

ANDRÉ OLIVEIRA LIMA

**BIOFUMIGAÇÃO DO SOLO COM *Brassica rapa* PARA O
CONTROLE DE FITONEMATÓIDES.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732b
2006

Lima, André Oliveira, 1981-
Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para o
controle de fitonematóides / André Oliveira Lima. –
Viçosa : UFV, 2006
x, 44f. : il. ; 29cm.

Orientador: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nematoda - Controle biológico. 2. Nematoda -
Efeito dos glucosinolatos. 3. Brassicaceae. 4. Microorga-
nismos do solo. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 632.6257

ANDRÉ OLIVEIRA LIMA

**BIOFUMIGAÇÃO DO SOLO COM *Brassica rapa* PARA O
CONTROLE DE FITONEMATÓIDES.**

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

APROVADA: 23 de março de 2006.

Prof. Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)

Prof. Gulab Jham
(Conselheiro)

Prof. José Rogério de Oliveira

Prof. Silamar Ferraz

Prof^a Rosângela D’Arc de Lima Oliveira
(Orientadora)

Aos meus pais Humberto Pampolha
Lima e Maria Paula Oliveira Lima.
Aos meus irmãos Hugo e Paola.
À minha noiva Juliana.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela orientação.

Aos professores Onkar D. Dhingra, Gulab Jham, Silamar Ferraz e José Rogério de Oliveira, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Aos amigos Daniel Schurt e Dagoberto Saunders, pelo apoio dado neste trabalho.

Aos colegas de turma Cristiano, Davi, Henrique, Cristiane, Cristiana, Vivian e Magnólia.

Aos colegas da Nematologia Roseli, Rodrigo, Naylor, Débora e Elói.

Aos colegas da Química Eduardo e Carol.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRÉ OLIVEIRA LIMA, filho de Humberto Pampolha Lima e Maria Paula Oliveira Lima, nasceu em 04 de setembro de 1981, em Belém, Pará.

Em novembro de 2003, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém, Pará.

Em março de 2004, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na área de Nematologia, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO	Vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
CAPÍTULO 1: MOSTARDA COMO BIOFUMIGANTES DE SOLO NO CONTROLE DE ITONEMATÓIDES.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Ensaio 01: Efeito de diferentes concentrações de folha desidratada, farinha de sementes e farinha de sementes desengordurada de mostarda na biofumigação de solos infestados com <i>Meloidogyne incognita</i>	13
Ensaio 02: Efeito dos compostos voláteis liberados no solo durante o processo de biofumigação com <i>B. rapa</i> sobre a eclosão de <i>Meloidogyne incognita</i>	13
Ensaio 03: Efeito da mostarda na mortalidade de juvenis de diferentes espécies de nematóides.....	14
RESULTADOS.....	15
Ensaio 01.....	15
Ensaio 02.....	20
Ensaio 03.....	21
DISCUSSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DA MOSTARDA NAS POPULAÇÕES MICROBIANAS DO SOLO E QUANTIFICAÇÃO DO ITCA.....	30

INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Ensaio 01: Efeito da biofumigação com mostarda nas populações microbianas do solo.....	32
Ensaio 02: Quantificação de ITCA produzido durante o processo de biofumigação com mostarda.....	33
RESULTADOS.....	34
Ensaio 01.....	34
Ensaio 02.....	36
DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

LIMA, André Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para o controle de fitonematóides. Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Co-orientadores: Onkar Dev Dhingra e Gulab Jham.

Os nematóides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, constituem o grupo de fitonematóides com maior importância econômica na agricultura, causando a formação de galhas em raízes hospedeiras. Os prejuízos são maiores quando a infecção ocorre ainda na fase de mudas. A família Brassicaceae tem representantes como a mostarda (*Brassica rapa*), que produzem glucosinolatos, que ao sofrerem hidrólise enzimática vão gerar produtos tóxicos como os isotiocianatos. Acredita-se que sua incorporação permitirá o controle de fitonematóides presentes em substratos para viveiros e em pequenas áreas destinadas ao cultivo de olerícolas. Assim, esta pode ser uma alternativa viável ao uso de fumigantes sintéticos, como o brometo de metila, prejudiciais ao meio ambiente. Para avaliar o potencial biofumigante da mostarda no manejo de fitonematóides, folha desidratada, farinha de sementes e farinha de sementes desengordurada foram estudados para determinar a melhor dose destes produtos a ser incorporada ao solo visando o controle de *Meloidogyne incognita*. Conhecidas as doses, estas foram utilizadas para avaliar o efeito “*in vitro*” sobre a mortalidade de *Heterodera glycines*, *M. javanica*, *M. exigua*, *M. mayaguensis* e *M. incognita*. A ação biofumigante da mostarda foi avaliada sobre populações microbianas do solo, assim como a quantificação de isotiocianato de alila liberado no solo durante o processo de biofumigação. Folha, farinha de sementes e farinha de sementes desengordurada foram eficientes no controle de *M. incognita*, sendo que a

farinha de sementes desengordurada foi a que apresentou melhores resultados. Foi possível comprovar que o efeito nematicida da mostarda se deve aos seus subprodutos voláteis, e foi verificada a sua eficiência em causar a morte dos juvenis de todas as espécies de nematóides testadas. A folha de mostarda ao ser incorporada ao solo aumentou o número de ufc's de bactérias e actinomicetos. A farinha de sementes desengordurada apresentou as maiores quantidades de isotiocianato de alila liberadas durante a fumigação. Conclui-se que o uso da mostarda como biofumigante de solo é uma alternativa para o controle de fitonematóides e apresenta potencial para a substituição do brometo de metila no tratamento de solo e substratos.

ABSTRACT

LIMA, André Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2006.

Soil biofumigation with *Brassica rapa* to control plant nematodes.

Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Committee members: Onkar Dev Dhingra e Gulab Jham.

The root knot nematodes, belonging to the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887, are economically most important group of plant nematodes in the agriculture, producing knobs or galls on the roots of host plants. The losses are greater when infection occurs at the seedling stage. In the botanical family there are species like that of wild mustard (*Brassica rapa*), that contain glucosinolates, which after enzymatic hydrolyses can generate toxic volatile compounds such as isothiocyanates. It is believed that the incorporation of mustard tissues controls plant nematodes present in the planting substrates used in nursery and seedling production and in the small areas destined for vegetable crops. Thus this can be a viable alternative to the synthetic soil fumigants such as methyl bromide that are harmful to the environment. To evaluate the biofumigant potential of mustard in the management of plant nematodes, dried leaves, seed meal and defatted seed meal were studied to find the efficient tissue and the dose to be incorporated to the substrate to control *Meloidogyne incognita*. After determining the ideal tissue and the dose they were also used to study the *in vitro* effect on the mortality of *Heterodera glycines*, *M. javanica*, *M. exigua*, *M. mayaguensis* and *M. incognita*. The biofumigant effect was evaluated on the general microbial population of soil. The amount of allyl isothiocyanate liberated in the soil was also determined. The leaves, seed meal and defatted seed meal efficiently controlled *M. incognita*, but the defatted seed meal proved to be most efficient. The nematocidal effect of mustered was attributed to the volatile

compounds. The defatted seed meal efficient in causing the mortality of juveniles of all the nematode species tested. The dehydrated mustard leaves when incorporated into the soil increased the population of bacteria and actinomycetes. The maximum of allyl isothiocyanate was liberated by the defatted seed meal during the biofumigation process. It was concluded that the use of mustard as biofumigant is a viable alternative to control plant nematodes and has the potential to substitute the methyl bromide for seedling substrates treatment.

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides formadores de galhas radiculares, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, constituem o grupo de fitonematóides com maior importância econômica na agricultura, devido sua ampla distribuição geográfica e extensa gama de hospedeiros entre as plantas cultivadas e daninhas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Estes nematóides são mais freqüentemente encontrados em regiões de climas quentes e invernos curtos, onde várias gerações do nematóide ocorrem durante o ano, causando a formação de galhas em raízes hospedeiras (Hussey, 1985). Estas deformações radiculares diminuem a absorção de água e nutrientes, o que conseqüentemente reduz a produtividade das culturas e o seu valor de mercado. As perdas podem ser maiores ainda ou mesmo chegar a destruição da cultura, quando plantas são infectadas nas fases iniciais de desenvolvimento (Agrios, 1988; Mai, 1985).

Estes fitoparasitas são encontrados atacando uma grande variedade de hortaliças nas áreas destinadas a olericultura. Devido aos danos causados, principalmente por *Meloidogyne incognita*, o cultivo de culturas importantes, como a do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*. L), se torna prejudicado e algumas vezes impossibilitado (Mai, 1985). Sasser (1979) estimou que 23% das perdas ocorridas em culturas olerícolas são causados pelo ataque de nematóides. O mesmo autor, em 1989, publicou os resultados de um levantamento mundial acerca das perdas provocadas pelos nematóides nas diferentes culturas e mostrou que este grupo de patógenos era responsável por 20,6% das perdas na cultura do tomate. Em pepino, o ataque de *M. incognita* reduziu em mais de 50% a produção de frutos (Huang & Viana, 1980; citados por Lima et al., 1995). O controle

nestas áreas é difícil, visto que a maioria das hortaliças é suscetível a este patógeno, o que dificulta a aplicação da rotação de culturas como prática de manejo.

As medidas de manejo mais eficientes são aquelas que visam prevenir a introdução do patógeno em lavouras sadias. Para isto é importante que sejam produzidas mudas isentas de fitonematóides, e o tratamento do substrato é sem dúvida a melhor opção para garantir a sanidade do material de plantio, evitando assim a disseminação do patógeno e que as mudas já venham do viveiro infectadas por nematóides, o que ocasiona prejuízos maiores à produtividade das mesmas. Para se ter uma idéia, em 1977 foram destruídas 3.321.952 mudas de cafeeiro infestadas por *M. incognita* no estado de São Paulo (Gonçalves et al. 1978, citado por Campos et al., 1985), e em Maringá (PR) foram destruídas 5.400.000 mudas (Jaehn et al., 1977).

O uso de nematicidas é uma das mais importantes medidas adotadas no manejo de fitonematóides, visando principalmente ao controle de populações presentes no solo antes do plantio (Johnson, 1985). A produção de várias culturas vegetais depende do uso do brometo de metila como fumigante de solo para controlar uma vasta gama de fungos, nematóides, insetos e ervas daninhas (Anonymous, 1992). No entanto, a sua utilização como fumigante será limitada, de acordo com o Protocolo de Montreal assinado por 128 países, devido a sua alta toxicidade, redução da biodiversidade do solo, contaminação e principalmente a sua capacidade de destruir a camada de ozônio (López-Pérez et al., 2003).

As restrições quanto ao uso desse biocida fizeram com que aumentasse o interesse no desenvolvimento de estratégias alternativas, com baixo impacto ecológico, para o controle de nematóides. Esse passo é fundamental para proporcionar aos produtores uma alternativa viável a ser usada no manejo de áreas de plantio de hortaliças infestadas e para o tratamento de substratos utilizados em viveiros comerciais.

Um estudo mais aprofundado deve ser realizado na já conhecida atividade biocida de plantas da família Brassicaceae, as quais ao serem incorporadas ao solo liberam gases oriundos do processo de decomposição de seus tecidos (Rosa et. al.,1997). A utilização destes subprodutos voláteis

para o controle de pragas e doenças é uma prática já utilizada e conhecida como biofumigação (Bello 1998; Bello *et al.*, 1997 e 2001). A biofumigação também proporciona uma vantagem em relação ao uso de matéria orgânica sem efeito tóxico, visto que para a utilização de um biofumigante são necessárias quantidades menores de material a ser incorporado.

A comumente conhecida mostarda pode ser reconhecida em várias espécies do gênero *Brassica* como *B. rapa*, *B. nigra*, *B. juncea*, inclusive tem espécies no gênero *Sinapsi* (Fahey et al. 2001). As espécies de plantas pertencentes a esses gêneros são conhecidas por apresentarem uma alta taxa de cruzamento interespecífico, gerando uma grande quantidade de variedades e subespécies, que acabam sendo agrupadas e vulgarmente chamadas de mostarda. Ela é uma planta originária da Europa meridional e se encontra disseminada amplamente pelo mundo, em regiões de clima temperado e subtropical (Kissmann & Groth, 1999). Nos tecidos destas plantas são encontrados os glucosinolatos, que têm como função primária a defesa dos tecidos atacados por insetos e patógenos. Os glucosinolatos são um grupo de glucosídeos (β -D-tioglicosídeos) portadores de enxofre em suas cadeias (Zasada & Ferris, 2003). Durante a ação de defesa, os glucosinolatos, localizados no vacúolo das células (Poulton & Moller, 1993), entram em contato com a mirosinase (EC 3.2.3.1), também conhecida como tioglicosídeo glucohidrolase, a qual é armazenada separadamente na célula vegetal. Esta enzima catalisa a hidrólise dos glucosinolatos em glucose e um intermediário instável que sofre rearranjo não enzimático para formar sulfatos, isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas e enxofre elementar (Bones and Rossiter, 1996; Foo et al., 2000).

