídios foi sensivelmente afetada pelo ITCA nas diferentes doses testadas. Estimou-se DE<sub>50</sub> variando entre 1,08 e 1,31µL/L, sendo que a fumigação por 48 horas com 2,0µL/L causou a mortalidade dos conídios. Estudos anteriores mostraram que, a dose de 0,9µL/L proporcionou a completa inibição de conídios de *F. oxysporum* para a maioria dos isotiocianatos testados (Smolinska *et al.*, 2003). Entretanto, doses superiores às observadas no presente trabalho foram relatadas como sendo letais aos conídios de *P. expansum*, *A. flavus* e *Botrytis cinerea* (Delaquis & Sholberg, 1997).

Quanto à germinação de clamidósporos, foram verificados os maiores valores de DE<sub>50</sub> dentre todos os bioensaios propostos. O efeito do tempo de exposição também foi mais pronunciado, visto que a fumigação por 24 horas com a dose de 8,0µL/L não foi letal aos clamidósporos de *Fol*. Este comportamento está de acordo com o mecanismo de ação proposto para o ITCA. Outras estruturas de resistência já foram avaliadas por outros autores que verificaram a necessidade de maiores doses para aumentar a eficiência do controle (Harvey *et al.*, 2002; Yulianti *et al.*, 2006) devido à maior proteção conferida a essas estruturas pela parede celular. Foi relatada a mortalidade de clamidósporos de *F. oxysporum* expostos a doses de 0,9µL/L durante cinco dias, período no qual foi realizada a contagem de colônias formadas (Smolinska *et al.*, 2003). Acredita-se que estes resultados representem a inibição da germinação de clamidósporos por meio da ação fungistática do produto. No presente trabalho, após a fumigação, os clamidósporos foram incubados por sete dias na ausência de ITCA e,

neste período de tempo, observou-se que estas estruturas recuperaram a habilidade de se desenvolver, formando colônias.

Como verificado nos bioensaios *in vitro*, a mortalidade de *Fol* por meio da fumigação com ITCA é determinada pelo equilíbrio entre doses e tempo de exposição, o que se justifica com base nos mecanismos de ação do produto. Portanto, antes de se estudar o controle do fungo no solo, torna-se necessário definir doses e tempos de exposição preliminares para trabalhos subseqüentes. A partir do modelo de regressão estimado, foi possível definir, como parâmetros, a fumigação com 125µL/L de ITCA durante um período superior a 5,4 dias, visando à erradicação de *Fol*. Os vapores do produto foram letais aos clamidósporos fumigados em solo por períodos superiores a 5,4 dias. Efeito fungistático foi descartado, uma vez que a incubação, após a fumigação, durou 10 dias. Estudos anteriores mostraram que a fumigação por 7 dias com 150µL/L de ITCA, foi letal para escleródios de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*, enquanto que a fumigação por 4 dias não foi suficiente para causar a mortalidade de todos os escleródios avaliados (Schurt, 2006). Para controlar *Meloidogyne exigua* foi necessária a fumigação do solo com 80µL/L durante 5 dias (Aguiar, 2008). A fumigação de pães de centeio durante 7 dias, com a dose de 135µL/L, causou a mortalidade de 5 espécies de fungos degradadores desse alimento (Suhr & Nielsen, 2003).

A quantidade de ITCA necessária para inibir o desenvolvimento de *Fol in vitro* foi, consideravelmente, diferente da quantidade determinada para inibição no solo. O mesmo comportamento já foi demonstrado em vários outros trabalhos (Harvey *et al.*, 2002; Dhingra *et al.*, 2004; Larkin & Griffin, 2007). No entanto, os estudos *in vitro* permitem compreender como um microrganismo específico reage em resposta à ação de um produto fungicida. Nestes testes, procuram-se eliminar outros fatores que possam interferir no desempenho do fungicida, isolando apenas o efeito do produto sobre o microrganismo. Por este motivo, pequenas doses do composto fungicida são capazes de inibir o fungo, o que não se verifica quando este é misturado ao solo. A partir dos bioensaios *in vitro* foi possível identificar aspectos fundamentais da relação ITCA x *Fol*, como por exemplo, o efeito do tempo de exposição na eficiência de ação do produto e, que os clamidósporos são as estruturas mais resistentes ao efeito fungicida do ITCA. Foi por meio dessas observações que se propôs determinar, no solo, uma dose e um tempo de exposição ideais para o controle de clamidósporos do fungo.

