

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SOLARIZAÇÃO EM MICROCOSMO: EFEITO DE MATERIAIS VEGETAIS NA
SOBREVIVÊNCIA DE FITOPATÓGENOS E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS**

MARCO ANTONIO BASSETO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Dezembro – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SOLARIZAÇÃO EM MICROCOSMO: EFEITO DE MATERIAIS VEGETAIS NA
SOBREVIVÊNCIA DE FITOPATÓGENOS E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS**

MARCO ANTONIO BASSETO

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Co-orientador: Dr. César Junior Bueno

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Dezembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Basseto, Marco Antonio, 1981-
B319s Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais
na sobrevivência de fitopatógenos e na produção de volá-
teis / Marco Antonio Basseto. - Botucatu : [s.n.], 2009.
x, 79 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2009

Orientador: Edson Luiz Furtado

Co-orientador: César Junior Bueno

Inclui bibliografia.

1. Fungos de solo - Controle. 2. Brócolis. 3. Mamona.
4. Mandioca. 5. Cromatografia gasosa. I. Furtado, Edson
Luiz. II. Bueno, César Junior. III. Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu).
Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "SOLARIZAÇÃO EM MICROCOSMO: EFEITO DE MATERIAIS VEGETAIS
NA SOBREVIVÊNCIA DE FITOPATÓGENOS E NA PRODUÇÃO DE
VOLÁTEIS"

ALUNO: MARCO ANTONIO BASSETO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. CESAR JUNIOR BUENO

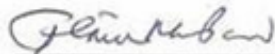
Aprovado pela Comissão Examinadora



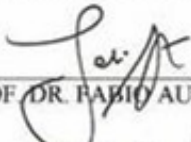
PROF. DR. CESAR JUNIOR BUENO



PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROFA. DRA. FLAVIA RODRIGUES ALVES PATRICIO



PROF. DR. FABIO AUGUSTO



PROFA. DRA. MARCIA MICHELLE DE QUEIROZ AMBRÓSIO

Data da Realização: 11 de dezembro 2009.

Aos meus pais, *Antonio Pedro Basseto* e *Neide Pereira Basseto*, que me educaram e deram a oportunidade para esta conquista, cujo exemplo de vida foi e sempre será de fundamental importância para minha formação pessoal e profissional.

DEDICO

Em memória ao saudoso Prof. Dr. *Nilton Luiz de Souza*, pelos ensinamentos, orientação, dedicação, paciência, companheirismo e principalmente amizade, fundamentais para a realização deste trabalho.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por sempre estar presente em minha vida, dando-me força, paciência e sabedoria nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Emerson e Tânia, a minha cunhada Tati e ao meu cunhado José, que estiveram sempre presentes nesta minha trajetória, dando-me incentivos e dedicação.

Com carinho, à minha noiva Bruna, pela compreensão, paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Edson Luiz Furtado, que me acolheu, e foi crucial e preponderante para o sucesso deste trabalho.

A todos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, pelos ensinamentos, amizade e colaboração para minha formação profissional.

Em especial ao Prof. Dr. Fábio Augusto, do Instituto de Química da Unicamp, e toda sua Equipe, sobretudo ao Márcio, Maira e Raquel, pela parceria, colaboração, dedicação e ajuda, sendo fundamentais no desenvolvimento da Etapa Química do trabalho.

Ao Dr. César Júnior Bueno, da APTA/Instituto Biológico – Centro Experimental Central, que mais que um co-orientador, foi um grande amigo e parceiro para todas as horas.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) e a CAPES, que respectivamente concederam auxílio financeiro (Processo: 2007/50895-3) e bolsa de estudos, sem os quais não seria possível a execução deste trabalho.

Ao Professor Carlos Roberto Padovani, do Departamento de Bioestatística – IBB/UNESP, pelo auxílio na elaboração e análises estatísticas do trabalho.

A todos meus amigos e companheiros do curso de Pós-Graduação, em especial: Julio César, Daniel, Haroldo, Ana Carolina, Hugo, Cecília, Gabriela, Otávio, Rita, Inocêncio Junior, Francisco Rafael, Simério, Carla, José Hiran, Rafael Cristoban e Juliana, pelos bons momentos que passamos juntos, companheirismo e auxílio nas horas difíceis.

A todos os técnicos de laboratório e funcionários, pela ajuda durante o curso e desenvolvimento desta pesquisa e amizade.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FCA-UNESP, pela paciência, ajuda e apoio durante o curso.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e meu desempenho acadêmico.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1. Fungos fitopatogênicos habitantes de solo	7
4.2. Controle de fungos fitopatogênicos habitantes de solo	7
4.3. Solarização do solo	8
4.4. Incorporação de vegetais associados à solarização	8
4.5. Incorporação de folhas de mandioca (brava e mansa) (<i>Manihot esculenta</i> L.) e mamona (<i>Ricinus comunis</i> Crantz), ao solo, associadas à solarização	10
4.6. Análise química das substâncias (voláteis) emanadas pela decomposição dos vegetais testados	11
4.7. Micro-Extração em Fase Sólida (SPME)	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1. Primeira etapa: Biológica	14
5.1.1. Multiplicação e produção das estruturas de resistência dos fitopatógenos	14
5.1.2. Condições experimentais	16
5.1.3. Incorporação dos materiais orgânicos e preparo dos tratamentos ...	19
5.1.4. Parâmetros avaliados e formas de análise	21
5.1.5. Delineamento experimental e análise estatística	24
5.2. Segunda etapa: Química	25
5.2.1. Técnica de análise dos voláteis	25
5.2.2. Condições experimentais	26
5.2.3. Parâmetros de extração e da rampa de separação	27
5.2.4. Processamento dos materiais orgânicos e preparo dos tratamentos	28
5.2.5. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos voláteis	28
5.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	29

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1. Primeira etapa: Biológica	30
6.1.1. Leitura dos gases O ₂ e CO ₂	30
6.1.2. Avaliação do efeito dos tratamentos no crescimento micelial dos fitopatógenos habitantes de solo.....	33
6.1.3. Avaliação do efeito dos tratamentos nas estruturas de resistência dos fitopatógenos habitantes de solo	39
6.1.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2	39
6.1.3.2. <i>Macrophomina phaseolina</i>	44
6.1.3.3. <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI.....	46
6.1.3.4. <i>Sclerotium rolfsii</i>	49
6.2. Segunda etapa: Química	51
6.2.1. Análise Qualitativa	52
6.2.2. Análise Semi-quantitativa	59
6.2.3. Voláteis <i>versus</i> sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos	63
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos materiais vegetais (brócolis, mamona, mandioca brava e mansa) utilizados quanto aos aspectos de composição mineral, umidade (%) e relação C/N.....	19
Tabela 2. Aspectos de composição mineral (macro e micronutrientes), pH e matéria orgânica (M.O.) do solo utilizado.....	20
Tabela 3. Gases O ₂ e CO ₂ gerados pelos tratamentos, em associação com a simulação da solarização, comparados com o ambiente, em diferentes períodos de avaliação.....	32
Tabela 4. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo, submetidos à simulação de solarização, em microcosmo, e incubados em condições de BOD, a 37°C, no escuro, nos diferentes períodos avaliados.....	34
Tabela 5. Análise do efeito fungistático sobre a velocidade de crescimento média e diária do micélio (VCMDM) dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo, nos diferentes tratamentos, de acordo com o período de exposição avaliado.....	37
Tabela 6. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2.....	40
Tabela 7. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i>	45
Tabela 8. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI.....	47
Tabela 9. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i>	50
Tabela 10. Voláteis oriundos da decomposição do brócolis, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a 37±2°C, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.....	53
Tabela 11. Voláteis oriundos da decomposição da mamona, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a 37±2°C, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.....	54

Tabela 12. Voláteis oriundos da decomposição da mandioca mansa, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME	55
Tabela 13. Análise comparativa entre os voláteis oriundos da decomposição de brócolis, mamona e mandioca mansa detectados na cromatografia gasosa pela técnica de SPME específicos a cada material vegetal e suas interações (BRO versus MA, BRO versus MM, MA versus MM e BRO versus MA versus MM).	58
Tabela 14. Análise descritiva dos grupos de voláteis oriundos da decomposição do brócolis, mamona e mandioca mansa, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ por diferentes períodos e analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.	60
Tabela 15. Análise de correlação de Pearson entre as porcentagens relativas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição do brócolis, com os dados de sobrevivência de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2, <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI e <i>Sclerotium rolfsii</i> , ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias)	64
Tabela 16. Análise de correlação de Pearson entre as porcentagens relativas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição da mamona, com os dados de sobrevivência de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2, <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI e <i>Sclerotium rolfsii</i> , ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias).	66
Tabela 17. Análise de correlação de Pearson entre as porcentagens relativas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição da mandioca, com os dados de sobrevivência de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2, <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI e <i>Sclerotium rolfsii</i> , ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias).....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substratos veiculando estruturas de resistência dos fungos.....	16
Figura 2. Mecanismo utilizado para simular o processo de solarização	18
Figura 3. Aparelho de leitura de gases (O ₂ e CO ₂) Testo T-325-1	18
Figura 4. Materiais vegetais triturados como auxílio de um processador de alimentos a serem incorporados ao solo	21
Figura 5. Mecanismo de extração de voláteis pela técnica SPME em ambiente controlado	26
Figura 6. Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (FID)	27
Figura 7. Concentração de oxigênio (O ₂) e de gás carbônico (CO ₂) nos diferentes tratamentos, submetidos ao processo de simulação da solarização, em microcosmo, com diferentes períodos de exposição aos tratamentos.	31
Figura 8. Sobrevivência de clamidósporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 2, em diferentes tratamentos mantidos em condições de microcosmo (37±2°C)..	40
Figura 9. Comparação da atividade da microbiota do solo nos tratamentos contendo solo (sem a incorporação de material vegetal) e solo + material vegetal.	43
Figura 10. Sobrevivência de microescleródios de <i>Macrophomina phaseolina</i> , em diferentes tratamentos mantidos em condições de microcosmo (37±2°C).....	44
Figura 11. Sobrevivência de escleródios de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-4 HGI, em diferentes tratamentos mantidos em condições de microcosmo (37±2°C).....	47
Figura 12. Sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> , em diferentes tratamentos mantidos em condições de microcosmo (37±2°C).....	49
Figura 13. Área normalizada média relativa dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea do brócolis para cada período avaliado.	61
Figura 14. Área normalizada média relativa dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea de mamona para cada período avaliado.....	62
Figura 15. Área normalizada média dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea de mandioca mansa, para cada período avaliado.....	63

1. RESUMO

A incorporação de culturas específicas associadas à solarização do solo tem sido apresentada como um avanço muito promissor para o controle de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Além das brássicaceas, comumente utilizadas, novos materiais vegetais como a mandioca e a mamona têm apresentado potencial para controle desses fitopatógenos. Vários fatores são apontados como responsáveis pelo controle, entre eles os voláteis oriundos da decomposição dos vegetais. Assim, este trabalho foi idealizado com dois objetivos divididos em duas etapas complementares: biológica - avaliar o efeito ocasionado pela incorporação e decomposição de parte aérea de brócolis, mamona e mandioca brava e mandioca mansa, associadas à simulação da solarização, sobre diferentes estruturas dos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e *Sclerotium rolfsii*; química - identificar e apontar dentro de cada material vegetal qual(is) é(são) o(s) volátil(eis) potencial(ais) pelo controle das estruturas dos fungos. Na primeira etapa, quatro ensaios idênticos foram instalados em conjuntos de microcosmos, com quatro períodos de exposição diferentes e independentes (7, 14, 21 e 28 dias), avaliando efeitos no crescimento micelial (inócuo, fungistático e fungicida) e na sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos de solo. Verificou-se efeito fungistático e fungicida no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e de *S. rolfsii*. O efeito fungicida apenas ocorreu aos 21 dias de incubação para *F. oxysporum* e *R. solani* e aos 28 dias para *S. rolfsii*. Para *M. phaseolina*, observou-se apenas efeito inócuo. Os tratamentos solo+materiais vegetais, ao longo dos períodos testados, reduziram, significativamente, a sobrevivência das estruturas de resistência de todos os fungos. No geral, destacaram-se o brócolis e a mandioca brava, além da mandioca mansa para *S. rolfsii*. A segunda etapa contou com ensaios realizados sob as mesmas condições da primeira, entretanto sendo realizada em frascos âmbar ao invés de microcosmos. A identificação dos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa com detectores por espectrometria de massas (GC-MS) e por ionização em chama (GC-FID), utilizando a técnica de Microextração em Fase Sólida, SPME, para extração e pré-concentração dos mesmos. As avaliações desta etapa ocorreram aos 7, 14, 21 e 28 dias, onde foram identificados os voláteis oriundos da decomposição de três materiais vegetais - brócolis, mamona e mandioca mansa. A identificação dos voláteis oriundos da decomposição da mandioca brava apresentou

resultados inconsistentes. Para o brócolis foram identificados 26 voláteis divididos em seis grupos de compostos: álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, sulfurados e os chamados “outros”. A exemplo do brócolis e a exceção do grupo dos sulfurados foram identificados 37 voláteis para mamona e 29 para a mandioca mansa. Com base na “área normalizada”, referente à área do pico de cada volátil, realizou-se análise semi-quantitativa por meio do estudo descritivo dos dados e correlação dos voláteis com os dados de sobrevivência dos fitopatógenos pela análise de Correlação de Pearson. Verificou-se um comportamento diferenciado de cada material vegetal com relação a cada grupo de compostos gerados, destacando-se os sulfurados para o brócolis, os álcoois para a mamona e os ácidos para a mandioca mansa. Foram detectadas correlações positivas e negativas entre alguns voláteis e a média dos compostos com a sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos estudados. O estudo descritivo e as correlações serviram como uma importante ferramenta de indicação e apontaram para potenciais grupos de voláteis e/ou voláteis, que poderão ser purificados e testados isoladamente com relação à sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos, de modo a se chegar qual(is) o(s) responsável(eis) pelo controle destes organismos.

Palavras chave: controle, fungos de solo, materiais vegetais, brócolis, mamona, mandioca, cromatografia gasosa

SOLARIZATION IN MICROCOSM: EFFECT OF PLANT MATERIALS ON PHYTOPATHOGEN SURVIVAL AND VOLATILE COMPOUND PRODUCTION.

Botucatu, 2010, 79 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Marco Antonio Basseto

Adviser: Edson Luiz Furtado

Co-adviser: César Junior Bueno

2. SUMMARY

The incorporation of specific cultures associated with solarization has been a highly promising advance to control phytopathogenic fungi inhabiting the soil. In addition to the commonly used Brassicaceae, new plant materials such as cassava and castor plants have shown potential to control these phytopathogens. Several factors are considered responsible for this control, including volatile compounds from plant decomposition. Thus, the present work was divided into two complementary steps according to its two major aims: biological step – to evaluate the effect of the incorporation and decomposition of broccoli, castor and cassava (bitter and sweet) shoot, associated with simulated solarization, on different structures of the fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI and *Sclerotium rolfsii*; chemical step – to identify for each plant material which volatile compound(s) present(s) potential to control fungal structures. In the first step, four identical assays were established in groups of microcosms, with four different and independent exposure periods (7, 14, 21 and 28 days), to evaluate the effects on mycelial growth (innocuous, fungistatic and fungicide) and survival of resistance structures of soil fungi. Fungistatic and fungicide effects were detected on the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 2, *R. solani* AG-4 HGI and *S. rolfsii*. Fungicidal effect occurred only at 21 days of incubation for *F. oxysporum* and *R. solani* and at 28 days for *S. rolfsii*. As regards *M. phaseolina*, only an innocuous effect was observed. The treatments soil+plant material, over the tested periods, significantly reduced the survival of resistance structures for all fungi. In general, broccoli and bitter and sweet cassava had expressive

results for *S. rolfsii*. The second step included assays done under the same conditions as those in the first step; however, they were carried out in amber bottles instead of microcosms. Volatile compounds were identified by using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and flame ionization detectors (GC-FID), adopting Solid-Phase Microextraction Techniques, SPME, for extraction and pre-concentration. Evaluations in this step occurred at 7, 14, 21 and 28 days to identify volatile compounds from the decomposition of three plant materials – broccoli, castor and sweet cassava plants. The identification of volatile compounds from the decomposition of bitter cassava yielded inconsistent results. For broccoli, 26 volatile compounds were identified and divided into six groups: alcohols, ketones, acids, esters, sulfurs and “others”. Similarly to broccoli, except for sulfurs, 37 volatile compounds were identified for castor and 29 for sweet cassava plants. Based on the “normalized area”, corresponding to the peak of each volatile compound, a semi-quantitative analysis was performed by means of a descriptive study on the data and a correlation of volatile compounds with the phytopathogen survival data through Pearson’s Correlation. Each plant material had a differentiated behavior concerning each group of generated compounds, especially sulfurs for broccoli, alcohols for castor, and acids for sweet cassava plants. Some volatile compounds and their means had positive and negative correlations with the survival of the studied phytopathogen resistance structures. This descriptive study and the correlations served as important tools for indicating potential groups of volatiles and/or volatiles, which can be purified and tested separately for the survival of phytopathogen structures in order to detect which volatile compound(s) is/are responsible for the control of these organisms.