O efeito tóxico dos glucosinolatos está ligado aos seus produtos de degradação biologicamente ativa, principalmente aos isotiocianatos (ITCs) (Brown & Morra, 1997; Chew, 1988). Donkin et al. (1995) confirmaram que o efeito tóxico das plantas da família *Brassicaceae* é devido aos isotiocianatos em um teste de mortalidade com *Caenorhabditis elegans*. Eles observaram que o glucosinolato sinigrina, na ausência da enzima mirosinase, não mostrou toxicidade ao nematóide, em nenhuma concentração testada, enquanto que na presença da enzima, a sinigrina apresentou toxicidade com

0,5 g/L (DL₅₀). Já o isotiocianato de alila, que é um subproduto da interação sinigrina-mirosinase apresentou uma DL₅₀ de 0,04 g/L.

Zasada & Ferris (2003) estudaram o efeito de diferentes ITCs em *Tylenchulus semipenetrans* e *Meloidogyne javanica*, e concluíram que os ITCs oriundos de brássicas, isotiocianato de alila (2-propanil) e de benzila (2-feniletil), são os mais promissores no manejo de nematóides parasitas de plantas. Em 1949, Evenari (citado por Bialy, 1990) já sugeria que o isotiocianato de alila e seu precursor não volátil, a sinigrina (glucosinolato), eram alelopáticos.

Já foram identificados mais de 20 isotiocianatos diferentes, dentre outros aleloquímicos potenciais, oriundos de *Brassica napus*, *B. hirta*, *B. campestris*, *B. juncea*, *B. nigra* e outras. Cada espécie tem um perfil de glucosinolatos único, resultando correspondentemente em diferentes isotiocianatos (ITCs) (Brown et al., 1991; Brown & Morra, 1996; Spencer & Daxenbichler, 1980).

Contudo, há dificuldades em se interpretar o papel de ITCs nos efeitos supressivos de nematóides, obtidos em muitos estudos, porque nenhuma ou pouca informação é provida sobre o tipo ou concentração do glucosinolato precursor nos tecidos incorporados. E a supressão de pragas e doenças obtida nestes estudos sugere que podem ser esperadas melhorias na seleção de biofumigantes e mais informação sobre o destino e atividade dos compostos no solo. Este fato ressalta a importância em se determinar a quantidade e a eficiência de liberação dos ITCs no solo.

Tais achados possibilitam o estudo da incorporação de material verde de plantas da família *Brassicaceae*, ao solo, como compostos biocidas naturais e até mesmo de material seco contendo altos níveis do sistema glucosinolatos-mirosinase (Lazzeri et al. 2004). Outrossim, a incorporação de tecidos vegetal destas plantas traz outros benefícios como a melhoria na estrutura do solo e como fonte de nutrientes (N) (Akhtar, 2000).

É indiscutível o potencial de plantas da família *Brassicaceae* utilizadas como biofumigantes de solo no controle de microrganismos parasitas de plantas economicamente importantes. Neste estudo, dar-se-á atenção à espécie selvagem de mostarda, *Brassica rapa* (Lorenzi, 2000), amplamente disseminada no Brasil e considerada como infestante de áreas cultivadas,

pois apresenta grande produção de biomassa, ultrapassando 1,0 kg/ha/ano na produção de sementes e entre 530 a 1.260 kg/ha de matéria seca após 45 dias do plantio em locais com temperaturas mais baixas (Matai et al., 1973). Em estudos preliminares “*in vitro*” obtiveram-se resultados promissores no controle de *Meloidogyne* spp. Por ser a espécie em questão facilmente encontrada no Brasil e poder ser cultivada pelos próprios agricultores aumentam-se as chances de se implementar essa tecnologia no sistema produtivo brasileiro. Além disso, acredita-se que sua incorporação permitirá o controle de fitonematóides em substratos para viveiros, em áreas destinadas a horticultura e em cultivos protegidos, criando-se assim uma alternativa viável ao uso de fumigantes sintéticos prejudiciais ao meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biofumigante da mostarda (*Brassica rapa*), incorporada ao solo, no manejo de fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. 1988. Plant Pathology. 3 ed. Academic Press, Inc: San Diego. 803.

ANONYMOUS. 1992. United Nations Environment Programme. 1992. Montreal Protocol Assessment. Methyl Bromide: Its Atmospheric Science, Technology and Economics. Synthesis Report of the Methyl Bromide Interim Scientific Assessment and Methyl Bromide Interim Technology and Economic Assessment. 41.

AKHTAR, M. 2000. Effect of organic and urea amendments in soil on nematode communities and plant growth. *Soil Biology & Biochemistry* 32. 573-575.

BIALY, Z.; OLESZEK, W.; LEWIS, J.; FENWICK, G. R.; 1990. Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glycosides) and their degradation products against wheat. *Plant Soil*. 129: 277-281.

BELLO, A. 1998. Biofumigation and cropping techniques in vegetable crops. *In: Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries*. (Bello, A. González, J. A.; Arias, M.; Rodríguez-Kábana, R.). CSIC-DGXI, Valencia, Spain. 99-126.

BELLO, A.; LÓPEZ-PÉREZ, J. A.; DÍAZ-VIRULICHE, L.; TELLO, J. 2001. Alternatives to methyl bromide for soil fumigation in Spain. *In: Global Report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation* (Labrada, R.; Fornasari, L). FAO-UNEP, Roma, Paper 166:33-44.

BELLO, A.; PASTRANA, M. A.; GONZÁLEZ, J. A.; ESCUER, M.; ORTS, C. 1997. Control de nematodos sin bromuro de metilo y producción integrada en España. *In: Alternativas al Bromuro de Metilo en Agricultura* (Bello, A.; González, J. A.; Pérez Parra, J.; Tello, J.). Junta de Andalucía, Sevilla, España. 191-212

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant*. 97. 194-208.

- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6:553.
- BROWN, P. D.; MORRA, M. J. 1996. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. Plant Soil. 181. 307-316.
- BROWN, P. D.; MORRA, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. Adv. Agron. 61:167-231.
- BROWN, P. D., MORRA, M. J., MCCAFFREY, J. P.; WILLIAMS, L. III. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. J. Chem. Ecol. 17. 2021-2034.
- CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D; ALMEIDA, V. F. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. Inf. Agropecuário. 11 (126).
- CHEW, F. S. 1988. Biological effects of glucosinolates. in: Biologically active natural products: potential use in agriculture. (H. G. Cutler). American Chemical Society, Washington, DC. 155-181.
- DONKIN, S. G.; EITEMAN, M. A.; WILLIAMS, P. L. 1995. Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. Journal of Nematology. 27(3). 258-262.
- EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In *Manual of Agricultural Nematology* (Nickle, W. R., ed.). New York. Marcel Dekker. 191-274.
- FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry. 56. 5-51.
- FOO, H. L.; GRØNNING, L. M.; GOODENOUGH, L.; BONES, A. M.; DANIELSEN, B. E.; WHITING, D. A.; ROSSITER, J. T. 2000. Purification and characterization of epithiospecifier protein from *Brassica napus* enzymatic intermolecular sulfur addition with alkenyl thio-hydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. FEBS Lett. 468. 243-246.
- HUSSEY, R. S. 1985. Host parasite relationships and associated physiological changes. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne* (Sasser, J.N., Carter, C.C. (Eds.)), Vol. 1: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA. 143-153.
- JACOB, J. J.; BEZOOIJEN, J. V. 1977. A manual for practical work in nematology. Wageningen. 65.
- JAEHN, A.; REBEL, E. K.; MATIELLO, J. B. 1977. Estudo do efeito curativo de nematicidas em mudas de café infestado com *M. incognita*. In: Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras, 5. Guarapari. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA. 32-33.

- JOHNSON, G. W. 1985. Specific crop rotation effects combined with cultural practices and nematicides. in: An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. 283-301
- KISSMANN, K. G.; GROTH. D. 1999. Plantas infestantes e Nocivas – Tomo II. 2 ed. BASF. 521.
- LAZZERI, L.; LEONI, O.; MANICI, L. M. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products*. 20, 59-65.
- LIMA, R. D; DIAS, W. P. 1995. Doenças causadas por nematóides em cucurbitáceas. *Inf. Agropecuário*. 17. 57-59.
- LÓPEZ-PÉREZ, J. A.; ARIAS, M.; SANZ, R.; ESCUER, M. 2003. Alternatives to the methyl bromide to control *Meloidogyne incógnita* in cucumber crops. *Nematropica*. 33. 189-196.
- LORENZI, H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 309.
- MAI, W. F. 1985. Plant parasitic nematodes: their threat to agriculture. In: Sasser JN, Carter CC (eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. I: biology and control. North Carolina State University Graphics, Raleigh. 11-17.
- MATAI, S.; BAGCHI, D.K.; CHANDRA, S. 1973. Optimal seed rate and fertilizer dose for maximum yield of extracted protein from the leaves of mustard (*Brassica nigra* Koch) and turnip (*Brassica rapa* L.). *Indian J. Agr. Sci.* 43(2).165–169.
- POULTON, J. E.; MØLLER, B. L. 1993. Glucosinolates. *Methods Plant Biochem.* 9. 209-237.
- ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; FENWICH, G. R.; PORTAS, C. A. M. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Hort.* 19. 99-215.
- SASSER, J. N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: Lamberti, F. & Taylor, C.E. (Eds.) Root-knot nematodes (*MELOIDOGYNE* species) Systematics, biology and control. 359-374.
- SASSER, J. N. 1989. Plant parasitic nematodes: the farmers's hidden enemy. Raleigh. University Graphics. 115.
- SPENCER, G. F.; DAXENBICHLER, M. E. 1980. Gas chromatography-mass spectrometry of nitriles, isothiocyanates and oxazolidinethiones derived from cruciferous glucosinolates. *J. Sci. Food Agric.* 31. 359-367.
- ZASADA, I. A.; FERRIS, H. 2003 Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Phytopathology*. 93(6). 747-750.

CAPÍTULO 1

MOSTARDA COMO BIOFUMIGANTE DE SOLO NO CONTROLE DE FITONEMATÓIDES.

INTRODUÇÃO

Os fitonematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) quando encontrados em altas densidades populacionais, causam severos danos ao sistema radicular de plantas hospedeiras, inviabilizando algumas vezes o cultivo de culturas agrícolas em áreas infestadas.

O controle dos nematóides das galhas nestas áreas e em substratos de viveiros é altamente dependente da fumigação com produtos químicos. A disponibilidade destes nematicidas está sendo reduzida devido aos seus efeitos deletérios ao meio ambiente. Assim, a procura de medidas alternativas para controlar fitonematóides se tornou de fundamental importância (Lazzeri et. al., 2004).

O efeito de diferentes espécies vegetais incorporadas ao solo tem sido bastante estudado quanto ao seu efeito sobre populações de fitonematóides. Plantas da família Brassicaceae, tais como mostarda, canola, brócolis e outras produzem substâncias chamadas glucosinolatos, que por meio de ação enzimática transformam-se em isotiocianatos (ITC), nitrilas, isocianatos e enxofre elementar, substâncias muito eficientes como biocidas naturais. Pesquisadores de diferentes partes do mundo têm investigado, com sucesso, as propriedades biológicas do resíduo da extração do óleo das sementes e a utilização do material verde de brássicas, incorporando-os ao solo de cultivo de plantas atacadas por fitopatógenos (Brown & Morra, 1997; Borek et al, 1995). A degradação dos tecidos de brássica no solo libera estes compostos que podem reduzir a incidência de patógenos além de melhorar as condições físicas e químicas pela incorporação de matéria orgânica (Kirkegaard et al., 1998; Brown, et al., 1991).

O desenvolvimento de sistemas de produção, não dependentes do uso do brometo de metila ou outros químicos danosos ao meio ambiente e ao homem, se faz necessário principalmente num sistema de manejo integrado, combinando técnicas de práticas culturais e redução de risco (Kokalis-Burelle & Dickson, 2003). O uso da mostarda poderia se encaixar

neste sistema e ser utilizada via aplicação direta por pequenos produtores de hortaliças, para o tratamento de substratos de sementeiras e viveiros e até mesmo para o cultivo orgânico.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as melhores concentrações de mostarda (*Brassica rapa*) na biofumigação do solo visando ao controle de *M. incognita*; estudar o efeito dos produtos voláteis da mostarda sobre *M. incognita*; e estudar o efeito da biofumigação do solo com mostarda em diferentes espécies de fitonematóides.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e multiplicação do inóculo

Os ovos dos nematóides de *Meloidogyne* spp. foram extraídos segundo o método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981): raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), cultivados em casa de vegetação, foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar as partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaOCl 0,5% por 15 a 20 segundos. Os ovos foram recolhidos em peneira com abertura de 0,0254 mm (500 “mesh”), após a passagem da suspensão por uma peneira de 0,074 mm (200 “mesh”). A concentração de ovos foi determinada em câmara de contagem de Peters, e a suspensão calibrada para 1000 ovos/mL.