Para avaliar o efeito de ITCA, em diferentes doses, em casa de vegetação, visando ao uso desse produto como fumigante de amplo espectro, utilizou-se o período de fumigação de sete dias, visto que Schurt (2006) e Aguiar (2008) demonstraram que este tempo foi mais eficaz no controle dos patógenos estudados. Inicialmente, observou-se que a fumigação do solo com 100 e 150 $\mu$ L/L, pelo período de 7 dias, foi eficiente na redução do inóculo de *Fol* no solo. A quantidade de inóculo no solo, após a fumigação, foi quase indetectável nessas doses. O inóculo inicial, que era de 4000  $\pm$ 250 clamidósporos/g de solo, declinou para cerca de 100 em solos fumigados com 150 $\mu$ L/L, o que representa 97,5% de redução da densidade de propágulos, após 45 dias de cultivo. Este nível de redução não foi atingido, em condições de campo, por meio da quimigação com furfural (454 kg/ha) + ITCA (152 kg/ha), em que a eficiência de controle não ultrapassou 17% em relação à testemunha, 3 semanas depois do plantio. Entretanto, houve redução de 41% quando foi utilizado o metam-sodium (isotiocianato de metila, 478 kg/ha) (Gerik, 2005). Em outro estudo, a utilização de metam-sodium (360 kg/ha) reduziu, em média, 84% do número de propágulos de *Fusarium* spp. em solos infestados com cerca de 3600 UFC/g (Collins *et al.*, 2006). A fumigação com este mesmo produto (640 kg/ha) diminuiu, em média, 50% da população de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, (Triky-Dotan *et al.*, 2007).

Quando se acompanhou a dinâmica populacional do fungo no solo, verificou-se um aumento do nível de inóculo, ao longo do tempo, após fumigação com 100 e 150 $\mu$ L/L, muito embora esses níveis ainda continuassem baixos (100 a 500 UFC/g). De acordo com Marois & Mitchell (1981), 1000 a 4000 clamidósporos/g de solo são necessários para o estabelecimento da doença com elevada severidade. A população de *Fol* restante no solo fumigado com ITCA, após 45 dias de cultivo (100 a 500 UFC/g), causou uma severidade de 15 a 35% em tomateiro. Já foram relatadas severidades de 24 e 67% para solos onde restaram, respectivamente, 100 e 500 clamidósporos/g de solo, decorrida a fumigação com brometo de metila (Marois & Mitchell, 1979). Em solos não fumigados, com as respectivas densidades de inóculo, estes autores observaram 10 e 29% de severidade da doença. Estes últimos valores estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Já é conhecido que a fumigação com brometo induz a formação de um vácuo biológico no solo. Desta forma, a população restante do patógeno, após a fumigação, recoloniza o solo muito rapidamente, já que não encontra uma microbiota diversificada

para competir. Acrescenta-se a esta situação, a presença do hospedeiro neste sistema, favorecendo ainda mais o patógeno diante dos demais microrganismos, o que resulta na maior severidade da doença em solo fumigado, mesmo com baixas populações do patógeno. Solos fumigados com ITCA não induzem ao vácuo biológico, sendo observada uma diversidade de espécies de fungos, bactérias e actinomicetos depois da fumigação (Schurt, 2006; Lima, 2006). Várias espécies de *Trichoderma* apresentaram tolerância em solos biofumigados com mostarda etíope (*B. carinata*) (Galletti *et al.*, 2008). Em solos com 100 e 500 clamidósporos/g restantes, após fumigação com brometo e recolonização com organismos de controle biológico, foram verificadas severidades inferiores a 5% (Marois & Mitchell, 1981). Portanto, isto explica a diferença constatada entre a severidade verificada em solo fumigado com ITCA, em comparação com os resultados obtidos com brometo de metila (Marois & Mitchell, 1979).

