

NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR

Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda para  
o controle de *Meloidogyne exigua*.

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  
2008

NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR

Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda para o controle de *Meloidogyne exigua*.

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: 25 de Fevereiro de 2008.

---

Prof. Onkar Dev Dhingra  
(Co-Orientador)

---

Prof. Luiz Antonio Maffia  
(Co-Orientador)

---

Prof. Olinto Liparini Pereira

---

Dr. Antônio Alves Pereira

---

Prof<sup>a</sup> Rosângela D'Arc de Lima Oliveira  
(Orientadora)

Aos meus pais, Nadir e Lourdes.

Ao meu filho, Pedro.

À minha noiva Stefânia.

À minha irmã Noely.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pai de infinita bondade.

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

À 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, dedicação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Onkar D. Dhingra, Luiz Antonio Maffia, Antônio Alves Pereira e Olinto Liparini Pereira, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Aos colegas da Nematologia Roseli, Rodrigo, Ângelo, Renata, Patrícia, Douglas, Dalila, Aline e Déborah.

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

## **BIOGRAFIA**

Naylor Daniel da Costa Aguiar, filho de Nadir Aparecido da Costa Aguiar e Lourdes Aparecida Rossi da Costa Aguiar, nasceu em 05 de dezembro de 1982, em Monte Alto, Estado de São Paulo.

Em 2001, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 05 de maio de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nematologia e submetendo-se à defesa de dissertação em 25 de fevereiro de 2008.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
CAPÍTULO 1 - MÉTODOS DE APLICAÇÃO DA TORTA E DO ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA EM SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE CAFEIEIRO .....	12
INTRODUÇÃO .....	13
MATERIAL E MÉTODOS .....	16
1. Obtenção e multiplicação do inóculo .....	16
2. Obtenção da torta e do óleo de mostarda .....	17
3. Substrato utilizado nos ensaios .....	17
4. Alcance dos voláteis originados da aplicação de torta e óleo de mostarda na mortalidade de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	18
5. Efeito de formas de aplicação da torta em substratos para o controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	19
6. Efeito das formas de aplicação do óleo essencial de mostarda em substratos para o controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	20
7. Uso da formulação em cilindro de papel embebido com óleo essencial de mostarda no controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	20
8. Efeito das concentrações do óleo essencial de mostarda em três tempos de fumigação no controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	21
9. Análise estatística .....	21
RESULTADOS .....	22
1. Alcance dos voláteis originados da aplicação de torta e óleo essencial de mostarda na mortalidade de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	22
2. Efeito das formas de aplicação da torta em substratos para o controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	24
3. Efeito das formas de aplicação do óleo essencial de mostarda em substratos para o controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	24
4. Uso da formulação em cilindro de papel embebido com óleo essencial de mostarda para o controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	25
5. Efeito das concentrações do óleo essencial de mostarda em três tempos de fumigação no controle de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	25
DISCUSSÃO .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

CAPÍTULO 2 - VIDA DE PRATELEIRA DA TORTA DE MOSTARDA.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Obtenção da torta de mostarda .....	41
Obtenção dos juvenis de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	41
Efeito do armazenamento da torta de mostarda na produção de isotiocianatos e mortalidade de juvenis de <i>Meloidogyne exigua</i> .....	41
Determinação do isotiocianato de alila (ITCA) na torta armazenada. ....	42
Efeito do armazenamento da torta na mortalidade de juvenis de <i>Meloidogyne exigua in vitro</i> .....	43
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CONCLUSÕES GERAIS .....	55

## RESUMO

AGUIAR, Naylor Daniel da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda para o controle de *Meloidogyne exigua***. Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Co-orientadores: Onkar Dev Dhingra e Luiz Antonio Maffia.

Considerando a importância de *Meloidogyne* spp. na formação de mudas e o potencial do óleo e da torta de mostarda no controle desses nematóides, objetivou-se desenvolver uma tecnologia de aplicação desses produtos para o tratamento de substrato para a formação de mudas de cafeeiro, bem como determinar a vida de prateleira da torta. Para tal, estudaram-se formas de aplicação do óleo e da torta da mostarda, alcance dos gases, eficiência da formulação em óleo, tempo de biofumigação e armazenamento da torta em diferentes condições. Os gases tiveram alcance na horizontal e vertical ascendente até 30 cm de distância, onde proporcionaram 100% de mortalidade dos nematóides. Na vertical descendente, o óleo foi eficiente até 20 cm, mas com a torta não se obteve controle satisfatório. As formas de aplicação do óleo resultaram em 100 % de controle de *M. exigua*, mas com a torta apenas com a aplicação em sulcos transversal e longitudinal chegou-se ao mesmo resultado. Aumentar o tempo de fumigação para 10 dias ao invés de 5 permitiu reduzir a dose do óleo para 60 mL/m<sup>3</sup>, com 100% controle do nematóide. A influência do tipo de recipiente e condições de armazenamento na conservação da torta foi avaliada até os 14 meses. A conservação em embalagem impermeável (vidro) manteve-se constante tanto na concentração do ITCA quanto na mortalidade do J2 por até 14 meses, independente da temperatura e luz. Em embalagem permeável (saco de papel), em temperatura ambiente, a conservação da mesma foi mantida por até 5 meses, mas quando armazenada em geladeira, a conservação foi mantida até os 14 meses. Conclui-se que a melhor forma de aplicação da torta é no formato de cruz, interceptada a cada 40 cm. O bastão de papel impregnado com óleo revelou-se um possível substituto para o brometo de metila no tratamento de substrato para produção de mudas de cafeeiro. É possível armazenar a torta de mostarda de um ano

para outro desde que se utilize um recipiente hermeticamente fechado, ou, se mantenha em saco de papel fechado, na geladeira.

## ABSTRACT

AGUIAR, Naylor Daniel da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2008. **Technology of application of the mustard cake and essential oil for the *Meloidogyne exigua* control** . Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Co-Advisers: Onkar Dev Dhingra and Luiz Antônio Maffia.

Considering the importance of *Meloidogyne* spp. on the seedlings formation and the potential of the mustard cake and essential oil in the control of this nematode, it was proposed to develop an application technology of these products for the substrates treatment in order to get health coffee seedlings, as well as to determinate the shelf life of the mustard cake. Previously, it was evaluated the gas reaching on the substrate and then, different ways of applying oil and mustard cake. The gas reached 30 cm of distance horizontally and vertically down, that resulted in 100% of nematode mortality. In case of essential oil, the gas movement upright was efficient until 20 cm, but no satisfactory control was observed with the cake. The oil application, independently of the distribution way, resulted in 100% of *M. exigua* mortality, but the same result only was obtained by the cake application on transversal and longitudinal furrows. Also, the efficiency of the essential oil formulation, biofumigation time and the cake storage in different conditions were evaluated. Increasing the fumigation time to 10 instead of 5 days, allowed to reduce the oil doses to 60 mL/m<sup>3</sup>, with 100% of nematode control. The influence of the storage recipient type and cake storage conditions on the ITCA concentration was evaluated until 14 months. The preservation of the cake in impermeable packaging (bottle) guaranteed the ITCA concentration and J2 mortality percentage until 14 months, independently the temperature and light. In permeable packaging (paper bag), at environment temperature, the conservation was maintained until 5 months, but when maintained on the fridge the conservation lasted 14 months. In conclusion, the best way of cake application is in the cross format, spaced every 40 cm. The impregnated paper stick with essential oil is a possible substitute to the methyl bromide in the infested substrate treatment on coffee nurseries. It is possible to store the mustard cake from one to another year if using a recipient hermetically closed, or by using paper bag on the fridge.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca de medidas que controlem nematóides no substrato é um desafio contínuo e ainda atual. Isto se deve ao fato desses organismos passarem parte ou toda a sua vida no ambiente do solo. Além disso, as complexas interações físicas, químicas e biológicas que ali ocorrem, muitas vezes, impedem ou reduzem a eficiência de práticas que visem à sua eliminação. Embora nematóides sejam habitantes naturais dos solos, eles são prejudiciais a muitas culturas de interesse econômico, nas quais podem causar severos danos, especialmente em plantas que se propagam por mudas. Um exemplo disso é o cafeeiro, cuja lavoura é implantada no campo a partir de mudas formadas em viveiros. Esses organismos são capazes de prejudicar a formação da nova planta e ainda, ser disseminação de uma região para outra (Boneti *et al.*, 1982; Tronconi *et al.*, 1986).

O patossistema cafeeiro-*Meloidogyne exigua* merece destaque, não pela agressividade do nematóide, mas por ser a espécie mais disseminada nas regiões produtoras de café do Brasil, especialmente no sul de Minas Gerais (Campos *et al.*, 1985), Zona da Mata Mineira (Oliveira *et al.*, 2005) e Rio de Janeiro (Barbosa *et al.*, 2004).

Quando lavouras de café são formadas a partir de mudas infectadas por este nematóide, observa-se plantas com crescimento reduzido e queda de folhas, e algumas nem sobrevivem à estação seca durante a fase inicial de desenvolvimento da lavoura (Tronconi *et al.*, 1986). Dependendo do tipo de solo, cafeeiros adultos infectados podem sofrer intensa desfolha ou até chegar à morte (Campos *et al.*, 1990), ou apresentam perdas na produção variando entre 13 e 30%, quando estes se encontram com menos de cinco anos de idade, e superior à 45% naqueles com mais de cinco anos (Barbosa *et al.*, 2004).

Uma vez infestada a área, a erradicação do nematóide fica impossível pelas medidas de controle conhecidas. Dessa forma, o produtor deverá adotar estratégias de manejo que visem prevenir a introdução do patógeno em áreas indenidas e, para isto, é importante que sejam produzidas ou adquiridas mudas isentas de fitonematóides.

O Governo do Estado de Minas Gerais em 1995 criou a portaria N° 179/95, por intermédio do Instituto Mineiro de Agropecuária, que regulamenta a produção de mudas de cafeeiro fiscalizadas (Ima, 1995). Em 2007, o Governo Federal baixou uma portaria N° 114, regulamentando o comércio e trânsito de mudas em todo o território nacional (Mapa, 2007). Por estes documentos oficiais, exige-se que mudas de cafeeiro estejam livres de *Meloidogyne* spp.

Os viveiristas para atender a estes requisitos, usam solo de barranco ou terriço aliado ao tratamento químico. Os produtos químicos mais usados para o tratamento do substrato são o Metam sódio, Isotiocianato de metila e Brometo de metila (Duniway, 2002). O brometo de metila, principal fumigante usado no controle de nematóides, foi proibido mundialmente no ano de 1998 (Unep, 1998). De acordo com o Protocolo de Montreal, o Brometo de metila deveria ter sua produção e importação encerrada em 2005, nos países desenvolvidos e o seu fornecimento seria interrompido em 2015 nos países subdesenvolvidos. Após essa data, a previsão de uso será somente nos programas de quarentena. O Brasil antecipou a retirada do brometo do mercado em dezembro de 2006, ficando sua aplicação restrita para fins quarentenários (Mapa, 2005).

Plantas da família Brassicaceae são estudadas pelo potencial de controle sobre vários organismos fitopatogênicos. A incorporação de partes de brássicas ao substrato de cultivo visando ao controle de fitonematóides não é assunto recente e foi demonstrado por Ellenby (1945); Mojtahedi *et al.*, (1991) e Potter *et al.*, (1998). Mas, o uso de derivados de mostardas (*Brassica* spp.) para tratamento de substratos no sistema de produção de mudas é recente e resultados promissores foram relatados por Lima (2006) e Goulart (2007). O uso do óleo essencial e tortas de sementes de mostarda (*B. rapa*) resultou em níveis adequados de controle de diversos nematóides, com baixo impacto sobre organismos saprófitas e com ação nematicida constante, independente de variações na textura e umidade do substrato.

Para tornar prática a utilização de produtos da mostarda, alguns pontos ainda merecem ser elucidados, como por exemplo, a melhor forma

de aplicação e do tipo de produto no tratamento de substratos para formação de mudas saudáveis.

Pelos resultados obtidos com produtos oriundos de mostarda (*Brassica* spp.) até o presente, há indicações que estes poderão substituir o Brometo de metila. Contudo, há carência de informações sobre a tecnologia de aplicação de tais produtos, visando à sua utilização no tratamento de substratos para a produção de mudas isentas de nematóides.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma alternativa para a substituição dos fumigantes sintéticos é o uso de partes de plantas ou compostos bioativos derivados de plantas. Estes compostos, ou plantas que os contenham, podem ser utilizados como biopesticida ou material orgânico incorporado ao substrato (Akhtar & Alam, 1993).

A decomposição de certos tipos de materiais orgânico incorporado ao substrato, resulta na liberação de substâncias químicas voláteis, que podem atuar na eliminação ou controle de patógenos do solo, processo esse denominado biofumigação (Unep, 1998). Além disso, pode estimular a atividade microbiana, inclusive de microorganismos antagonistas aos nematóides (Bridge, 1996). Diversas plantas são conhecidas por apresentarem substâncias com efeito nematicida e, ou nematostático, entretanto, merecem destaque as plantas da família Brassicaceae, devido às potencialidades de seu uso no controle de nematóides parasitas de plantas (Duniway, 2002). Dentre estas plantas, vem sendo explorado o potencial biofumigante principalmente da mostarda (*Brassica juncea*, *B. nigra* e *B. rapa.*), do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), do brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e da couve (*B. oleracea* var. *acephala*) (Kirkegaard & Sarwar, 1998).