Plantas de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ com dois a três pares de folhas definitivas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade para dois litros, contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1 previamente tratada com brometo de metila. A inoculação foi feita uma semana após o transplante. Para tanto, 5 mL da suspensão de ovos (5.000 ovos) foram aplicados, com o auxílio de uma pipeta, em quatro orifícios de cerca de 5 cm de profundidade, feitos no substrato ao redor das plantas.

As plantas utilizadas para a multiplicação dos nematóides e realização dos ensaios, foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de

Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, com os tratos culturais necessários ao desenvolvimento das mesmas, de acordo com as recomendações técnicas para a cultura.

Para a obtenção de juvenis de segundo estágio (J2), os ovos de cada espécie foram depositados em funil de Baermann (Baermann, 1917, citado por Jacob & Bezooijen, 1977) modificado, utilizando-se uma tigela, ao invés de funil. Após doze horas descartaram-se os nematóides eclodidos, com a finalidade de se padronizar a idade dos J2. Após 24 horas do descarte inicial, recolheram-se os juvenis de segundo estágio (J2) eclodidos e ajustou-se a suspensão para 500 J2 por mL de água.

Solo utilizado nos ensaios.

Em todos os ensaios, foi utilizado solo com textura franco-argilo-arenosa (areia 64%; silte 7% e argila 29%) e com pH 6,06, previamente tratado com brometo de metila, na dose de 100 cc/m³ de solo.

Material vegetal utilizado nos experimentos

Os produtos de origem vegetal utilizados nos ensaios foram produzidos a partir plantas de mostarda (*Brassica rapa*) cultivadas em condições de campo no Departamento de Fitopatologia da UFV. Folhas maduras e frescas foram coletadas, secas em estufas e trituradas para compor o biofumigante de folha desidratada. A farinha de sementes foi preparada a partir de sementes moídas, e a farinha de sementes desengordurada foi obtida similarmente, exceto que as sementes passaram por um processo prévio de extração de seus compostos lipídicos com solvente.

Ensaio 01: Efeito das diferentes concentrações de folha desidratada, farinha de sementes e farinha de sementes desengordurada de mostarda na biofumigação de solos infestados com *Meloidogyne incognita*.

O ensaio foi montado em vasos de plástico de 2 litros de capacidade. O solo de cada vaso foi umidificado com água a 18% (v/v) ou 58,5% da capacidade de campo (501 kPa) e infestado com 5.000 ovos de *M. incognita*. A seguir, foi incorporado o material vegetal de *B. rapa* constituído de folhas desidratadas e moídas nas doses de 0%; 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,8% e 1,6% (p/v), farinha de sementes ou farinha de sementes desengordurada nas doses de 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% (p/v). A mistura resultante foi revolvida visando à homogeneização dos substratos. Estes foram colocados e vedados em sacos plásticos e permaneceram em câmara de crescimento a 26° C, por 7 dias. Em seguida, cada substrato foi envasado e, após quatro dias, recebeu uma muda de tomateiro por vaso, o qual foi mantido em casa de vegetação à temperatura média de 26 ± 5 °C.

A avaliação foi realizada aos 60 dias após o transplântio das mudas de tomateiro. Foram mensuradas as seguintes variáveis: número de galhas, número de massas de ovos e número de ovos por sistema radicular. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições e os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 0,1}$, exceto na variável massas de ovos. Os dados foram submetidos à análise de regressão não linear, realizada pelo programa SAS (Statistical Analysis System, 1995).

Ensaio 02: Efeito dos compostos voláteis liberados no solo durante o processo de biofumigação com *B. rapa* sobre a eclosão de *Meloidogyne incognita*.

O ensaio foi montado em potes de plástico de 500 mL de capacidade. O solo de cada pote foi umidificado com água a 18% (v/v) ou 58,5% da capacidade de campo (501 kPa) e ao qual foi incorporado o material vegetal de *B. rapa* constituído de folha desidratada nas doses de 0%; 0,1%; 0,2%;

0,4%; 0,8% e 1,6% (p/v), ou farinha de sementes nas doses de 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% (p/v). Após a adição de cada tratamento, revolveu-se o solo tratado visando à distribuição uniforme da mostarda. Uma cápsula, preparada com filtro milipore (0,45µm) contendo 1000 ovos de *M. incognita* em seu interior, foi depositada sobre a superfície de cada solo. Os potes foram vedados e permaneceram em câmara de crescimento a 26 °C, por 7 dias. Após o período de biofumigação, as cápsulas foram abertas e colocadas em funil de Baermann por 48 h. Os nematóides extraídos foram contados com o auxílio de microscópio ótico. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições e submetido à análise de regressão não linear, realizada pelo programa SAS (Statistical Analysis System, 1995).

Ensaio 03: Efeito da mostarda na mortalidade de juvenis de diferentes espécies de nematóides.

A partir das melhores doses obtidas no primeiro ensaio, outras espécies de fitonematóides da família Heteroderidae foram avaliadas quanto à biofumigação com mostarda: *Heterodera glycines*, *Meloidogyne javanica*, *M. exigua*, *M. mayaguensis* e *M. incognita*. Seguindo a metodologia de Zasada & Ferris (2004), alíquotas de 10 mL de solo incorporado com folha desidratada (1,6% p/v), farinha de sementes (0,2 % p/v) ou farinha de sementes desengordurada (0,1 p/v), foram depositados numa depressão no centro dos frascos de vidro 1 mL de suspensão contendo aproximadamente 500 nematóides de cada espécie. Água foi adicionada aos frascos para atingir uma umidade de solo de aproximadamente 60% da capacidade de campo e então estes foram vedados e incubados por 48 h a 25 °C. Após este período de incubação, o solo foi retirado do frasco e colocado em funil de Baermann por 48 h, quando os nematóides extraídos foram contados com auxílio de microscópio ótico. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada pelo programa SAEG (Sistema para análises Estatísticas e Genéticas) (Ribeiro Jr., 2001).

RESULTADOS

Ensaio 01: Efeito de diferentes concentrações de folha desidratada, farinha de sementes e farinha de sementes desengordurada de mostarda na biofumigação de solos infestados com *Meloidogyne incognita*.

Ao final do período de tratamento com *B. rapa*, os solos apresentaram uma estrutura visualmente mais agregada e com menor umidade quando comparados com a testemunha, principalmente os que receberam maior quantidade de material vegetal. Outra característica relevante notada nos solos tratados, especialmente naqueles com doses mais elevadas, foi a colonização pelo fungo *Trichoderma* sp.

As mudas de tomateiro apresentaram sintomas de fitotoxidez, como crescimento retardado, clorose nas folhas e algumas chegaram a morrer, quando cultivadas em vasos contendo os solos tratados com farinha de sementes na concentração de 0,8% e com farinha de sementes desengordurada à partir da concentração de 0,4%. No solo que recebeu a farinha de sementes foi possível observar o desenvolvimento de alguns embriões de *B. rapa*, mas o mesmo não foi observado quando se utilizou a farinha de sementes desengordurada.

A biofumigação com folhas desidratadas de mostarda suprimiu a população de *M. incognita* à medida que a quantidade incorporada ao solo aumentava. Estes resultados foram semelhantes para as três variáveis observadas: número de galhas (Fig. 01), massas de ovos (Fig. 02) e ovos (Fig. 03). Pode-se notar que o tratamento do solo com as duas menores doses (0,1% e 0,2%) resultou em um baixo controle de *M. incognita*, mas a partir de 0,4% o número de galhas, de massas de ovos e de ovos nas raízes começou a diminuir até que na dose de 1,6% as supressões foram de 92,7%; 97,7% e 94,2% em relação à testemunha para as três variáveis analisadas, respectivamente.

As curvas de regressão ajustadas apresentaram tendência exponencial e na concentração de 0,8% a taxa de supressão foi de 73% no

número de galhas, 86,6% no número de massas de ovos e 76% no número de ovos.

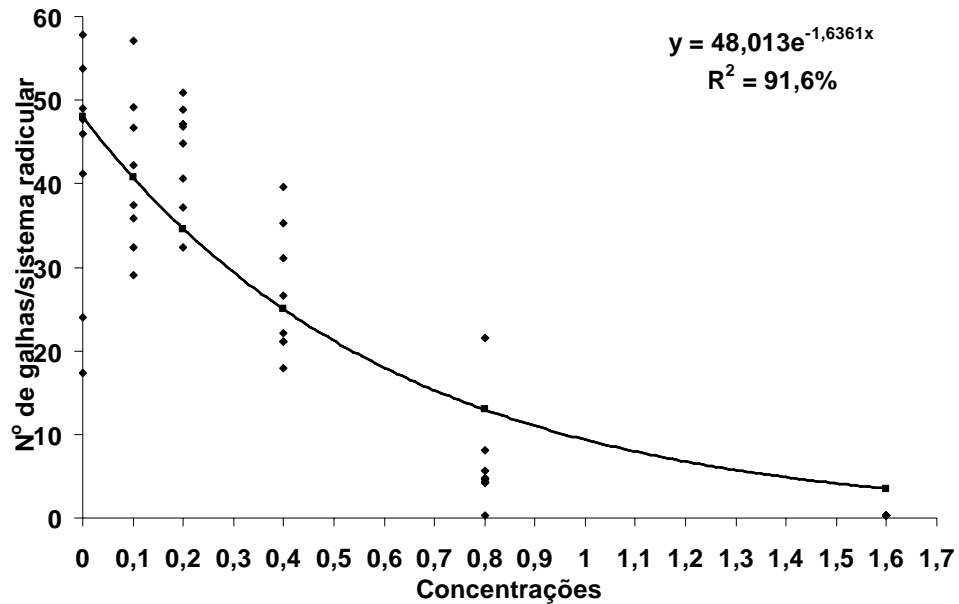


Figura 01 – Número de galhas por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de folha desidratada de mostarda. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,1}$.

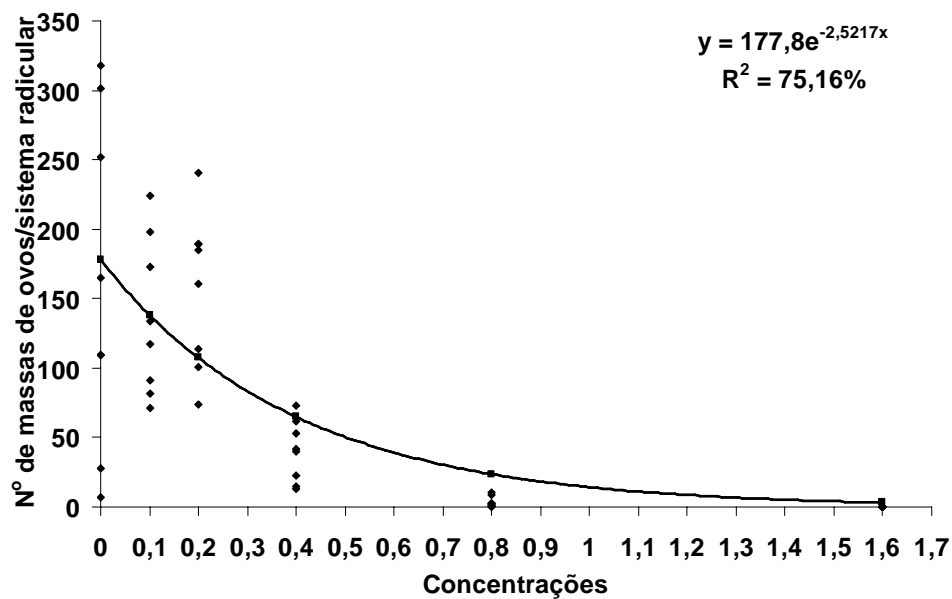


Figura 02 – Número de massas de ovos por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de folha desidratada de mostarda.