A análise do conteúdo de clorofila permitiu acompanhar o estabelecimento da doença antes que os sintomas fossem visíveis. Foi possível verificar que, com 22 dias do transplântio, a doença começou a reduzir o conteúdo de clorofila no controle positivo e aos 26 dias, nos solos fumigados com 50µL/L. Pôde-se verificar que a quantidade de clorofila não variou entre o tratamento com 150µL/L e o controle negativo. Esta técnica mostrou-se útil no acompanhamento dos sintomas iniciais da doença. No entanto, sua utilização é limitada, após aparecimento de sintomas visíveis, pela queda de folhas baixas nos estágios mais avançados de severidade.

A eficiência do ITCA, em condições de casa de vegetação, serve de base para estudos posteriores do seu comportamento no controle de *Fol*, em campo. A aplicação do produto concentrado, seja na forma líquida ou sólida, se mostra mais viável do que a biofumigação proposta por outros pesquisadores. A aplicação de metam-sodium mostrou-se significativa na redução de inóculo de *F. oxysporum* no solo, enquanto que a incorporação de mostarda branca (*Brassica hirta*) não foi capaz de reduzir o inóculo do fungo, não diferindo da testemunha (Collins *et al.*, 2006). Similarmente, a redução da população de *F. oxysporum* por meio da biofumigação com canola (*B. napus*) ou com mostarda indiana (*B. juncea*) não foi significativa (Njoroge *et al.*, 2008), assim como a de *Phytophthora cactorum* e *Cylindrocladium destructans* a partir da incorporação de nabo (*B. rapa*) ou de canola no solo (Mattner *et al.*, 2008). A incorporação de mostarda indiana no solo reduziu em apenas 40% a quantidade inicial de inóculo de *R. solani* (Larkin & Griffin, 2007).

Atualmente, tem-se trabalhado muito com o metam-sodium e os resultados tem sido promissores. Contudo, este produto nem sempre tem alcançado a eficiência desejada no campo. Sarwar *et al.* (1998) relataram que o ITCA foi mais eficiente na supressão *in vitro* dos diversos patógenos avaliados do que o isotiocianato de metila (metam-sodium). Novos estudos devem verificar se o ITCA continuará eficiente no controle de *Fol* e de outros patógenos de solo, quando aplicado no campo e em ambiente protegido.

## 5. CONCLUSÕES

A fumigação do solo por 7 dias, com 150 $\mu$ L/L de ITCA, proporciona mais de 95% de eficiência na redução de inóculo de *Fol*, em condições de casa de vegetação.

É possível controlar ou retardar a epidemia da murcha de Fusário em tomateiro a partir da fumigação do solo com ITCA.

Os clamidósporos de *Fol* são menos sensíveis aos vapores de ITCA em relação aos conídios e ao micélio.

O maior período de exposição de propágulos de *Fol* ao ITCA aumenta a eficiência de controle.

As doses determinadas para mortalidade de *Fol in vitro* são, consideravelmente, menores do que aquelas determinadas em estudos do fungo no solo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology (5). London: Elsevier Academic Press. 922p. 2004.
- AGROFIT - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plataforma de pesquisa de agrotóxicos registrados no Brasil. 2008. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 27 de março de 2008.
- AGUIAR, N.D.C. Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda para o controle de *Meloidogyne exigua*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2008.
- ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P. & STEINBERG, C. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. Pesticide Science 37:365-373. 1993.
- ALEXANDER, L.J. & TUCKER, C.M. Physiological specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Agricultural Research 70:303-313. 1945.
- ARRUDA, S.C. Murcha de *Fusarium* do tomateiro. Biológico 7:199-200. 1941.
- BESRI, M. Study of mechanism of seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Verticillium dahliae*. Journal of Phytopathology 93:148-163. 1978.
- BHATTI, M.A. & KRAFT, J.M. Effects of inoculum density and temperature on root-rot and wilt of chickpea. Plant Disease 76:50-54. 1992.
- BLETOS, F.A. Use of grafting and calcium cyanamide as alternatives to methyl bromide soil fumigation and their effects on growth, yield, quality and *Fusarium* wilt control in melon. J. Phytopathology 153:155-161. 2005.
- BOHN, G.W. & TUCKER, C.M. Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. Science 89:603-604. 1939.
- BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. 237p. 1971.
- BOOTH, C. *Fusarium* - Laboratory guide to the identification of the major species. Key: Commonwealth Mycological Institute. 58p. 1977.
- CAI, G., GALE, L.R., SCHNEIDER, R.W., KISTLER, H.C., DAVIS, R.M., ELIAS, K.S. & MIYAO, E.M. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93:1014-1022. 2003.
- CHARRON, C.S. & SAMS, C.E. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. Journal of the American Society for Horticultural Science 124:462-467. 1999.