Nestas plantas, os glucosinolatos, compostos secundários, têm como função primária a defesa de tecidos atacados por insetos e patógenos. Doughty *et al.* (1991) avaliaram as alterações no conteúdo de

glucosinolatos de folhas de *Brassica* sp. inoculadas com *Alternaria brassicae* e observaram um acúmulo destes compostos durante a infecção do tecido vegetal. Durante a ação de defesa, os glucosinolatos entram em contato com a enzima mirosinase e são hidrolisados a grande quantidade de produtos tóxicos, incluindo isotiocianatos, nitrilas e tiocianatos (Fenwick *et al.*, 1983), assim o efeito tóxico dos glucosinolatos está ligado aos seus produtos de degradação biologicamente ativos (Brown & Morra, 1997).

Os glucosinolatos são grupos diversos de glucosídeos ( $\beta$ -D-tioglicosídeos) portadores de enxofre em suas cadeias, distinguindo-se um do outro pelas cadeias orgânicas laterais (grupo R) (Zasada & Ferris, 2003). Quando as células são rompidos os glucosinolatos, localizados no vacúolo de células (Poulton & Moller, 1993), entram em contato com a enzima mirosinase (EC 3.2.3.1), que é armazenada no citoplasma. Esta catalisa a hidrólise dos glucosinolatos em glucose e um intermediário instável que sofre rearranjo não enzimático para formar sulfato e isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas ou enxofre elementar dependendo da concentração de  $H^+$ , íons de metal, proteína epitioespecífica e/ou outros cofatores (Foo *et al.*, 2000).

Isotiocianatos (ITCs) são compostos voláteis e são o subproduto mais tóxico da hidrólise dos glucosinolatos (Brown & Morra, 1996; Smolinska *et al.*, 1997). Já foram identificados mais de 20 diferentes ITCs, dentre outros aleloquímicos potenciais, oriundos de *Brassica napus*, *B. hirta*, *B. campestris*, *B. juncea*, *B. nigra* e de outras. Cada espécie tem um perfil de glucosinolatos único, resultando correspondentemente em diferentes isotiocianatos (Brown & Morra, 1996; Brown *et al.*, 1991).

Pesquisas têm focado a sistemática da família Brassicaceae, buscando cultivares com altas concentrações de glucosinolatos e bons atributos agronômicos, para aumentar o potencial de biofumigação deste material ao ser incorporado ao solo (Kirkegaard & Sarwar, 1998). Busca-se também o conhecimento sobre os tipos, concentrações e distribuição dos glucosinolatos nas plantas (Kirkegaard & Sarwar, 1998; Kushad *et al.*, 2004), bem como o desenvolvimento de novos métodos para aumentar a ruptura das células dessas plantas e subseqüentemente ter uma maior liberação de ITCs (Morra & Kirkegaard, 2002).

Estudos sobre o efeito tóxico das plantas da família Brassicaceae sobre o controle de nematóides são realizados desde 1945 (Ellenby, 1945). A partir de então, poucos trabalhos foram realizados até o final da década de 80.

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*, após observarem que o glucosinolato sinigrina, na ausência da enzima mirosinase, não mostrou toxicidade em nenhuma concentração testada, mas quando aplicado com a enzima teve DL50 na dose de 0,5 µl/ml.

A incorporação de teores 0,1 µl/ml de 2-feniletil-isotiocianato no substrato resultou em 90 % de mortalidade do nematóide *Pratylenchus neglectus*, sugerindo que o 2-feniletil de plantas da família Brassicaceae tem importância no impacto supressivo de nematóides (Potter *et al.*, 1998).

Buskov *et al.* (2002), demonstraram a atividade nematicida das substâncias isoladas de *Brassica napus* para *Globodera rostochiensis*, nematóide de cisto da batata, obtendo 100% na mortalidade *in vitro* na dose de 1 µl/ml do isotiocianato.

Zasada & Ferris (2003) estudaram o efeito de diferentes ITCs em *Tylenchulus semipenetrans* e *Meloidogyne javanica*, e concluíram que os ITCs benzil (2-feniletil) e alil (2-propanil) isotiocianato foram os mais promissores no manejo de nematóides parasitas de plantas.

Em plantação de tomate em estufa, com a incorporação de repolho picado na dosagem de 5,2 Kg/m<sup>2</sup>, obteve redução de 54% da reprodução de *Nacobbus aberrans*, trabalhando no campo com dose de 3,25 Kg/m<sup>2</sup> obteve-se redução de 66% (Franco-Navarro *et al.*, 2002).

Brown & Morra (2005) recomendaram para uma biomassa ter uma eficiência aceitável, esta deve produzir acima de 1µl de ITC g<sup>-1</sup> de solo, comparando-se com os pesticidas sintéticos a base de ITCs já comercializados. Este fato ressalta a importância em se determinar a quantidade e eficiência de liberação dos ITCs no substrato.

Lima (2006) estudando o efeito de *B. rapa* na biofumigação de substrato infestado por *M. incognita*, observou 99% de redução no número de galhas, número de massas de ovos e número de ovos em plantas de

tomateiro em relação a testemunha utilizando 16 Kg de folha desidratada de mostarda por m<sup>3</sup> de solo. Com a torta das sementes a redução foi de 99,5% e 99,9% nas doses de 4 e 8 Kg/m<sup>3</sup>, respectivamente. Este autor também verificou que a mortalidade *in vitro* foi superior a 95% em juvenis de *Heterodera glycines*, *M. incognita*, *M. mayaguensis*, *M. javanica* e *M. exigua* utilizando a folha desidratada e tortas de sementes.

Na busca de implementar o uso de tortas em condições de viveiros de mudas, Goulart (2007) determinou que a dose de 2 Kg de torta por m<sup>3</sup> de substrato seria eficiente para controlar juvenis de *M. exigua*. Observou ainda que não havia diferença no teor de umidade e na textura do substrato quanto ao controle do nematóide, desde que a quantidade de água fosse suficiente para ocorrer a hidrólise dos glucosinolatos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M. & ALAM, M.M. Utilization of Waste Materials in Nematode Control - a Review. *Bioresource Technology*. 45:1-7. 1993.
- BARBOSA, D.H.S.G., VIEIRA, H.D., SOUZA, R.M., VIANA, A.P. & SILVA, C.P. Estimativas a campo de perdas de produção e níveis de dano em lavouras cafeeiras afetadas por *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*. 28:49-54. 2004.
- BONETI, J.I.S., FERRAZ, S., BRAGA, J.M. & OLIVEIRA, L.M. Influência do parasitismo de *Meloidogyne exigua* sobre absorção de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn e B) e sobre o vigor de mudas de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*. 7:197-207. 1982.
- BRIDGE, J. Nematode Management in Sustainable and Subsistence Agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 34:201-225. 1996.
- BROWN, J. & MORRA, M.J. 2005. Glucosinolate-Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests: 2000-2002. In Other Information: PBD: 1 Jul 2005; Related Information: Work performed by University of Idaho, Moscow, Idaho.
- BROWN, P.D. & MORRA, M.J. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. *Plant and Soil*. 181:307-316. 1996.
- BROWN, P.D. & MORRA, M.J. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy*, Vol 61. 61:167-231. 1997.
- BROWN, P.D., MORRA, M.J., MCCAFFREY, J.P., AULD, D.L. & WILLIAMS, L. Allelochemicals Produced during Glucosinolate Degradation in Soil. *Journal of Chemical Ecology*. 17:2021-2034. 1991.
- BUSKOV, S., SERRA, B., ROSA, E., SORENSEN, H. & SORENSEN, J.C. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates

in myrosinase catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:690-695. 2002.

CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode Parasites of *Coffee, Cocoa* and *Tea*. In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. C.A.B International. 1990. pp. 387-430.

CAMPOS, V.P., LIMA, R.D. & ALMEIDA, V.F. Nematóides parasitos do cafeeiro. Informe Agropecuário. 11:50-58. 1985.

DONKIN, S.G., EITEMAN, M.A. & WILLIAMS, P.L. Toxicity of Glucosinolates and Their Enzymatic Decomposition Products to *Caenorhabditis elegans*. Journal of Nematology. 27:258-262. 1995.

DOUGHTY, K.J., PORTER, A.J.R., MORTON, A.M., KIDDLE, G., BOCK, C.H. & WALLSGROVE, R. Variation in the Glucosinolate Content of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Leaves .2. Response to Infection by *Alternaria brassicae* (Berk) Sacc. Annals of Applied Biology. 118:469-477. 1991.

DUNIWAY, J.M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. Phytopathology. 92:1337-1343. 2002.

ELLENBY, C. Control of the Potato-Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, by Allyl Isothiocyanate, the Mustard Oil of *Brassica nigra* L. Annals of Applied Biology. 32:237-239. 1945.

FENWICK, G.R., GRIFFITHS, N.M. & HEANEY, R.K. Bitterness in Brussels-Sprouts (*Brassica oleracea* L. Var Gemmifera) - the Role of Glucosinolates and Their Breakdown Products. Journal of the Science of Food and Agriculture. 34:73-80. 1983.

FOO, H.L., GRONNING, L.M., GOODENOUGH, L., BONES, A.M., DANIELSEN, B.E., WHITING, D.A. & ROSSITER, J.T. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic

intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *Febs Letters*. 468:243-246. 2000.

FRANCO-NAVARRO, F., DEL PRADO-VERA, I.C., ZAVALA-MEJIA, E. & SANCHEZ-GARCIA, P. Application of organic amendments for the management of *Nacobbus aberrans* on tomato. *Nematropica*. 32:113-124. 2002.

GOULART, R.R. Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do substrato, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2007.

IMA. 1995. Instituto Mineiro de Agropecuária. PORTARIA Nº 179/95, DE 12 DE JULHO DE 1995. Disponível em:<[http://www.ima.mg.gov.br/site\\_ima/legislacao/portarias\\_pdf/0179.pdf](http://www.ima.mg.gov.br/site_ima/legislacao/portarias_pdf/0179.pdf)> Acesso 10 janeiro de 2008.

KIRKEGAARD, J.A. & SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil*. 201:71–89. 1998.

KUSHAD, M.M., CLOYD, R. & BABADOOST, M. Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Scientia Horticulturae*. 101:215-221. 2004.

LIMA, A. O. Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de substrato no controle de *Meloidogyne incognita*, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2006.

MAPA. 2005. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 19, DE 7 DE JULHO DE 2005. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12412>> Acesso 25 setembro de 2007.

MAPA. 2007. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. PORTARIA Nº 114, DE 7 DE NOVEMBRO DE 2007. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18189>> Acesso 10 JANEIRO de 2008.

MOJTAHEDI, H., SANTO, G.S., HANG, A.N. & WILSON, J.H. Suppression of Root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. *Journal of Nematology*. 23:170-174. 1991.

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

OLIVEIRA, D.S., OLIVEIRA, R.D.L., FREITAS, L.G. & SILVA, R.V. Variability of *Meloidogyne exigua* on coffee in the Zona da Mata of Minas Gerais state, Brazil. *Journal of Nematology*. 37:323-327. 2005.

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

POULTON, J.E. & MOLLER, B.L. Glucosinolates. Lea, J. P. (ed.). In: *Methods in Plant Biochemistry*. London. Academic Press. 1993. pp. 209-237.

SMOLINSKA, U., MORRA, M.J., KNUDSEN, G.R. & BROWN, P.D. Toxicity of Glucosinolate Degradation Products from *Brassica napus* Seed Meal Toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*. *Phytopathology*. 87:77-82. 1997.

TRONCONI, N.M., FERRAZ, S., SANTOS, J.M. & REGAZZI, A.J. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. *Nematologia Brasileira*. 10:69-83. 1986.

UNEP. Montreal Protocol on Substances that deplete the ozone layer : United Nations Environment Programme. Methyl bromide technical options committee. Assessment of Alternative to Methyl Bromide. 1998.

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

# CAPÍTULO 1

## **MÉTODOS DE APLICAÇÃO DA TORTA E DO ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA EM SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE CAFEIRO**

## INTRODUÇÃO

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 são causadores de galhas radiculares e constituem um dos grupos de patógenos de maior importância econômica para a agricultura. Ocorrem em todo o mundo, e freqüentemente são encontrados em regiões de clima tropical ou subtropical, em locais de inverno curto ou moderado (Agrios, 2005). Em todo o mundo são estimadas perdas médias anuais de 12,3% na produtividade das principais culturas (Sasser & Freckman, 1987).