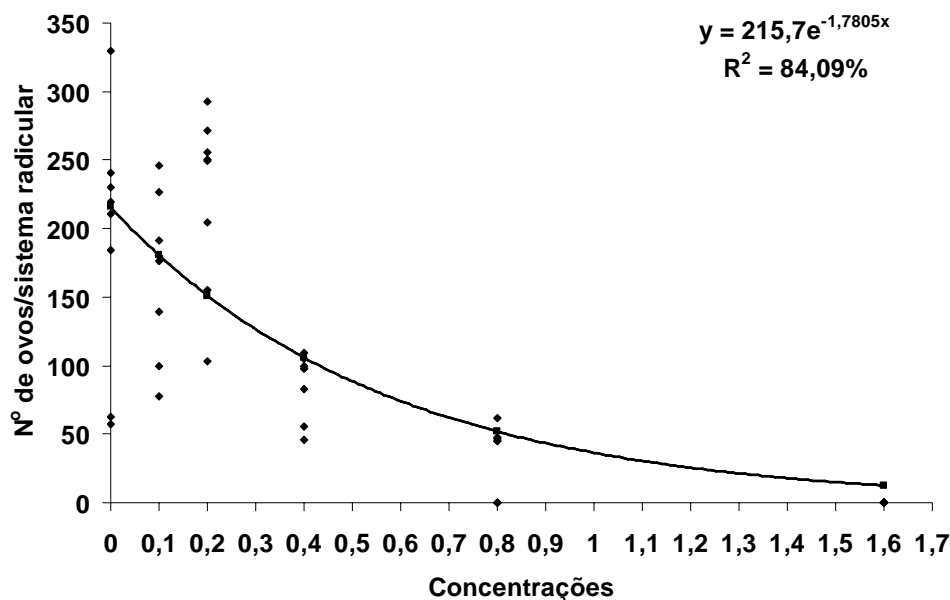


Figura 03 – Número de ovos por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de folha desidratada de mostarda. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,1}$.

A biofumigação com farinha de sementes apresentou efeito sobre a população de *Meloidogyne incognita* a partir de 0,1%. As curvas de regressão ajustadas para as três variáveis apresentaram uma redução bastante acentuada até a dose de 0,2% na qual a supressão foi de 94,1% para o número de galhas (Fig. 4), 96% para massas de ovos (Fig. 5) e 92,6% para ovos (Fig. 6). Nas doses de 0,4% e 0,8% as reduções foram de 99,5% e 99,9% respectivamente para todas as variáveis observadas.

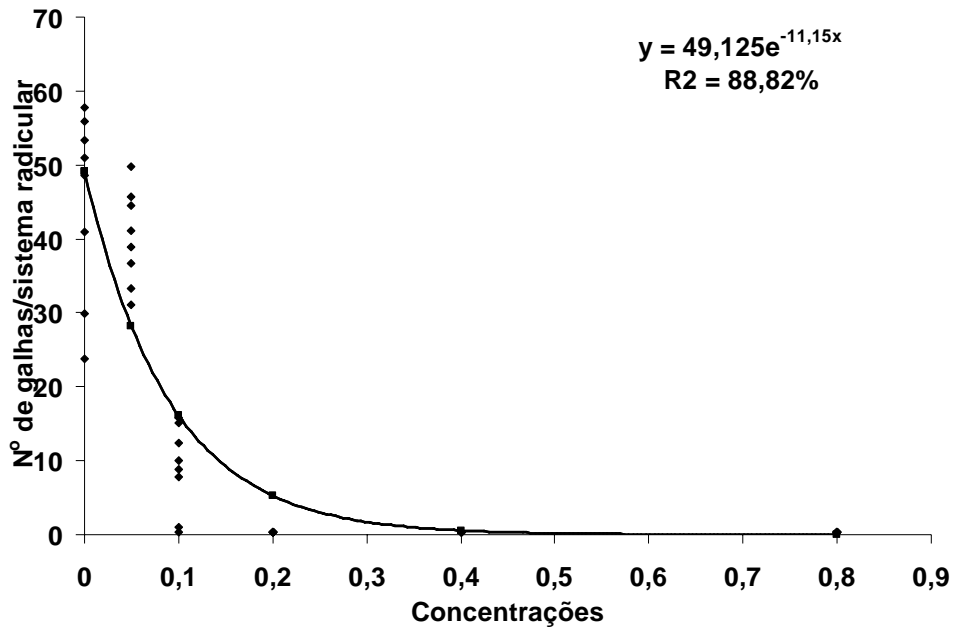


Figura 04 – Número de galhas por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de farinha de sementes de mostarda. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,1}$.

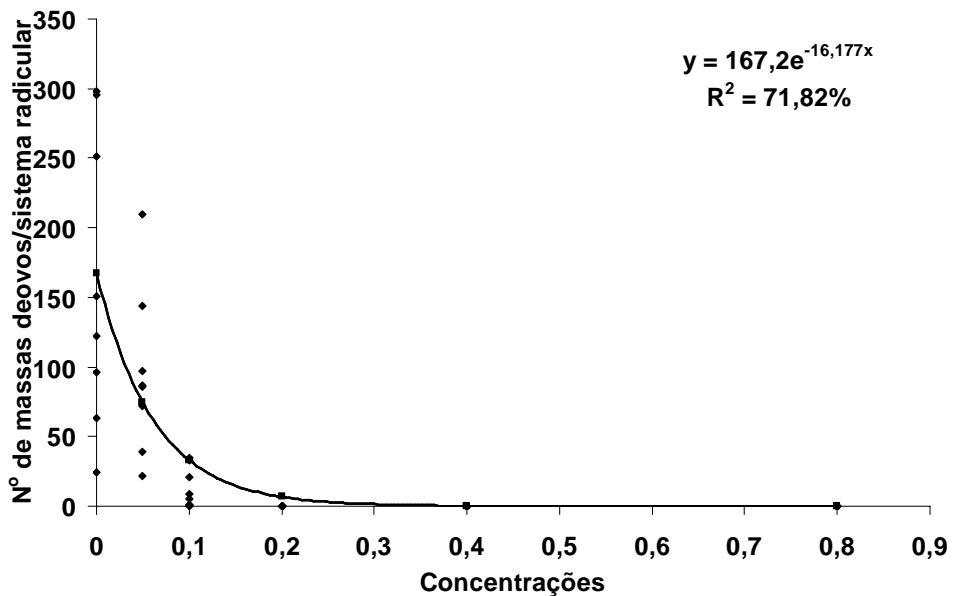


Figura 05 – Número de massas de ovos por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de farinha de sementes de mostarda.

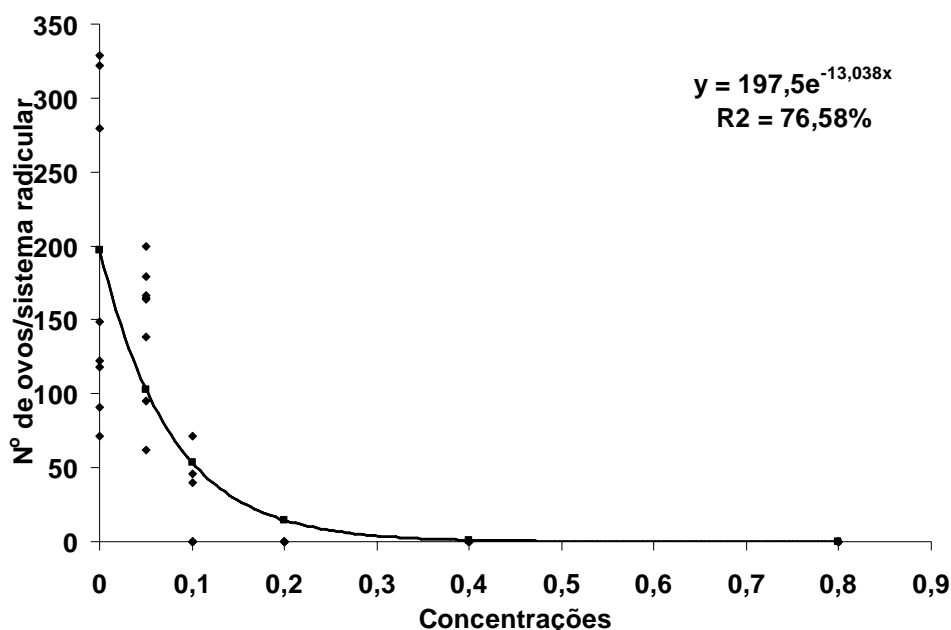


Figura 06 – Número de ovos por sistema radicular de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* e tratados com diferentes concentrações de farinha de sementes de mostarda. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,1}$.

O uso da farinha de sementes desengordurada no solo ocasionou grande redução na população de *M. incognita*. A quantidade desta necessária para reduzir 97,5% do número de ovos, 99,4% de galhas e 98,1% de massas de ovos do fitonematóide foi de 0,05% (p/v), mas 100% de supressão foi observada com a dose de 0,1% mantendo essa porcentagem nas doses superiores (Fig. 07).

Tabela 07 - Número de ovos, galhas e massas de ovos de *Meloidogyne incognita* no sistema radicular de tomateiro cultivado em substrato tratado com doses de farinha de sementes desengordurada de mostarda.

Tratamento	Número de		
	ovos	galhas	massas de ovos
0,0%	7326,0 ± 3222,8	346,4 ± 230,2	36,6 ± 22,4
0,05%	183,5 ± 449,4	2,2 ± 4,4	0,7 ± 1,0
0,10%	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
0,20%	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
0,40%	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
0,80%	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0

Média de oito repetições ± desvio padrão.

Ensaio 02: Efeito dos compostos voláteis liberados no solo durante o processo de biofumigação com *Brassica rapa* sobre a eclosão de *Meloidogyne incognita*.

A ação dos compostos voláteis oriundos da decomposição da mostarda, tanto da folha quanto da farinha de sementes, resultou num menor número de juvenis J2 de *M. incognita*. Quando a folha de mostarda foi utilizada como biofumigante a redução de J2 foi contínua à medida que se aumentava a dose do produto. Com a dose de 0,8% a supressão no número de juvenis foi de 58% em relação à testemunha e 82% de supressão foi atingida quando esta dose foi dobrada (Fig. 08). Já com a farinha de sementes a redução foi bastante acentuada e obteve-se uma supressão de 77% com 0,2% do produto e 99,7% de redução no número de J2 foi observado com a dose de 0,8% (Fig. 09).

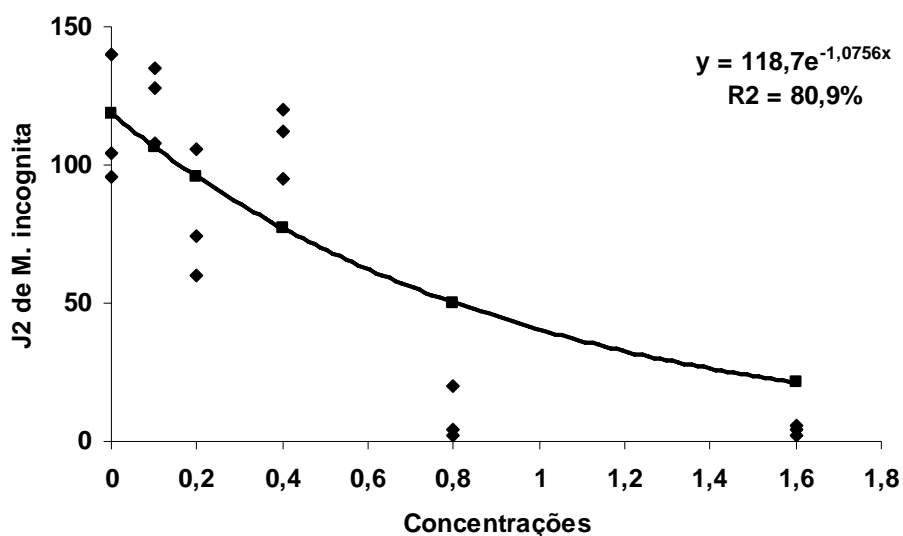


Figura 08 – Número de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* eclodidos após exposição aos compostos voláteis de diferentes doses de folha de mostarda.