- CIRULLI, M. & ALEXANDER, L.J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. *Phytopathology* 56:1301-&. 1966.
- COELHO NETTO, R.A. Hospedeiros alternativos e potencial de isolados não-patogênicos de *Fusarium oxysporum* na supressão da murcha-de-*Fusarium* do feijoeiro. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1997.
- COLLINS, H.P., ALVA, A., BOYDSTON, R.A., COCHRAN, R.L., HAMM, P.B., MCGUIRE, A. & RIGA, E. Soil microbial, fungal, and nematode responses to soil fumigation and cover crops under potato production. *Biology and Fertility of Soils* 42:247-257. 2006.
- CONWAY, W.S. & MACHARDY, W.E. Distribution and growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race-1 or race-2 within tomato plants resistant or susceptible to wilt. *Phytopathology* 68:938-942. 1978.
- COUPEAUDIER, Y. & ALABOUVETTE, C. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 36:551-556. 1990.
- DE CAL, A., GARCIA-LEPE, R. & MELGAREJO, P. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology* 90:260-268. 2000.
- DE CAL, A., PASCUAL, S., LARENA, I. & MELGAREJO, P. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathology* 44:909-917. 1995.
- DE CAL, A., PASCUAL, S. & MELGAREJO, P. Infectivity of chlamydospores vs microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. *Journal of Phytopathology* 145:231-233. 1997.
- DELAQUIS, P.J. & MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanates and their role in food preservation. *Food Technology* 49:73-84. 1995.
- DELAQUIS, P.J. & SHOLBERG, P.L. Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. *Journal of Food Protection* 60:943-947. 1997.
- DHINGRA, O.D., COELHO-NETTO, R.A., RODRIGUES, F.A., SILVA, G.J. & MAIA, C.B. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress *Fusarium*-yellow of beans. *Biological Control* 39:75-86. 2006.
- DHINGRA, O.D., COSTA, M.L.N. & SILVA JR., G.J. Potencial of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. *J. Phytopathology* 152:352-357. 2004.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods (2). Lewis Publishers. 434p. 1995.

- ELIAS, K.S. & SCHNEIDER, R.W. Origin and relatedness of races within *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and nonpathogenic strains of *F. oxysporum*. *Phytopathology* 77:1710-1710. 1987.
- ELLENBY, C. Control of the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, by allyl isothiocyanate. *Nature* 155:544-544. 1945.
- FAO - FAO Statistics Division: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acessado em: 25 de março de 2008.
- FERRISS, R.S. Relationship of infection and damping-off of soybean to inoculum density of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 72:1397-1403. 1982.
- FIGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças (2). Viçosa, MG: UFV. 412p. 2003.
- FONTES, P.C.R. & SILVA, D.J.H. Cultura do Tomate. pp.457-475 In: FONTES, P.C.R. (Ed.) Olericultura: teoria e prática. Viçosa, MG: UFV. 2005.
- FOSTER, R.E. The 1st symptom of tomato *Fusarium* wilt: clearing of the ultimate veinlets in the leaf. *Phytopathology* 36:691-694. 1946.
- FOSTER, R.E. & WALKER, J.C. Predisposition of tomato to *Fusarium* wilt. *Journal of Agricultural Research* 74:165-185. 1947.
- FURUYA, K., MIYAO, S. & ISSHIKI, K. Inhibition of bean sprout pathogenic fungi growth using allyl isothiocyanate vapor. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 49:388-394. 2002.
- GALLETTI, S., SALA, E., LEONI, O., BURZI, P.L. & CERATO, C. *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. *Biological Control* 45:319-327. 2008.
- GERDEMANN, J.W. & FINLEY, A.M. The pathogenicity of races-1 and races-2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 41:238-244. 1951.
- GERIK, J.S. Evaluation of soil fumigants applied by drip irrigation for *Liatris* production. *Plant Disease* 89:883-887. 2005.
- GHINI, R. Alternativas para substituir o brometo de metila na agricultura. *Summa Phytopathologica* 27:162-163. 2001.
- GONZALEZ-TORRES, R., MELERO-VARA, J.M., GOMEZ-VAZQUEZ, J. & DIAZ, R.M.J. The Effects of soil solarization and soil fumigation on *Fusarium* wilt of watermelon grown in plastic houses in South-Eastern Spain. *Plant Pathology* 42:858-864. 1993.