O ataque de nematóides fitoparasitas é mais problemático para as plantas no estágio de muda, no qual grande número de plântulas morre no canteiro e outras nem resistem ao transplântio (Netscher & Sikora, 1990). Além disso, a sanidade das mudas no sistema de produção é importante, pois, estas se constituem na principal forma de disseminação de nematóide. Na década de 70, mais de três milhões de mudas de café destinadas ao transplântio, no Estado de São Paulo (Gonçalves *et al.*, 1978), e mais de cinco milhões no Paraná (Jaehn *et al.*, 1977) foram destruídas por estarem infectadas com *Meloidogyne incognita*. Em Minas Gerais, não se tem dados recentes acerca da destruição de viveiros contaminados, mas o programa de fiscalização de mudas é contínuo e abrangente.

Uma vez infestada a área, a erradicação do nematóide fica, praticamente impossível pelas medidas de controle conhecidas. Dessa forma, o produtor deverá adotar estratégias de manejo que visem prevenir a introdução do patógeno em áreas não infestadas, e para isto, é importante que sejam produzidas ou adquiridas mudas isentas de fitonematoides.

O governo do Estado de Minas Gerais em 1995, por intermédio do IMA, editou a portaria N° 179/95, que regulamenta a produção de mudas de café fiscalizadas. Esta portaria proíbe a comercialização de mudas contaminadas com *Meloidogyne* spp. (Ima, 1995). Similarmente, o Governo Federal reeditou uma portaria proibindo o comércio e trânsito de mudas contaminadas com *Meloidogyne* spp. no território nacional (Mapa, 2007).

Os produtores de mudas para atender a estes requisitos usaram por anos, substrato de barranco ou terriço aliado ao tratamento químico, para garantir a sanidade das mudas. Dentre os produtos químicos usados para o tratamento do substrato estão o Metam sódio, Isotiocianato de metila e Brometo de metila (Duniway, 2002). O brometo de metila, principal fumigante usado no controle de nematóides, foi proibido mundialmente no ano de 1998 (Unep, 1998). De acordo com o Protocolo de Montreal, o Brometo de metila teve sua produção e importação encerrada em 2005, nos países desenvolvidos e o seu fornecimento deverá ser interrompido em 2015 nos países subdesenvolvidos. O Brasil antecipou a retirada deste produto do mercado, fato previsto para dezembro de 2006, ficando sua aplicação restrita para fins quarentenários (Mapa, 2005).

Essa realidade tem estimulado a pesquisa de estratégias de controle alternativo para os fitonematóides, que sejam menos danosas ao homem e ao ambiente, para o manejo destes em áreas de cultivo protegido e no tratamento de substratos visando à produção de mudas em viveiros comerciais (Duniway, 2002).

Uma alternativa para a substituição dos fumigantes sintéticos é o uso de partes de plantas ou compostos bioativos derivados de plantas. Estes compostos, ou plantas que os contenham, podem ser utilizados como biopesticida ou material orgânico incorporado ao substrato (Akhtar & Alam, 1993).

A decomposição de certos materiais orgânicos incorporados ao substrato resulta na liberação de substâncias químicas voláteis, atuando no controle de patógenos do substrato, processo esse denominado biofumigação (Unep, 1998). Além disso, pode estimular a atividade microbiana, inclusive de microorganismos antagonistas aos nematóides (Bridge, 1996).

Dentre estas plantas, tem-se explorado o potencial biofumigante principalmente das Brassicaceae como a mostarda (*Brassica rapa*; *B. nigra*; *B. juncea*), o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), o brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e a couve (*B. oleracea* var. *acephala*) (Kirkegaard & Sarwar, 1998). A mostarda é uma planta originária da Europa meridional e se encontra dispersa em regiões de clima temperado e subtropical, no

período do inverno e primavera. A incorporação de material vegetal oriundo de brássicas resultou no controle de nematóides conforme dados de Franco-Navarro *et al.* (2002), cuja dosagem de repolho a 5,2 Kg/m<sup>2</sup> resultou na redução de 54% de *Nacobbus aberrans*. *Brassica napus* controlou *M. chitwoodi* (Mojtahedi *et al.*, 1993), e doses de 20 Kg/m<sup>3</sup> de matéria seca de várias brássicas atuaram no controle de vários nematóides (Potter *et al.*, 1998). Resultados satisfatórios também foram encontrados no controle de fungos de substrato, *Fusarium oxysporum* (Smolinska *et al.*, 2003), *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. (Chung *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2005), sementes de plantas invasoras (Brown & Morra, 1996) e bactérias (Charron *et al.*, 2002).

No Brasil, *Brassica rapa* é estudada visando o controle de fitonematóides, fungos e insetos. Resultados promissores foram obtidos com a mortalidade de *Heterodera glycines*, *M. incognita*, *M. mayaguensis*, *M. javanica* (Lima, 2006) e *M. exigua* (Goulart, 2007). Dados de Schurt (2006) mostraram a sua eficiência no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Em grãos armazenados, a aplicação de produto oriundo da mostarda resultou em controle de *Sitophilus zeamais* (Campos *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2006).

Donkin *et al.* (1995) confirmaram que o efeito tóxico das plantas da família Brassicaceae é devido aos isotiocianatos, após avaliar a mortalidade de *Caenorhabditis elegans*, e que o glucosinolato sinigrina, depois de ser hidrolisado, apresentava DL50 na dose de 0,5 µl/ml.

Vários são os produtos da hidrólise de glucosinolatos e estes atuam como os ingredientes ativos contra os diferentes organismos. Zasada & Ferris (2003) estudaram o efeito de diferentes ITCs sobre *Tylenchulus semipenetrans* e *Meloidogyne javanica*, e concluíram que os ITCs benzil (2-feniletil) e alil (2-propanil) isotiocianato foram os mais promissores no manejo de nematóides parasitas de plantas. A dose de de 0,1 µl/ml de 2-feniletil-isotiocianato resultou em controle dos nematóides *Pratylenchus neglectus* (Potter *et al.*, 1998) e *Globodera rostochiensis* (Buskov *et al.*, 2002).

Os trabalhos supracitados foram realizados *in vitro* ou com a incorporação das brássicas ao substrato de forma homogênea, o que

dificulta sua utilização na rotina do viveiro. Nas literaturas consultadas, nada foi encontrado sobre tecnologia de aplicação dos produtos oriundos das brássicas, e assim o objetivo deste trabalho foi testar as formas de aplicação da torta e do óleo de mostarda no tratamento de substrato para produção de mudas saudáveis, usando como patossistema o cafeeiro e *M. exigua*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Obtenção e multiplicação do inóculo

A população original de *Meloidogyne exigua* foi multiplicada em cafeeiro cv. Catuaí, em casa de vegetação. Para a sua multiplicação, os ovos foram extraídos, seguindo Boneti & Ferraz (1981): raízes infectadas foram lavadas, cuidadosamente, sob água corrente para retirar as partículas de substrato aderidas à sua superfície, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm, trituradas em liquidificador com uma solução de NaOCl à concentração de 0,5% por 15 a 20 segundos. Os ovos foram recolhidos em peneira de “500 mesh” (abertura de 0,025 mm) após a passagem da suspensão por uma peneira de 200 “mesh” (abertura de 0,074 mm). A suspensão de ovos foi calibrada para a concentração de 1000 ovos/mL após contagem em câmara de Peters.

Para a multiplicação do inóculo, plantas de pimentão (*Capsicum frutescens*) com dois a três pares de folhas foram escolhidas por serem boas hospedeiras de *M. exigua*, apresentarem ciclo rápido com alta taxa reprodutiva e facilidade de manutenção das plantas em casa de vegetação (Silva *et al.*, 2006). As mudas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade de dois litros, contendo uma mistura de substrato e areia na proporção de 2:1 previamente tratada com Brometo de metila. Decorrida uma semana do transplante, foi realizada a inoculação, adicionando-se 5 mL da suspensão de ovos, com o auxílio de uma pipeta, em quatro orifícios com profundidade de aproximadamente 3 cm, feitos ao redor das plantas.

As plantas utilizadas para a multiplicação do nematóide e realização dos ensaios foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, recebendo os tratamentos culturais necessários ao desenvolvimento das mesmas, de acordo com as recomendações técnicas para a cultura.

## 2. Obtenção da torta e do óleo de mostarda

De plantas de mostarda (*Brassica rapa*) cultivadas no município de Monte Alto/SP na fazenda São João, no ano de 2006, obteve-se a torta moendo-se as sementes e extraído-se os compostos lipídicos com solvente orgânico apolar. O óleo essencial (90% isotiocianato de alila) foi obtido comercialmente da indústria alimentícia.

## 3. Substrato utilizado nos ensaios

O substrato utilizado nos ensaios foi preparado a partir de uma mistura de substrato argiloso e areia na proporção 2:1, previamente tratado com Brometo de metila, na dosagem de 100 cc/m<sup>3</sup> de substrato. Foi realizada a análise química e física deste substrato (tabelas 1 e 2) visando à determinação da umidade e adubação necessárias às plantas durante a condução do ensaio.

Tabela 1 – Análise química do substrato (substrato:areia 2:1).

	<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca<sup>++</sup></b>	<b>Mg<sup>++</sup></b>	<b>MO</b>
	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>		cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>		dag/Kg
<b>Substrato</b>	5,01	87,7	30	1,59	0,08	0,52

pH em água, KCl e CaCl<sub>2</sub> - Relação 1:2,5, P-K - Extrator Mehlich 1, Ca - Mg -Al - Extrator: KCl - 1 mol/L - pH 7,0 e Mat. Org. (MO) = C. Org x 1,724 - Walkley-Black.

Tabela 2 – Análise granulométrica e classe textural do substrato (substrato:areia 2:1)

	<b>Areia Grossa</b>	<b>Areia Fina</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>	<b>Classe Textural</b>
	dag/Kg				
<b>Substrato</b>	60	5	1	34	Franco-Argilo-Arenosa

#### 4. Alcance dos voláteis originados da aplicação de torta e óleo de mostarda na mortalidade de *Meloidogyne exigua*.

Para o estudo da difusão de gases oriundos da torta e do óleo de mostarda utilizaram-se tubos de PVC de 100 mm de diâmetro e 400 mm de comprimento, preenchidos com substrato e umedecido para 60 % da capacidade de campo. O volume de água colocado para atingir esta umidade foi determinado através da curva de retenção de água deste substrato. A dose da torta e do óleo foi de 2 Kg/m<sup>3</sup> de substrato e 100 mL/m<sup>3</sup> respectivamente, efetuando-se a aplicação localizada em uma extremidade do tubo. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e três repetições, constituiu-se a unidade experimental um tubo de PVC. Os tratamentos foram constituídos da direção de difusão dos gases: horizontal, vertical ascendente e descendente. Considerou-se vertical ascendente quando o tubo estava em pé e a torta ou óleo estavam na parte inferior, e vertical descendente quando a torta ou óleo estavam na parte superior. Uma cápsula, preparada com membrana para filtro Millipore® (0,45 µm) contendo 1000 ovos de *M. exigua* no seu interior, foi distribuída a cada 10 cm nos tubos, que foram lacrados com tampas apropriadas e envolvidos em filme de PVC. Após cinco dias, as cápsulas foram retiradas registrando-se as suas respectivas posições. Estas foram abertas e colocadas em funil de Baermann por 48 horas, para recuperação de juvenis ativos. Os juvenis recuperados foram contados com auxílio de microscópio estereoscópico e calculou-se o percentual de mortalidade dos juvenis em relação à testemunha.

## **5. Efeito de formas de aplicação da torta em substratos para o controle de *Meloidogyne exigua*.**

Quarenta litros do substrato foram infestados com ovos de *M. exigua* na proporção de 1000 ovos por litro de substrato, com ajuda de uma betoneira. A umidade do substrato foi ajustada para aproximadamente 60 % da capacidade de campo, como descrito anteriormente. Em seguida, o substrato foi transferido para uma caixa (dimensões 60 x 40 x 20 cm) forrada com lona plástica preta, onde se procedeu a aplicação da torta de mostarda na dose de 2 Kg/m<sup>3</sup> de substrato. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco tratamentos. A unidade experimental foi constituída de cada caixa. Os tratamentos foram aplicação localizada (um ponto), aplicação em quatro pontos, aplicação em sulco longitudinal, aplicação em sulcos longitudinal e transversal e testemunha, sem aplicação (figura 1). Posteriormente, a caixa foi virada no chão coberto com lona plástica e as bordas da lona foram vedadas com substrato, para que os gases oriundos da hidrólise dos glicosinolatos não se perdessem para atmosfera. O tempo de biofumigação foi de cinco dias, deixando-se o substrato aberto por mais 24 horas, quando foi distribuído em seis vasos plásticos com capacidade de cinco litros, que receberam uma muda de pimentão com dois pares de folhas/vaso. Mudanças de pimentão foram usadas como planta indicadora pela sua rapidez de desenvolvimento e suscetibilidade ao nematóide (Silva *et al.*, 2008). A avaliação foi realizada aos 60 dias após o transplante e consistiu da contagem do número de galhas e ovos por sistema radicular.

Durante a condução do ensaio, a média das temperaturas máximas do ar foi de 30,2 °C e das mínimas, 13,3 °C.