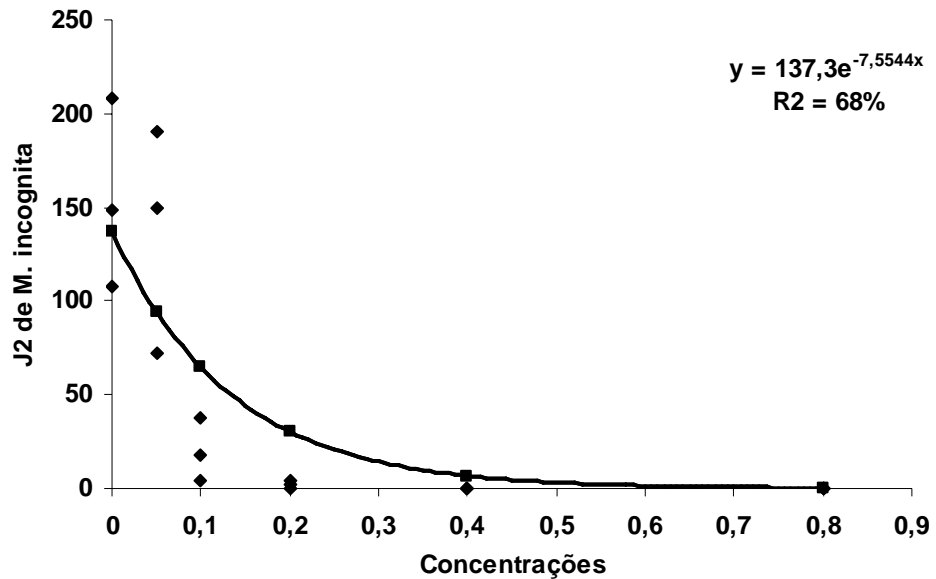


Figura 09 – Número de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* eclodidos após exposição aos compostos voláteis de diferentes doses de sementes de mostarda.

Ensaio 03: Efeito da mostarda na mortalidade de juvenis de diferentes espécies de nematóides.

Notou-se que a ação nematicida dos produtos biofumigantes de mostarda sobre outras espécies de fitonematóides foi efetiva, tanto para *Heterodera glycines* (Fig. 10), como *M. mayaguensis* (Fig. 11), *M. incognita* (Fig. 12), *M. javanica* (Fig. 13) e *M. exigua* (Fig. 14). De maneira geral, os resultados foram semelhantes para todas as espécies, e houve diferença estatística ($P < 0,05$) apenas entre a testemunha e os demais tratamentos, mas estes não diferiram entre si. A mortalidade de juvenis atingiu mais de 95% para folha, de 98,5% para farinha de sementes e de 97,7% para farinha de sementes desengordurada nas cinco espécies testadas.

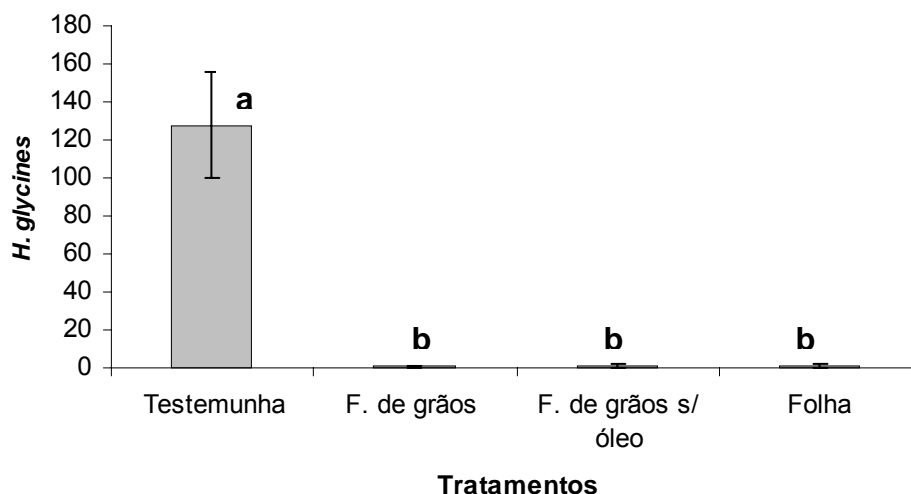


Figura 10 – Número de juvenis de *Heterodera glycines* recuperados vivos após a biofumigação do solo com farinha de sementes (0,2%), de sementes desengordurada ou sem óleo (0,1%) e folha desidratada de mostarda (1,6%). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. C.V. = 42,8%

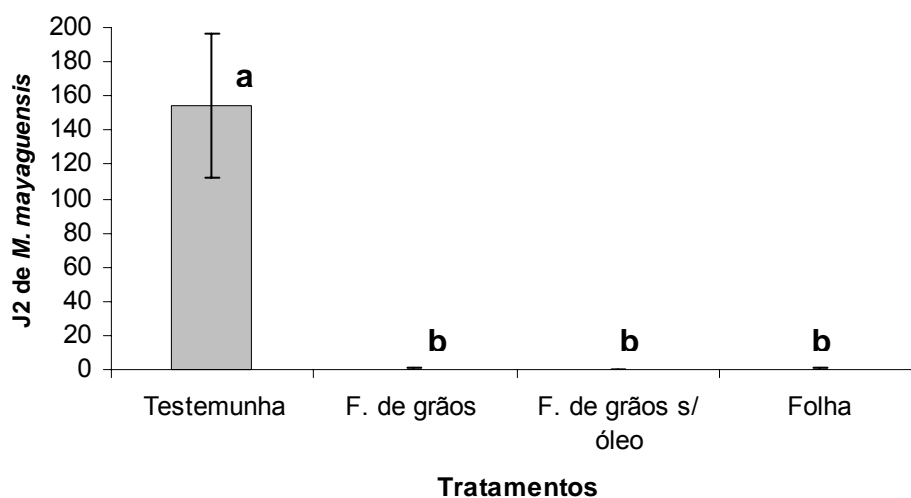


Figura 11 – Número de juvenis de *Meloidogyne mayaguensis* recuperados vivos após a biofumigação do solo com farinha de sementes (0,2%), de sementes desengordurada ou sem óleo (0,1%) e folha desidratada de mostarda (1,6%). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. C.V.= 54,1%

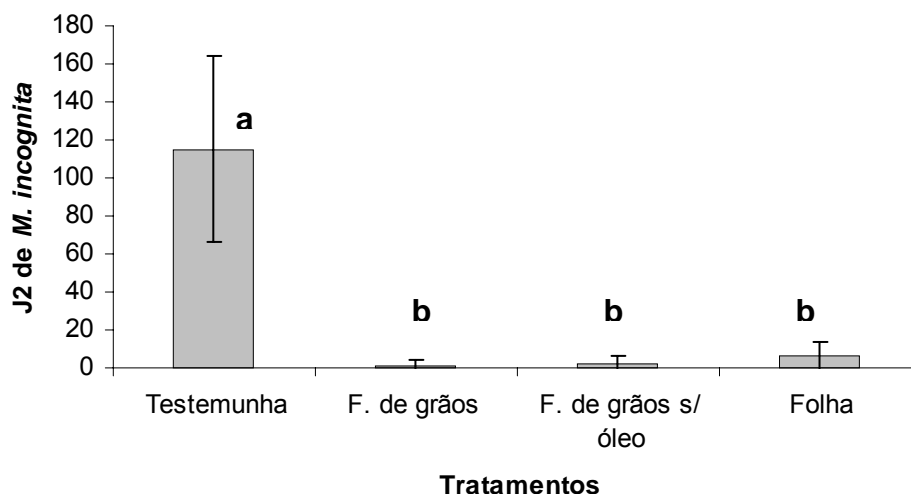


Figura 12 – Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* recuperados vivos após a biofumigação do solo com farinha de sementes (0,2%), de sementes desengordurada ou sem óleo (0,1%) e folha desidratada de mostarda (1,6%). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. C.V.= 79%.

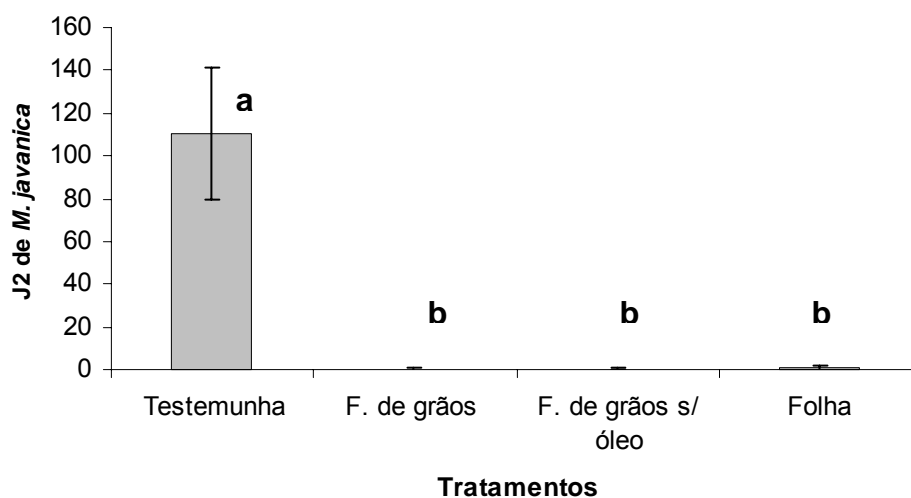


Figura 13 – Número de juvenis de *Meloidogyne javanica* recuperados vivos após a biofumigação do solo com farinha de sementes (0,2%), de sementes desengordurada ou sem óleo (0,1%) e folha desidratada de mostarda (1,6%). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. C.V. = 55,1%

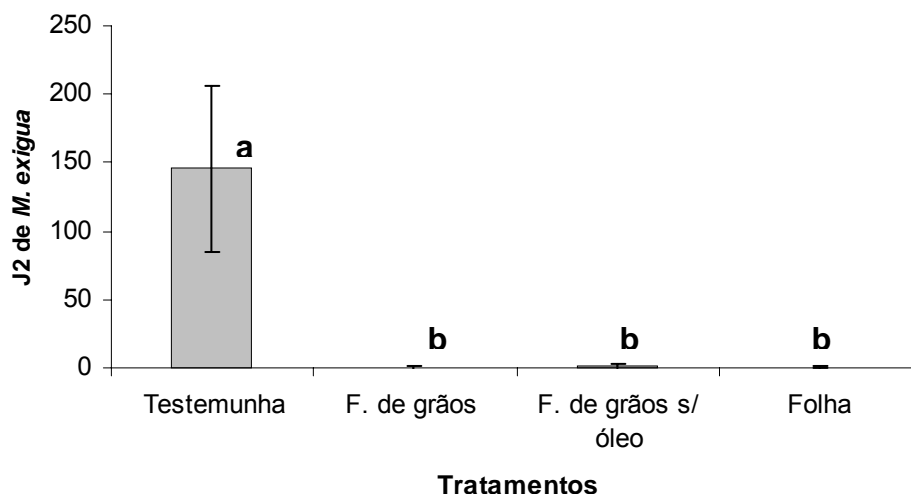


Figura 14 – Número de juvenis de *Meloidogyne exigua* recuperados vivos após a biofumigação do solo com farinha de sementes (0,2%), de sementes desengordurada ou sem óleo (0,1%) e folha desidratada de mostarda (1,6%). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. C.V. = 57,8%

DISCUSSÃO

O fato dos solos tratados apresentarem-se colonizados pelo fungo *Trichoderma* sp., pode ser explicado pela ausência do efeito tóxico da mostarda ao saprófita, o qual já se mostrou bastante tolerante a ação de isotiocianatos em outros estudos (Smith & Kirkegaard, 2002; Sanchi *et al.* 2005). Este microrganismo também pode ter sido beneficiado pela supressão de seus competidores no solo. Esta constatação deve ser ressaltada uma vez que este fungo é um antagonista natural de outros fitoparasitas de solo e já é utilizado como agente de controle biológico, o que possibilitaria o estudo da utilização conjunta de mostarda e *Trichoderma* sp. visando ao controle de fitoparasitas. Sanchi *et al.* (2005), relataram que o tratamento do solo com farinha de sementes de *Brassica carinata* surtiu efeito na interação *Trichoderma harzianum* - *Sclerotinia* spp., inibindo o fungo *Sclerotinia* spp. e não influenciando o *T. harzianum*.

O efeito fitotóxico de brássicas às mudas de tomateiros também foi observado por Mojtahedi *et al.* (1991), que sugeriram que tal efeito alelopático fosse devido a uma substância liberada pela decomposição de *Brassica* sp., provavelmente um isotiocianato. Na prática esse efeito pode ser eliminado aumentando o tempo entre o tratamento do solo e o transplântio das mudas. No entanto, as doses necessárias para controlar 99% de *M. incognita* não causaram fitotoxidez às mudas de tomateiro.

Os resultados do ensaio com folha de mostarda comprovaram a hipótese de que este produto apresenta ação nematicida e pode ser utilizado no manejo de fitonematóides. A dose de 1,6%, necessária para suprimir 99% de *M. incognita*, foi mais eficiente do que foi necessária em outros trabalhos, como o de Potter *et al.* (1998), no qual 2% de folha de *B. rapa* e *B. napus* causaram apenas 55% de mortalidade do fitonematóide *Pratylenchus neglectus*. Mesmo no de Johnson *et al.* (1992), no qual a incorporação de 1,3 - 2,7 % (p/p) de folha de *B. napus* não afetou a densidade populacional de *M. incognita* e *M. javanica*. Mas, equiparou-se ao resultado obtido por Zasada & Ferris (2004), em que 2% (p/p) de *B. juncea* foram suficientes para o controle de 100% de *M. javanica*. A inconstância dos resultados destes trabalhos é explicada pelo fato de que cada espécie de *Brassica* apresenta teores e tipos diferentes de glucosinolatos em seus tecidos. É devido a essas diferenças que a escolha de uma espécie de brássica que apresente altos teores de glucosinolatos é fundamental para o sucesso da biofumigação.