- GORDON, T.R. & MARTYN, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology 35:111-128. 1997.
- GOULART, R.R. Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2007.
- GRATTIDGE, R. & OBRIEN, R.G. Occurrence of a 3rd race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. Plant Disease 66:165-166. 1982.
- GULLINO, M.L., CAMPONOGARA, A., GASPARRINI, G., RIZZO, V., CLINI, C. & GARIBALDI, A. Replacing methyl bromide for soil disinfestation: the italian experience and implications for other countries. Plant Disease 87:1012-1021. 2003.
- HARVEY, S.G., HANNAHAN, H.N. & SAMS, C.E. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. Journal of the American Society for Horticultural Science 127:27-31. 2002.
- HOLGUIN-PENA, R.J. *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* race 3 in Baja California Sur, Mexico. Plant Disease 89:1360-1360. 2005.
- HUANG, C.C. & LINDHOUT, P. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* race 1 and race 2. Euphytica 93:145-153. 1997.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acessado em: 25 de março de 2008.
- ISSHIKI, K., TOKUOKA, K., MORI, R. & CHIBA, S. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56:1476-1477. 1992.
- JAKUBIKOVA, J., BAO, Y.P. & SEDLAK, J. Isothiocyanates induce cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial potential depolarization in HL-60 and multidrug-resistant cell lines. Anticancer Research 25:3375-3386. 2005.
- JONES, J.P. & OVERMAN, A.J. Evaluation of chemicals for control of *Verticillium* and *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease Reporter 62:451-455. 1978.
- JONES, J.P. & OVERMAN, A.J. Effect of solarization on *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology 77:1712-1713. 1987.
- JONES, J.P., OVERMAN, A.J. & GERALDSON, C.M. Effect of fumigants and plastic film on control of several soil-borne pathogens of tomato. Phytopathology 56:929-&. 1966.
- JONES, J.P. & WOLTZ, S.S. Effect of soil pH and micronutrient amendments on *Verticillium* and *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease Reporter 56:151-&. 1972.

- KATAN, J. Symptomless carriers of tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology* 61:1213-&. 1971.
- KATAN, J. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19:211-236. 1981.
- KATAN, J., GREENBERGER, A., ALON, H. & GRINSTEIN, A. Soil heating by polyethylene mulching for control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology* 66:683-688. 1976.
- KATAN, T., SHLEVIN, E. & KATAN, J. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology* 87:712-719. 1997.
- KEINATH, A.P. Relationships between inoculum density of *Rhizoctonia solani*, wirestem incidence and severity, and growth of cabbage. *Phytopathology* 85:1487-1492. 1995.
- KIRKEGAARD, J.A., WONG, P.T.W. & DESMARCHELIER, J.M. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathology* 45:593-603. 1996.
- KROON, B.A.M. & ELGERSMA, D.M. Induction of mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* with altered virulence. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97:409-416. 1991.
- KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). pp.607-626 In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: 2005.
- LARENA, I., SABUQUILLO, P., MELGAREJO, P. & DE CAL, A. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology* 151:507-512. 2003.
- LARKIN, R.P. & GRIFFIN, T.S. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. *Crop Protection* 26:1067-1077. 2007.
- LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. *The Fusarium Laboratory Manual* (1). Ames, USA: Blackwell Publishing. 387p. 2006.
- LIMA, A.O. Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para o controle de fitonematóides. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2006.
- LIN, C.M., KIM, J., DU, W.X. & WEI, C.I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection* 63:25-30. 2000a.
- LIN, C.M., PRESTON, J.F. & WEI, C.I. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *Journal of Food Protection* 63:727-734. 2000b.