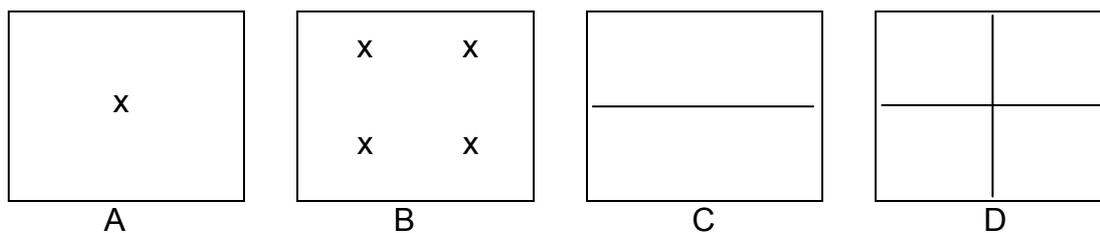


Figura 1 – esquema representativo das formas de aplicação de produtos oriundos da mostarda (A - aplicação localizada, B - aplicação em quatro pontos, C - aplicação em sulco longitudinal, D - aplicação em sulcos longitudinal e transversal).

## 6. Efeito das formas de aplicação do óleo essencial de mostarda em substratos para o controle de *Meloidogyne exigua*.

A metodologia neste ensaio foi igual a do item 5, variando-se apenas o produto, que foi o óleo essencial de mostarda na dose de 100 mL/m<sup>3</sup> de substrato.

Durante a condução do ensaio, a média das temperaturas máximas do ar foi de 30,9 °C e das mínimas, 14,5 °C.

## 7. Uso da formulação em cilindro de papel embebido com óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne exigua*.

Quinhentos litros do substrato foram infestados com ovos de *M. exigua* conforme descrito no item 5. Em seguida o substrato foi transferido para chão coberto com lona plástica preta formando um monte na dimensão 110 x 150 x 30 cm. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições e três tratamentos. Os tratamentos foram: cilindro de papel embebido com óleo de mostarda na dose de 100 mL/m<sup>3</sup> de substrato, brometo de metila 100 cc/m<sup>3</sup> de substrato e testemunha sem aplicação. O cilindro tinha dimensão de 19 cm de comprimento por 0,8 cm de diâmetro e foi impregnado com um mL de óleo de mostarda. No monte foram colocados 50 bastões no espaçamento 15 x

10 cm, para atingir a concentração final de 100 mL/m<sup>3</sup> de substrato. Demais procedimentos seguiram a metodologia do item 5.

Durante a condução do ensaio, as médias das temperaturas máximas e mínimas do ar foram de 31,4 e 18,5 °C, respectivamente.

#### **8. Efeito das concentrações do óleo essencial de mostarda em três tempos de fumigação no controle de *Meloidogyne exigua*.**

Quarenta litros do substrato foram infestados com ovos de *M. exigua*, como no item 5. Em seguida o substrato foi transferido para um saco plástico com capacidade de 60 litros, onde se procedeu a incorporação do óleo essencial de mostarda nas doses de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mL/m<sup>3</sup> de substrato e os sacos foram vedados. O experimento foi montado em esquema fatorial com seis doses do óleo e três tempos de fumigação, 5, 10 e 15 dias. O delineamento usado foi o inteiramente casualizado, com 8 repetições. Demais procedimentos seguiram a metodologia do item 5.

Durante a condução do ensaio, as médias das temperaturas máximas e mínimas do ar foram de 32,7 e 18,2 °C, respectivamente.

#### **9. Análise estatística.**

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de normalidade (teste de Liliefors), homogeneidade (teste de Cochran e Bartlett), análise de variância e teste de média quando necessário (Teste de Tukey) no programa SAS (Versão 9.0).

O ensaio de doses com diferentes tempos de fumigação não atendeu aos requisitos dos testes de normalidade e homogeneidade, mesmo depois de algumas transformações, e foram usados os dados originais para análise.

## RESULTADOS

### 1. Alcance dos voláteis originados da aplicação de torta e óleo essencial de mostarda na mortalidade de *Meloidogyne exigua*.

O alcance dos gases no substrato no sentido horizontal foi eficiente até 30 cm, para a torta e o óleo de mostarda (Figura 2). O percentual de controle com base na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. exigua* até os 30 cm foi praticamente 100%, caindo drasticamente para 36 e 10% para o óleo e a torta, respectivamente, a 40 cm de difusão horizontal.

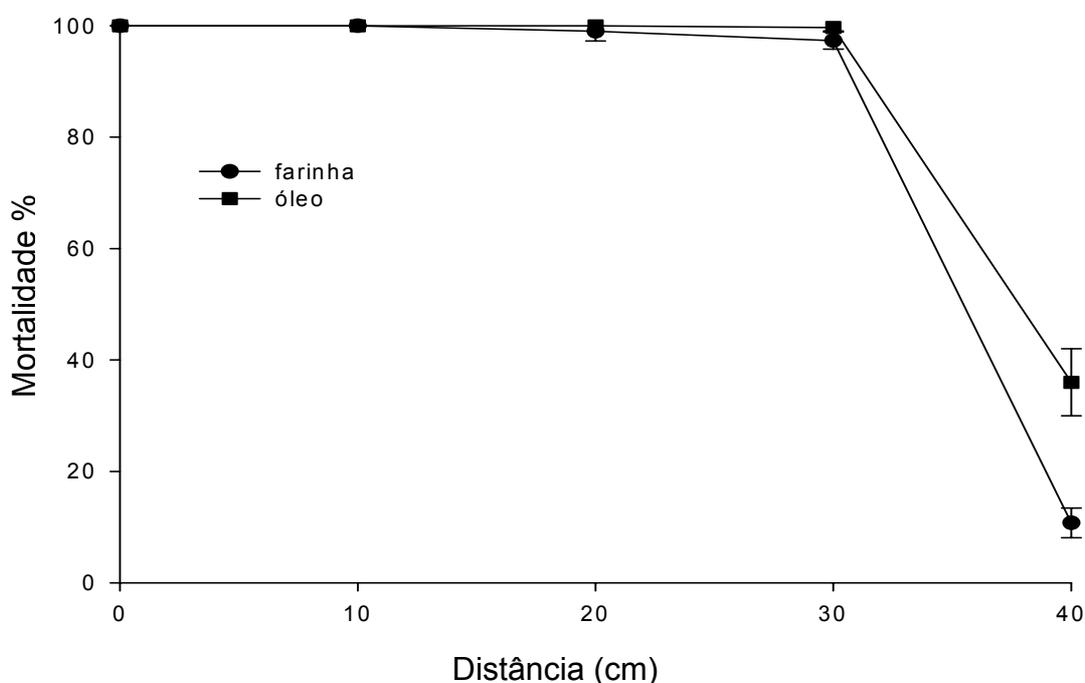


Figura 2 – Alcance dos gases de Isotiocianato de alila na horizontal, em cm, e percentual de mortalidade de juvenis de *Meloidogyne exigua*. Barras representam desvio padrão.

O percentual de mortalidade dos J2 de *M. exigua*, na vertical foi maior para o óleo de mostrada, tanto para o alcance ascendente quanto descendente, quando comparado com a torta. Na direção ascendente até 30 cm, os dois produtos apresentaram eficiência de praticamente 100 %

(Figura 3). À 40 cm, o óleo apresentou eficiência de 50 %, mas a torta não apresentou nenhuma atividade contra os juvenis. No sentido descendente, o óleo apresentou uma maior difusão dos gases, já que nas distâncias estudadas o controle de J2 foi superior à 75 %, e atingiu 100 % quando avaliado até 20 cm de profundidade. Com a torta, a partir de 10 cm de profundidade, o percentual de controle foi de 38 %, e caiu linearmente até 40 cm, onde o controle foi de 10 %.

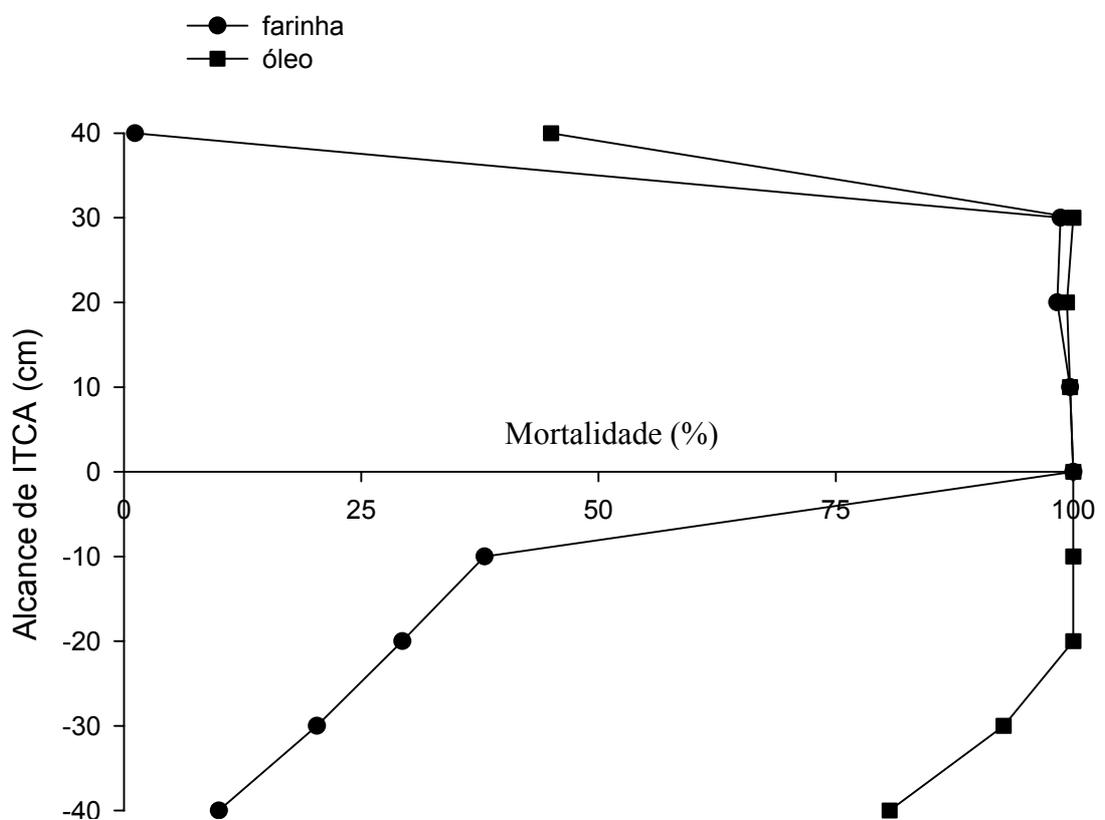


Figura 3 – Alcance dos gases de Isotiocianato de alila (ITCA) na vertical ascendente e descendente, em cm, e percentual de controle de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*.

## 2. Efeito das formas de aplicação da torta em substratos para o controle de *Meloidogyne exigua*.

A aplicação localizada da torta (um ponto central) resultou em um número médio de galhas e de ovos de 43 e 2613 respectivamente, o que diferiu significativamente da testemunha (Tabela 3), mas não diferiu da aplicação de quatro pontos. Na aplicação em sulco longitudinal, não houve diferença no número médio de galhas e ovos em relação à aplicação em quatro pontos. A aplicação em sulcos longitudinal e transversal resultou em eficiência de 100% na mortalidade dos juvenis no substrato, pois plantas cultivadas no substrato não exibiram galhas nem produção de ovos pelo nematóide.

**Tabela 3** - Número médio de galhas e ovos em cada planta de pimentão cultivadas em substratos infestados com *Meloidogyne exigua* e tratados com torta de mostarda sob diferentes formas de aplicação

Tratamentos	Nº de galhas	Nº de ovos
Testemunha	69,13 a	8877,10 a
Aplicação localizada	43,00 b	2613,30 b
Aplicação em quatro pontos	34,00 bc	2210,60 b
Aplicação em sulco longitudinal	29,75 c	1779,40 b
Aplicação em sulco longitudinal e transversal	0,00 d	0,00 c

Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C.V. = 23,95%.

## 3. Efeito das formas de aplicação do óleo essencial de mostarda em substratos para o controle de *Meloidogyne exigua*.

Quanto ao número de galhas causadas por *M. exigua* não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as formas aplicação, mas esses diferiram da testemunha (Tabela 4). Similarmente, o número de ovos também não diferiu entre os tratamentos.

**Tabela 4** - Número médio de galhas e ovos por planta de pimentão, cultivadas em substratos infestados com *Meloidogyne exigua* e tratados com óleo essencial de mostarda, sob diferentes formas de aplicação

<b>Tratamentos</b>	<b>N° de galhas</b>	<b>N° de ovos</b>
Testemunha	140,83 a	6890,90 a
Aplicação localizada	0,00 b	0,00 b
Aplicação em quatro pontos	0,21 b	6,5 b
Aplicação em sulco longitudinal	0,00 b	0,00 b
Aplicação em sulcos longitudinal e transversal	0,00 b	0,00 b

Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C.V. = 20,78%.