Keywords: control, soilborne fungi, plant material, broccoli, castor plant, cassava, gas chromatography

3. INTRODUÇÃO

A incorporação de culturas específicas associadas à solarização do solo tem sido apresentada como um avanço muito promissor para o controle de fitopatógenos de solo. Além de permitir a inativação de vários patógenos que não são afetados pela solarização [técnica desenvolvida por Katan, (1976)], quando utilizada isoladamente, essa prática tem reduzido drasticamente o tempo necessário para o controle (SOUZA e BUENO, 2003). Uma das culturas mais utilizadas em conjunto com a solarização tem sido as brássicas (BLOK *et al.*, 2000; GAMLIEL e STAPLETON, 1993a; GAMLIEL e STAPLETON, 1993b; RAMIREZ-VILLAPUDUA e MUNNECKE, 1988; SOUZA, 2004).

Segundo Rosa *et al.* (1997) existem aproximadamente 20 diferentes tipos de glucosinolatos comumente encontrados em brássicas. Os glucosinolatos são hidrolizados endogenamente em tecidos de brássicas pela enzima mirosinase e no processo de decomposição do material liberam compostos incluindo isotiocianatos, que apresentam atividade biocida.

Além das brássicas, há necessidade de se buscar novos materiais com ação tóxica a fitopatógenos e que possam ser facilmente encontrados em diversas regiões, onde os danos e perdas para agricultura ocorram com frequência, devido a estes organismos (AMBRÓSIO, 2006).

Entre os novos materiais com ação tóxica a fitopatógenos, merecem destaque à mamona (*Ricinus comunis* Crantz) e a mandioca brava (*Manihot esculenta* L.) (AMBRÓSIO *et al.*, 2008).

Existem várias substâncias presentes em plantas de mamona (CARVALHO e CARVALHO, 1979) e mandioca (brava e mansa) (RIBEIRO e BEDENDO, 1999; FONSECA, 2001), que são apontadas como prováveis agentes de controle de fitopatógenos de solo. No entanto, apesar das evidências, ainda não existe na literatura nenhum relato sobre quais substâncias especificamente emanadas pela decomposição destes materiais (analitos), em associação com a solarização, são realmente responsáveis pela erradicação dos fitopatógenos de solo.

O desenvolvimento de metodologias para análise química de compostos de materiais vegetais (matrizes), envolvendo extração e pré-concentração dos analitos (voláteis), sua separação, identificação e quantificação é extremamente interessante. Entre as novas metodologias, a Micro-Extração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*) é uma técnica de extração e pré-concentração eficiente, introduzida no início da década de 90, e que tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990).

Em função do exposto acima, o presente trabalho procurou abordar os seguintes objetivos: a) estudar e avaliar o efeito da incorporação e decomposição de parte aérea de brócolis, mamona e mandioca brava e mansa, associadas à solarização, em conjuntos de microcosmos, sob condições de ambiente controlado (BOD), nas estruturas vegetativas e de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e *Sclerotium rolfsii*; b) identificar o(s) volátil(eis) emanado(s) pela decomposição destes materiais e apontar qual (ais) é (são) o(s) volátil(eis) que poderia(m) estar correlacionado(s) com a inativação dos organismos testados.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Fungos fitopatogênicos habitantes do solo

Os fungos de solo estão entre os que causam inúmeras perdas em várias culturas, ocasionando em alguns casos a inviabilidade de cultivo das mesmas em extensas áreas agrícolas (SOUZA, 2001). Estes organismos apresentam estruturas de resistência que garantem sua sobrevivência, frente a situações adversas, tais como ausência do hospedeiro e/ou condições climáticas desfavoráveis (AMORIM, 1995). Assim, uma vez introduzidos na área estes fungos tornam-se um grave problema, pois suas estruturas de resistência são de difícil controle e podem sobreviver por vários anos no solo.

Cada fitopatógeno de solo em particular é especializado em produzir uma determinada estrutura de resistência (AMBRÓSIO, 2006). Como exemplos têm-se os oósporos por *Pythium* e *Phytophthora*, microescleródios por *Macrophomina phaseolina* e *Verticillium dahliae*, escleródios por *Rhizoctonia*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* e os clamidósporos por certas espécies de *Fusarium* (AMORIM, 1995).

4.2. Controle dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo

A princípio, a principal forma de controle destes tipos de fitopatógenos é de maneira preventiva por meio de medidas que impeçam a entrada ou estabelecimento dos mesmos na área (AMBRÓSIO, 2006). Após o estabelecimento destes organismos na área, recomenda-se o uso de variedades resistentes e o controle químico

(GHINI, 2001). Além disto, deve-se buscar medidas alternativas de controle para estes fitopatógenos e isto encontra-se em evolução (SOUZA, 2001).

A maioria das formas alternativas de controle se baseia na redução do potencial de inóculo em áreas infestadas, de forma a possibilitar o desenvolvimento da cultura, mesmo que suscetível (ROBBS, 1991). Entre essas alternativas, a solarização merece destaque (SOUZA, 1994).

4.3. Solarização do solo

A solarização é um método desenvolvido por Katan (1976), que consiste basicamente na cobertura do solo umedecido em pré-plantio, com um filme plástico transparente, durante o período de maior radiação solar (verão), sendo relatada como eficiente no controle de diversos fitopatógenos (AMBRÓSIO, 2006).

Este método atua na inativação dos patógenos através de efeitos diretos, causados pelas altas temperaturas, e indiretos, favorecendo o controle biológico e a supressividade do solo (SOUZA, 1994). Porém, de acordo com alguns pesquisadores, essa técnica, quando utilizada isoladamente, não controla efetivamente alguns fungos fitopatogênicos habitantes do solo como *M. phaseolina*, *F. oxysporum* e *Plasmodiophora brassicae* (SOUZA e BUENO, 2003). Uma das medidas que vem sendo utilizada e que potencializa o uso deste método de controle e que ainda diminui o tempo necessário para o processo, é a incorporação de partes vegetais de culturas específicas ao solo seguido de solarização (GAMLIEL e STAPLETON, 1993a; SOUZA, 2001; SOUZA e BUENO, 2003; AMBRÓSIO, 2006; AMBRÓSIO *et al.*; 2008).

4.4. Incorporação de vegetais associados à solarização

O uso de materiais vegetais específicos incorporados ao solo causa redução na densidade de inóculo dos patógenos, diminuindo conseqüentemente a severidade das doenças (COOK e BAKER, 1983). Existe um grande número de trabalhos, tanto em condições laboratoriais, quanto em condições de campo, comprovando a efetividade do emprego da solarização associada à incorporação de materiais vegetais (fresco ou seco), no controle de fitopatógenos de solo (FERRAZ, 2001).

Um dos pontos importantes afetados por esta associação é a comunidade microbiana decompositora presente no solo. Segundo Cruz *et al.*, (2005), a incorporação de material vegetal ao solo associado a solarização estimula a comunidade fúngica e bacteriana presente no solo. Robbs, (1991), em seu estudo relata que o processo de decomposição de materiais vegetais incorporados ao solo estimula a atividade microbiana natural limitando os danos ocasionados por fitopatógenos. Reis *et al.*, (2005), acrescenta que a ação da microbiota é afetada pela quantidade e qualidade de material vegetal incorporado ao solo podendo aumentar a densidade de uma ou várias espécies de microorganismos selecionados pelo material, além de estimular ou ativar a ação de alguns inicialmente em dormência (DeNOBILLI *et al.*, 2001).

Entre os materiais vegetais, as brássicas, em especial, quando em associação com a solarização, são umas das mais pesquisadas e possíveis de serem empregadas para o controle de doenças causadas por fitopatógenos de solo (SUBBARAO e HUBBARD, 1996; MORRA e KIRKEGAARD, 2002). Há relatos na literatura de uma série de patógenos afetados por esta associação: *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (RAMIREZ-VILLAPUDUA e MUNNECKE, 1988), *Pythium ultimum* e *S. rolfsii* (GAMLIEL e STAPLETON, 1993a), entre vários outros fungos fitopatogênicos, citados por Souza (2004), como: *Aphanomyces euteches*, *Didymella brioniae*, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *M. phaseolina*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Pythium* spp., *R. solani*, *S. cepivorum* e *Verticillium dahliae*.

Em geral, membros da família das brássicas contêm em sua composição uma grande quantidade e variedade de glucasinolatos (ROSA *et al.*, 1997). Os glucasinolatos são compostos sulfúricos, composto de um grupo de tioglicose, um variável carbono pertencente ao chamado grupo “R” e um óxido sulfatado. Estes compostos são nomeados de acordo com a estrutura do seu grupo “R”, onde aproximadamente cerca de 100 diferentes tipos de glucasinolatos já foram identificados em diferentes tecidos vegetais (DUNCAN, 2001).

Os glucasinolatos são hidrolisados por enzimas específicas (mirosinases), no processo de decomposição dos resíduos vegetais, gerando uma série de compostos voláteis como aldeídos (formaldeído e acetaldeído) e compostos de enxofre, incluindo tiocianatos e isotiocianatos (GAMLIEL e STAPLETON, 1993b). Estes compostos voláteis, em especial o isotiocianato, emanado pela degradação rápida do material e retido na superfície do solo pela cobertura plástica no processo de solarização,

atua comprovadamente como substância fungicida, sendo letal a vários fitopatógenos de solo como pôde ser observado por diversos autores (LODHA *et al.*, 1997).

Smolinska e Horbowick (1999), avaliando a liberação de propenil isotiocianato a partir de resíduos de mostarda (*Brassica juncea*), observaram correlação positiva entre a presença deste composto e a inibição da germinação de clamidósporos de *F. oxysporum* var. *radicis*. O etil, pentenil e benzil isotiocianatos, assim como os butil e fenil isotiocianatos, estes menos eficientes, são compostos que também possuem atividade fungitóxica comprovada na inibição da germinação de conídios e clamidósporos (KIRKEGAARD e SAWAR, 1999).

A eficiência de controle esta estreitamente relacionada à natureza do grupo “R” do isotiocianato, além do material vegetal e do fungo que se está trabalhando (FREIRE *et al.*, 2004).

4.5. Incorporação de parte aérea de mandioca (brava e mansa) (*Manihot esculenta* L.) e mamona (*Ricinus comunis* Crantz), ao solo, associadas à solarização

Além das brássicas, existem outros materiais com potencial para serem utilizados em associação com a solarização no controle de fitopatógenos presentes no solo. Ambrósio (2006), buscando novos materiais, tão ou mais eficientes quanto às brássicas, no que diz respeito ao controle de fitopatógenos de solo, trabalhou com folhas de eucalipto, mamona e mandioca brava, associados à solarização, em condições de laboratório (microcosmo) e em campo. Praticamente em todos os tratamentos, em ambas as condições, utilizando-se a proporção de três quilos de material vegetal por metro quadrado de solo, os patógenos estudados (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii*) foram erradicados, sendo que a incorporação da mandioca brava seguida de solarização propiciou o controle de todos os fungos com menos de sete dias da instalação do experimento, sendo tão eficiente quanto o brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*).

Estas informações mostram a viabilidade da utilização de materiais de outras espécies vegetais, associadas à solarização, como uma alternativa promissora no controle de fitopatógenos de solo (AMBRÓSIO, 2006). No entanto, apesar destas informações, ainda não se sabe especificamente, como nas brássicas, no caso dos

isotiocianatos, qual (is) substância (s) emanada (s) pela decomposição destes materiais é (são) realmente responsável (eis) pela ação fungicida.

Em mandioca, brava e mansa, acredita-se que a atividade fungicida seja causada pela presença de dois glicosídeos cianogênicos, que são a linamarina, que participa em maior proporção (92-98%), a lotaustralina metil, derivada da linamarina (2-8%), e pela presença da enzima linamarase, que promove a hidrólise dos glicosídeos (CARVALHO e CARVALHO, 1979). O enxofre, presente em larga quantidade neste material, atrelado a presença de outras substâncias, tais como cetonas, aldeídos, cianalaninas, lectinas e outras proteínas tóxicas, inibidoras de amilases e proteinases, apresentam grande eficiência como agentes fungicidas (PONTE, 2001).

Segundo Lorenzi e Dias (1993), basicamente a diferença entre a mandioca mansa e a brava está na quantidade de ácido cianídrico presentes em suas raízes. A mandioca mansa tem menos de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de HCN (ácido cianídrico) na polpa crua das raízes, enquanto que a brava possui mais de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de HCN.

Na mamona, por sua vez, suspeita-se que a atividade anti-fúngica seja atribuída a compostos presentes em sua parte aérea como alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos e compostos fenólicos (RIBEIRO e BEDENDO, 1999; FONSECA, 2001). Entretanto, apesar da suspeita, não se sabe qual ou quais compostos ou substâncias liberadas por este material, que associados à solarização, seriam os responsáveis por inibir o crescimento e o desenvolvimento de certos fungos fitopatogênicos habitantes do solo.

4.6. Análise química das substâncias (voláteis) emanadas pela decomposição de vegetais

Gamliel e Stapleton (1993a) avaliaram os compostos voláteis presentes nas diferentes fases da decomposição do repolho (brássicaceae), submetido à solarização, no controle de dois fungos de solo, *P. ultimum* e *S. rolfsii*. Neste trabalho, os autores armazenaram os gases em uma câmara que continha solo incorporado com repolho, imersa em um banho-maria, com a temperatura desejada, simulando assim o aquecimento pela solarização. Esta câmara era dotada de um septo de borracha, através do qual foi inserida a agulha de uma seringa para a retirada do gás a ser injetado em um cromatógrafo a gás. Através da associação dos resultados das análises realizadas pela cromatografia

gasosa, com avaliações da atividade microbiológica dos organismos testados no solo, verificou-se uma correlação positiva entre grupos específicos de voláteis (isotiocianatos) com o controle dos fitopatógenos.

4.7. Micro-Extração em Fase Sólida (SPME)

A SPME é uma técnica de extração rápida, simples, que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva da amostra. Além disso, pode-se fazer extrações seletivas pela escolha adequada do material de recobrimento da fibra. O princípio básico da SPME é simples: uma fibra de sílica coberta com um filme de material sorvente (polímeros absorventes ou adsorventes) é exposta à amostra ou ao seu *headspace* (fase gasosa confinada, em equilíbrio com a matriz da amostra). Os voláteis contidos na amostra, ou no *headspace*, são sorvidos na camada de recobrimento da fibra, que é posteriormente recolhida e introduzida diretamente no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás. Esses voláteis coletados são então dessorvidos termicamente no injetor e arrastados para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos compostos (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990).

Nos estudos iniciais sobre SPME, esta técnica foi otimizada e aplicada a extrações com inserção direta das fibras em matrizes líquidas (ARTHUR *et al.*, 1992a; ARTHUR *et al.*, 1992b; BUCHHOLZ e PAWLISZYN, 1993). Posteriormente foi proposta e avaliada sua aplicação à extração e pré-concentração de voláteis em fase gasosa (ZHANG e PAWLISZYN, 1993), demonstrando que em relação aos métodos convencionais de *headspace* (fase gasosa confinada em equilíbrio com a matriz da amostra), a técnica permitia melhores repetibilidades e reprodutibilidades (MACGILLIVRAY *et al.*, 1994).

Diversos trabalhos demonstram a aplicação do SPME com análise do *headspace* na determinação de compostos gerados em meios de cultura. Pirazinas produzidas por diversos microorganismos foram isoladas por *purge and trapping* e quantificadas ao nível de traço por Baudron *et al.* (1991), que otimizaram as condições de extração de *headspace* utilizando planejamento fatorial completo. Vergnais *et al.* (1998), estudando os efeitos de força iônica do meio e do tipo de fibra extratora, determinaram metabólitos de *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*, tanto após extração direta por SPME do meio de cultura, quanto do seu *headspace*. Neste trabalho, os melhores

resultados foram em extrações de *headspace* com fibra recoberta com PA (poliacrilato), onde se determinou que tanto *S. xylosum* como *S. carnosus* produziam ésteres a partir de leucina, enquanto somente este último o fazia por oxidação de ácidos graxos livres presentes no meio de cultura.

Nilsson *et al.* (1996) compararam *purge and trapping* com extração por SPME através do *headspace* combinadas a GC-MS, como ferramenta para diferenciar diversas espécies e subespécies de fungos do gênero *Penicillium* (*P. hirsutum* var. *albocoremium* e var. *venetum*, *P. vulpinum*, *P. decumbens* e *P. discolor*). Para as extrações por *purge and trapping*, os voláteis gerados nos meios de cultura foram arrastados por um fluxo de ar até cartuchos contendo Tenax com posterior dessorção térmica diretamente na coluna. Nas extrações por SPME foram testadas fibras recobertas com PDMS (polidimetilsiloxano) e PA (poliacrilato). Os resultados dos dois métodos testados foram similares, sendo que SPME se mostrou mais rápida e simples.

Deste modo, com a utilização da SPME como metodologia de análise, torna-se mais rápido e possível o estudo de vários compostos ou substâncias emanadas pela ação direta ou indireta de diversos organismos sob um substrato.

Assim, o presente trabalho foi idealizado com dois objetivos divididos em duas etapas complementares: biológica – estudar e avaliar o efeito ocasionado pela incorporação e decomposição de parte aérea de brócolis, mamona e mandioca (brava e mansa), associadas à simulação da solarização, sobre diferentes estruturas dos fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii*; química - identificar os voláteis oriundos da decomposição de cada material vegetal e qual(is) é(são) o(s) volátil(eis) que poderia(m) estar correlacionado(s) no controle das estruturas dos fungos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Primeira etapa: Biológica

Os ensaios foram realizados nas dependências do Departamento de Produção Vegetal (DPV), da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), UNESP, Campus de Botucatu – SP.