No entanto, há de se considerar ainda que a supressão da população de *M. incognita*, quando se incorporou folha de mostarda, pode não estar restrita a ação dos produtos derivados da hidrólise dos glucosinolatos presentes em seus tecidos. Provavelmente, as alterações na estrutura e ecologia do solo, como o estímulo de microrganismos parasitas, predadores e antagonistas, devido à incorporação de material orgânico contribuiu à supressão de nematóides neste ensaio. Isto pode ser vantajoso, pois além de eliminar o fitonematóide, a incorporação de matéria orgânica traz benefícios como uma melhor estruturação do solo, estímulo à biodiversidade de microrganismos benéficos e disponibilização de nutrientes para a cultura de interesse.

A aplicação de farinha de sementes foi mais eficiente na supressão do nematóide das galhas do que a folha desidratada. Esse resultado que já é relatado na literatura, deve-se ao fato de que cada tecido da planta contém teores diferentes de glucosinolatos assim como seus padrões de distribuição (Davis et al., 1989). Esta observação também foi confirmada neste projeto (Capítulo 2), em que a quantidade de isotiocianato de alila presente na farinha de sementes foi 5 vezes maior que a concentração encontrada na folha desidratada. Davis *et al.* (1989), relataram que a incorporação ao solo de sementes de canola (*B. napus*) reduziu significativamente a população de *Pratylenchus neglectus*, o mesmo não foi observado quando folhas foram incorporadas.

Um ponto negativo na utilização da farinha de sementes para o tratamento de solos e substratos foi a germinação de alguns embriões de *B. rapa*, uma vez que plantas do gênero *Brassica* são consideradas como invasoras e competiriam por espaço e nutrientes com a planta de interesse econômico.

A aplicação da farinha de sementes desengordurada foi mais eficiente do que o esperado pelos autores, e tudo indica que os glucosinolatos não são perdidos e mantêm-se estáveis durante o processo de extração do óleo das sementes de mostarda. Pelos resultados obtidos com o emprego da farinha de sementes desengordurada, na dose de 0,1%, verificou-se que esta foi suficiente para controlar 100% de *M. incognita*. Esta informação torna este produto uma alternativa em potencial a ser implementada como medida de manejo de fitonematóides presentes no solo ou substrato. Além de não apresentar a desvantagem da germinação de embriões, a dose necessária para inibir 100% da população de *M. incognita* foi metade da dose de farinha de sementes com óleo necessária para inibir essa mesma taxa, e 8 vezes menor que a dose de folha de mostarda.

No ensaio 2, foi possível comprovar que o efeito nematicida da mostarda é devido a seus subprodutos voláteis. Os ovos de *M. incognita* não entraram em contato direto com o solo, o que descarta a possibilidade de que outras substâncias que poderiam estar diluídas na solução do solo ou mesmo a ação direta de antagonistas sejam os responsáveis pela supressão do fitonematóide. A ação ovicida ou supressora da eclosão de juvenis foi

menor que a ação tóxica sobre o nematóide como visto nos ensaios de dosagem conduzidos em casa de vegetação. Mas, eles seguem a mesma tendência de controle, pois à medida que se aumenta a quantidade de mostarda incorporada ao solo maior é a supressão de *M. incognita*, o que é justificado pela maior liberação de compostos tóxicos voláteis. Um próximo passo para se conhecer melhor o processo de biofumigação com *B. rapa*, seria identificar que volátil está agindo como princípio ativo e qual a quantidade deste que está sendo liberada no solo.

Um estudo mais específico deve ser realizado para esclarecer se os voláteis agem sobre os ovos do nematóide, apresentando assim uma ação ovicida, ou se é apenas sobre os juvenis já eclodidos. Estudos “*in vitro*” já confirmaram a ação tóxica do isotiocianato de alila (ITCA) sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* (Yu et al., 2005), no entanto o efeito ovicida ainda não foi estudado. Esta informação seria de grande utilidade para a escolha da melhor estratégia de aplicação do produto, visto que os ovos são as estruturas de sobrevivência do patógeno no solo.

A exposição de diferentes espécies de nematóides aos produtos voláteis da mostarda mostrou que não houve seletividade do efeito tóxico dentro da família Meloidogynidae. Na realidade outros estudos já haviam demonstrado a sensibilidade de vários nematóides aos subprodutos das brássicas como *Meloidogyne javanica*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Heterodera glycines*, *M. incognita*, *M. hapla*, *H. schachtii*, *Pratylenchus penetrans* e *P. neglectus* (Zasada & Ferris, 2004; Yu et. al., 2005). As doses utilizadas foram suficientes para suprimir todas as espécies testadas neste ensaio, apesar de haver relatos na literatura de grandes discrepâncias de sensibilidade dentro do mesmo gênero de nematóide ao ITCA (Yu et. al., 2005). Com estes resultados, é viável o uso da biofumigação com farinha de sementes desengordurada, farinha de sementes e folha desidratada de mostarda em solos infestados com mais de uma espécie do fitoparasita.

Baseado nos resultados deste trabalho, acredita-se que a biofumigação com a *B. rapa* seja uma alternativa viável a ser utilizada em sistemas de manejo integrado, com o objetivo de suprimir fitonematóides presentes em áreas destinadas ao plantio de hortaliças e em substratos para sementeiras e viveiros. Apesar das farinhas de sementes com óleo e

desengordurada apresentarem maior eficiência que a folha de mostarda, todos podem ser aplicados como biofumigantes, e a escolha irá depender da disponibilidade da matéria prima economicamente acessível e do interesse de cada produtor. No entanto, outras informações devem ser adquiridas para se estabelecer uma otimização do uso destes biofumigantes, como as melhores temperaturas e umidades a que deve ser exposto o produto e conseqüentes benefícios para a produtividade de plantios comerciais.

Um grande potencial foi observado na farinha de sementes desengordurada que, além das já citadas, apresenta outras vantagens em relação aos demais biofumigantes: além de se mostrar mais efetiva no controle de fitonematóides, ela pode ser armazenada, não exigindo assim o uso imediato do produto. Esse é um ponto comum na maioria dos biofumigantes obtidos a partir de brassicáceas, uma vez que estes são incorporados ainda frescos e necessitam ser cultivados na entressafra das culturas importantes. Estes atributos apresentados pelos biofumigantes à base de farinha de sementes, são essenciais para difundir essa tecnologia promissora no controle de fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOREK, V.; MORRA, M. J.; BROWN, P. D.; McCAFFREY, J. P. 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. *J. Agric. Food Chem.* 43.1935-1940.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. *Adv. Agron.* 61. 167-231.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J.; McCAFFREY, J. P.; AULD, D. L.; WILLIAMS, L., III. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Chemical Ecology.* 17. 2021-2023.

DAVIS, J. R.; SORENSEN, L. H.; SCHNEIDER, A. T.; HAFEZ, S. L.; AULD, D. L. 1989. Suppression of *Verticillium dahliae*, *Pratylenchus neglectus*, and nutritional benefits to Russet Burbank potato with *Brassica napus*. *Potato Journal.* 66. 515.

JOHNSON, A. W.; GOLDEN, A. M.; AULD, D. L.; SUMNER, D. R. 1992. Effects of rapeseed and vetch as green manure crops and flaow on nematodes and soil-borne parthogens. *J. Nematol.* 24(1). 117-126.

KIRKEGAARD, J. A.; SARWAR, M.; WONG P. T. W.; MEAD A. 1998. Biofumigation by brassicas reduces take-all infection. In " Agronomy - growing a greener future" Proceedings 9th Australian Agronomy Conference (Eds DL Michalk; JE Pratley) 465-468.

KOKALIS-BURELLE, N.; DICKSON, D. W. 2003. Evaluation of plantpro 45 and plantpro 20ec as alternatives to Methyl bromide soil fumigation for tomato production in florida. *Nematropica*. 33(2).

LAZZERI, L.; LEONI, O.; MANICI, L. M. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products*. 20. 59-65.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S.; HANG, A. N.; WILSON, J. H. 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. *J. Nematol.* 23. 170-174.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. 1998. Suppressive impact of glucosinolates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. *Journal of Chemical Ecology*. 24, 67-80.

RIBEIRO JR., J. I. 2001. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa. UFV. 301.

SANCHI, S.; ODORIZZI, S.; LAZZERI, L.; MARCIANO, P. 2005. Effect of *Brassica carinata* seed meal treatment on the *Trichoderma harzianum* t39-*Sclerotinia* species interaction. *Acta Hort.* (ISHS) 698. 287-292.

SAS Institute INC.SAS/STATTM. 1995. SAS user's guide for windows. environment. 6.11 ed. Cary : SAS Institute.

SMITH, B. J.; KIRKEGAARD, J. A. 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology*. 51(5). 585-593.

YU, Q.; TYAN, R.; CHIBA, M.; POTTER, J. 2005. Selective nematicidal activity of allyl isothiocyanate. *Journal of Food. Agric. & Environmnt.* 3(2). 218-221.

ZASADA, I. A; FERRIS, H. 2004. Nematode suppression with brassicaceous amendments: aplication based upon glucosinolate profiles. *Soil Biology & Biochemistry*. 36. 1017-1024.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA MOSTARDA NAS POPULAÇÕES MICROBIANAS DO SOLO E QUANTIFICAÇÃO DO ISOTIOCIANATO DE ALILA.

INTRODUÇÃO

Os fitonematóides constituem um dos principais problemas para a agricultura brasileira, causando grandes perdas na produtividade de culturas de importância econômica. Muitas dessas culturas já vêm do viveiro infectadas por nematóides, o que ocasiona prejuízos maiores à rentabilidade das mesmas. O controle químico através de fumigantes vem se tornando uma solução insustentável face aos problemas causados por nematóides devido aos altos custos e danos ao meio ambiente.

As plantas da família Brassicaceae são conhecidas por conterem glucosinolatos em seus tecidos, os quais são produtos do seu metabolismo secundário e constituem um grupo diverso de glucosídeos portadores de enxofre em suas cadeias (Zasada & Ferris, 2003). Quando os tecidos destas plantas são rompidos os glucosinolatos, localizados no vacúolo das células (Poulton and Moller, 1993), entram em contato com a mirosinase, que é armazenada separadamente na célula vegetal. Esta catalisa a hidrólise dos glucosinolatos em sulfatos, isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas e enxofre elementar (Bones and Rossiter, 1996; Foo et al., 2000). Os isotiocianatos (ITCs) são compostos que apresentam volatilidade e são reconhecidos como o subproduto mais tóxico da hidrólise dos glucosinolatos (Smolinska, 1997). Dentre os vários ITCs já identificados o isotiocianato de alila (ITCA) tem se mostrado como o mais efetivo no controle de fitonematóides como *Meloidogyne javanica*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Heterodera glycines*, *M. incognita*, *M. hapla*, *H. schachtii*, *Pratylenchus penetrans* e *P. neglectus* (Zasada & Ferris, 2004; Yu et al., 2005).

Brassica rapa é uma espécie de mostarda considerada como planta daninha em cultivos de cereais de inverno no Brasil e o óleo de suas sementes é considerado tóxico para o consumo do homem e de animais (Lorenzi, 2000). Este fato talvez explique a pouca importância dada a esta espécie e pouco conhecimento sobre os seus subprodutos e ação destes sobre os microrganismos presentes no solo. Obviamente, a incorporação de resíduos orgânicos apresenta um forte impacto nas propriedades físicas e

biológicas do solo e pode promover um ambiente favorável para microorganismos antagônicos a fitonematóides (Stirling, 1991).

O uso de plantas da família Brassicaceae incorporadas ao solo permite explorá-las como uma alternativa promissora ao controle dos fitoparasitas de solo devido a ação tóxica de seus subprodutos.

Os objetivos deste estudo foram quantificar o isotiocianato de alila produzido durante o processo de biofumigação do solo com mostarda (*Brassica rapa*) e avaliar o efeito da mostarda nas populações microbianas do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio 01: Efeito da biofumigação com mostarda nas populações microbianas do solo.