#### **4. Uso da formulação em cilindro de papel embebido com óleo essencial de mostarda para o controle de *Meloidogyne exigua*.**

Não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre o tratamento do substrato com cilindro impregnado com óleo de mostarda e o brometo de metila, no que diz respeito à infectividade e reprodução do nematóide (Tabela 5), mas diferiram da testemunha. Ambos resultaram em 100% de controle dos juvenis infectivos de *M. exigua* presentes no substrato.

**Tabela 5** - Número médio de galhas e ovos por planta de pimentão cultivada em substratos infestados com *Meloidogyne exigua* e tratados com óleo de mostarda ou brometo de metila

<b>Tratamentos</b>	<b>N° de galhas</b>	<b>N° de ovos</b>
Testemunha	153,00 a	7729,10 a
Cilindro de papel	0,00 b	0,00 b
Brometo de metila	0,00 b	0,00 b

Média de 2 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem significativamente pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ). C.V. = 30,91%.

#### **5. Efeito das concentrações do óleo essencial de mostarda em três tempos de fumigação no controle de *Meloidogyne exigua*.**

A interação doses X tempo de fumigação foi não significativa. O eficiente controle exercido pelo produto tornou impossível ajustar qualquer modelo de regressão, por que em muitos tratamentos não houve detecção

de nematóides. Nas doses de 20 e 40 mL/m<sup>3</sup> do óleo de mostarda não houve redução no número de galhas e ovos em relação à testemunha, em nenhum tempo de fumigação (Figuras 4 e 5). Na dose de 60 mL/m<sup>3</sup> do óleo de mostarda houve uma redução de aproximadamente 65 e 50% no número de galhas e ovos no tempo de fumigação de 5 dias, mas foi de 100% aos 10 e 15 dias de fumigação. Nas doses de 80 e 100 mL/m<sup>3</sup>, independente do tempo de fumigação, observou-se uma redução de 100 % para o número de galhas e ovos por sistema radicular.

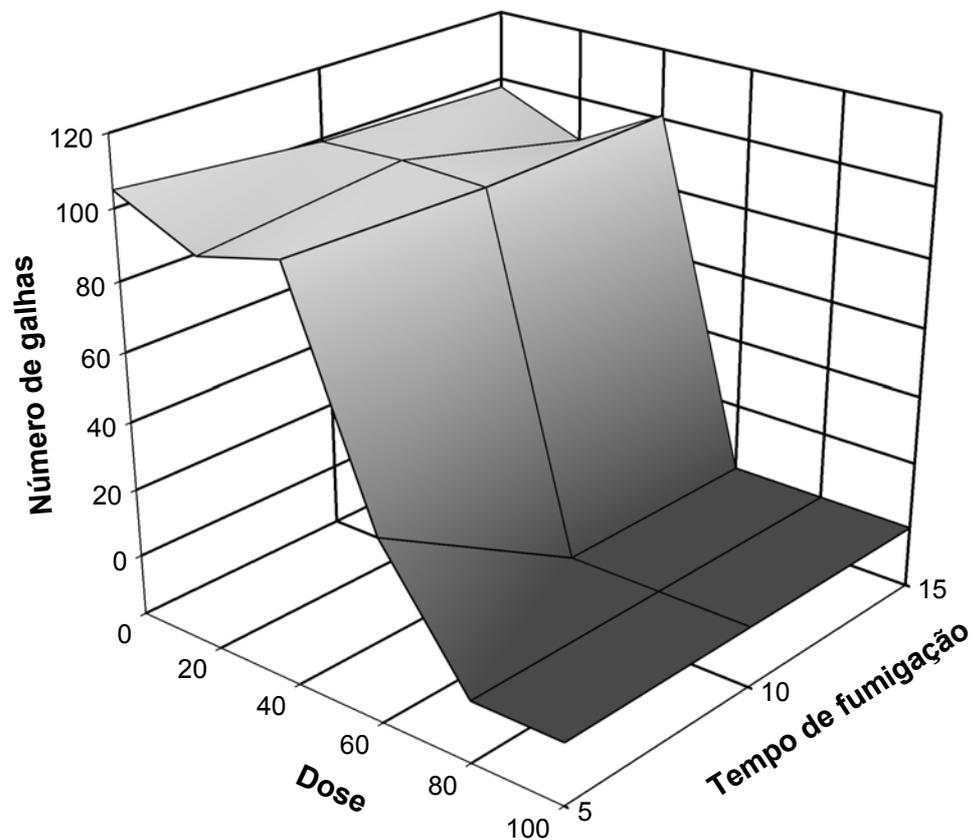


Figura 4 – Número de galhas de *Meloidogyne exigua* por planta cultivada em substrato tratado com doses do óleo essencial de mostarda sob diferentes períodos de fumigação.

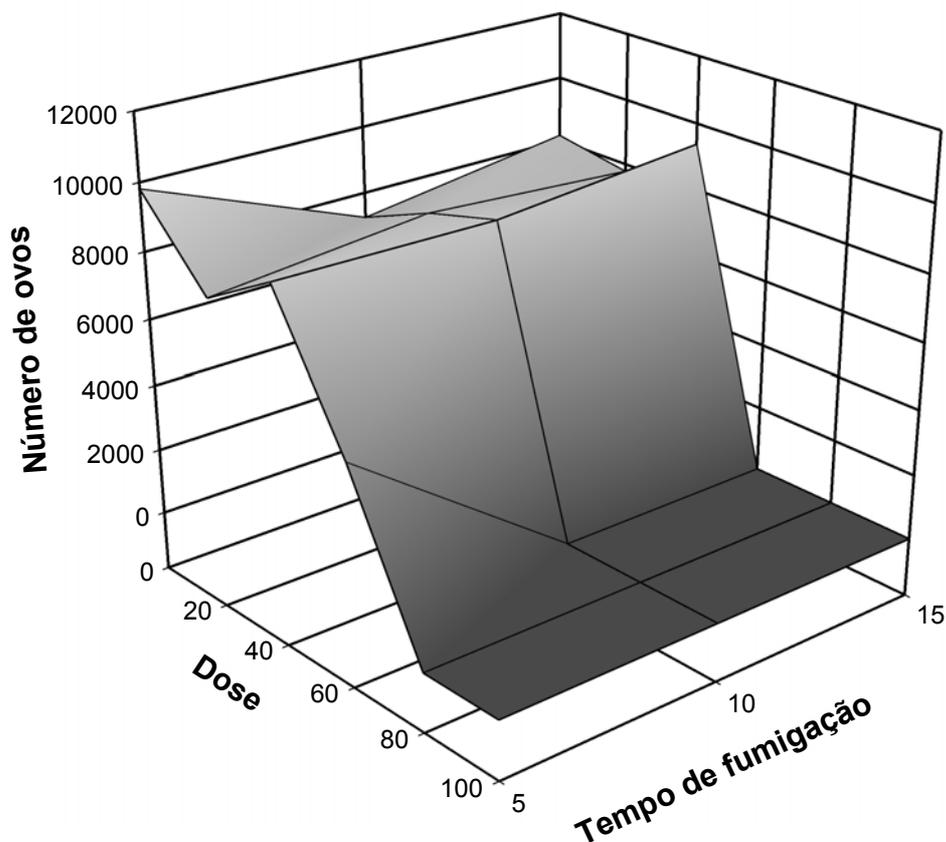


Figura 5 – Número de ovos de *Meloidogyne exigua* por planta cultivada em substrato tratado com doses do óleo essencial de mostarda sob diferentes períodos de fumigação.

## DISCUSSÃO

No geral, o alcance dos vapores oriundos do óleo essencial de mostarda foi maior que os da torta. No sentido horizontal e vertical ascendente, ambos os produtos, óleo e torta, tiveram alcance até 30 cm, com eficiência de praticamente 100% na mortalidade dos juvenis de *M. exigua*. Mas, a partir dessa distância, e comparando-se também o alcance no sentido vertical descendente, o óleo sobressaiu-se. Esta diferença na difusão dos gases se deve provavelmente à concentração do isotiocianato de alila, já que no óleo a concentração ITCA é 50% maior em relação à torta (veja dados obtidos no segundo capítulo). Há estudos que mostram

que o alcance pode ser até maior que o detectado numa determinada profundidade, mas a concentração do ingrediente ativo ali presente pode não ser suficiente para se obter níveis satisfatórios de controle. Por exemplo, Mignard & Benet (1989) observaram que o aumento na concentração do brometo de metila no substrato aumentava a difusão no sentido vertical descendente. Com a dose de 100 cc/m<sup>3</sup> de substrato, o gás atingia até 30 cm de profundidade, de forma a exercer controle efetivo. Mas, a partir desta profundidade, eles não obtiveram eficiência no controle de patógenos de substrato.

Em estudos com a incorporação de tecidos de *B. oleracea*, no controle de *M. incognita*, foi observado que o alcance dos gases teve efeito até 10 cm no sentido vertical descendente (Roubtsova *et al.*, 2007). Já Schurt (2006) observou que o óleo de mostarda podia se difundir até 15 cm, alcance menor que o obtido neste trabalho. Provavelmente esta diferença está relacionada com o tempo de fumigação, onde este autor avaliou a difusão após 24 h da aplicação do óleo e neste trabalho o tempo de fumigação utilizado foi de 5 dias, assim os gases teriam mais tempo para se difundir no substrato. Como o alcance dos gases tóxicos é relativamente pequeno os autores sugeriram incorporar homogêneo o material ao substrato para se ter eficiência de controle aceitável. Quando se trata da incorporação de resíduos da planta, o volume a ser incorporado é maior, o que facilita a sua distribuição na área a ser tratada. Mas, a incorporação da torta e do óleo de mostarda ao substrato de forma homogênea é difícil, pois a quantidade a ser utilizada no tratamento de substratos é reduzida. Uma forma de elevar a eficiência de controle de nematóides pelo uso desses fumigantes naturais seria promover a sua mais ampla distribuição no volume de substrato a ser tratado, mas procurando adequar também a praticidade de aplicação.

Considerando as formas de aplicação, seja da torta seja do óleo, observou-se que havia diferença na eficiência de controle. Como se têm diferentes alcances no substrato para serem atingidos pelas substâncias voláteis, já era de se esperar que a aplicação mais distribuída dos produtos resultaria em melhor eficiência. Na aplicação em sulco longitudinal, o volume de substrato a ser ocupado pelos gases seria de 24000 cm<sup>3</sup>, mas

seria de 12000 cm<sup>3</sup> na aplicação em quatro pontos e aplicação em sulcos longitudinal e vertical. Já na aplicação localizada num único ponto, o volume de substrato que os gases tinham que preencher era de 48000 cm<sup>3</sup>. Presumiu-se, assim, que a aplicação em quatro pontos e em sulcos longitudinal e transversal teria a mesma eficiência, entretanto, tal fato não ocorreu. Provavelmente, o alcance e a distribuição dos gases são menores na aplicação de quatro pontos devido aos gases partirem de cada um desses pontos. Já na aplicação em sulcos os gases têm origem em vários pontos ao longo dos sulcos, e assim a distância que o gás teria a percorrer na aplicação em quatro pontos é maior, e este não foi eficiente em ocupar todo o volume de substrato. Este mesmo raciocínio vale para a aplicação localizada, pois a distância seria ainda maior, já que o volume de substrato é também maior.

Na avaliação do óleo essencial de mostarda nos cilindros de papel embebido, não foi observada diferença de eficiência em comparação com o brometo de metila. Ambos os produtos resultaram em 100% de controle dos juvenis de *M. exigua* no substrato.

Como observado no ensaio de difusão, os gases do óleo tiveram maior eficiência de controle na distância de 40 cm. Assim ao preparar o substrato para o tratamento deve-se atentar para a distribuição do produto no monte, pois o volume de substrato que os gases têm que ocupar deve estar está dentro do limite de alcance dos gases oriundos do óleo de mostarda.

O óleo de mostarda puro tem o inconveniente de causar desconforto ao aplicador, pois os seus gases se volatilizam rapidamente atingindo os órgãos sensoriais, onde causam sintomas semelhantes àqueles produzidos durante o descascamento da cebola, isto é, irritação nos olhos e nas narinas, ardor na pele, etc. Assim, buscou-se melhorar a formulação do óleo de mostarda para minimizar este efeito. A utilização de cilindros de papel embebido com o óleo se mostrou eficiente no controle igual à aplicação do óleo puro. A vantagem desta formulação foi a rapidez de aplicação, pois estes estavam preparados na concentração de 1 ml de óleo por cilindro, assim para 1 metro cúbico de substrato seriam necessários 100 cilindros, não sendo preciso medir pequenos volumes do óleo. O

tempo de exposição ao produto durante a aplicação foi reduzido não sendo observada a sensação desagradável, como na aplicação do óleo puro. Para fins de comercialização, esta formulação em cilindros de papel pareceu prática, pois o produtor já a compraria pronta para uso, não necessitando fazer medição de volumes reduzidos para aplicação aos substratos. É possível fazer a recomendação de 100 cilindros por  $m^3$  de substrato a ser tratado. Viveiristas de cafeeiro preparam  $1 m^3$  de substrato para formar cerca de 1200 mudas no sistema de produção de mudas de meio ano de idade. Mesmo grandes viveiristas podem empregar essa tecnologia com rapidez e facilidade, eliminando assim o inconveniente da aplicação direta do óleo. Entretanto, não se deve esquecer que a cobertura com lona plástica, à semelhança do uso do brometo, é importante para minimizar as perdas dos gases por volatilização, e conseqüentemente, melhorar a eficiência de controle.