5.1.1. Multiplicação e produção das estruturas de resistência dos fitopatógenos de solo

Os fitopatógenos estudados foram cedidos pela Micoteca do DPV/FCA/UNESP. Inicialmente, estes foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) + oxitetraciclina ($0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) e, posteriormente, transferidos para substratos específicos, auxiliando na produção das estruturas de resistência dos mesmos (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006). É importante ressaltar que as estruturas de resistência de cada organismo foram produzidas para cada ensaio em particular, garantindo assim o máximo de viabilidade das mesmas para cada período testado.

Para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, a metodologia adotada para produção das estruturas de resistência foi a adaptada por Bueno (2004), que consiste em multiplicar o fungo em meio líquido de extrato de malte, no escuro, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, por sete dias. Após crescimento, a suspensão sem centrifugação foi colocada em uma bandeja de alumínio, acrescentando pó de talco na proporção 2:1 (v/p), deixando para secar em estufa de circulação forçada de ar a 26°C , por 14 dias (Figura 1A).

Na produção das estruturas de resistência dos fungos *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI, foram utilizados frascos contendo substrato areno-orgânico estéril, onde estes organismos foram cultivados. O substrato foi composto por três partes de esterco bovino curtido, uma parte de areia lavada e 2% de aveia (v/p), ajustando, com água destilada, a umidade de 20% (v/v) (LEFÈVRE e SOUZA, 1993). O substrato foi autoclavado por duas vezes, em intervalos de 24 horas, durante uma hora, a 120°C. Posteriormente, em câmara asséptica, foram transferidos três discos de cinco milímetros de diâmetro retirados das bordas das colônias de cada fungo em crescimento, para os frascos contendo o substrato areno-orgânico. Os frascos foram mantidos em estufa tipo BOD a 25°C para *R. solani* e a 32°C para *M. phaseolina*, ambos no escuro, por 15 dias, sendo periodicamente agitados com o objetivo de homogeneizar a infestação (Figura 1B e C).

A produção das estruturas de resistência de *S. rolfsii* foi realizada conforme a metodologia adotada por Bueno (2004), onde se transfere um escleródio para placa contendo uma fina camada de meio BDA + oxitetraciclina (0,05 mg.mL⁻¹) e incubase em estufa tipo BOD, a 25 °C, no escuro, por 30 dias, até a formação completa dos escleródios, os quais foram removidos com auxílio de pincel de cerdas macias (Figura 1D).

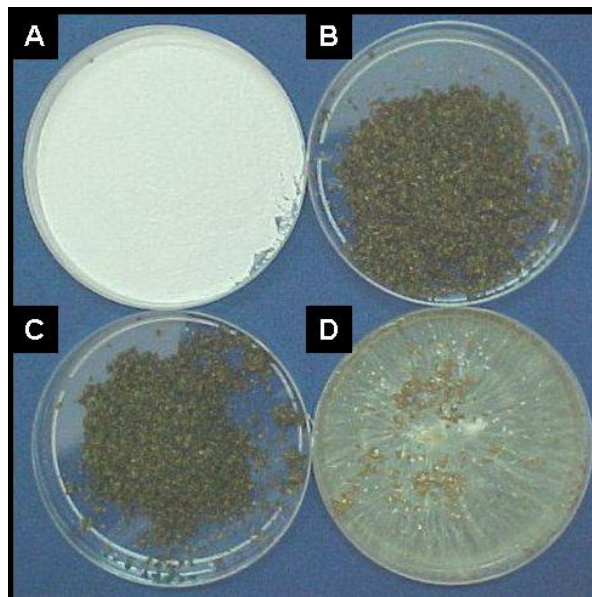


Figura 1. Substratos veiculando estruturas de resistência dos fungos. **Legenda:** 1A - Pó de talco neutro contendo clamidósporos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2; 1B - Substrato areno-orgânico contendo microescleródios de *M. phaseolina*; 1C - Substrato areno-orgânico contendo escleródios de *R. solani* AG-4 HGI; 1D. Escleródios de *S. rolfii* produzidos em meio BDA.

5.1.2. Condições experimentais

Os ensaios foram instalados em condições de laboratório, dentro de estufas tipo BOD, à temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 2A). Essa temperatura proporciona acelerar a decomposição dos materiais e, também, simula a temperatura média do solo em campos solarizados nos meses de verão em Botucatu - SP. Essa época é propícia para instalação da técnica de solarização. Com isso, é possível simular o processo de solarização do solo em condições laboratoriais.

As parcelas experimentais dos ensaios consistiram de microcosmos, previamente desenvolvidos e testados por Bueno *et al.* (2004) e Ambrósio (2006). Segundo estes autores, o microcosmo constitui-se de uma câmara de vidro, com capacidade de três litros e meio e com uma tampa vazada de 15 cm de diâmetro. Essa abertura na tampa permite a passagem de um tubo de silicone para amostrar gases (O_2 e CO_2) que podem ser gerados no interior do frasco, com uma rolha de borracha (septo) inserida na extremidade da mangueira, a qual impede a saída dos mesmos. Na outra

extremidade, enterrada no solo, foi acoplada uma sonda coletora de gases, desenvolvida por Bueno e Souza (2002). Os gases (O_2 e CO_2) foram avaliados pela introdução de uma agulha de seringa através do septo ligada a um analisador de gases modelo Testo 325-1, previamente calibrado para o trabalho (Figura 3).

Para atender os objetivos do presente trabalho, os microcosmos sofreram uma modificação, com o intuito de verificar apenas a ação dos gases gerados nos tratamentos sobre as estruturas vegetativas (micélio) e de resistência dos fungos testados (Figura 2B). Portanto, cada parcela experimental consistiu de um conjunto de dois microcosmos interligados entre si por meio de uma mangueira de silicone. Em uma das extremidades dessa mangueira foi acoplada a sonda coletora, enquanto que a outra extremidade foi apenas conectada no interior do outro frasco servindo de ponte entre eles. Essa sonda, já mencionada anteriormente, teve por objetivo auxiliar na captação dos gases no microcosmo contendo solo mais material vegetal incorporado ou solo (sem a incorporação de material vegetal), e, com isso, conduzir a atmosfera gasosa para o microcosmo posterior sem solo e sem material orgânico, utilizado para colocar as estruturas vegetativas (micélio) e de resistência dos fungos testados. Todo microcosmo contendo solo + material vegetal ou solo (sem a incorporação de material vegetal) (testemunha) foi dotado de uma saída auxiliar com uma mangueira de silicone e um septo de borracha em sua extremidade, onde foi acoplado o aparelho leitor de gases, para avaliação dos gases (CO_2 e O_2) no momento de cada avaliação (Figura 2B).

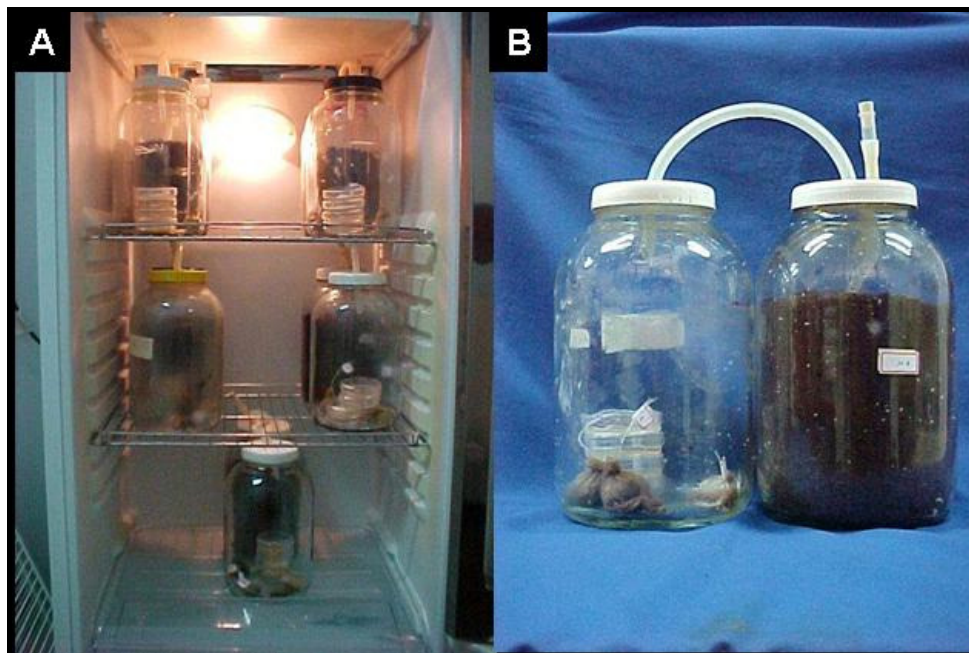


Figura 2. Esquema utilizado para simular o processo de solarização. **Legenda:** 2A - Interior da estufa do tipo BOD com os conjuntos de microcosmos; 2B - Detalhe do conjunto de microcosmos.

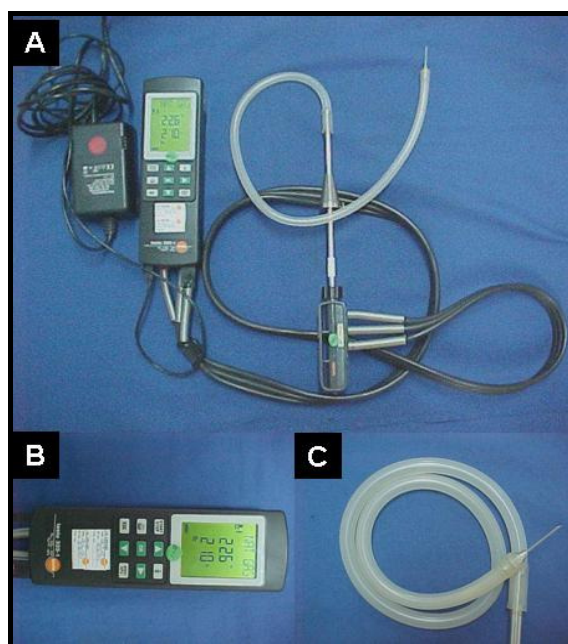


Figura 3. Aparelho de leitura de gases (O_2 e CO_2) Testo T-325-1. **Legenda:** 3A - Visão geral do Aparelho T-325-1 e seus dispositivos auxiliares; 3B - Leitor do Aparelho T-325-1; 3C - Mangueira de silicone com agulha na extremidade para se acoplar ao microcosmo.

Segundo Bueno *et al.* (2004) e Ambrósio (2006), o microcosmo oferece condições para simular o processo de solarização do solo a campo e, ainda, facilita qualificação e quantificação dos produtos da decomposição de materiais vegetais associados à solarização sobre fitopatógenos. Além disto, o microcosmo apresenta facilidade para instalação dos experimentos e com baixo custo quando comparado com aqueles realizados em condições de campo. No entanto, todo resultado obtido em microcosmo deve ser confirmado, também, em condições de solarização a campo.

5.1.3. Incorporação dos materiais vegetais e preparo dos tratamentos

Os tratamentos foram compostos por parte aérea de quatro materiais vegetais, devidamente caracterizados quanto aos seus elementos, umidade e relação C/N, pelo Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas “Prof.^a Dr.^a Leonina Aparecida de Lima”, FCA/UNESP, Botucatu – SP (Tabela 1), oriundos de mamona (*Ricinus comunis* L.), mandioca brava e mansa (*Manihot esculenta* Crantz) e brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* L). Estes materiais foram incorporados ao solo, além da testemunha contendo solo (sem material vegetal incorporado).

Tabela 1. Caracterização dos materiais vegetais (brócolis, mamona, mandioca brava e mansa) utilizados quanto aos aspectos de composição mineral, umidade (%) e relação C/N.

Materiais	Macronutrientes						Micronutrientes					Umidade	Relação
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn		
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹					(%)	C/N
Brócolis	57	8,3	35	9	3,2	10,4	39	8	128	26	61	89	15/1
Mamona	41	3,2	25	14	2,9	6,4	52	9	374	215	30	78	25/1
Mandioca Brava	35	2,3	12	17	3,3	2,2	50	8	388	269	61	80	22/1
Mandioca Mansa	36	3,5	12	21	3,6	2,4	46	9	267	250	104	82	20/1

O brócolis foi utilizado como padrão de comparação para os demais materiais vegetais (mamona, mandioca brava e mandioca mansa), pois pesquisas demonstram que é um material que incorporado no solo juntamente com a técnica da solarização do solo, possui potencial para supressão de várias estruturas de resistência de

fungos fitopatogênicos de solo (SUBBARAO e HUBBARD, 1996; MORRA e KIRKEGAARD, 2002).

O solo utilizado, Latossolo Vermelho Distroférrico de Textura Média, foi retirado de uma área agricultável (Embrapa, 1999) de uma camada de dez centímetros de profundidade. As características de fertilidade foram determinadas, também, pelo Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, FCA/UNESP, Botucatu – SP (Tabela 2).

Tabela 2. Aspectos de composição mineral (macro e micronutrientes), pH e matéria orgânica (M.O.) do solo utilizado.

pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol/dm ³							mg/dm ³						
4,2	14	8	11	66	0,4	6	2	8	74	11	53	0,27	3,5	10	2,9	0,1

Antes de serem incorporados, os materiais vegetais foram triturados com o auxílio de um processador de alimentos, visando facilitar sua decomposição no solo (Figura 4). A proporção dos materiais incorporados no solo úmido (20% de umidade) foi de três quilos para cada 120 kg de solo (aproximadamente 100 litros), seguindo padrões adotados por Ambrósio (2006). Portanto, cada tratamento, a exceção da testemunha, foi constituído de aproximadamente três quilos de solo (dois litros e meio) mais 75 gramas de material vegetal, de forma a proporcionar uma altura de 15 centímetros de material no microcosmo.



Figura 4. Materiais vegetais triturados como auxílio de um processador de alimentos a serem incorporados ao solo. **Legenda:** BRO – brócolis; MA – mamona; MB - mandioca brava; e MM – mandioca mansa.

Além da testemunha - solo (sem material vegetal incorporado), um frasco sem solo e sem material vegetal foi incluído com o intuito de manter as estruturas dos fungos em condições de temperatura ambiente, atestando sua viabilidade em condições ambiente e avaliando o papel real da temperatura ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$) isoladamente sobre as mesmas.

5.1.4. Parâmetros avaliados e formas de análise

Os parâmetros avaliados em todos os tratamentos e em cada período foram: a) concentração de oxigênio e gás carbônico no interior dos conjuntos de microcosmos; b) taxa de crescimento micelial e c) sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos.

A concentração de oxigênio e gás carbônico foi medida, em porcentagem (massa/massa), no conjunto de microcosmo de cada tratamento e em cada período de avaliação por meio do analisador de gases modelo Testo 325-1, previamente calibrado pelo fabricante, em dois momentos; uma após a instalação do ensaio e a outra no final de cada período testado (7, 14, 21 e 28 dias).

A análise do efeito de cada tratamento no crescimento micelial dos fungos foi realizada em placas contendo meio BDA para onde foram transferidos discos

contendo micélio de cada fungo oriundo de colônias novas. As placas, uma de cada fungo, foram então colocadas dentro de cada conjunto de microcosmos.

O efeito dos tratamentos foi verificado através da medição do crescimento das colônias dos fungos nas placas (nove centímetros de diâmetro), comparando com as medidas do diâmetro das colônias antes de serem transferidas para as câmaras (D1), após serem retiradas das câmaras (D2) e após serem levadas a BOD, a 25°C, por um período de sete dias de incubação (D3). Essas medidas foram efetuadas com o auxílio de uma régua graduada, onde a partir das comparações entre elas pode-se inferir sobre a ausência do efeito do tratamento, inócuo ($D1 < D2$), o efeito fungistático ($(D1 = D2) < D3$) e o efeito fungicida de cada tratamento ($D1 = D2 = D3$). Para cada período analisado foi adicionado um controle geral, onde foi mensurado o crescimento micelial e diário de cada fungo incubado na temperatura ideal para o seu crescimento.

Para a análise da sobrevivência das estruturas de resistência dos fitopatógenos foram utilizadas bolsas de tecido sintético (náilon), contendo cada uma dez gramas dos substratos infestados (talco e substrato areno-orgânico) com as estruturas dos fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *M. phaseolina* e *R. solani*. Para *S. rolfsii*, cada bolsa recebeu aproximadamente 100 escleródios. As bolsas foram amarradas com linha de náilon e identificadas em sua extremidade livre com fita crepe (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006).

Cada conjunto de microcosmo conteve uma bolsa (repetição) de cada organismo e as avaliações foram realizadas através do plaqueamento das estruturas de resistência dos fitopatógenos em placas contendo meios de cultura semi-seletivos, com cinco repetições, propiciando o desenvolvimento de cada organismo em questão, o que possibilitou a quantificação dos sobreviventes através da contagem das colônias formadas (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006).