Neste experimento foram avaliadas as populações microbianas durante o processo de biofumigação de um solo natural oriundo de uma área de cultivo de hortaliças localizada na Universidade Federal de Viçosa, este solo apresentava uma umidade de 54% de sua capacidade de campo. Ao solo foram incorporados farinha de sementes (0,2% p/p), farinha de sementes desengordurada (0,2% p/p) ou folha desidratada (1,6% p/p) de *B. rapa*. Parcelas com solo não tratado corresponderam à testemunha. Os solos tratados foram depositados em potes plásticos e estes devidamente vedados para evitar a perda de gases produzidos durante o processo de biofumigação, e foram mantidos a 25°C. Amostras destes solos foram coletadas com 0, 48 e 168 horas após a incorporação dos materiais vegetais. A partir das amostras coletadas foram preparados os extratos a 1:10 (10g de solo em 90 mL de solução salina de NaCl a 0,85%), que foram diluídos seqüencialmente: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Um volume de 0,1 mL das diluições foi transferido para placas de Petri contendo o meio de cultura correspondente a cada grupo de microrganismos estudado: bactérias (ágar-nutriente/ciclohexamida), fungos (meio de Martin/estreptomicina) e

actinomicetos (dextrose nitrato/estreptomicina) (Dhingra & Sinclair, 1995). As placas foram incubadas a 25° C e o aparecimento e contagem de colônias foram acompanhados diariamente durante 7 dias.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 tratamentos X 3 períodos de avaliação) com 12 repetições. As médias dos resultados das foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%. A análise estatística foi realizada no programa SAEG (Sistema para análises Estatísticas e Genéticas) (Ribeiro Jr., 2001).

Ensaio 02: Quantificação de isotiocianato de alila produzido durante o processo de biofumigação com mostarda.

Neste ensaio cada amostra foi constituída de 10 g de solo [franco-argilo-arenoso (areia 64%; silte 7% e argila 29%), pH 6,06] umidificado com água destilada, para atingir 60% da capacidade de campo, e ao solo foram incorporados farinha de sementes (0,2% p/p), farinha de sementes desengordurada (0,2% p/p) ou folha desidratada (1,6% p/p) de *B. rapa*. Uma amostra de solo não tratado correspondeu à testemunha. Imediatamente após a incorporação da mostarda os solos foram depositados em frascos de vidro com 30 mL de capacidade, e estes foram devidamente vedados com septos de teflon e tampas de plástico para evitar a perda de gases produzidos durante o processo de biofumigação. Os frascos permaneceram a 25°C no escuro.

Para a extração do ITCA (isotiocianato de alila) produzido no solo, 10 ml do solvente ciclohexano foram adicionados a cada frasco e estes foram agitados vigorosamente por 1 minuto para formar uma suspensão de solo e ciclohexano, e então os frascos ficaram sob agitação constante por mais 10 minutos em um agitador a 100 rpm. Com o auxílio de uma seringa, coletou-se uma amostra de 1 mL do extrato de ciclohexano de cada frasco, durante os seguintes períodos de avaliação 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a incorporação da mostarda ao solo. As amostras foram injetadas num cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5000), nas seguintes condições: coluna Equity-5

(Supelco) (30m x 0,25mm di x 0,25 μ m filme), com programação de temperatura iniciando a 40 $^{\circ}$ C (permanência: 5 minutos), taxa de crescimento de 8 $^{\circ}$ C/min até 260 $^{\circ}$ C (permanência: 30 minutos). A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260 $^{\circ}$ C. Hélio foi usado como gás de arraste (30 kPa, vazão 0,8 mL/min), injeção em modo splitless. O espectrômetro de massas, 70 eV, foi operado no modo scan, com faixa m/z 40-300.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 tratamentos X 8 períodos de avaliação) com 3 repetições. As médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada pelo programa SAEG (Sistema para análises Estatísticas e Genéticas) (Ribeiro Jr., 2001).

RESULTADOS

Ensaio 01: Efeito da biofumigação com mostarda nas populações microbianas do solo.

Pela análise dos resultados observou-se que a incorporação da mostarda no solo influenciou as populações microbiológicas, tanto quanto o tipo de material incorporado como o tempo em que as populações ficaram expostas a biofumigação. Quando avaliada a população total de bactérias (Tab. 1), pode-se observar que houve interação significativa ($P < 0,05$) entre os dois fatores estudados. As populações de bactérias sofreram maior influência da incorporação de mostarda quando foi utilizada a folha desidratada como biofumigante. Às 48 horas, houve um aumento significativo em relação aos outros tratamentos, cuja densidade populacional foi a mais elevada ($664,67 \times 10^7$ ufc). Mesmo que a população tenha decrescido na avaliação seguinte (168 horas), ainda assim ela manteve-se maior que nos outros materiais incorporados. Nos solos em que foram incorporadas as farinhas de sementes com óleo ou desengordurada, assim como a testemunha, a densidade populacional de bactérias não diferiu estatisticamente.

Tabela 1 – Unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias presentes no solo após a biofumigação com folha (1,6%), farinha de sementes (0,2%) e farinha de sementes desengordurada (sem. deseng.) de mostarda (0,2%), em três períodos.

Período de avaliação	UFC ($\times 10^7$) g^{-1} solo				
	Testemunha	Farinha de			
		Folha	Sementes	Sem. deseng.	
0 horas	79,10 \pm 21,3 Aa	71,90 \pm 58,6 Ac	81,30 \pm 31,0 Aa	85,00 \pm 69,6 Aa	
48 horas	7,23 \pm 9,3 Ba	664,67 \pm 374,0 Aa	51,83 \pm 50,2 Ba	105,33 \pm 125,4 Ba	
168 horas	21,71 \pm 20,4 Ba	432,67 \pm 329,2 Ab	261,5 \pm 223,8 Aa	301,67 \pm 351,0 Aa	

Média de 12 repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). C.V. = 53,8%

Não houve interação significativa entre os tratamentos e os períodos de avaliação. O número de unidades formadoras de colônias fúngicas no solo variou significativamente ($P < 0,05$) entre os tratamentos (Tab. 2). A incorporação de folha desidratada de mostarda não diferiu da testemunha quanto a quantidade de fungos no solo, enquanto a farinha de sementes desengordurada diminuiu a população fúngica. Um aumento no número de colônias fúngicas também foi constatado no decorrer do período de biofumigação.

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos presentes no solo após a biofumigação com folha (1,6%), farinha de sementes (0,2%) e de sementes desengordurada de mostarda (0,2%), em três períodos.

Tratamento	UFC ($\times 10^6$) g^{-1} solo	Período de avaliação	UFC ($\times 10^6$) g^{-1} solo
Testemunha	6,00 \pm 6,3 AB	0 horas	2,26 \pm 4,8 B
Farinha de Folha	9,51 \pm 8,7 A	48 horas	6,59 \pm 9,3 AB
F. sementes	5,66 \pm 4,4 AB	168 horas	8,68 \pm 7,6 A
F. sementes desengordurada	2,21 \pm 1,3 B		

Média de doze repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). C.V. = 76,1%

O número de actinomicetos variou significativamente ($P < 0,05$) e houve interação entre os fatores estudados (Tab. 3). A população de actinomicetos respondeu de forma semelhante à de bactérias, isto é, a maior densidade foi detectada no solo tratado com farinha de folha e após 48 horas de biofumigação, o que se repetiu para os outros tratamentos, exceto para a farinha de sementes desengordurada. Esta causou redução na densidade populacional desse microrganismo a partir de 0 hora de tratamento. Independente do material usado para a biofumigação, estes atuaram como substrato para os actinomicetos, cuja população de foi maior que na testemunha após 168 horas de tratamento.

Tabela 3 – Unidades formadoras de colônias de actinomicetos presentes no solo após a biofumigação com folha (1,6%), farinha de sementes (0,2%) e de sementes desengordurada (sem. deseng.) (0,2%), em três períodos.

Período de avaliação	UFC ($\times 10^5$) g^{-1} solo			
	Testemunha	Folha	F. sementes	F. sem. deseng.
0 horas	5,28 \pm 3,2 Ab	6,61 \pm 6,3 Ac	4,25 \pm 2,1 Ac	5,13 \pm 2,6 Aa
48 horas	9,50 \pm 16,8 Ca	62,83 \pm 35,5 Aa	29,83 \pm 24,6 Ba	2,83 \pm 14,3 Dc
168 horas	0,83 \pm 53,3 Ac	41,50 \pm 49,9 Bb	7,50 \pm 33,5 Bb	3,50 \pm 38,7 Bb

Média de doze repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). C.V. = 45,9%

Ensaio 02: Quantificação de isotiocianato de alila (ITCA) liberado na biofumigação com mostarda.

Para a construção da curva padrão foram injetadas amostras do padrão de ITCA à 0; 4,9; 6,2; 7,1; 9,9 e 12,3 ppm (Fig. 1), de uma solução 0,1 mg/mL de ciclohexano. Após quantificação, o teor de ITCA foi expresso em ppm.

Nas amostras injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas o único isotiocianato detectado foi o isotiocianato de alila e apresentou um tempo de retenção de 10,06 minutos (Fig. 2), semelhante ao tempo de retenção do padrão de ITCA, 10,00. (Fig. 3).

Foi observada interação significativa ($P < 0,05$) entres os fatores estudados para a quantificação do ITCA produzido pelos produtos incorporados ao solo. O tratamento com farinha de sementes desengordurada apresentou as maiores concentrações de ITCA no período total de avaliação. O ITCA começou a ser detectado após 2 horas de incorporação e atingiu seu pico às 6 horas, com uma concentração de 9,76 ppm. Após esse tempo, o composto foi decrescendo gradualmente até 2,66 ppm, em 48 horas. A farinha de sementes, liberou suas maiores concentrações de ITCA entre 2 e 12 horas após a mesma ser incorporada ao solo e às 48 horas não foi observada a presença do composto. Não foi detectada a presença de ITCA no solo tratado com folha até 24 horas, mas, no tempo de 36 e 48 horas houve liberação do composto em doses muito baixas, as quais não diferiram estatisticamente dos demais tempos de avaliação (Tab. 4).

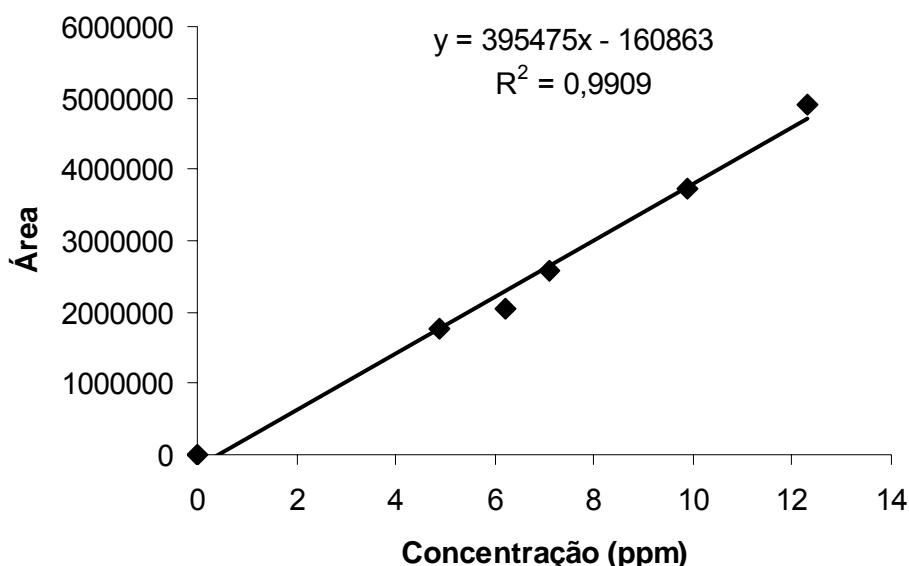


Figura 1 - Curva padrão de isotiocianato de alila. Os pontos são referentes a injeções do padrão às concentrações de 0; 4,9; 6,2; 7,1; 9,9 e 12,3 ppm, em análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (coluna Equity-5 (Supelco), temperatura inicial 40 °C, taxa de crescimento de 8 °C/min até 260 °C. A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260 °C.

Gás de arraste hélio. Injeção em modo splitless. O espectrômetro de massas, 70 eV, operado no modo scan, com faixa m/z 40-300).