Observou-se também que durante o tratamento dos substratos com o óleo de mostarda, ainda havia odor do óleo após a retirada da cobertura plástica. Assim, a hipótese de redução da dose do óleo de mostarda foi confirmada no experimento com maior tempo de fumigação com diferentes doses. Pois com o tempo de fumigação de 5 dias na dosagem de  $80 mL/m^3$  obteve-se 100% de controle de juvenis de *M. exigua*, o mesmo ocorrendo com o tempo de 10 dias de fumigação à dose de  $60 mL/m^3$ .

Outras formulações devem ser produzidas visando tornar mais prática a aplicação do óleo, e estudos posteriores devem ser feitos para verificar se nas doses menores que  $100 mL/m^3$  as novas formulações e maneiras de aplicação terão a mesma eficiência, pois neste ensaio o óleo foi distribuído homogêaneamente no substrato.

Observou-se intensa colonização visível pelo fungo *Trichoderma* sp. no substrato tratado, como também relatado por (Goulart, 2007 e Lima, 2006). A torta e o óleo essencial de mostarda reduz a microbiota do substrato tratado, mas não cria um vácuo biológico (Lima, 2006; Schurt, 2006) e como *Trichoderma* sp. é um fungo agressivo, na ausência de competidores, ele vai se estabelecer com sucesso antes que outros colonizem o substrato. Uma possível utilização do *Trichoderma* sp. junto com a torta poderia também agregar um certo nível de controle pela

atuação como antagonista ou parasita no substrato. É sabido que algumas espécies deste fungo apresentam potencial como agentes de controle biológico (Howell, 2003; Sharon *et al.*, 2001). Estudos comprobatórios envolvendo o seu papel como agente de controle de *Meloidogyne* spp. poderiam aumentar as chances de sua exploração no tratamento de substratos.

Mesmo a utilização da torta na atividade de produção de mudas pode ser atrativa para os viveiristas. Plantas de mostarda são pouco exigentes quanto ao cultivo, preferem substratos férteis e argilosos e não necessitam de muita chuva ou irrigação, podendo ser plantada em regiões com pouca precipitação anual, e crescem bem no período da entressafra (Lorenzi, 2000). Assim, produtores podem cultivá-las na propriedade para a fabricação da própria torta.

Com base nos dados apresentados, conclui-se que para a utilização eficiente da torta e do óleo de mostarda, o monte de substrato a ser tratado não deverá ter altura superior a 30 cm, e o produto deverá ser aplicado próximo à superfície da base. A distribuição desses produtos em sulcos longitudinal e transversal mostrou alta eficiência no controle de *M. exigua*, o que facilitará a sua utilização pelos produtores. O uso da formulação do bastão de papel impregnado com óleo de mostarda vai tornar a sua utilização mais vantajosa por não apresentar o inconveniente do odor do óleo e, ainda, manter a mesma eficiência de controle. Embora os testes fossem realizados com a dose de 100 mL/m<sup>3</sup> do óleo, foi demonstrado que com a redução de dose até 60 mL/m<sup>3</sup> e o tempo de fumigação de 10 dias não há redução na eficiência de controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, N.G. Plant Diseases Caused by Nematodes. In: Plant Pathology. San Diego. Academic Press. 2005. pp. 826-872.

AKHTAR, M. & ALAM, M.M. Utilization of Waste Materials in Nematode Control - a Review. Bioresource Technology. 45:1-7. 1993.

BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira. 6:553. 1981.

BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. Annual Review of Phytopathology. 34:201-225. 1996.

BROWN, P.D. & MORRA, M.J. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. Plant and Soil. 181:307-316. 1996.

BUSKOV, S., SERRA, B., ROSA, E., SORENSEN, H. & SORENSEN, J.C. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:690-695. 2002.

CAMPOS, S.C., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D., PAES, J.L. & ALENCAR, E.R. Eficácia do extrato de mostarda (*Brassica alba* L.) no controle de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) em grãos de milho. I Simpósio de Entomologia da UFV, Viçosa. 2004. 256-260. (Resumo)

CHARRON, C.S., SAMS, C.E. & CANADAY, C.H. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica group)) on growth of *Pseudomonas marginalis*, a causal agent of bacterial soft rot. Plant Disease. 86:629-632. 2002.

CHUNG, W.C., HUANG, J.W., HUANG, H.C. & JEN, J.F. Effect of ground Brassica seed meal on control of *Rhizoctonia* damping-off of cabbage.

Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie. 24:211-218. 2002.

COHEN, M.F., YAMASAKI, H. & MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology & Biochemistry*. 37:1215-1227. 2005.

COSTA, R.R., SOUSA, A.H., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D. & PIMENTEL, A.G. Toxicity of mustard essential oil to larvae and pupas of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Campinas. 2006. 908-913. (Resumo)

DONKIN, S.G., EITEMAN, M.A. & WILLIAMS, P.L. Toxicity of Glucosinolates and Their Enzymatic Decomposition Products to *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*. 27:258-262. 1995.

DUNIWAY, J.M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology*. 92:1337-1343. 2002.

FRANCO-NAVARRO, F., DEL PRADO-VERA, I.C., ZAVALETA-MEJIA, E. & SANCHEZ-GARCIA, P. Application of organic amendments for the management of *Nacobbus aberrans* on tomato. *Nematropica*. 32:113-124. 2002.

GONÇALVES, W., THOMAZIELLO, R.A., MORAES, M.V., FERNANDO, J.A.R., COSTA, A.M., CORRI, T., JUNQUEIRA, C.A. & LACERDA, L.A.O. 1978. Estimativas de danos ocasionados pelos nematóides do cafeeiro. In Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Ribeirão Preto: Rio de Janeiro, IBC/GERCA.

GOULART, R.R. Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do substrato, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2007.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87:4-10. 2003.

IMA. 1995. Instituto Mineiro de Agropecuária. PORTARIA Nº 179/95, DE 12 DE JULHO DE 1995. Disponível em:<[http://www.ima.mg.gov.br/site\\_ima/legislacao/portarias\\_pdf/0179.pdf](http://www.ima.mg.gov.br/site_ima/legislacao/portarias_pdf/0179.pdf)> Acesso 10 janeiro de 2008.

JAEHN, A., REBEL, E.K. & MATIELLO, J.B. 1977. Estudo do efeito curativo de nematicidas em mudas de café infestado com *Meloidogyne incognita*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 5., Guarapari. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, s.d. p. 32-33.

KIRKEGAARD, J.A. & SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil*. 201:71–89. 1998.

LIMA, A. O. Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de substrato no controle de *Meloidogyne incognita*, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2006.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil. Terrestres, aquáticas parasíticas e tóxicas. 3 ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum. 2000.

MAPA. 2005. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 19, DE 7 DE JULHO DE 2005. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12412>> Acesso 25 setembro de 2007.

MAPA. 2007. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. PORTARIA Nº 114, DE 7 DE NOVEMBRO DE 2007. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis->

[consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18189>](#)

Acesso 10 JANEIRO de 2008.

MIGNARD, E. & BENET, J.C. Diffusion of Methyl-Bromide in Soil. *Journal of Soil Science*. 40:151-165. 1989.

MOJTAHEDI, H., SANTO, G.S., WILSON, J.H. & HANG, A.N. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on Potato with Rapeseed as Green Manure. *Plant Disease*. 77:42-46. 1993.

NETSCHER, C. & SIKORA, A.R. Nematode Parasites of Vegetables. Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (eds.). In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. C.A.B International. 1990. pp. 237-283.

PAES, J.L., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D., CAMPOS, S.C. & SOUSA, A.H. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) e em grãos de milho armazenados. XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, João Pessoa. 2006. (Resumo)

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

ROUBTSOVA, T., LOPEZ-PEREZ, J.A., EDWARDS, S. & PLOEG, A. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*. 39:111-117. 2007.

SASSER, J.N. & FRECKMAN, D.W. A world perspective Nematology: the role of the society. Veech, J. A. & Dickson, D. W. (eds.). In: *Vistas on Nematology. A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists*. 1987. pp. 7-14.

SCHURT, D. A. Potencial do isotilcianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2006.

SHARON, E., BAR-EYAL, M., CHET, I., HERRERA-ESTRELLA, A., KLEIFELD, O. & SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 91:687-693. 2001.

SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D.L., SENI, D.J. & FERREIRA, P.S. Incremento na produção de ovos de *Meloidogyne exigua* pela inoculação em plantas de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*. 31(supl.):195. 2006.

SILVA, R.V., OLIVEIRA, R.D.L., FERREIRA, P.S., SENI, D.J. & CASTRO, D.B. Preservação da capacidade reprodutiva de *Meloidogyne exigua* em mudas de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*. (no prelo). 2008.

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.

UNEP. Montreal Protocol on Substances that deplete the ozone layer : United Nations Environment Programme. Methyl bromide technical options committee. Assessment of Alternative to Methyl Bromide. 1998.

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

# **CAPÍTULO 2**

## **VIDA DE PRATELEIRA DA TORTA DE MOSTARDA**

## INTRODUÇÃO

Nematóides em substratos de sementeiras e viveiros podem causar elevadas perdas, por impedir o desenvolvimento pleno das plântulas e ter sua disseminação para áreas não contaminadas (Jaehn *et al.*, 1977; Lehman, 2004; Tronconi *et al.*, 1986). Assim, se o substrato para a produção de mudas não sofrer algum tratamento para a sua erradicação, poderá formar mudas contaminadas, o que no caso de *Meloidogyne* spp., por exemplo, vai impedir a sua comercialização, conforme portaria N° 179/95 do IMA (Ima, 1995).

Até recentemente, os patógenos existentes nos substratos usados em viveiros eram controlados por fumigação com o brometo de metila. Este produto, por ser altamente tóxico, poluente e capaz de danificar a camada de ozônio, está sendo gradualmente proibido no mundo inteiro. Desde dezembro de 2006, no Brasil, seu uso em viveiros e sementeiras fora proibido (Mapa, 2005) e agora, se encontra restrito a propósitos quarentenários. Iniciou-se a busca de novas alternativas, mas até o momento, não há um substituto eficiente e aceitável para o tratamento de substratos.

Plantas da família Brassicaceae são consideradas como as mais promissoras no controle de patógenos de solo em substituição ao brometo de metila (Duniway, 2002; Kirkegaard & Sarwar, 1998). Sua ação de controle já foi comprovada para bactéria (Charron *et al.*, 2002), fungos (Cohen *et al.*, 2005; Smolinska *et al.*, 1997), nematóides (Potter *et al.*, 1998; Zasada & Ferris, 2003) e plantas oportunistas (Brown & Morra, 1996). Embora o efeito tóxico das brássicas seja conhecida há mais tempo sobre diferentes patógenos, a partir de 2001 é que os estudos com os seus extratos se intensificaram para o controle de fungos nas sementes e grãos armazenados (Costa *et al.*, 2005a, 2005b). Demonstrou-se que isotiocianatos (ITCs) extraídos dessas espécies protegem os alimentos processados, sementes e grãos secos nas embalagens, ao crescimento de fungos deterioradores destes produtos (várias espécies de *Aspergillus*) por meio do efeito vaporífico. Mais recentemente, descobriam-se o seu efeito no controle de insetos dos grãos armazenados (Campos *et al.*, 2004; Costa

*et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2006). Resultados promissores também foram alcançados com o controle de fungos de solo (Schurt, 2006). O potencial de controle sobre nematóides já é conhecido, principalmente pelo uso de restos vegetais dessas culturas (Franco-Navarro *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 1992; Potter *et al.*, 1998). A exploração desse potencial sobre os nematóides das galhas é agora estudada pela sua utilização no tratamento de substratos para produção de mudas (Goulart, 2007; Lima, 2006).

O mecanismo de ação das folhas ou tortas de grãos de brássicas na supressão de patógenos no solo está relacionado com a liberação de isotiocianatos (ITCs). Esse conhecimento vem dos estudos que confirmaram que o grau de mortalidade de juvenis de segundo estágio "*in vitro*" e a redução de *Meloidogyne* spp. em condições de campo, correlacionaram-se diretamente com a produção destes compostos durante a decomposição dos tecidos (Gamliel & Stapleton, 1993; Mayton *et al.*, 1996). Mais de 20 diferentes isotiocianatos (ITCs), dentre outros aleloquímicos potenciais, são obtidos de *Brassica napus*, *B. hirta*, *B. campestris*, *B. juncea*, *B. nigra* e de outras. Cada espécie tem um perfil de glucosinolatos único, resultando correspondentemente em diferentes isotiocianatos (Brown & Morra, 1996; Brown *et al.*, 1991). ITCs são compostos voláteis e correspondem aos subprodutos mais tóxicos da hidrólise dos glucosinolatos, os quais são encontrados abundantemente nas brássicas (Brown *et al.*, 1991).