Antes do plaqueamento em meio semi-seletivo, as bolsas com os fungos *M. phaseolina*, *R. solani* e *S. rolfsii* foram submetidas a uma desinfestação superficial para diminuir os contaminantes e possibilitar a contagem dos sobreviventes, conforme metodologia de Bueno (2004). Cada organismo em particular possui um processo de desinfestação diferente. Para *M. phaseolina*, o processo é iniciado com a transferência do inóculo para uma nova bolsa de náilon. Esta nova bolsa passa por uma rápida imersão em álcool 70%, 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. O fungo *R. solani*, após também ser

transferido para uma nova bolsa, passa então pelas etapas de rápida imersão em álcool 70%, 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavagens sucessivas em água estéril. Já *S. rolfsii*, além da imersão em álcool 70%, após a troca de bolsa de náilon, é exposto por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% e lavado sucessivamente em água destilada esterilizada (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006).

No plaqueamento propriamente dito, foram utilizadas dez porções do substrato contendo as estruturas de resistência de *M. phaseolina* e *R. solani* e, no caso de *S. rolfsii*, dez escleródios, sendo em seguida transferidos para cada uma das cinco placas (repetições), posteriormente mantidas em BOD à temperatura favorável para cada fungo (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006). Para o substrato contendo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, este foi submetido a diluição seriada antes do plaqueamento, de acordo com a metodologia de Bueno (2004), que consiste em efetuar quatro diluições (1:10) da amostra (pó de talco + clamidósporos – 10 g) em solução salina (0,85% de NaCl) seguindo-se de plaqueamento de alíquotas (0,1 mL).

Os meios seletivos utilizados para o plaqueamento também variam de acordo com cada fungo (BUENO, 2004; AMBRÓSIO, 2006). Para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, o meio de cultura utilizado para avaliar a sobrevivência desse patógeno foi o semi-seletivo de Komada (15 g peptona; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 g ágar; 0,25 g clorofenicol; 0,7 g PCNB; 1 L água destilada). O PCNB foi adicionado somente após esterilização do meio (KOMADA, 1975).

Em *M. phaseolina*, o meio proposto foi o semi-seletivo RB (CLOUD, 1991) modificado que consiste de 39 g de BDA, 224 mg i.a de metalaxyl, 100 mg de rifampicina e 1L de água destilada. Já para *Rhizoctonia solani* AG4 HGI utilizou o meio semi-seletivo de KHMP (1g KH_2PO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g KCl; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,20 g $NaNO_2$; 0,05 g clorofenicol; 20 g ágar; 0,05 g de sulfato de estreptomicina; 0,24 g metalaxyl; 0,05 g prochloraz) e 940 mL água destilada (KO e HORA, 1971), enquanto que para *S. rolfsii* foi utilizado o próprio meio de BDA (batata, dextrose, ágar) + 0,05 mg.mL⁻¹ de oxitetraciclina (BUENO, 2004).

Para cada período e fungo analisado foi verificado o inóculo inicial no momento da montagem de cada ensaio (população inicial), além da sua sobrevivência em condições ambiente (laboratório). Tanto a população inicial quanto o laboratório contaram com o mesmo número de repetições utilizado para os tratamentos incubados nos microcosmos.

5.1.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, aleatorizando tanto os conjuntos de microcosmos dentro das BODs quanto os períodos de avaliação. O trabalho contou então com quatro ensaios independentes, mas idênticos, diferindo apenas com relação aos períodos de avaliação: 7, 14, 21 e 28 dias.

A análise estatística dos dados dos gases oxigênio (O₂) e carbônico (CO₂) foi realizada por meio de análise paramétrica, com seis tratamentos [solo - sem a incorporação de material vegetal, solo+brócolis, solo+mamona, solo+mandioca brava, solo+mandioca mansa e ambiente (leitura realizada em condições ambiente utilizada como controle)] e com quatro repetições, sendo as médias dos dados comparadas entre si por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Com essa análise foi possível verificar o efeito dos tratamentos e dos diferentes períodos na concentração destes gases dentro dos microcosmos.

O efeito dos tratamentos sob o micélio foi analisado segundo descrito na metodologia acima, inócuo (D1<D2), fungistático ((D1=D2)<D3) ou fungicida (D1=D2=D3). Quando foi constatado efeito fungistático, determinou-se a velocidade média e diária do crescimento micelial (VMDCM) para o fitopatógeno em questão, em cada tratamento (solo - sem a incorporação de material vegetal), solo+brócolis, solo+mamona, solo+mandioca brava, solo+mandioca mansa no período onde foi observado o referido efeito. Também foi calculada a VMDCM dos fungos sob suas condições ideais de temperatura de incubação, controle geral. Os dados foram analisados pela análise paramétrica, contando com seis tratamentos, e as médias dos dados foram comparadas entre si por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para os dados de sobrevivência dos fungos, a técnica de análise de variância utilizada foi o do esquema fatorial de sete tratamentos (solo - sem a incorporação de material vegetal), solo+brócolis, solo+mamona, solo+mandioca brava, solo+mandioca mansa, além do laboratório e da população inicial) *versus* quatro fungos (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii*) *versus* quatro períodos de avaliação (7, 14, 21 e 28 dias), com quatro repetições por tratamento, considerando o vetor de resposta a sobrevivência dos quatro fungos. Os dados de sobrevivência foram transformados em porcentagem e, novamente, transformados em $\arcsen\sqrt{(X/100)}$, sendo X o valor da porcentagem, o que possibilitou utilizar a análise

paramétrica, baseada em médias. Isto foi feito em razão da diferença de metodologia utilizada para avaliação da sobrevivência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 com relação aos demais fungos. O teste utilizado para comparação das médias de sobrevivência foi também o de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5.2. Segunda etapa: Química

A etapa química foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Fábio Augusto, no Instituto de Química da UNICAMP – Campinas – SP.

5.2.1. Técnica de análise dos voláteis dos materiais vegetais

A técnica de análise de voláteis utilizada foi a Microextração em Fase Sólida conhecida também por SPME. O princípio básico dessa técnica consiste em uma fibra de sílica fundida de 100 mm de diâmetro coberta com um filme fino de material sorvente (tanto polímeros como adsorventes sólidos) com 10 mm de comprimento e cerca de 100 µm de espessura de filme extrator. As espessuras dos recobrimentos de fibras comerciais variam entre 7 e 100 mm (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

A fibra foi exposta às amostras dos tratamentos do item 5.2.4., através da exposição da fibra ao *headspace* (fase gasosa confinada em equilíbrio com a matriz da amostra) de cada amostra. Para isto, a fibra foi colocada em um suporte, *holder*, com a função de protegê-la durante a extração, por ser a mesma muito frágil.

Na extração, a ponta do *holder* foi inserida no septo do frasco da amostra e a fibra foi exposta ao *headspace* para que os voláteis fossem transferidos para o material sorvente da fibra. Os voláteis extraídos ficaram sorvidos no recobrimento da fibra, e passado o tempo de extração, a fibra foi retraída e retirada do frasco amostral, para ser introduzida diretamente no injetor aquecido de um cromatógrafo a gás GC-FID (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*) ou GC-MS (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). As substâncias extraídas foram dessorvidas termicamente no injetor e arrastados para a coluna cromatográfica, sendo posteriormente identificadas com base em padrões armazenados em uma biblioteca presente no cromatógrafo.

5.2.2. Condições experimentais

Os ensaios foram realizados em condições de laboratório, dentro de estufas tipo BOD, à temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para os experimentos montados na Etapa Biológica (Figura 5A).

Nesta etapa, cada parcela experimental foi representada por dois frascos âmbar de 500mL dotado de uma tampa revestida por um septo de silicone. Este frasco, indicado para este tipo de análise, foi silanizado de forma a não adsorver os voláteis em suas paredes, e sua tampa revestida de silicone proporcionou um ambiente hermético, permitindo apenas a introdução da fibra sem o escape dos voláteis (Figura 5).

A fibra de SPME empregada foi a DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano), assim como o próprio *holder*, da marca Supelco (Bellefonte), acondicionada de acordo com as recomendações do fabricante antes de ser utilizada. Demais reagentes que foram empregados nesse trabalho foram de grau de pureza P.A. (Pró- Análise) ou superior.

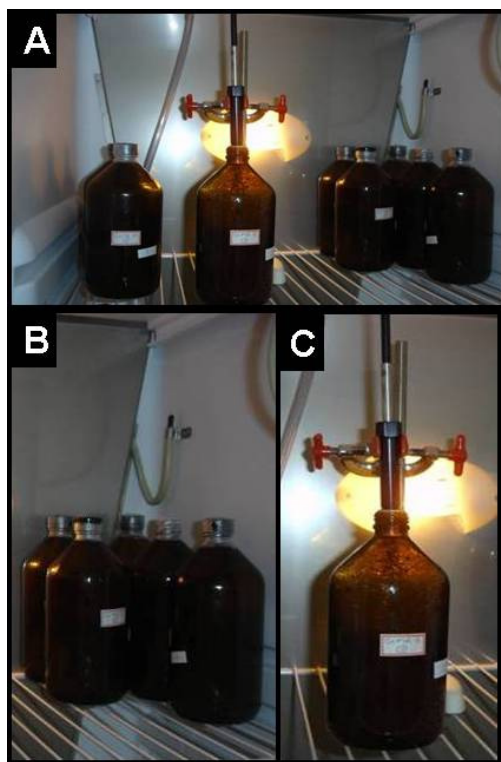


Figura 5. Extração de voláteis pela técnica SPME em ambiente controlado. **Legenda:** 5A – Visão geral dos frascos âmbar e do processo de extração realizado no interior

da BOD; 5B – Detalhe dos frascos âmbar devidamente vedados; 5C – Introdução e exposição da fibra aos voláteis acondicionados dentro do frasco.

5.2.3. Parâmetros de extração e da rampa de separação

A temperatura de extração por SPME foi de $37\pm 2^\circ\text{C}$ simulando o processo de decomposição que ocorre no solo. O tempo de extração foi de 30 minutos e depois de inserir a fibra de SPME no injetor do cromatógrafo, a mesma ficou 10 minutos no injetor para garantir que todos os voláteis extraídos da matriz fossem desorvidos. Os parâmetros relativos ao GC-FID (Figura 6) também foram avaliados, principalmente programação da temperatura do forno e vazão do gás de arraste, para minimizar a coeluição dos compostos extraídos. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector foi de 280°C . O injetor foi operado no modo *splitless* em todas as injeções. Como gás de arraste foi usado He grau 5.0 a $0,8\text{ mL min}^{-1}$. A rampa de temperatura escolhida foi a de 40°C por 10 minutos, 5°C/min até 75°C , 15°C/min até 165°C , 40°C/min até 190°C por 3 minutos.

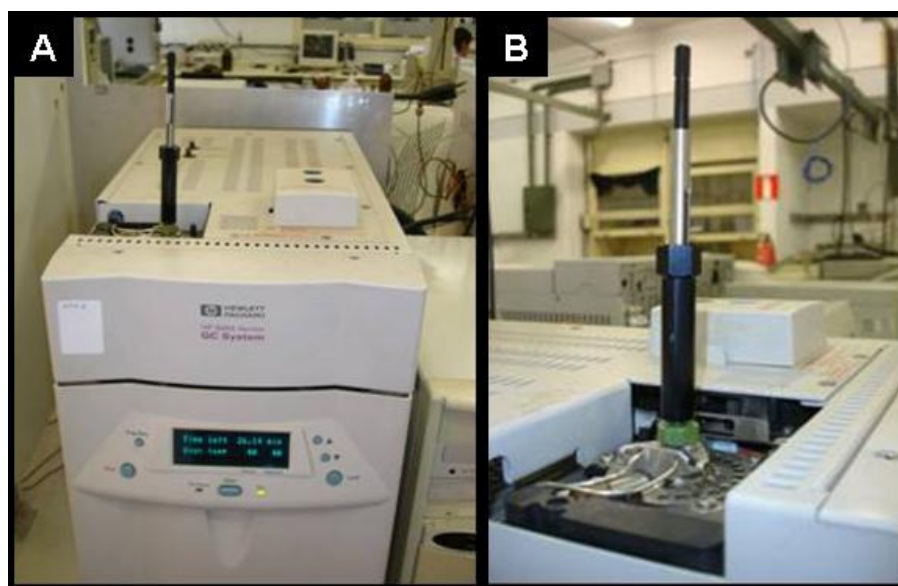


Figura 6. Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (FID). **Legenda:** 6A - Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (FID) no momento da injeção; 6B - Detalhe do injetor do cromatógrafo a gás com injeção por SPME.

5.2.4. Processamento dos materiais orgânicos e preparo dos tratamentos

Os materiais vegetais brócolis, mamona, mandioca brava e mansa foram triturados (Figura 4) e incorporados ao solo segundo a metodologia utilizada na Etapa Biológica, respeitando as dimensões dos frascos âmbar. Sendo utilizados 270 g de solo e 8,1 g de cada material vegetal, umedecidos com aproximadamente 54 mL de água destilada [20% umidade (v/p)], além da testemunha solo (sem a incorporação de material vegetal).

5.2.5. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos voláteis

A identificação dos voláteis (análise qualitativa) foi realizada por comparação do índice de retenção experimental obtido para os compostos com os valores da literatura e também através de análise por GC-MS. Os parâmetros cromatográficos foram os mesmos utilizados nas análises por GC-FID. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C e a faixa de massas analisada foi de 40-350 u.m.a. A identificação dos picos foi feita usando o programa *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS)* v. 2.63 e a biblioteca *NIST Mass Spectral Search Program* v. 1.7 (NIST, Washington - DC, USA). Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca.

A análise semi-quantitativa, por sua vez, foi obtida após a qualitativa observando as áreas dos picos de cada volátil nos cromatogramas, uma vez que os mesmos já haviam sido identificados. Com base nestas áreas foi calculada a chamada “área normalizada”, utilizando como referência a maior área ou pico de um dado volátil (100%) (PM) e correlacionando com os demais picos deste mesmo volátil em cada material vegetal.

$$\text{“Área normalizada”} = \frac{\text{Área do Pico}}{\text{Área do maior Pico}} \times 100$$

Deste modo foi estimada a concentração, em porcentagem, de cada composto formado para cada material vegetal, em cada período testado, fornecendo dados importantes sobre o comportamento destes voláteis em cada material ao longo do tempo.

5.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

A etapa química contou com todos os tratamentos solo+material vegetal da etapa biológica, a exceção do tratamento solo+mandioca brava. Esse tratamento foi retirado, em virtude de problemas enfrentados em sua análise cromatográfica. Por se tratar de uma técnica (SPME) com uma alta sensibilidade e reprodutibilidade, atrelado a seu custo elevado, foram preparadas apenas duas réplicas por tratamento.

A análise qualitativa baseou-se na comparação entre a presença e ausência dos voláteis, em cada material vegetal (brócolis (BRO), mamona (MA) e mandioca mansa (MM)) e suas associações (BRO versus MA, BRO versus MA, MA versus MM e BRO versus MA versus MM). A avaliação semi-quantitativa foi realizada pela análise descritiva das médias e desvios padrões contando com três tratamentos (brócolis, mamona e mandioca mansa) e quatro períodos de avaliação (7, 14, 21 e 28 dias). Foi realizada também a análise de correlação linear de Pearson (ZAR, 1999) entre as porcentagens relativas dos voláteis emanados por cada material e os dados de sobrevivência das estruturas de resistência de cada fungo de solo avaliado na primeira etapa.

As análises estatísticas do trabalho, tanto da Primeira quanto da Segunda Etapa, contaram com o apoio e supervisão do Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, do Departamento de Bioestatística, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Primeira etapa: Biológica

6.1.1. Leitura dos gases O₂ e CO₂

A incorporação de determinados materiais orgânicos ao solo é uma técnica que quando associada à solarização pode aumentar sua eficiência no controle de fitopatógenos (SOUZA e BUENO, 2003). Um dos fatores que contribui para este aumento de eficiência está na geração de uma atmosfera anaeróbica. Isto ocorre porque a microbiota do solo, grande responsável pelo processo de decomposição dos materiais orgânicos, realiza durante este processo um grande consumo de oxigênio (O₂) e, conseqüentemente, libera uma grande quantidade de gás carbônico (CO₂) no solo (BUENO *et al.*, 2008).

Na Figura 7 constam às concentrações de O₂ e CO₂ mensuradas pelo aparelho leitor de gases Testo 325-1, nos diferentes tratamentos submetidos ao processo de solarização, em microcosmo, em diferentes períodos de exposição. É importante esclarecer que as concentrações destes gases, de maneira geral, são inversas para este tipo de ambiente. Sendo assim, quando um aumenta o outro certamente diminui e vice-versa (SOUZA, 2001).