- MARLATT, M.L., CORRELL, J.C., KAUFMANN, P. & COOPER, P.E. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease* 80:1336-1342. 1996.
- MAROIS, J.J. & MITCHELL, D.J. Relationship of density of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* to infection of tomato in fumigated and non-fumigated soils. *Phytopathology* 69:1037-1037. 1979.
- MAROIS, J.J. & MITCHELL, D.J. Effects of fumigation and fungal antagonists on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in *Fusarium* crown rot of tomato. *Phytopathology* 71:167-170. 1981.
- MATTNER, S.W., PORTER, I.J., GOUNDER, R.K., SHANKS, A.L., WREN, D.J. & ALLEN, D. Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. *Crop Protection* 27:1165-1173. 2008.
- MCNEW, G.L. The nature, origin and evolution of parasitism. pp.19-69 In: HORSFALL, J.G. & DIMOND, A.E. (Eds.) *Plant Pathology: an advanced treatise*. New York: Academic Press. 1960.
- MINUTO, A., GILARDI, G., POMÈ, A., GARIBALDI, A. & GULLINO, M.L. Chemical and physical alternatives to methyl bromide for soil disinfestation: results against soilborne diseases of protected vegetable crops. *Plant Pathology* 82:179-186. 2000.
- MINUTO, A., GULLINO, M.L., LAMBERTI, F., D'ADDABBO, T., TESCARI, E., AJWA, H. & GARIBALDI, A. Application of an emulsifiable mixture of 1,3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy. *Crop Protection* 25:1244-1252. 2006.
- MORRA, M.J. & KIRKEGAARD, J.A. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 34:1683-1690. 2002.
- MUNIZ, M.F.S. Influência da nutrição com cálcio sobre a severidade da antracnose e da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1990.
- NIELSEN, P.V. & RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 60:219-229. 2000.
- NJOROGE, S.M.C., RILEY, M.B. & KEINATH, A.P. Effect of incorporation of *Brassica* spp. residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping-off and *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Disease* 92:287-294. 2008.
- OGAWA, T., NAKATANI, A., MATSUZAKI, H., ISOBE, S. & ISSHIKI, K. Combined effects of hydrostatic pressure, temperature, and the addition of allyl

- isothiocyanate on inactivation of *Escherichia coli*. Journal of Food Protection 63:884-888. 2000.
- OLIVAIN, C., HUMBERT, C., NAHALKOVA, J., FATEHI, J., L'HARIDON, F. & ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. Applied and Environmental Microbiology 72:1523-1531. 2006.
- OLIVIER, C., VAUGHN, S.F., MIZUBUTI, E.S.G. & LORIA, R. Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. Journal of Chemical Ecology 25:2687-2701. 1999.
- PEREIRA, H.S. & MELLO, S.C. Aplicações de fertilizantes foliares na nutrição e na produção do pimentão e do tomateiro. Horticultura Brasileira 20:597-600. 2002.
- POSTMA, J. & LUTTIKHOLT, A.J.G. Benomyl resistant *Fusarium* isolates in ecological studies on the biological control of *Fusarium* wilt in carnation. Netherlands Journal of Plant Pathology 99:175-188. 1993.
- REIS, A., COSTA, H., BOITEUX, L.S. & LOPES, C.A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. Fitopatologia Brasileira 30:426-428. 2005.
- RISTAINO, J.B. & THOMAS, W. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps? Plant Disease 81:964-977. 1997.
- ROSA, E.A.S. & RODRIGUES, P.M.F. Towards a more sustainable agriculture system: The effect of glucosinolates on the control of soil-borne diseases. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74:667-674. 1999.
- ROUZAUD, G., YOUNG, S.A. & DUNCAN, A.J. Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 13:125-131. 2004.
- SARWAR, M., KIRKEGAARD, J.A., WONG, P.T.W. & DESMARCHELIER, J.M. Biofumigation potential of brassicas - III. *In vitro* toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. Plant and Soil 201:103-112. 1998.
- SCHURT, D.A. Potencial do isotiocianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2006.
- SCOTT, J.W. & JONES, J.P. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race-3. Euphytica 40:49-53. 1989.
- SELLAM, A., DONGO, A., GUILLEMETTE, T., HUDHOMME, P. & SIMONEAU, P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. Molecular Plant Pathology 8:195-208. 2007.