Brássicas se desenvolvem bem em temperaturas amenas e, no Brasil, é considerada uma planta de inverno (Lorenzi, 2000). A formação das mudas de cafeeiro também se dá no inverno, logo após a colheita de suas sementes. Desta forma, para a utilização da torta no tratamento de substratos para mudas de cafeeiro, a mostarda deverá ser produzida no ano anterior, já que a colheita de suas sementes acontece após o preparo do substrato.

A torta de mostarda apresenta grande potencial para o controle de fitonematóides (Goulart, 2007; Lima, 2006), com a vantagem de ser oriunda de sementes, cuja concentração dos glucosinolatos é alta (Fahey *et al.*, 2001). Assim, são necessárias menores doses para o controle de nematóides, em relação à incorporação de outras partes da planta.

A vida de prateleira dos produtos é influenciada por vários fatores, tais como luz, temperatura, umidade do produto e umidade relativa do ar (Backman, 1978; Montesinos, 2003). Em produtos biológicos, a vida de prateleira é requisito obrigatório para que a comercialização seja liberada, além de que a especificação de armazenamento é de fundamental importância para que estes produtos tenham sucesso no controle dos patógenos (Montesinos, 2003). Estudos com agentes de controle biológico mostram que as altas temperaturas, presença de luz e alta umidade diminuem a vida útil destas formulações (Elzein *et al.*, 2004; Fravel, 2005; Montesinos, 2003). Já com compostos químicos usados no controle de doenças, não há muita interferência do ambiente na degradação do produto quando este se encontra na formulação líquida, mas quando é utilizada a formulação em pó, observa-se que durante a armazenagem do produto com alta umidade relativa do ar, há formação de agregados nas partículas, dificultando sua aplicação (Backman, 1978).

Considerando que nada se conhece sobre a durabilidade da torta de mostarda (*Brassica rapa*) quanto ao seu armazenamento e manutenção de suas propriedades tóxicas aos nematóides, o objetivo desse trabalho foi verificar qual a melhor condição e o tempo de armazenamento desse produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção da torta de mostarda**

A torta de sementes foi obtida a partir de plantas de mostarda (*B. rapa*) cultivadas no município de Monte Alto/SP na fazenda São João, no ano de 2006, procedendo-se à moagem destas e posterior extração dos compostos lipídicos com solvente orgânico.

### **Obtenção dos juvenis de *Meloidogyne exigua***

A população original de *Meloidogyne exigua* foi multiplicada em cafeeiro cv. Catuaí, em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos, conforme estabelecido por Boneti & Ferraz (1981): raízes infectadas foram lavadas, cuidadosamente, sob água corrente para retirar as partículas de solo aderidas à sua superfície, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm, trituradas em liquidificador com uma solução de NaOCl à concentração de 0,5% por 15 a 20 segundos. Os ovos foram recolhidos em peneira de “500 mesh” (abertura de 0,025 mm) após a passagem da suspensão por uma peneira de 200 “mesh” (abertura de 0,074 mm). A suspensão de ovos foi depositado em funil de Baermann modificado, onde permaneceu por 48 h, quando os J2 foram coletados. A suspensão foi calibrada para a concentração de 1000 J2/mL após contagem em câmara de Peters em microscópio de luz.

### **Efeito do armazenamento da torta de mostarda na produção de isotiocianatos e mortalidade de juvenis de *Meloidogyne exigua***

A torta foi preparada e armazenada em Outubro de 2006. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2 X 2 X 2 (dois tipos de embalagens, duas temperaturas e ausência ou presença de luz), com três repetições. Cada repetição constituiu de 1 grama de torta, com 6% umidade, sendo estas

armazenadas por 14 meses. Efetuaram-se cinco avaliações ao longo deste período: a primeira aos 2 meses após o armazenamento, e as outras, a cada 3 meses. As análises consistiram da quantificação química do isotiocianato de alila e de seu efeito na mortalidade de juvenis de *M. exigua* in vitro.

### **Determinação do isotiocianato de alila (ITCA) na torta armazenada.**

Nas datas citadas acima, a amostra foi incorporada ao solo, na dose de 2 Kg/m<sup>3</sup> solo. Os tratamentos se constituíram de 10 g de solo [franco-argilo-arenoso (areia 60%; silte 6% e argila 34%), pH 5,01 previamente esterilizado e umidificado com água destilada até atingir 60% da capacidade de campo. 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 por 6 horas à 25°C no escuro.

Para a extração do ITCA produzido no solo, 10 ml do solvente hexano foram adicionados a cada frasco e estes agitados vigorosamente por 1 minuto para formar uma suspensão, e então os frascos ficaram sob agitação constante por mais 10 minutos a 100 rpm. Com o auxílio de uma seringa, coletou-se uma amostra de 1 mL do extrato de hexano de cada frasco. 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 µm filme), com programação de temperatura iniciando a 40 0C (permanência: 5 minutos), taxa de crescimento de 8 0C/min até 260 0C (permanência: 30 minutos). A temperatura da interface entre CG/EM foi de 260 0C. Hélio foi usado como gás de arraste (30 kPa, vazão 0,8 mL/min) e o modo de injeção foi em splitless. O espectrômetro de massas, 70 eV, foi operado no modo scan, com faixa m/z 40-300.

A concentração do isotiocianato em cada data foi submetida a análise de variância no programa SAS (Versão 9.0).

### **Efeito do armazenamento da torta na mortalidade de juvenis de *Meloidogyne exigua* in vitro**

Em cada data citada anteriormente, alíquotas de 10 g de solo franco-argilo-arenoso, previamente esterilizados, foram colocadas em frascos de 30 mL de volume juntamente com a dose da torta na proporção de 2 Kg/m<sup>3</sup> solo, a testemunha correspondeu somente solo. Em cada frasco foi depositado 1 mL de suspensão contendo 300 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. exigua*. A umidade do solo foi ajustada para 60 % da capacidade de campo. Em seguida, estes frascos foram tampados e vedados com filme plástico, para evitar a perda dos gases voláteis, e colocados por 48 h em câmara de crescimento a 26 °C. Após esse período, o solo foi retirado de cada frasco e depositado em funil de Baermann, onde permaneceu por mais 48 h, quando os J2 foram coletados e contados em microscópio de luz.

Calculou-se o percentual de redução dos juvenis em relação à testemunha, e os dados foram submetidos à ANOVA e correlação de Pearson entre o teor de ITCA e a mortalidade dos J2, as análises foram realizadas no programa SAS (Versão 9.0).

## **RESULTADOS**

Foi observado que houve baixa oscilação na umidade relativa durante o período de armazenamento da torta, e na média, esteve acima dos 80 %, variando de  $\geq 52$  e  $\leq 99\%$ . Da mesma forma, a amplitude de variação das temperaturas máximas oscilou de 20,5 a 34 °C, entretanto, a amplitude das mínimas flutuou mais, isto é, de 4,5 a 22 °C (Figuras 1 e 2).

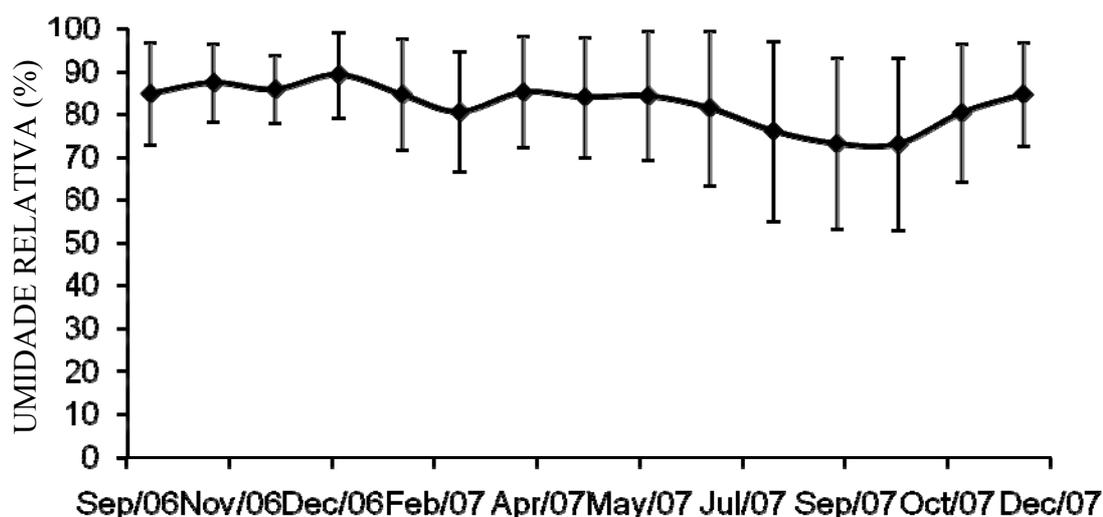


Figura 1 – Umidade relativa do ar, em porcentagem, observada durante o período de armazenamento da torta de mostarda. Barras representam desvio padrão.

As interações embalagem X temperatura X luz não foram significativas para os percentuais de controle de J2 de *M. exigua* e teor ITCA. Até os cinco meses de armazenamento, o que correspondeu às duas primeiras avaliações, não houve interação dupla entre os fatores e nem diferença estatística entre os tratamentos. Aos oito, onze e quatorze meses de armazenamento, houve interação entre embalagem e temperatura ( $P < 0,001$ ), para as duas variáveis. O tratamento temperatura ambiente/embalagem permeável diferiu dos outros tratamentos quanto à atividade biológica da torta, para todas essas épocas de avaliação ( $P < 0,05$ ), mas a capacidade de causar a morte dos juvenis diminuiu com o tempo de armazenamento, chegando aos 14 meses com 2,5% de mortalidade dos nematóides (tabela 1).

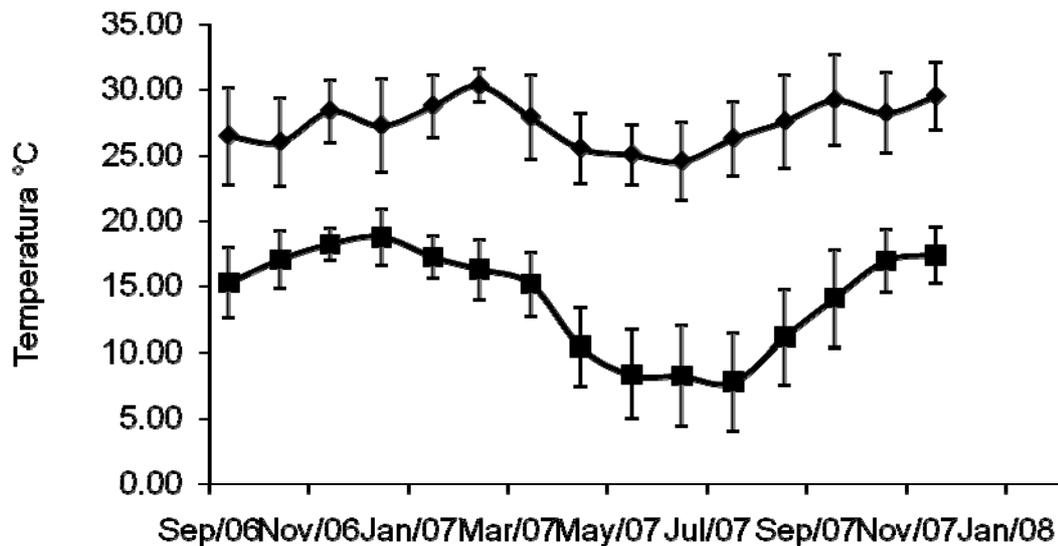


Figura 2 – Temperaturas máxima (◆ TempMax) e mínima (■ TempMin) do ar observadas durante o período de armazenamento da torta de mostarda. Barras representam desvio padrão.

Por meio do desdobramento da interação temperatura x embalagem, o teor de ITCA foi superior quando a torta foi armazenada na geladeira (8 °C) em relação à torta mantida à temperatura ambiente ( $P < 0,05$ ), exceto quando armazenada por oito meses em vidro (tabela 2).