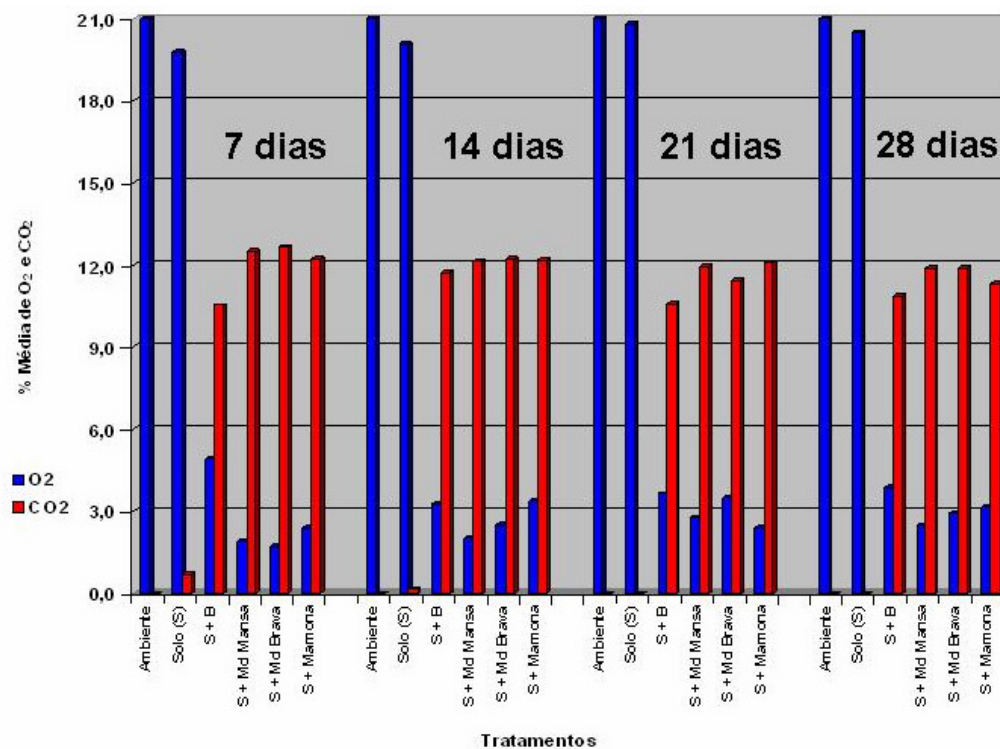


Figura 7. Concentração de oxigênio (O₂) e de gás carbônico (CO₂) nos diferentes tratamentos, submetidos ao processo de simulação da solarização, em microcosmo, com diferentes períodos de exposição aos tratamentos. **Legenda:** Ambiente – leitura do ambiente fora do microcosmo; S=Solo; B=Brócolis; Md=Mandioca.

Com base nos dados da Figura 7, observou-se que em todos os tratamentos onde houve incorporação de materiais vegetais no solo, seguido de simulação de solarização, a concentração de CO₂ foi alta e a de O₂ baixa, principalmente quando comparados com o solo (sem a incorporação de material vegetal) mais solarização e ambiente. Estes tratamentos não diferiram entre si quanto à concentração destes gases, apresentando altas concentrações de O₂ e baixas de CO₂. Estas informações demonstram o efeito da incorporação de resíduos vegetais ao solo, associados à solarização, na diminuição da concentração de O₂ e aumento na de CO₂, em razão da ação da microbita na decomposição dos resíduos vegetais (BLOK *et al.*, 2000).

Analisando apenas os tratamentos contendo solo + material vegetal, verificou-se que não houve diferença entre eles na maioria dos períodos avaliados, para ambos os gases mensurados. Entretanto, pode-se constatar que o brócolis foi o que

gerou uma menor concentração de gás carbônico e, conseqüentemente, uma maior de oxigênio (Tabela 3). Isto denota que apesar de possuir uma relação C/N menor (15/1, Tabela 1), o brócolis apresentou uma velocidade de decomposição inferior aos demais tratamentos contendo solo + material vegetal, principalmente no que se refere ao primeiro período avaliado (sete dias) (Tabela 3).

Tabela 3. Gases O₂ e CO₂ gerados pelos tratamentos, em associação com a simulação da solarização, comparados com o ambiente, em diferentes períodos de avaliação.

Gases	Tratamentos	Períodos de avaliação (dias)								Média ¹	
		7		14		21		28			
Oxigênio (O ₂)	solo+brócolis	4,92 [*]	b ² A ³	3,22	b B	3,62	b B	3,85	b B	3,90	c
	solo+mamona	2,37	c A	2,37	b A	2,40	b A	3,15	b A	2,57	d
	solo+md brava	1,67	c B	2,50	b B	3,50	b A	2,90	b B	2,64	d
	solo+md mansa	1,90	c A	2,02	b A	2,75	b A	2,47	b A	2,28	d
	Solo	19,77	a A	20,10	a A	20,80	a A	20,47	a A	20,28	b
	Ambiente	21,00	a A	21,00	a A	21,00	a A	21,00	a A	21,00	a
	CV (%)	10,07									
Gás carbônico (CO ₂)	solo+brócolis	10,52	b B	11,70	b A	10,57	b B	10,87	b B	10,91	b
	solo+mamona	12,23	c A	12,19	b A	12,08	c A	11,31	b A	11,95	c
	solo+md brava	12,65	c A	12,19	b A	11,44	c A	11,90	b A	12,04	c
	solo+md mansa	12,49	c A	12,15	b A	11,90	c A	11,88	b A	12,10	c
	Solo	0,65	a A	0,15	a A	0,00	a A	0,00	a A	0,20	a
	Ambiente	0,00	a A	0,00	a A	0,00	a A	0,00	a A	0,00	a
	CV (%)	8,98									

¹Análise da média dos tratamentos; ^{2,3}Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade; ^{*}Média de quatro repetições.

Esta informação contraria Assis *et al.* (2003) que aponta os materiais com baixa relação C/N como os mais favoráveis à ação de decomposição da microbiota do solo. No entanto, é importante ressaltar que a velocidade de decomposição depende, também, de outros fatores inerentes ao material e não somente sua riqueza em N ou sua relação C/N unicamente (RUSSEL e RUSSEL, 1968).

Quando comparados o efeito dos períodos para cada tratamento, quanto às concentrações de O₂ e CO₂, observou-se que a concentração destes gases não variaram significativamente com o período de exposição, a exceção do brócolis para ambos os gases (Tabela 3).

A rápida geração de ambiente anaeróbico, ou seja, baixa concentração de oxigênio e alta de gás carbônico, resultante do emprego de resíduos de diferentes espécies vegetais associados à solarização, é um importante fator que contribui para o controle de fitopatógenos termotolerantes ou não erradicados totalmente pela técnica de solarização quando utilizada isoladamente (BUENO *et al.*, 2008). Conforme o relato de Wyllie *et al.* (1984), baixas concentrações de O₂ no solo é um fator limitante para a germinação de microescleródios de determinados fitopatógenos de solo, sendo que concentrações de oxigênio abaixo de 16% podem afetar diretamente a viabilidade das estruturas de *M. phaseolina*.

Outros fatores contribuem para o controle de fitopatógenos, quando se utiliza a prévia incorporação de material orgânico combinado com a solarização (BUENO e SOUZA, 2002). Entre esses fatores, destacam-se a temperatura, a ação direta da microbiota do solo e os gases fungitóxicos emanados pela decomposição acelerada dos materiais vegetais incorporados no solo pela solarização.

6.1.2. Avaliação do efeito dos tratamentos no crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo

O crescimento micelial ou vegetativo é uma característica importante para a grande maioria dos fungos, sobretudo para os fitopatogênicos. Por meio do micélio, os fungos fitopatogênicos absorvem nutrientes das plantas e conseguem sobreviver fora do seu hospedeiro, em restos culturais ou na forma de estruturas de resistência (escleródios, microescleródios ou clamidósporos) originadas do micélio (KRUGNER e BACCHI, 1995). Por exemplo, no caso do fungo de solo *S. rolfsii*, os escleródios (estrutura de resistência) originam-se do enovelamento das hifas, que rapidamente se melanizam, resultando em um grânulo de coloração amarronzada que pode ficar no ambiente solo por meses ou anos (AYCOCK, 1966).

Na Tabela 4 constam os efeitos dos tratamentos, em associação com a simulação da solarização, sobre o micélio de cada organismo e para cada período avaliado.

Tabela 4. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo, submetidos à simulação de solarização, em microcosmo, e incubados em condições de BOD, a 37°C, no escuro, nos diferentes períodos avaliados.

Fungos	Tratamentos	Dias de exposição do micélio aos tratamentos											
		7			14			21			28		
		Efeito dos tratamentos ¹											
		IN ²	FS ³	FC ⁴	IN ²	FS ³	FC ⁴	IN ²	FS ³	FC ⁴	IN ²	FS ³	FC ⁴
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Solo+brocólis	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mamona	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mandioca brava	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mandioca mansa	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>M. phaseolina</i>	Solo+brocólis	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Solo+mamona	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Solo+mandioca brava	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Solo+mandioca mansa	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Solo	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>R. solani</i> AG-4 HGI	Solo+brocólis	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mamona	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mandioca brava	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo+mandioca mansa	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Solo	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. rolfii</i>	Solo+brocólis	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	Solo+mamona	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	Solo+mandioca brava	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	Solo+mandioca mansa	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	Solo	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+

¹Média de quatro repetições; ² Inócuo; ³Fungistático; e ⁴Fungicida.

Os símbolos de + e - indicam a ocorrência (+) ou não (-) do efeito dos tratamentos sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos estudados

De acordo com os dados da Tabela 4, pode-se constatar que o tratamento testemunha (solo) apresentou o mesmo efeito (inócuo, fungistático ou fungicida) observado para os tratamentos contendo solo + material vegetal, no crescimento micelial dos fitopatógenos, em todos os períodos de exposição avaliados. Isto denota que não houve influência significativa dos materiais vegetais incorporados no solo no crescimento micelial dos fungos, ou seja, os voláteis fungitóxicos oriundos da decomposição acelerada destes diferentes materiais vegetais, bem como a atmosfera

anaeróbica gerada (Figura 7), não foram os fatores limitantes na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados.

A temperatura de 37°C, na qual os fitopatógenos foram submetidos (simulação da solarização), pode ser apontada como o fator preponderante que atuou sobre a inibição do crescimento da estrutura vegetativa da maioria deles. Os micélios dos fungos ficaram expostos cerca de dez graus acima da temperatura ideal para o crescimento dos mesmos, a exceção da *M. phaseolina*, que cresce mesmo em temperatura acima de 30°C.

Segundo Kuniega-Alonso *et al.* (2005), a sobrevivência saprofítica destes organismos, em restos culturais, no solo, através do micélio, pode variar de meses a anos, dependendo das condições do ambiente. Neste contexto, a temperatura figura como uma das condições ambientais mais importantes, que pode reduzir, drasticamente, o crescimento e a viabilidade do micélio nos restos culturais (PARK, 1970).

O fungo *M. phaseolina* foi o único fitopatógeno estudado que apresentou efeito inócuo às condições impostas (Tabela 4). No contexto deste experimento, o efeito inócuo caracteriza-se por não haver nenhuma influência dos tratamentos sob o crescimento micelial do fungo. Mihail *et al.* (1988) verificaram que uma das condições favoráveis ao desenvolvimento da *M. phaseolina* são as altas temperaturas. Temperaturas variando de 28°C a 35°C foram relatadas como sendo favoráveis à sobrevivência e desenvolvimento deste fungo (DHINGRA e SINCLAIR, 1978). Este relato corrobora os dados obtidos no presente trabalho (Tabela 4), por se tratar de fungo altamente termotolerante, a *M. phaseolina* não sofreu nenhuma influência da temperatura de 37°C no crescimento do seu micélio.

O efeito fungistático foi constatado para os fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 e *R. solani* AG-4 HGI, somente nos períodos de sete e 14 dias de exposição. Para *S. rolfsii*, além destes dois períodos citados, o mesmo ainda apresentou efeito fungistático para o período de 21 dias (Tabela 4). O efeito fungistático caracteriza-se por não inativar, de maneira definitiva, o organismo. Um determinado efeito ou uma combinação deles paralisa, momentaneamente, o seu crescimento. No entanto, quando o organismo é colocado em condições ideais o micélio volta novamente a se desenvolver.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii* são fungos cuja temperatura ótima de crescimento micelial é de 25 a 26°C (BUENO, 2004). Por esta razão, estes fungos paralisaram, momentaneamente, o seu crescimento micelial quando incubados a temperatura de 37°C, nos períodos de exposição citados,

voltando a crescer apenas quando incubados em sua temperatura ideal de desenvolvimento (25°C).

Vale ressaltar para o efeito fungistático, que apesar dos fungos voltarem a se desenvolver quando incubados em suas temperaturas ideais de crescimento, os mesmos apresentaram uma velocidade média e diária de crescimento micelial significativamente inferior à observada para o controle geral, indicando que houve uma alteração na fisiologia destes fitopatógenos (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do efeito fungistático sobre a velocidade de crescimento média e diária do micélio (VCMDM) dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo, nos diferentes tratamentos, de acordo com o período de exposição avaliado.

Fungos	Tratamentos	Dias de exposição do micélio aos tratamentos /								
		Velocidade média e diária de crescimento micelial (cm.dia ⁻¹)								
		7			14			21		
<i>S. rolfsii</i>	Controle Geral ¹	1,77*	a ³	A ³	1,77	a	A	1,77	a	A
	Solo+brocólis ²	1,22	b	A	0,94	b	B	1,19	b	A
	Solo+mamona ²	1,22	b	A	0,98	b	B	1,19	b	A
	Solo+mandioca brava ²	1,19	b	A	0,97	b	B	1,21	b	A
	Solo+mandioca mansa ²	1,29	b	A	0,97	b	B	1,07	b	B
	Solo ²	1,25	b	A	0,93	b	B	1,07	b	B
CV (%)		10,36								
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Controle Geral ¹	0,45	a	B	0,88	a	A	-	-	-
	Solo+brocólis ²	0,27	b	A	0,34	b	A	-	-	-
	Solo+mamona ²	0,20	b	B	0,42	b	A	-	-	-
	Solo+mandioca brava ²	0,22	b	A	0,28	b	A	-	-	-
	Solo+mandioca mansa ²	0,25	b	B	0,38	b	A	-	-	-
	Solo ²	0,30	b	B	0,43	b	A	-	-	-
CV (%)		18,90								
<i>R. solani</i> AG-4 HGI	Controle Geral ¹	2,65	a	A	2,65	a	A	-	-	-
	Solo+brocólis ²	1,63	b	A	1,03	b	B	-	-	-
	Solo+mamona ²	1,85	b	A	1,02	b	B	-	-	-
	Solo+mandioca brava ²	1,59	b	A	1,05	b	B	-	-	-
	Solo+mandioca mansa ²	1,60	b	A	1,03	b	B	-	-	-
	Solo ²	1,61	b	A	1,07	b	B	-	-	-
CV (%)		9,06								

¹Estruturas vegetativas de cada fungo submetidas a condições ideais de temperatura de crescimento; ²Estruturas vegetativas submetidas ao processo de simulação de solarização, em microcosmo, e incubadas em condições de BOD, a 37°C, no escuro; *Média de quatro repetições; ³Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Dentre os fungos que apresentaram efeito fungistático não foi observado diferenças entre os tratamentos para nenhum dos períodos avaliados. Os tratamentos apenas diferiram com relação ao controle geral. Esta observação reforça a afirmação de que não houve influência significativa tanto dos voláteis fungitóxicos oriundos da decomposição acelerada dos diferentes materiais vegetais estudados, quanto da atmosfera anaeróbica gerada, no crescimento micelial dos fungos (Tabela 5).

Analisando os períodos de exposição para o fungo *S. rolfsii*, observou-se uma oscilação na velocidade de crescimento micelial nos períodos de sete, 14 dias e 21 dias. A taxa de crescimento micelial foi menor no período de 14 dias em relação aos períodos de sete e 21 dias. Estes períodos não diferiram entre si quanto à taxa de crescimento micelial nos diferentes tratamentos, com exceção dos tratamentos solo + mandioca mansa e solo (sem a incorporação de material vegetal, Tabela 5). Para este fungo, constatou-se um período maior (28 dias) de exposição à temperatura de 37°C para haver efeito fungicida sobre as suas estruturas vegetativas (Tabela 4).

Para o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, a exceção dos tratamentos solo + brócolis e solo + mandioca brava, a velocidade de crescimento no período de sete dias foi inferior à apresentada aos 14 dias, indicando que o tempo de incubação por algum motivo favoreceu o crescimento micelial deste fungo (Tabela 5). Entretanto, à medida que se aumentou o período de exposição do micélio à temperatura de 37°C, o efeito passou a ser fungicida, ou seja, não houve mais crescimento do fungo aos 21 dias (Tabela 4).

No caso de *R. solani* AG-4 HGI, em relação ao período de sete dias, verificou-se uma diminuição na velocidade de crescimento do micélio aos 14 dias, para a maioria dos tratamentos, com exceção do tratamento controle geral. Para este fungo, o efeito da temperatura e do tempo de exposição mostra-se prejudicial ao micélio, ou seja, com 14 dias houve uma significativa diminuição no crescimento em comparação aos sete dias. Aos 21 dias, o efeito sobre as estruturas vegetativas foi fungicida (Tabelas 4 e 5).

Com relação ao efeito fungicida, este foi verificado para os fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 e *R. solani* AG-4 HGI a partir do período de 21 dias de incubação, enquanto que para *S. rolfsii* este efeito foi constatado apenas aos 28 dias (Tabela 4). Pode-se verificar que, a partir de um determinado período de exposição destes fungos a simulação da solarização, o crescimento micelial é inativado, independente do tratamento, não voltando a se desenvolver mesmo quando incubados em condições ideais de temperatura. Outra constatação importante é que o período para inativação definitiva varia de organismo para organismo, sendo de 21 dias para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 e *R. solani* AG-4 HGI e de 28 dias para *S. rolfsii*.