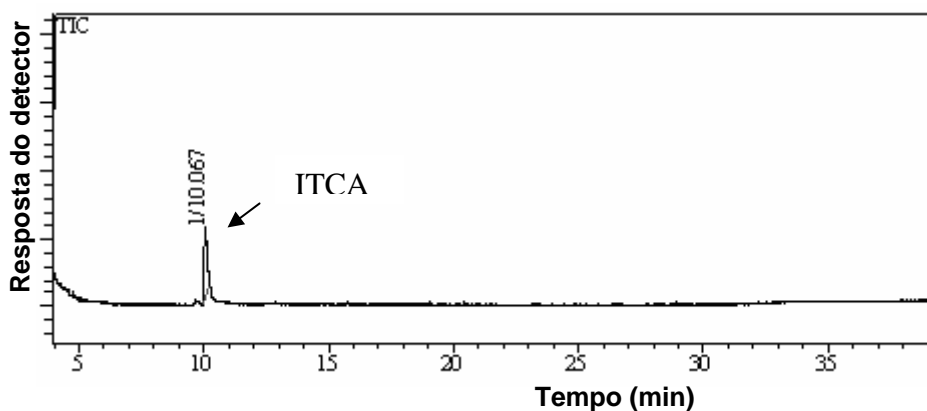


Figura 2 - Cromatograma obtido pela amostra de farinha de sementes desengordurada, 2 horas após sua incorporação ao solo, em análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (coluna Equity-5 (Supelco), temperatura inicial 40 °C, taxa de crescimento de 8 °C/min até 260 °C. A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260 °C. Gás de arraste hélio. Injeção em modo splitless. O espectrômetro de massas, 70 eV, operado no modo scan, com faixa m/z 40-300). (t_R 10,06).

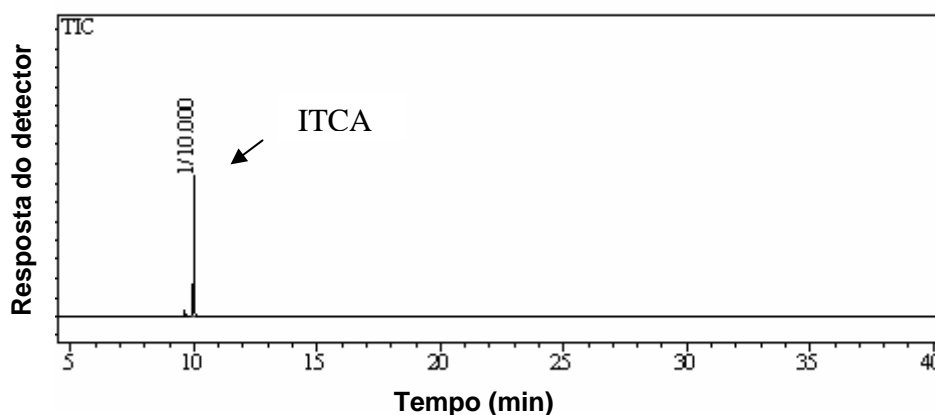


Figura 3 - Cromatograma total de íons representantes do padrão de isotiocianato de alila na concentração de 47,61 ng/ μ L, obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (coluna Equity-5 (Supelco), temperatura inicial 40 °C, taxa de crescimento de 8 °C/min até 260 °C. A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260 °C. Gás de

arraste hélio. Injeção em modo splitless. O espectrômetro de massas, 70 eV, operado no modo scan, com faixa m/z 40-300). (t_R 10,00).

Tabela 4 - Quantidade de isotiocianato de alila (ppm) produzido durante o processo de biofumigação do solo tratado com folha desidratada, farinha de sementes e de sementes desengordurada de mostarda, em oito períodos diferentes

Período de avaliação	Testemunha	Folha	Farinha de sementes	Farinha de sementes desengordurada
0 horas	0,0 ± 0 Aa	0,0 ± 0 Aa	0,94 ± 1,63 Acd	0,00 ± 0 Ad
2 horas	0,0 ± 0 Ba	0,0 ± 0 Ba	5,40 ± 0,90 Aabc	6,58 ± 1,12 Abc
4 horas	0,0 ± 0 Ba	0,0 ± 0 Ba	4,14 ± 0,77 Aabcd	6,06 ± 1,33 Abcd
6 horas	0,0 ± 0 Ca	0,0 ± 0 Ca	3,42 ± 2,17 Babcd	9,76 ± 3,51 Aab
12 horas	0,0 ± 0 Ba	0,0 ± 0 Ba	5,12 ± 0,39 Aabc	5,46 ± 1,63 Abcd
24 horas	0,0 ± 0 Ba	0,0 ± 0 Ba	2,25 ± 0,12 Bbcd	5,63 ± 0,82 Abcd
36 horas	0,0 ± 0 Ba	0,47 ± 0,82 Ba	1,42 ± 1,23 Bbcd	3,89 ± 0,87 Abcd
48 horas	0,0 ± 0 Ba	0,38 ± 0,67 ABa	0,00 ± 0 Bd	2,66 ± 2,39 Acd

Dados das médias de três repetições ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste Tukey ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

A folha triturada de mostarda, no geral, aumentou a população de microrganismos no solo durante o período avaliado. Essa observação faz sentido por dois motivos, primeiro porque a produção de ITCA pela utilização da folha é mais baixa, especialmente nas primeiras horas, e segundo, a matéria orgânica quando incorporada ao solo disponibiliza nutrientes para os microrganismos. Estes decompositores de matéria orgânica presentes no solo vão atuar no substrato disponível, o que pode explicar as maiores contagens das populações microbianas no tratamento com folha de mostarda com 48 horas após a incorporação do material, uma vez que a quantidade de matéria orgânica incorporada ao solo foi oito vezes maior com a folha do que com os outros produtos. Mesmo com os outros materiais usados, as populações de bactérias, actinomicetos e fungos no solo tenderam a aumentar depois de certo tempo de tratamento.

A população total de fungos, cujas contagens foram menores no tratamento com farinha de sementes desengordurada que nos outros tratamentos, poderia levar ao questionamento acerca da sensibilidade deste grupo de microrganismos ao princípio ativo liberado pela mostarda durante a biofumigação. Contudo, parece que este efeito, se existiu, não é prolongado no solo, já que permitiu o aumento da população fúngica após 168 horas de aplicação do produto, quando comparado com a testemunha.

A produção de ITCA, que foi crescente nas primeiras horas de biofumigação, pouco influenciou a população microbiana no solo. Mesmo no caso da farinha desengordurada que chegou a produzir 9,76 ppm de ITCA em 6 horas, os microrganismos foram capazes de recuperar a sua população já com sete dias após a aplicação do biofumigante.

A influência da microbiota do solo na degradação dos tecidos vegetais e produção de isotiocianatos (ITCs) apresenta dados contraditórios. Bending & Lincoln (1999) sugerem que as enzimas produzidas por microrganismos durante a decomposição da parede celular vegetal podem degradar rapidamente a mirosinase antes que essa entre em contato com o glucosinolato, sendo prejudicial à produção de ITCs. Sugerem também que a hidrólise dos glucosinolatos ocorre principalmente nos estágios iniciais da colonização do tecido vegetal por microrganismos. Tsao et al. (2000) sugeriu que a presença de microrganismos no solo, não contribui para a degradação do ITCA, já que os resultados foram semelhantes quando utilizou água esterilizada e não esterilizada. É muito difícil interpretar a complexidade dos resultados, visto que as populações microbianas sofrem uma série de influências de fatores intrínsecos do solo, e cabe aos pesquisadores identificar e administrar estas sutilezas com o objetivo de otimizar os resultados da biofumigação

Quanto à produção do ITCA, notou-se que a hidrólise enzimática dos glucosinolatos teve início imediatamente após a incorporação da farinha de sementes e após 2 horas a incorporação de farinha de sementes desengordurada ao solo. O contato do tecido vegetal com a água, permitiu que a enzima mirosinase entrasse em contato com os glucosinolatos e catalisasse a reação de hidrólise. Estes dados são importantes uma vez que o controle de um organismo necessita da liberação de quantidade suficiente

de ITCA num determinado tempo. Considerando a rápida liberação do ITCA no solo, recomenda-se que após a aplicação da mostarda no solo ou substrato deverá se cobrir o solo o mais rápido possível, para que fique retida uma maior quantidade de gases tóxicos e, conseqüentemente, o controle de fitonematóides será mais eficiente.

O ITCA tem uma vida útil no solo de aproximadamente 48 horas e é um composto bastante reativo, interage com reagentes nucleofílicos, formando ésteres e outros derivados (Borek *et.al.*, 1995). Por isso, houve um decréscimo nas concentrações após atingirem seus picos de liberação. No caso da folha em que a primeira detecção de ITCA só ocorreu com 36 horas, pode ser explicado devido a esse tipo de tecido gastar mais tempo na sua decomposição que a farinha de sementes, a qual estaria mais prontamente exposta à ação da mirosinase.

Corroborando com os resultados deste experimento, em que os maiores teores de ITCA foram observados logo após a incorporação dos tecidos vegetais no solo, Chin & Lindsay (1993) observaram que as concentrações mais altas, obtidas em diferentes cultivares de *B. oleracea* pelo método de “headspace” foram observadas logo aos 10 minutos após o preparo das amostras, e as concentrações tenderam a decrescer à medida que o tempo de avaliação aumentava. No trabalho de Tsao et al. (2000) a concentração de ITCA atingiu seu ápice aos 54 minutos após a incorporação. Morra & Kirkegaard (2002) também encontraram a máxima liberação de isotiocianatos logo na primeira avaliação, 2 horas após a incorporação de tecidos triturados de *B. juncea* e *B. napus*, e a concentração de ITCs chegou ao mínimo na amostra de 48 horas.

Morra & Kirkegaard (2002) em suas conclusões sugeriram que grandes avanços com o uso de brássicas para o controle de fitoparasitas de solo seriam alcançados pelo desenvolvimento de técnicas que aumentassem a ruptura das células vegetais e, conseqüentemente, aumentasse a liberação de ITCs. O que faz sentido, pois a taxa de transformação de glucosinolatos em ITC ocorre em apenas 5 - 15% da quantidade prevista. O uso da farinha de sementes desengordurada como biofumigante pode se encaixar nessa hipótese, já que o processo de moagem e extração do óleo podem disponibilizar a interação glucosinolatos-mirosinase a uma ação

maior e mais rápida, potencializando a liberação de ITCs e a eficiência do biofumigante. Este fato ressalta a importância em se determinar a quantidade e eficiência de liberação dos ITCA no solo.

Mas vale ressaltar que o ITCA oriundo de folhas ou de sementes pode agir de forma diferente do produto sintético devido a existência de outros componentes da planta que agem em conjunto, como nitrilas, tiocianatos e até mesmo outros isotiocianatos que podem afetar a atividade química e biológica do ITCA.

A utilização efetiva da mostarda visando ao controle de fitoparasitas irá depender principalmente da escolha do material com propriedades biofumigantes baseado na composição e quantidade de ITCs produzidos por este. Neste trabalho a farinha de sementes desengordurada se destacou pelo alto teor de ITCA produzido e foi constatado que essa espécie de brássica (*B. rapa*) apresenta grande potencial para atuar no manejo de fitonematóides como biofumigante de solo, principalmente quando utilizada na forma de farinha de sementes desengordurada.

Este produto apresenta outras vantagens em relação aos demais biofumigantes, além de se mostrar mais efetivo no controle de fitonematóides, ele pode ser armazenado, não exigindo assim o uso imediato do produto como é o caso dos biofumigantes testados maioria dos estudos com brassicáceas, uma vez que estes são incorporados ainda frescos e necessitam ser cultivados na entressafra das culturas importantes. Estes atributos apresentados pelos biofumigantes à base de farinha de sementes, são essenciais para difundir essa tecnologia promissora no controle de fitonematóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. 1999. Characterization of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 31. 695-703.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant* 97. 194-208.

BOREK, V.; MORRA, M. J.; BROWN, P. D.; McCAFFREY, J. P. 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. *J. Agric. Food Chem.* 43. 1935-1940.

CHIN, H. W.; LINDSAY, R.C. 1993. Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbage cultivars. *J. Food Sci.*, 58, 835-841.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology method. 2 ed CRC Lewis Publishers, Florida, USA.

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

LORENZI, H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 309.

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

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

RIBEIRO JR., J. I. 2001. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa. UFV. 301.

SMOLINSKA, U.; KNUDSEN, G. R.; MORRA, M. J.; BOREK, V. 1997. Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. *Plant Disease.* 81. 288-292.

STIRLING, G.R. 1991. Conservation and enhancement of naturally occurring antagonists and the role of organic matter. In *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes*, 166–85. Wallingford, UK: CAB Int.

TSAO, R., YU, Q., FRIESEN, I., POTTER, J., AND CHIBA M. 2000. Factors affecting the dissolution and degradation of oriental mustard-derived sinigrin and allyl isothiocyanate in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 48(5). 1898 – 1902.

YU, Q.; TYAN, R.; CHIBA, M.; POTTER, J. 2005. Selective nematicidal activity of allyl isothiocyanate. *Journal of Food. Agric. & Environmnt.* 3(2). 218-221.

ZASADA I. A.; FERRIS, H. 2003 Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Phytopathology.* 93(6). 747-750.

ZASADA, I. A; FERRIS, H. 2004. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biology & Biochemistry*. 36. 1017-1024.