**Tabela 1** – Mortalidade de juvenis de segundo estágio (% em relação à testemunha) de *Meloidogyne exigua* causada pela torta de mostarda após oito, onze e quatorze meses de armazenamento em diferentes condições

Período de armazenamento (meses)	Embalagem	Temperatura	
		Ambiente	Geladeira
8	Impermeável	98,7 Aa	98,9 Aa
	Permeável	62,1 Bb	98,9 Aa
11	Impermeável	99,2 Aa	100,0 Aa
	Permeável	47,8 Bb	99,1 Aa
14	Impermeável	98,5 Aa	99,6 Aa
	Permeável	2,5 Bb	83,0 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula horizontal e minúscula na coluna, em cada período de armazenamento, não diferem pelo teste F ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 2** – Concentração de isotiocianato de alila ( $\mu\text{L/L}$ ), após oito, onze e quatorze meses de armazenamento da torta de mostarda, em diferentes condições

Período de armazenamento	Embalagem	Temperatura	
		Ambiente	Geladeira
8 meses	Impermeável	71,0 Aa	69,0 Aa
	Permeável	17,8 Bb	73,9 Aa
11 meses	Impermeável	35,3 Bb	75,7 Aa
	Permeável	19,4 Bb	80,1 Aa
14 meses	Impermeável	48,3 Ba	64,3 Aa
	Permeável	16,9 Bb	72,2 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula horizontal e minúscula na coluna, em cada período de armazenamento, não diferem pelo teste F ( $P < 0.05$ ).

Nas avaliações de 2 e 5 meses após o início do armazenamento da torta, verificou-se que a correlação foi negativa entre o teor ITCA e o percentual de mortalidade dos J2, mas, foi positiva a partir do oitavo mês de armazenamento (tabela 3). Isto quer dizer que a variação no teor ITCA não foi suficiente para interferir na eficiência de controle do nematóide nas primeiras avaliações, mas a queda mais acentuada na concentração do ITCA nos tratamentos mantidos em saco de papel no ambiente resultou em decréscimo na atividade biológica.

**Tabela 3** – Correlação de Pearson entre o teor do ITCA da torta de mostarda e o percentual de controle dos juvenis de *Meloidogyne exigua*

Meses	R	P
2	-0,27	0,19
5	-0,14	0,50
8	0,85	0,0001
11	0,70	0,0001
14	0,81	0,0001

## DISCUSSÃO

A armazenagem da torta de mostarda é essencial para a sua utilização prática no tratamento de substrato para produção de mudas de cafeeiro. A razão disso é que a época da colheita das sementes de mostarda e o semeio das sementes de cafeeiro ocorrem na mesma época, e assim para o preparo dos substratos do corrente ano é preciso usar a mostarda produzida no ano anterior.

Ficou claro que é possível fazer uso da torta após o seu armazenamento, pelo menos durante o tempo de 14 meses em que esse estudo transcorreu. Aos 2 e 5 meses de armazenamento, em todas as

embalagens e condições de ambiente, houve redução na concentração do isotiocianato de alila, mas essa redução não afetou a atividade tóxica da torta sobre os nematóides, pois manteve em cerca de 100 % a mortalidade dos J2 de *M. exigua*.

Dentre as condições de armazenamento estudadas, a presença ou ausência de luz e a temperatura controlada (cerca de 8 °C) ou ambiente de laboratório, não interferiram marcadamente na durabilidade da torta, quanto ao seu efeito sobre os nematóides. O mesmo não ocorreu com a embalagem, pois o uso do saco de papel, principalmente aquele mantido no ambiente, não impediu a redução de sua ação nematicida. Assim, a presença de água ou de umidade na torta foi a responsável por essa redução. Formulações secas ou em pó molhável, armazenadas sob condições de alta umidade, podem formar agregados e ainda permitir a lenta liberação de seus ingredientes ativos (Backman, 1978; Brown-Rytlewski, 2005).

Esse efeito redutor pelo uso do saco de papel foi ainda maior no teor do isotiocianato de alila, pois foram obtidos valores de apenas 16-18 % de ITCA quando comparado com à torta fresca (recém preparada) aos 14 meses de armazenamento,

Especificamente no caso das tortas de brássicas, ricas em glucosinolatos, a água desempenha um papel preponderante na atividade tóxica das mesmas, sendo preparada com umidade inicial em 6% para melhor preservação. A produção dos isotiocianatos é decorrente da presença de água, que vai promover a hidrólise dos glucosinolatos pela ação da mirosinase. Pelo exposto, a eficiência de controle da torta está relacionada com a presença de certo teor de umidade na mesma para liberar o ingrediente ativo (ITCA). Mas, se a reação de hidrólise ocorre em todo o material, a liberação do ITCA vai também ocorrer rapidamente, diminuindo a durabilidade ou vida de prateleira da torta. Pela figura 1, vê-se que a umidade relativa do ar ficou na média na faixa de 70-85% durante o tempo de armazenamento, o que teria permitido a reação de hidrólise na torta mantida no saco de papel, reduzindo conseqüentemente a sua conservação.

Até os oito meses de armazenamento, não foi observada mudança na atividade da torta devido às flutuações na temperatura, quanto à liberação do ITCA. Se as amostras foram mantidas em laboratório (com temperaturas máximas acima de 25 °C e mínimas acima de 10 °C) ou em geladeira (8 °C), também não resultou em perda de ação tóxica sobre os nematóides. Aliás, nesse quesito, as reduções obtidas no teor de ITCA a partir de 11 meses sob condições de laboratório, não foram suficientes para afetar a mortalidade dos juvenis quando comparado com a conservação da amostra em geladeira. Se tais variações na temperatura são bem suportadas pela torta, que mantém sua qualidade, um aspecto a considerar é se essas variações de temperatura poderiam afetar a expansão dos recipientes usados no armazenamento. Sabe-se que conteúdos que produzem gases e, portanto estão sujeitos à pressão, podem causar deformações na embalagem e o conseqüente vazamento do produto (Brown-Rytlewski, 2005).

Houve, no geral, correlação entre o teor de ITCA e mortalidade de J2. A correlação negativa obtida nas duas primeiras avaliações foi devida que a variação na concentração de ITCA não foi suficiente para causar diminuição na eficiência da torta no controle dos nematóides.

Aos 8 meses de armazenamento, observou-se certa oxidação na torta naqueles tratamentos que usaram a embalagem de papel em condições de ambiente. Esta oxidação foi percebida pelo escurecimento, agregação das partículas e mudança na textura da torta. Procedeu-se à análise microbiológica do material, para descartar a possibilidade de ataque de algum microorganismo, mas não foi encontrado nenhum crescimento até ao quinto dia de observação. Esta oxidação provavelmente foi originada da hidrólise dos glucosinolatos, pois a concentração de isotiocianato caiu drasticamente a partir desta avaliação. Na embalagem de papel a 8 °C, não foi observada qualquer oxidação na torta, o que se deve à baixa umidade relativa do ar no interior da geladeira, umidade esta insuficiente para ocasionar a hidrólise dos glucosinolatos. Obviamente, na embalagem impermeável (vidro) também não se observou nenhuma oxidação, já esta não permite que a água entre em contato com a torta.

A preservação da torta em saco de papel é possível por 12 meses, desde que a mesma seja mantida em geladeira, independente da presença ou ausência de luz. Quando este tipo de embalagem for mantido no ambiente, a conservação não ultrapassará seis meses. Com a embalagem impermeável, pode-se armazenar o produto no ambiente que a qualidade do mesmo se manterá por 14 meses. Assim, a embalagem utilizada no armazenamento da torta tem papel importante na sua vida útil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKMAN, P.A. Fungicide Formulation - Relationship to Biological-Activity. Annual Review of Phytopathology. 16:211-237. 1978.

BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira. 6:553. 1981.

BROWN, P.D. & MORRA, M.J. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. Plant and Soil. 181:307-316. 1996.

BROWN, P. D., MORRA, M.J., MCCAFFREY, J.P., AULD, D.L. & WILLIAMS, L. Allelochemicals Produced during Glucosinolate Degradation in Soil. Journal of Chemical Ecology. 17:2021-2034. 1991.

CAMPOS, S.C., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D., PAES, J.L. & ALENCAR, E.R. Eficácia do extrato de mostarda (*Brassica alba* L.) no controle de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) em grãos de milho. I Simpósio de Entomologia da UFV, Viçosa. 2004. 256-260. (Resumo)

CHARRON, C.S., SAMS, C.E. & CANADAY, C.H. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica group)) on growth of *Pseudomonas marginalis*, a causal agent of bacterial soft rot. Plant Disease. 86:629-632. 2002.

COHEN, M.F., YAMASAKI, H. & MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. Soil Biology & Biochemistry. 37:1215-1227. 2005.

COSTA, M.L. N., SILVA JR., G.J. & DHINGRA, O.D. Controle de deterioração de grãos de amendoim armazenados com óleo essencial de mostrada. XXXVIII Congresso de Brasileiro de Fitopatologia, Brasília. 2005a. 593-593. (Resumo)

COSTA, M.L. N., SILVA JR., G.J. & DHINGRA, O.D. Controle de deterioração fúngica de grãos de soja armazenados com óleo essencial de mostarda. XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília. 2005b. S94-S94. (Resumo)

COSTA, R.R., SOUSA, A.H., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D. & PIMENTEL, A.G. Toxicity of mustard essential oil to larvae and pupas of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Campinas. 2006. 908-913. (Resumo)

DUNIWAY, J.M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology*. 92:1337-1343. 2002.

ELZEIN, A., KROSCHEL, J. & MULLER-STOVER, D. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of 'Pesta' formulation of *Fusarium oxysporum* 'Foxy 2', a potential mycoherbicide for *Striga*: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Science and Technology*. 14:545-559. 2004.

FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T. & TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56:5-51. 2001.

FRANCO-NAVARRO, F., DEL PRADO-VERA, I.C., ZAVALETA-MEJIA, E. & SANCHEZ-GARCIA, P. Application of organic amendments for the management of *Nacobbus aberrans* on tomato. *Nematropica*. 32:113-124. 2002.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43:337-359. 2005.

GAMLIEL, A. & STAPLETON, J.J. Characterization of Antifungal Volatile Compounds Evolved from Solarized Soil Amended with Cabbage Residues. *Phytopathology*. 83:899-905. 1993.

GOULART, R.R. Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2007.

IMA. 1995. Instituto Mineiro de Agropecuária. PORTARIA Nº 179/95, DE 12 DE JULHO DE 1995. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/site\\_ima/legislacao/portarias\\_pdf/0179.pdf](http://www.ima.mg.gov.br/site_ima/legislacao/portarias_pdf/0179.pdf)> Acesso 10 janeiro de 2008.

JAEHN, A., REBEL, E.K. & MATIELLO, J.B. 1977. Estudo do efeito curativo de nematicidas em mudas de café infestado com *Meloidogyne incognita*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 5., Guarapari. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, s.d. p. 32-33.

JOHNSON, A.W., GOLDEN, A.M., AULD, D.L. & SUMNER, D.R. Effects of Rapeseed and Vetch as Green Manure Crops and Fallow on Nematodes and Soil-borne Pathogens. *Journal of Nematology*. 24:117-126. 1992.

KIRKEGAARD, J.A. & SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil*. 201:71–89. 1998.

LEHMAN, P.S. Cost-benefits of Nematode Management through Regulatory Programs. Chen, Z. X., Chen, S. Y. & Dickson, D. W. (eds.). In: *Nematology advances and perspectives*. Beijing. Tsinghua University Press. 2004. pp. 1131-1177.

LIMA, A. O. Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de solo no controle de *Meloidogyne incognita*, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2006.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil. Terrestres, aquáticas parasíticas e tóxicas. 3 ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum. 2000.

MAPA. 2005. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 19, DE 7 DE JULHO DE 2005. Disponível

em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12412>> Acesso 25 setembro de 2007.

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

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*. 6:245-252. 2003.

PAES, J.L., FARONI, L.R.A., DHINGRA, O.D., CAMPOS, S.C. & SOUSA, A.H. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) e em grãos de milho armazenados. XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, João Pessoa. 2006. (Resumo)

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

SCHURT, D.A. Potencial do isotilcianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa. 2006.

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

TRONCONI, N.M., FERRAZ, S., SANTOS, J.M. & REGAZZI, A.J. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. *Nematologia Brasileira*. 10:69-83. 1986.

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

## CONCLUSÕES GERAIS

Conforme os resultados dos estudos da tecnologia de aplicação da torta e óleo de mostarda, e a vida de prateleira da torta conclui-se que:

1. O alcance do ITCA no substrato foi relativamente baixo, principalmente para a torta. A distribuição do óleo no sentido vertical, permitirá trabalhar com montes de substrato com 30 cm de altura.

2. Respeitando-se a altura dos montes em 30 cm, o óleo poderá ser aplicado a intervalos de no máximo 60 cm. A torta, que apresentou melhor resultados com a aplicação em sulcos cruzados, deverá ser distribuída com intervalos também de 60 cm.

3. Com 10 dias de fumigação, conseguiu reduzir a dose do óleo para 60 mL/m<sup>3</sup>, mantendo 100 % de mortalidade do nematóide.

4. É possível armazenar a torta de um ano para outro, sem perder a eficiência de controle do nematóide das galhas, principalmente se a mesma for acondicionada em embalagem impermeável. Pode-se usar a geladeira (armazenamento a cerca de 8 °C) em caso de embalagem permeáveis como o saco de papel.

5. Graças ao potencial eficiente controle sobre *Meloidogyne exigua* no substrato, produtos originados da mostarda como a torta e óleo, acredita-se que eles possam substituir o Brometo de metila no tratamento de substrato para produção de mudas isentas de nematóides.