A simulação da solarização (37°C) afetou o crescimento das estruturas vegetativas dos fungos estudados, com exceção da *M. phaseolina*, sendo

verificando um efeito fungistático nos primeiros períodos de avaliação e efeito fungicida para os últimos períodos, principalmente quando avaliados aos 28 dias.

Com base nos dados apresentados nas Tabelas 4 e 5, pode-se concluir que os voláteis oriundos da decomposição acelerada dos diferentes materiais vegetais incorporados no solo, bem como a atmosfera anaeróbica proporcionada (Figura 7), não são os fatores limitantes na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados. O principal fator que causou efeito fungistático e fungicida para o micélio dos fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii* foi a temperatura de 37°C.

6.1.3. Avaliação do efeito dos tratamentos nas estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo

6.1.3.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2

Quanto à sobrevivência das estruturas de resistência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos contendo solo + material vegetal com relação aos tratamentos contendo solo (sem a incorporação de material vegetal), o laboratório e a população inicial (Figura 8; Tabela 6). Em função disto, constatou-se a efetividade dos voláteis fungitóxicos e da condição de anaerobiose (Figura 7) na diminuição da viabilidade dos clamidósporos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2.

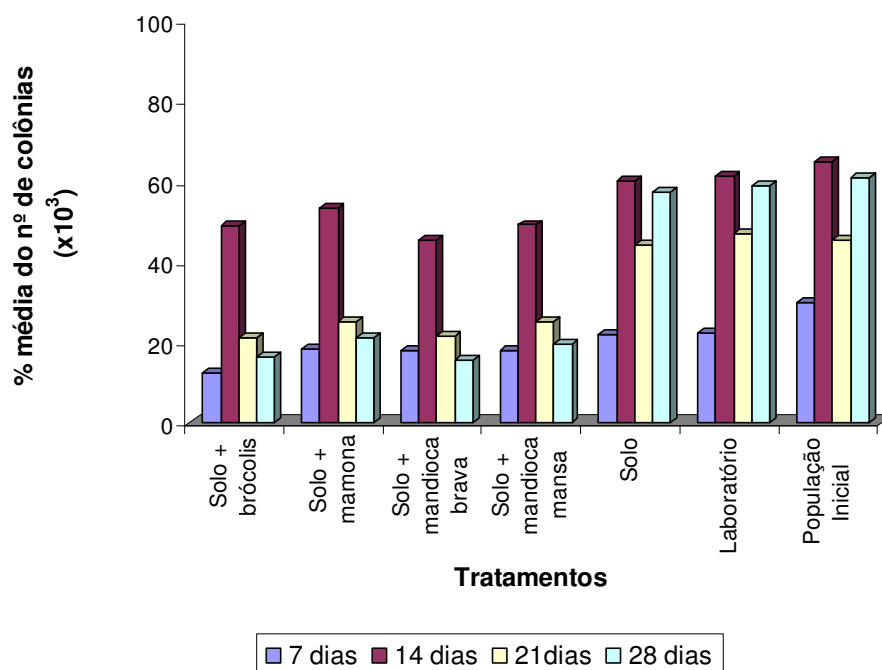


Figura 8. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, em diferentes tratamentos mantidos por diferentes períodos em condições de microcosmo ($37\pm 2^\circ\text{C}$).

Tabela 6. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2.

Tratamentos	Dias de exposição das estruturas aos tratamentos /												Média	
	(%) Média de estruturas sobreviventes													
	7			14			21			28				
Solo+brocolis	12,40*	d ¹	B ¹	48,95	b	A	21,10	b	B	16,40	b	C	24,71	d
Solo+mamona	18,40	c	B	53,55	b	A	25,05	b	B	21,20	b	C	29,55	c
Solo+mandioca brava	17,85	c	B	45,45	b	A	21,65	b	B	15,50	b	B	25,11	d
Solo+mandioca mansa	17,85	c	B	49,20	b	A	25,00	b	B	19,55	b	B	27,90	c
Solo	21,75	b	B	60,10	a	A	44,25	a	A	57,55	a	A	45,91	b
Laboratório	22,45	b	B	61,25	a	A	46,95	a	A	58,80	a	A	47,36	b
População Inicial	29,70	a	B	65,00	a	A	45,55	a	A	60,90	a	A	50,29	a
CV (%)	9,24													

*Porcentagem referente à média de quatro repetições;

¹Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Entre os tratamentos solo + material vegetal não foi verificada diferença entre eles para a maioria dos períodos analisados, com exceção de sete dias onde o tratamento solo + brócolis foi o que obteve os menores índices de sobrevivência das estruturas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 (Tabela 6). Considerando a porcentagem média de sobrevivência das estruturas deste fungo, pode-se observar diferença entre os tratamentos no controle deste fungo, mostrando que há especificidade de toxicidade do material vegetal em relação a este fitopatógeno. Esta informação assemelha-se com o que foi constatado por Ambrósio (2006), que também observou uma diferença na eficiência de controle entre os materiais vegetais.

Assim como foi observado por Ambrósio (2006), tanto em microcosmo como em campo, os tratamentos mais eficientes no controle deste fungo foram solo + brócolis e solo + mandioca brava. Apesar de estatisticamente inferiores, os tratamentos solo + mamona e solo + mandioca mansa apresentaram eficiência no controle deste patógeno quando comparados ao solo (sem a incorporação de material vegetal), o laboratório e a população inicial (Tabela 6).

O fato dos tratamentos solo e laboratório não terem diferido entre si, mas estes dois terem diferenciado dos tratamentos contendo solo + material vegetal, é um importante indicativo de que a alta temperatura de 37°C não foi um fator limitante para redução da sobrevivência das estruturas de resistência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2. Além disto, os valores da população inicial, inóculo no momento da montagem de cada ensaio, quando comparados com os valores dos tratamentos contendo solo + material vegetal, demonstram o efeito dos voláteis, das condições de anaerobiose e dos períodos de avaliação sobre a diminuição da viabilidade das estruturas do fungo (Tabela 6).

Os valores da população inicial, quando comparados com os valores dos tratamentos solo (sem a incorporação de material vegetal) e o laboratório, demonstram que não houve diferenciação quanto à sobrevivência dos clamidósporos do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, a exceção apenas no período de sete dias. Além de comprovar o efeito dos voláteis e das condições anaeróbicas sobre os clamidósporos, isto demonstra também a eficiência da metodologia de produção de estruturas de resistência do fungo em questão, pois as estruturas sobreviveram por um longo período (28 dias) sem alteração, atestando a qualidade dos dados e da conclusão.

Os tratamentos solo + material vegetal se comportaram de maneira semelhante para todos os períodos. O período de 14 dias foi o que apresentou os maiores

índices de sobrevivência, enquanto que os períodos de sete e 21 dias apresentaram índices intermediários e o de 28 dias os menores valores. Para o tratamento contendo solo (sem a incorporação de material vegetal) e o laboratório, o período de sete dias apresentou, em média, menor sobrevivência, enquanto que os demais períodos não diferiram entre si, mas a sobrevivência foi significativamente semelhante a população inicial (Tabela 6). Não foi constatada diferença entre os períodos para a população inicial, isso explica o porquê do mesmo ter sido utilizado como referência para a transformação dos demais dados para base 100 na análise estatística.

Deste modo não foi observado para nenhum tratamento e em nenhum dos períodos avaliados, a erradicação total das estruturas de resistência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2. Todavia, pode-se verificar uma tendência de diminuição do inóculo no decorrer do tempo para a maioria dos tratamentos contendo solo + material vegetal. Embora Ambrósio (2006) trabalhando com microcosmo e em campo com este mesmo fitopatógeno tenha obtido 100% de erradicação das estruturas, quando incorporou-se em ambas as situações 1kg.m^{-2} e 3kg.m^{-2} de material vegetal, no presente trabalho esta observação não foi confirmada. Esta observação procede, certamente, em virtude da diferença entre a metodologia aplicada no presente trabalho e a empregada por Ambrósio (2006), onde as estruturas de resistência também sofreram a interferência dos microorganismos presentes no solo. Isso indica que no trabalho de Ambrósio (2006) houve influência de microorganismos antagonistas (GHORBANI *et al.*, 2008) juntamente com a ação dos voláteis fungitóxicos e da condição de anaerobiose. No presente trabalho, por sua vez, não houve a contribuição dos antagonistas (Figura 9) já que as estruturas do fungo ficaram expostas apenas à ação dos voláteis, da condição de anaerobiose e da temperatura (Figura 7). Portanto, em função disto, houve apenas diminuição significativa da viabilidade dos clamidósporos do fungo e não a sua erradicação total.

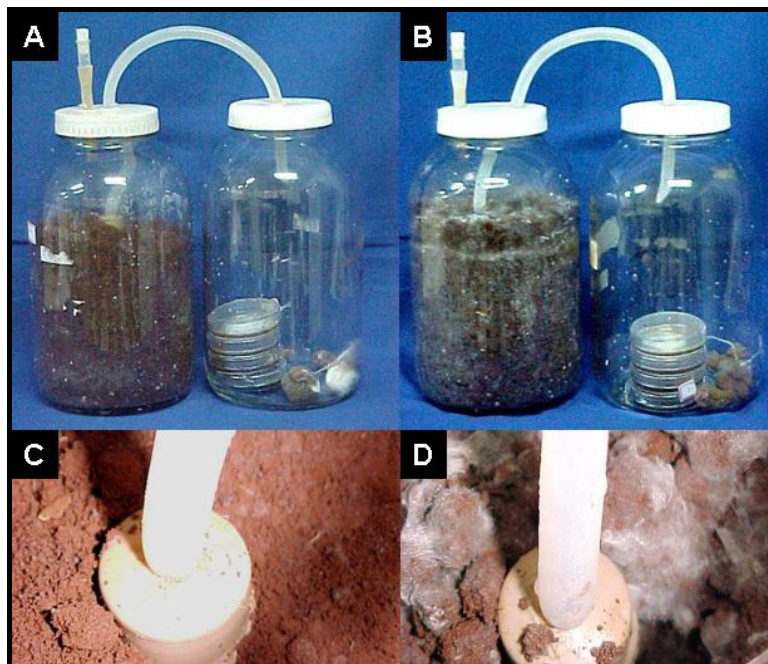


Figura 9. Comparação da atividade da microbiota do solo nos tratamentos contendo solo (sem a incorporação de material vegetal) e solo + material vegetal. **Legenda:** 9A - Conjunto de microcosmo com solo (sem a incorporação de material vegetal); 9B - Conjunto de microcosmo com solo + material vegetal; 9C - Detalhe da sonda inserida no solo (sem a incorporação de material vegetal); 9D - Detalhe da sonda inserida no solo + material vegetal.

Venâncio *et al.* (2006) verificaram que em solos solarizados não ocorre vácuo biológico como em solos esterilizados com brometo de metila e, além disto, os solos solarizados apresentam uma microbiota bem diversificada, tanto em quantidade como em qualidade, conferindo capacidade de controlar fitopatógenos de solo.

Diante dos resultados, os materiais vegetais mais promissores para as condições testadas, proporcionando os menores índices de sobrevivência para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, foram o brócolis e a mandioca brava. O brócolis já vem sendo exaustivamente estudado na literatura quanto aos voláteis liberados em seu processo de decomposição e seus efeitos sobre vários fitopatógenos (RAMIREZ-VILLAPUDUA e MUNNECKE, 1988; BLOK *et al.*, 2000; SOUZA e BUENO, 2003; AMBRÓSIO *et al.*, 2004). No entanto, para a mandioca brava e os demais materiais vegetais testados neste trabalho, que também reduziram significativamente a sobrevivência

das estruturas de resistência do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, ainda não são conhecidos os voláteis seguramente responsáveis por esta redução.

6.1.3.2. *Macrophomina phaseolina*

Foi observada diferença significativa entre os tratamentos solo + material vegetal com relação aos tratamentos solo e Laboratório, para todos os períodos avaliados (Figura 10; Tabela 7). Esta informação também observada para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, atesta, novamente, a efetividade da ação dos voláteis e da condição de anaerobiose agora sobre as estruturas de resistência de *M. phaseolina*.

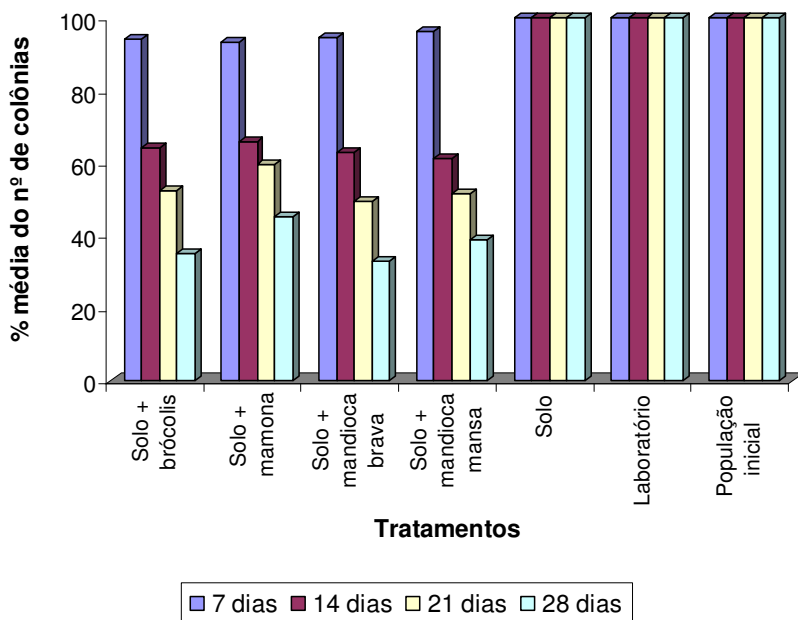


Figura 10. Sobrevivência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*, em diferentes tratamentos mantidos por diferentes períodos em condições de microcosmo ($37\pm 2^\circ\text{C}$).

Tabela 7. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*.

Tratamentos	Dias de exposição das estruturas aos tratamentos /												Média	
	(%) Média de estruturas sobreviventes													
	7			14			21			28				
Solo+brócolis	94,00*	c ¹	A ¹	64,00	b	B	52,50	c	C	35,00	c	D	61,38	c
Solo+mamona	93,50	c	A	66,00	b	B	59,50	b	B	45,00	b	C	66,00	b
Solo+mandioca brava	94,50	c	A	63,00	b	B	49,50	c	C	33,00	c	D	60,00	c
Solo+mandioca mansa	96,50	b	A	61,00	b	B	51,50	c	C	39,00	c	D	62,00	b
Solo	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
Laboratório	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
População Inicial	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
CV (%)	4,49													

*Porcentagem referente à média de quatro repetições;

¹Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Os tratamentos solo + material vegetal apresentaram também diferenças quanto comparados entre si dentro dos períodos (Tabela 7). Para o período de sete dias foi constatado diferença entre os materiais vegetais para a mandioca mansa, enquanto que aos 21 e 28 dias o tratamento solo + mamona foi o que se mostrou menos eficiente com relação à diminuição da viabilidade das estruturas de sobrevivência do fungo.

Na média geral, a exemplo do constatado por Ambrósio (2006), os tratamentos que apresentaram os menores índices de sobrevivência de *M. phaseolina* foram o solo + brócolis e solo + mandioca brava que foram estatisticamente superiores aos tratamentos solo + mamona e solo + mandioca mansa. Todos os tratamentos, solo + material vegetal diferiram do solo (sem a incorporação de material vegetal), laboratório e população inicial (Tabela 7).

Não foi observada diferença entre os tratamentos, solo (sem a incorporação de material vegetal), laboratório e a população inicial (Tabela 7), mas estes diferiram dos tratamentos contendo solo + material vegetal. Isto demonstra que a condição de alta temperatura (37°C) não afetou diretamente as estruturas de resistência de *M. phaseolina*. No trabalho de Ambrósio (2006), em condições de campo e em microcosmo, não se observou, também, o efeito da solarização isoladamente sobre as estruturas de sobrevivência de *M. phaseolina*.

Quanto ao efeito dos períodos de exposição, independentemente do material vegetal adicionado ao solo, pode-se constatar uma tendência significativa de redução da viabilidade das estruturas de resistência da *M. phaseolina* com o decorrer do tempo, a exceção do solo (sem a incorporação de material vegetal) e do laboratório que se mantiveram constantes (Tabela 7).

O fato do solo (sem a incorporação de material vegetal), laboratório e população inicial não terem diferido entre si quanto ao período de exposição, confirma a alta viabilidade das estruturas do *M. phaseolina* com o decorrer do tempo e indica que para as condições e períodos testados neste trabalho, a simulação da solarização, quando utilizada isoladamente, não afeta as estruturas de resistência do fungo. Além disso, atesta a eficiência da metodologia de produção das estruturas do fungo (BUENO, 2004). Esta informação corrobora os dados obtidos por McCain *et al.* (1982), Mihail e Alcorn (1984), Hartz *et al.* (1987) e Ambrósio (2000 e 2006), que também não conseguiram erradicar a *M. phaseolina* através da solarização do solo quando empregada isoladamente.

No presente trabalho, não se observou a erradicação total das estruturas de *M. phaseolina* em todos os períodos testados, o que difere do constatado por Ambrósio (2006). A explicação para isto é a mesma descrita para o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2.