- SHANER, G. & FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056. 1977.
- SHISHIDO, M., MIWA, C., USAMI, T., AMEMIYA, Y. & JOHNSON, K.B. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. *Phytopathology* 95:1072-1080. 2005.
- SMITH, T.K., LUND, E.K., PARKER, M.L., CLARKE, R.G. & JOHNSON, I.T. Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. *Carcinogenesis* 25:1409-1415. 2004.
- SMOLINSKA, U., MORRA, M.J., KNUDSEN, G.R. & JAMES, R.L. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease* 87:407-412. 2003.
- SOUZA, N.L. Solarização do solo. *Summa Phytopathologica* 20:3-15. 1994.
- SUHR, K.I. & NIELSEN, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology* 94:665-674. 2003.
- TAMIETTI, G. & VALENTINO, D. Soil solarization as an ecological method for the control of *Fusarium* wilt of melon in Italy. *Crop Protection* 25:389-397. 2006.
- TANG, L. & ZHANG, Y.S. Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:1250-1259. 2005.
- TOUSSOUN, T.A. & NELSON, P.E. *Fusarium*: a pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen (2). The Pennsylvania State University Press. 43p. 1976.
- TRIKY-DOTAN, S., AUSTERWEIL, M. & STEINER, B. Generation and dissipation of methyl isothiocyanate in soils following metam sodium fumigation: impact on *Verticillium* control and potato yield. *Plant Disease* 91:497-503. 2007.
- UNEP - United Nations Environment Programme. The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. 2000. Disponível em: <<http://hq.unep.org/ozone/Montreal-Protocol/Montreal-Protocol2000.shtml>> Acesso em: 20 de março de 2008.
- VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L., PAUL, P.A. & COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. pp.699-756 In: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R. & COSTA, H. (Eds.) Controle de doenças de plantas hortaliças. Viçosa, MG: UFV. 2000.
- VIDA, J.B., OLIVEIRA, R.R., TESSMANN, D.J., VERZIGNASSI, J.R. & COSTA, H. A agricultura protegida: plasticultura - hortaliças - manejo de doenças. pp.225-240 In: AGUIAR, R.L., DAREZZO, R.J., ROZANE, D.E., AGUILERA, G.A.H. &

- SILVA, D.J.H. (Eds.) Cultivo em ambiente protegido: histórico, tecnologia e perspectivas. Viçosa, MG: UFV. 2004a.
- VIDA, J.B., ZAMBOLIM, L., TESSMANN, D.J., BRANDÃO FILHO, J.U.T., VERZIGNASSI, J.R. & CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira* 29:355-372. 2004b.
- WEISSINGER, W.R., MCWATTERS, K.H. & BEUCHAT, L.R. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection* 64:442-450. 2001.
- WELLMAN, F.L. Epinasty of tomato, one of the earliest symptoms of *Fusarium* wilt. *Phytopathology* 31:281-283. 1941.
- XU, C.J., YUAN, X.L., PAN, Z., SHEN, G.X., KIM, J.H., YU, S.W., KHOR, T.O., LI, W.G., MA, J.J. & KONG, A.N.T. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics* 5:1918-1926. 2006.
- YULIANTI, T., SIVASITHAMPARAM, K. & TURNER, D.W. Response of different forms of propagules of *Rhizoctonia solani* AG2-1 (ZG5) exposed to the volatiles produced in soil amended with green manures. *Annals of Applied Biology* 148:105-111. 2006.
- ZANADA, I.A. & FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Phytopathology* 93:747-750. 2003.
- ZHANG, Y.S., YAO, S. & LI, J. Vegetable-derived isothiocyanates: anti-proliferative activity and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 65:68-75. 2006.