A adição de brócolis e mandioca brava no solo foram os tratamentos mais eficientes na diminuição da sobrevivência das estruturas da *M. phaseolina* (Tabela 7), a exemplo do que foi constatado por Ambrósio (2006).

6.1.3.3. *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI

Em todos os períodos avaliados, os tratamentos solo + material vegetal foram eficientes e diferiram dos tratamentos contendo solo (sem a incorporação de material vegetal), laboratório e população inicial, quanto a diminuição da sobrevivência dos escleródios de *R. solani* AG-4 HGI (Figura 11; Tabela 8). Portanto, houve a ação dos voláteis fungitóxicos emanados pela decomposição dos materiais testados e da condição de anaerobiose sobre *R. solani* AG-4 HGI, fato este ocorrido também para o *Fusarium* e para a *Macrophomina*.

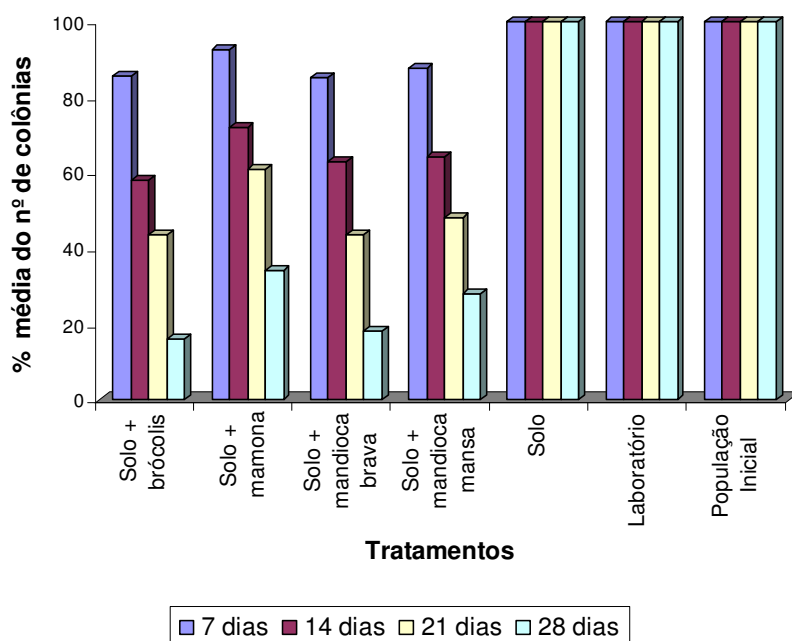


Figura 11. Sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI, em diferentes tratamentos mantidos por diferentes períodos em condições de microcosmo ($37\pm 2^\circ\text{C}$).

Tabela 8. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI.

Tratamentos	Dias de exposição das estruturas aos tratamentos /												Média	
	(% Média de estruturas sobreviventes)													
	7			14			21			28				
Solo+brocolis	85,40*	c ¹	A ¹	58,00	c	B	43,50	c	C	16,00	c	D	50,73	d
Solo+mamona	92,50	b	A	72,00	b	B	61,00	b	C	34,00	b	D	64,88	b
Solo+mandioca brava	85,00	c	A	63,00	c	B	43,50	c	C	18,00	c	D	52,38	d
Solo+mandioca mansa	87,50	c	A	64,00	c	B	48,00	c	C	28,00	b	D	56,88	c
Solo	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
Laboratório	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
População Inicial	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
CV (%)	4,89													

*Porcentagem referente a média de quatro repetições;

¹Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Entre os tratamentos solo + material vegetal foi observado um comportamento semelhante para os três primeiros períodos avaliados, sendo apenas

constatada diferença entre o tratamento solo + mamona com relação aos demais tratamentos solo + material vegetal, que apresentaram os menores índices de sobrevivência. Aos 28 dias, os tratamentos que apresentaram os menores índices de sobrevivência das estruturas do fungo foram o solo + brócolis e solo + mandioca brava, enquanto que o solo + mamona e solo + mandioca mansa apresentaram efeito intermediários (Tabela 8).

Considerando a porcentagem média das estruturas de resistência nos períodos avaliados foi observado que os tratamentos solo + brócolis e solo + mandioca brava foram os materiais mais adequados para o controle das estruturas de sobrevivência de *R. solani* AG-4 HGI (Tabela 8), conforme constatado também por Ambrósio (2006), tanto em condições de campo, quanto em microcosmo.

A análise do efeito dos períodos de avaliação sobre a sobrevivência das estruturas de resistência de *R. solani* AG-4 HGI foi semelhante ao mencionado para *M. phaseolina*. Verificou-se uma redução da sobrevivência das estruturas de resistência com o decorrer dos períodos para os tratamentos contendo solo + material vegetal. Nos tratamentos solo (sem a incorporação de material vegetal) e o laboratório não se observou efeito algum do tempo de exposição sobre as estruturas. Esta redução demonstra a importância do tempo de exposição das estruturas de resistência do fitopatógeno em contato com os voláteis gerados (Tabela 8).

Confirmando o que foi observado para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 e *M. phaseolina*, e contrariando o que foi verificado por Ambrósio (2006), tanto em condição de microcosmo, quanto em condições de campo, não foi constatada a erradicação total de *R. solani* AG-4 HGI nas condições testadas. Entretanto, o que se verifica é uma redução significativa dos índices de sobrevivência das estruturas de resistência com relação aos tratamentos solo + material vegetal quando comparados ao solo (sem a incorporação de material vegetal) e laboratório. A explicação para isto está também na ação dos microrganismos comumente verificada em condições naturais de campo (GHORBANI *et al.*, 2008).

Entre os tratamentos, apesar da especificidade de toxicidade de um material em relação a cada fitopatógeno, o que se pode notar para os fungos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI, é que para todos eles os tratamentos solo + brócolis e solo + mandioca brava foram os que associados a condição

de anaerobiose (Figura 7) apresentaram maior sucesso na tentativa de erradicação das estruturas de resistência destes fungos como verificado por Ambrósio *et al.* (2008).

6.1.3.4. *Sclerotium rolfii*

Os tratamentos solo + material vegetal também foram estatisticamente superiores aos tratamentos solo (sem a incorporação de material vegetal) e laboratório na diminuição da viabilidade dos escleródios de *S. rolfii* (Figura 12; Tabela 9). Os tratamentos solo, laboratório e população inicial não diferiram entre si, mas estes tratamentos diferiram dos tratamentos contendo solo + material vegetal. Mais uma vez esta informação serve de base para comprovar o efeito dos voláteis agora para diminuição da sobrevivência.

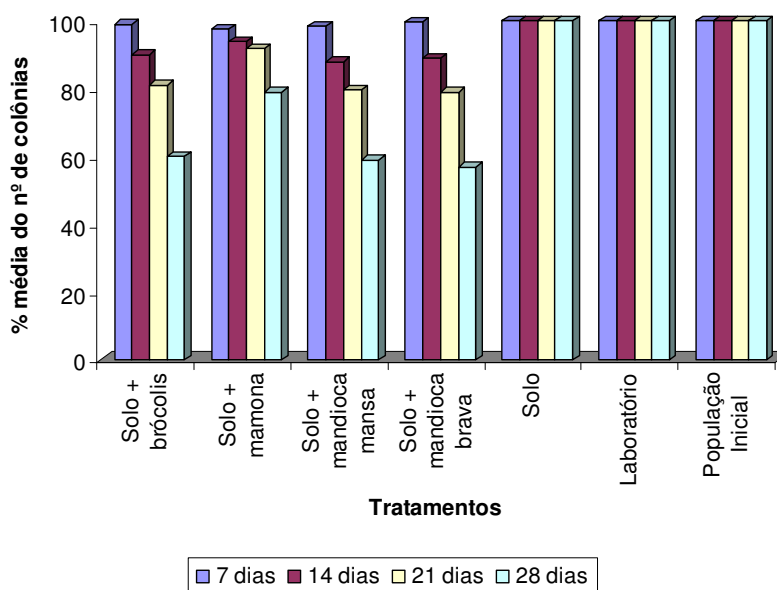


Figura 12. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfii*, em diferentes tratamentos mantidos por diferentes períodos em condições de microcosmo ($37\pm 2^\circ\text{C}$).

Tabela 9. Efeito de diferentes tratamentos submetidos a diferentes períodos sobre a sobrevivência de escleródios de *Sclerotium rolfsii*.

Tratamentos	Dias de exposição das estruturas aos tratamentos /												Média	
	(% Média de estruturas sobreviventes)													
	7			14			21			28				
Solo+brócolis	99,00*	b ¹	A ¹	90,00	c	B	81,00	c	C	60,00	c	D	82,50	c
Solo+mamona	97,50	b	A	94,00	b	B	92,00	b	B	79,00	b	C	90,63	b
Solo+mandioca brava	98,50	b	A	88,00	c	B	79,50	c	C	59,00	c	D	81,25	c
Solo+mandioca mansa	99,50	b	A	89,00	c	B	79,00	c	C	57,00	c	D	81,13	c
Solo	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
Laboratório	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
População Inicial	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a	A	100,00	a
CV (%)	3,90													

*Porcentagem referente à média de quatro repetições;

¹Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, segundo o teste de Scott-Knott.

Entre os tratamentos solo + material vegetal, apenas constatou-se diferença entre eles para a mamona, que a partir do período de 14 dias apresentou índices de sobrevivência superiores aos demais (Tabela 9). Deste modo, para *S. rolfsii*, diferentemente do que foi constatado para os demais fungos, o brócolis, a mandioca brava e a mansa podem ser apontados como os materiais mais promissores para a redução da sobrevivência das estruturas do *S. rolfsii*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ambrósio (2006) onde os tratamentos solo + brócolis e solo + mandioca brava propiciaram o melhor controle para *S. rolfsii*, já quando se associou a incorporação de mamona com a solarização não houve erradicação do fitopatógeno, embora tenha sido observada uma significativa redução no número médio de colônias viáveis.

Assim como verificado para os outros fitopatógenos, nos tratamentos onde se incorporou material vegetal, os períodos de exposição aos tratamentos tiveram um efeito significativo na diminuição gradativa da viabilidade dos escleródios do fungo (Tabela 9).

Os tratamentos solo (sem a incorporação de material vegetal), laboratório e população inicial, do mesmo modo como observado para *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI, não diferiram entre si quanto aos períodos, mantendo o índice de sobrevivência idêntico para todos os ensaios testados (Tabela 9). Além de comprovar o

efeito dos voláteis e das condições anaeróbicas sobre as estruturas de resistência, pode-se verificar também a eficiência da metodologia de produção das estruturas de resistência do fungo em questão, pois as estruturas sobreviveram por até 28 dias sem alteração, atestando a qualidade dos dados e da conclusão.

É importante ressaltar que diante de todos os fitopatógenos estudados, o *S. rolfsii* foi o que apresentou uma menor redução na sobrevivência de suas estruturas de resistência, para todos os tratamentos estudados ao longo dos períodos (Figura 9). Esta redução, quando comparado aos demais fungos, provavelmente deve-se as características do escleródio de *S. rolfsii*, que se mostrou mais resistente aos efeitos dos voláteis emanados pela decomposição dos materiais vegetais e as condições impostas a ele no presente trabalho.

Para *S. rolfsii*, a mandioca mansa obteve efeito semelhante ao observado para a mandioca brava, diferente dos demais fitopatógenos. Independentemente desta diferenciação entre seus efeitos, para alguns fitopatógenos (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI), em todos os casos, tanto a mandioca brava quanto a mansa reduziram significativamente a sobrevivência das estruturas de resistência destes organismos, quando comparadas aos tratamentos testemunhas (solo - sem a incorporação de material vegetal), laboratório e população inicial).

6.2. Segunda etapa: Química

Uma vez detectada a influência dos voláteis na diminuição da sobrevivência das estruturas de resistência dos organismos testados, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii*, a segunda etapa veio dar seguimento ao trabalho, auxiliando na identificação de voláteis potenciais nesta ação. Para atender a esse objetivo, a técnica para extração e identificação utilizada foi a Microextração em Fase Sólida (SPME) (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

A técnica de SPME, introduzida no início dos anos 90, tem sido largamente estudada e aplicada a diversos tipos de amostra por ser uma técnica de extração rápida, simples, que dispensa o uso de solventes e a manipulação excessiva da amostra, na qual os processos de extração e pré-concentração das substâncias ocorrem numa escala

dimensionalmente pequena, o que a torna bastante precisa (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

6.2.1. Análise Qualitativa

Nas Tabelas 10, 11 e 12, verifica-se para cada material vegetal, em cada período avaliado, os voláteis devidamente identificados e separados em grupos, além do tempo de retenção, importante característica no que diz respeito à identificação de cada composto, o pico máximo atingido por cada volátil ao longo das análises, e sua respectiva área normalizada, calculada a partir do pico máximo para cada volátil.

Tabela 10. Voláteis oriundos da decomposição do brócolis, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.

Grupos de Voláteis	Voláteis	TR*	Pico	Tempo de exposição (dias) / Área Normalizada				
		(min)	Máximo	0	7	14	21	28
ÁLCOOIS	etanol	2,56	582,00	14,35	99,31	0,00	0,00	0,00
	1-propanol	3,09	103,00	0,00	96,12	27,18	7,77	0,00
	2-butanol	3,41	255,50	0,00	36,40	90,80	63,99	100,00
	2-metil-1 propanol	3,71	58,00	0,00	98,28	70,69	89,66	68,10
	1-butanol	4,30	1295,50	0,00	93,92	34,16	3,47	0,00
	3-metil-1-butanol	6,05	266,00	11,47	98,87	84,77	48,50	40,79
	2-metil-1-butanol	6,20	138,50	0,00	70,94	97,29	66,06	70,76
	1-hexanol	13,80	371,00	38,14	89,49	65,09	11,73	9,16
	feniletilálcool	21,25	165,00	0,00	97,27	46,36	40,91	40,91
CETONAS	acetona	2,70	1163,00	5,76	33,66	58,94	85,86	93,85
	2-butanona	3,35	394,00	12,82	12,82	33,88	64,85	88,83
	2-pentanona	4,73	345,00	4,93	11,45	18,84	48,26	95,94
	3-octanona	18,80	301,00	35,88	9,97	33,39	86,88	87,87
ÁCIDOS	ácido acético	nd ¹	520,50	0,00	49,38	94,76	83,67	42,27
	ácido butanóico	nd ¹	1200,00	0,00	95,83	35,42	0,00	0,00
	ácido 2-metil-butanóico	nd ¹	1050,00	0,00	16,67	86,19	97,62	95,71
ÉSTERES	butanoato de metila	5,70	60,50	31,40	99,59	91,74	53,72	64,46
	butanoato de butila	19,07	253,00	23,12	99,01	56,13	20,36	20,36
	hexanoato de etila	19,20	153,50	28,99	98,53	69,06	59,93	71,01
	3-metil-butanoato de butila	20,15	499,50	0,00	94,04	0,00	0,00	0,00
	2-propenoato de 2-metilpentil	21,18	147,50	0,00	94,07	48,81	42,71	39,66
SULFURADOS	dimetilsulfeto	2,81	512,00	0,00	62,99	75,68	57,42	96,88
	dimetildissulfeto	6,40	892,00	24,50	11,43	20,68	87,16	20,35
	metil-benzilssulfeto	22,10	188,00	31,91	97,34	84,31	71,28	79,26
	5-metiltiopentanonitrila	22,55	91,50	90,71	83,33	94,26	68,31	92,62
OUTROS	2,5-dimetilfurano	5,20	408,00	6,86	96,81	96,20	45,59	39,58
	n.i. ¹	9,30	143,00	0,00	99,65	0,00	0,00	0,00
	n.i.	12,80	626,50	97,89	21,71	0,00	0,00	0,00
	n.i.	22,05	223,00	25,11	97,76	90,13	73,09	78,48

* TR – tempo de retenção; ¹ n.i. – não identificado.

Tabela 11. Voláteis oriundos da decomposição da mamona, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.

Grupos de Voláteis	Voláteis	TR*	Pico	Tempo de exposição (dias) / Área Normalizada				
		(min)	Máximo	0	7	14	21	28
ÁLCOOIS	etanol	2,56	1189,50	3,67	99,56	24,38	8,79	1,93
	1-propanol	3,09	97,00	0,00	91,24	51,03	29,38	21,13
	2-butanol	3,41	1281,00	0,00	37,00	75,29	82,28	98,01
	1-butanol	4,30	3753,00	0,00	97,97	59,57	35,17	35,97
	3-metil-1-butanol	6,05	80,00	0,00	94,38	95,00	96,25	70,00
	2-metil-1-butanol	6,20	63,00	0,00	93,65	89,68	85,71	60,32
	3-hexen-1-ol	13,00	2974,00	99,34	22,31	14,22	9,89	4,20
	1-hexanol	13,80	1288,00	62,89	54,74	97,48	73,02	40,49
CETONAS	acetona	2,70	381,00	11,29	91,86	59,71	70,08	66,14
	2-butanona	3,35	559,50	0,00	35,48	49,60	72,83	88,52
	3-pentanona	4,93	334,50	97,98	43,80	25,56	28,40	29,45
	2-heptanona	14,80	423,50	83,35	98,41	45,45	33,41	25,86
ÁCIDOS	ácido acético	nd ¹	874,50	0,00	73,01	95,57	71,07	25,96
	ácido 2-metil-propanóico	nd ¹	291,50	0,00	0,00	0,00	53,52	91,51
	ácido butanóico	nd ¹	5000,50	0,00	55,89	98,89	79,84	96,72
	ácido 3-metil-butanóico	nd ¹	530,00	0,00	0,00	33,02	55,09	94,34
	ácido 2-metil-butanóico	nd ¹	400,50	0,00	0,00	21,10	78,03	99,56
	ácido pentanóico	nd ¹	327,00	0,00	0,00	22,94	98,01	87,46
ÉSTERES	ácido hexanóico	nd ¹	1301,00	0,00	0,00	24,98	69,64	96,12
	butanoato de metila	5,70	105,00	17,14	92,86	83,81	0,00	0,00
	acetato de 2-metil-propil	7,60	496,50	97,53	34,34	27,90	14,50	10,37
	butanoato de etila	9,30	362,00	0,00	98,34	43,78	14,64	8,98
	acetato de butila	10,20	180,00	0,00	97,22	91,94	33,33	18,89
	1-metil-butanoato de etila	12,20	988,50	0,00	97,45	12,19	5,06	3,89
	butanoato de 2metilpropil	17,20	377,00	23,87	31,17	68,44	97,35	94,16
	2metil-2-propenoato de propil	17,40	191,00	39,01	95,55	37,43	24,87	19,11
	2-butenato de 1-metil-propil	17,80	570,00	0,00	95,00	80,09	60,53	48,77
	butanoato de butila	18,75	2359,50	0,00	97,40	85,82	38,40	21,00
	3-metil-butanoato de butila	19,07	5877,00	0,00	94,70	23,20	4,23	2,09
	2 metil-2-propenoato de metilbutil	20,15	265,50	40,49	95,01	52,17	42,00	34,84
	hexanoato de 2-metilpropil	20,60	329,50	8,95	38,54	58,88	87,56	99,92
	butanoato de hexila	21,20	665,00	14,81	59,17	99,32	74,06	60,68
3-metil-butanoato de hexila	21,60	120,50	20,75	97,72	53,53	42,32	32,78	
hexanoato de 3-metil-butil	22,35	219,50	12,76	97,15	55,13	36,45	32,12	
OUTROS	2,5-dimetilfurano	5,20	242,50	0,00	81,55	88,14	70,93	51,55
	n.i. ¹	7,30	2072,50	93,91	46,54	33,92	26,22	20,00
	n.i.	13,40	1193,00	96,98	33,45	30,55	26,40	18,40
	n.i.	13,55	1185,00	96,84	0,00	0,00	0,00	0,00
	nonano	15,20	365,50	99,66	58,55	39,95	32,69	22,16
	decano	18,95	1923,50	99,52	67,48	52,61	48,79	41,77
	n.i.	19,12	250,00	28,20	98,40	93,20	72,20	68,40
	n.i.	22,05	243,00	34,77	97,12	73,05	70,99	61,32

* TR – tempo de retenção; ¹ n.i. – não identificado.

Tabela 12. Voláteis oriundos da decomposição da mandioca mansa, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^\circ\text{C}$, analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.

Grupos de Voláteis	Voláteis	TR*	Pico	Tempo de exposição (dias) / Área Normalizada				
		(min)	Máximo	0	7	14	21	28
ÁLCOOIS	etanol	2,57	1629,65	0,00	99,45	67,69	26,64	60,47
	2-butanol	3,40	621,25	0,00	0,00	36,23	97,84	51,23
	1-butanol	4,30	3148,2	0,00	72,49	93,15	90,78	48,33
	2-pentanol	5,06	396,8	71,17	56,99	50,00	0,00	95,94
	3-metil-1-butanol	6,01	387	0,00	93,97	94,13	98,24	49,99
	3-hexen-1-ol	13,00	12927,35	99,49	30,14	24,89	15,47	8,74
	1-hexanol	13,90	5043,4	50,59	68,06	92,85	71,96	62,69
CETONAS	acetona	2,70	2000	0,00	89,43	57,77	68,91	65,91
	2-butanona	3,36	1388,1	0,00	33,90	21,60	25,10	82,22
	2-pentanona	4,70	1130,2	20,38	93,11	31,73	28,31	47,97
	3-pentanona	4,96	467,25	92,20	86,35	65,16	58,48	44,85
	3-octanona	18,83	46,05	0,00	0,00	50,00	0,00	0,00
ÁCIDOS	ácido acético	nd ¹	1087,00	0,00	42,82	55,80	97,10	87,07
	ácido butanóico	nd ¹	3000,00	0,00	0,00	65,88	96,67	70,00
ÉSTERES	butanoato de metila	5,67	119,2	0,00	51,64	92,37	39,14	0,00
	acetato de 2-metil-propil	7,60	229,3	97,23	0,00	0,00	0,00	0,00
	butanoato de etila	9,25	328,4	0,00	99,79	86,10	33,71	17,43
	3-metil-butanoato de etila	12,71	1837,55	93,96	8,42	11,30	7,53	3,86
	acetato de 3-metil-butil	14,04	1874,7	98,85	0,00	0,00	0,00	0,00
	butanoato de 2-metilpropil	17,20	119,9	0,00	25,15	65,85	91,08	82,94
	2-metil-propanoato de butila	17,80	203	0,00	0,00	46,16	82,56	79,80
	2-metil-propanoato de 2-metilpropil	17,86	86,55	0,00	0,00	60,20	80,18	100,00
	2-butenato de 1-metil-propil	18,80	184,5	69,49	73,63	34,91	50,00	100,00
	butanoato de butila	19,06	1772,3	3,46	55,02	81,41	67,29	50,65
	hexanoato de etila	19,18	703,55	15,86	61,69	87,66	72,06	56,32
	2-metil-propanoato de 3-metilbutil	19,50	561,6	0,00	25,05	40,93	83,06	94,44
OUTROS	2,5-dimetilfurano	5,27	931,95	3,85	84,20	93,78	78,88	53,01
	n.i. ¹	9,01	357,4	94,26	7,95	0,00	0,00	16,02
	n.i.	18,70	208,55	0,00	45,94	88,29	93,96	71,06
	isolimoneno	18,93	322,75	65,56	86,46	86,63	85,85	93,70
	decano	19,13	397,5	98,52	85,04	32,87	35,18	29,95

* TR – tempo de retenção; ¹ n.i. – não identificado.

Para o brócolis foram identificados 26 voláteis divididos em seis grupos de compostos: álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, sulfurados e os chamados “outros”, onde foram enquadrados os voláteis que não pertenciam aos grupos citados anteriormente ou simplesmente não foram identificados (ni) (Tabela 10). A exemplo do brócolis, com exceção do grupo dos sulfurados, foram identificados 37 voláteis para mamona e 29 para mandioca mansa (Tabela 11 e 12).

A particularidade da presença do grupo sulfurados apenas no material brócolis, deve-se a alta quantidade do elemento enxofre em seus tecidos (81 mg.dm^{-3}) (Tabela 2). Dentro dos sulfurados, os chamados glucosinolatos e seus derivados são apontados como os grandes responsáveis pela ação biocida a vários fitopatógenos de

solo (DUNCAN, 2001; GAMLIEL e STAPLETON, 1993b; LODHA *et al.*, 1997; KIRKEGAARD e SAWAR, 1999; SMOLINSKA e HORBOWICK, 1999; FREIRE *et al.*, 2004). Apesar de não serem identificados especificamente no material brócolis no presente trabalho, esse material foi um dos materiais vegetais que mais afetou a sobrevivência das estruturas de resistência dos fitopatógenos, e isto pode estar ligado aos voláteis detectados (Tabela 10).

Além do grupo dos sulfurados para o brócolis, na mamona e na mandioca mansa (Tabelas 10, 11 e 12) pode-se verificar outras particularidades com relação aos voláteis oriundos da decomposição de cada um deles. Isto evidencia que existem outras diferenças qualitativas, tão ou mais importantes, dentro de cada grupo de voláteis observados no resultado das análises de cada material vegetal (Tabela 13).

No grupo dos álcoois, apesar de algumas particularidades como o 2-metil-1 propanol e o feniletilálcool, oriundos da decomposição do brócolis, e o 2-pentanol da mandioca mansa, a maioria dos compostos presentes neste grupo podem ser observados para os três materiais vegetais analisados. Semelhante aos álcoois, no grupo das cetonas, a maioria dos voláteis também é constatada para os três materiais, a exceção do 2-heptanona para a mamona e do 2-pentanona para mandioca mansa (Tabela 13).

No caso dos ácidos, assim como verificado para os ésteres, o que se observa é que a grande maioria das chamadas particularidades é oriunda da decomposição da mamona, totalizando cerca de cinco voláteis agrupados nos ácidos e oito nos ésteres. A mandioca mansa, assim como a condição Mamona (MA) versus Mandioca Mansa (MM), também possui um número expressivo de ésteres, totalizando cinco voláteis peculiares a cada condição (Tabela 13).

Para os chamados “outros”, verifica-se que a grande maioria de seus voláteis não puderam ser identificados (ni), sendo quatro deles para brócolis, cinco para mamona e dois para mandioca mansa. Dos compostos identificados em “outros”, o nonano é apenas encontrado na mamona, o isolimeno na mandioca mansa e o decano para a condição MA *versus* MM e o 2,5-dimetilurano para os três materiais vegetais (BRO *versus* MA *versus* MM) (Tabela 13).

Estas diferenças qualitativas nos voláteis explicam possivelmente o efeito de cada um destes materiais vegetais com relação à redução da sobrevivência das estruturas de resistência dos fitopatógenos testados. Entretanto, é importante deixar claro que esta possível explicação, apesar de relevante, por si só não comprova o efeito

diferencial destes compostos particulares de cada material sobre as estruturas dos fitopatógenos.

Tabela 13. Análise comparativa entre os voláteis oriundos da decomposição de brócolis - BRO, mamona – MA e mandioca mansa - MM e suas interações (BRO versus MA, BRO versus MM, MA versus MM e BRO versus MA versus MM).

Grupos de Voláteis	Materiais Vegetais Incorporados ao Solo						
	Brócolis (BRO)	Mamona (MA)	Mandioca mansa (MM)*	BRO versus MA*	BRO versus MM*	MA versus MM*	BRO versus MM versus MA*
Alcoois	2-metil-1 propanol			1-propanol			etanol 2-butanol
		-	2-pentanol			3-hexen-1-ol	1-butanol
	feniletilálcool			2-metil-1-butanol			3-metil-1-butanol 1-hexanol
Cetonas	-	2-heptanona	2-pentanona	-	3-octanona	3-pentanona	acetona 2-butanona 2-pentanona
		ácido 2-metil-propanóico ácido butanóico					
Ácidos	-	ácido 3-metil-butanóico ácido pentanóico ácido hexanóico	-	ácido 2-metil-butanóico	ácido butanóico	-	ácido acético
		acetato de butila					
Ésteres	butanoato de butila	1-metil-butanoato de etila 2metil-2-propenoato de propil	3-metil-butanoato de etila acetato de 3-metil-butil			acetato de 2-metil-propil butanoato de etila	
	2-propenoato de 2-metilpentil	2 metil-2-propenoato de metilbutil hexanoato de 2-metilpropil butanoato de hexila 3-metil-butanoato de hexila hexanoato de 3-metil-butil	2-metil-propanoato de butila 2-metil-propanoato de 2-metilpropil 2-metil-propanoato de 3-metilbutil	3-metil-butanoato de butila	hexanoato de etila	butanoato de 2metilpropil 2-butenato de 1-metil-propil butanoato de butila	butanoato de metila
Outros	n.i.	nonano	isolimonoeno				
	n.i.	n.i.	n.i.				
	n.i.	n.i.	n.i.	-	-	decano	2,5-dimetilfurano
	n.i.	n.i.	n.i.				

*Interações entre os materiais vegetais, ou seja, compostos voláteis detectados em dois ou mais materiais vegetais.

6.2.2. Análise Semi-quantitativa

Observando a média de cada grupo de compostos dentro de cada material vegetal, verifica-se para os oriundos da decomposição do brócolis, que apenas o grupo sulfurados apresentou uma área normalizada superior (68,86 %). Para a mamona, o grupo que se sobressaiu foi o dos alcoóis (57,81 %), enquanto para a mandioca mansa merece destaque os ácidos (64,42 %) (Tabela 14).

Comparando os grupos de voláteis entre os materiais vegetais, verifica-se, em média, que cada um deles apresenta uma maior ou menor porcentagem de determinados grupos de compostos. O brócolis é o que gera em sua decomposição uma maior porcentagem de voláteis, tanto de sulfurados, quanto de ésteres, enquanto que a mamona se destaca apenas com relação aos alcoóis, as cetonas, os ácidos e os ésteres e na mandioca mansa se observa uma maior porcentagem de alcoóis, ácidos e “outros” (Tabela 14; Figura 13). O fato de um material vegetal gerar em sua decomposição uma maior porcentagem de determinados grupos de voláteis é um considerável indicativo e certamente ratifica a diferença entre eles, entretanto, isto, por si só, não determina qual(is) o grupo de voláteis ou voláteis é (são) responsável (is) pela redução da sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos avaliados.

Tabela 14. Análise descritiva dos grupos de voláteis oriundos da decomposição do brócolis, mamona e mandioca mansa, submetidos à simulação de solarização, em frascos âmbar a $37\pm 2^\circ\text{C}$ por diferentes períodos e analisados por cromatografia gasosa pela técnica de SPME.

Grupos de Voláteis	Períodos de Exposição (dias)	Materiais vegetais incorporados ao solo					
		Brócolis		Mamona		Mandioca Mansa	
		Média ¹	DP*	Média ¹	DP	Média ¹	DP
Alcoóis	7	86,73 ±	6,83	73,86 ±	3,82	60,16 ±	8,85
	14	57,37 ±	6,08	63,33 ±	0,09	65,56 ±	15,46
	21	36,90 ±	13,38	52,56 ±	0,18	57,28 ±	13,28
	28	36,64 ±	0,16	41,51 ±	6,29	53,91 ±	3,78
	Média²	54,41 ±	6,61	57,81 ±	2,60	59,23 ±	10,34
Cetonas	7	16,97 ±	0,24	67,39 ±	0,21	60,56 ±	10,60
	14	36,26 ±	1,58	45,08 ±	5,54	45,25 ±	12,59
	21	71,46 ±	12,15	51,18 ±	6,53	36,16 ±	30,02
	28	91,63 ±	0,40	52,49 ±	12,97	48,19 ±	32,99
	Média²	54,08 ±	3,59	54,03 ±	6,31	47,54 ±	21,55
Ácidos	7	53,96 ±	4,45	18,42 ±	0,87	21,41 ±	6,73
	14	72,12 ±	4,38	42,36 ±	12,05	60,84 ±	4,30
	21	60,43 ±	6,17	72,17 ±	2,73	96,88 ±	4,41
	28	45,99 ±	2,38	84,52 ±	3,96	78,54 ±	3,14
	Média²	58,13 ±	4,34	54,37 ±	4,90	64,42 ±	4,64
Sulfurados	7	63,77 ±	7,52	-	-	-	-
	14	68,73 ±	3,36	-	-	-	-
	21	71,04 ±	6,69	-	-	-	-
	28	72,28 ±	0,09	-	-	-	-
	Média²	68,96 ±	4,42	-	-	-	-
Ésteres	0	16,70 ±	3,14	18,35 ±	1,07	31,57 ±	0,97
	7	97,05 ±	4,17	81,44 ±	1,48	33,37 ±	1,65
	14	53,15 ±	2,35	58,24 ±	1,81	50,57 ±	1,74
	21	35,34 ±	3,07	38,35 ±	1,41	50,55 ±	5,48
	28	39,10 ±	3,48	32,51 ±	0,755	48,79 ±	3,43
	Média²	56,16 ±	3,27	52,64 ±	1,36	45,82 ±	3,07
"Outros"	0	26,80 ±	0,45	68,73 ±	0,60	52,44 ±	0,52
	7	71,51 ±	1,07	60,38 ±	2,03	61,92 ±	3,98
	14	50,77 ±	2,63	51,43 ±	1,59	60,31 ±	11,31
	21	36,44 ±	5,91	43,53 ±	1,89	58,77 ±	19,61
	28	42,19 ±	1,46	35,45 ±	3,77	52,75 ±	14,82
	Média²	50,23 ±	2,77	47,70 ±	2,32	58,44 ±	12,43

* DP – desvio padrão da média; ¹Média de duas repetições (frasco âmbar) de cada composto, de cada material, nos diferentes períodos avaliados; ²Média geral do grupo de cada material.

Analisando os grupos de voláteis oriundos da decomposição de cada material, dentro dos períodos, para o brócolis observa-se que os álcoois, ésteres e “outros” apresentaram tendência a diminuir ao longo dos períodos avaliados (Tabela 14). Esse comportamento foi semelhante ao que se observou para a sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos avaliados na Primeira Etapa deste trabalho. Já o grupo das cetonas e dos sulfurados exibiram, de acordo com a média dos compostos detectados, um comportamento inverso, ou seja, baixa porcentagem de gases no início e tendência de aumento nos últimos períodos avaliados. Os ácidos, entretanto, apresentaram um comportamento variável de seus voláteis, ou seja, no primeiro período avaliado a porcentagem foi baixa, aumentou e depois diminuiu nos últimos períodos (Tabela 14, Figura 14).

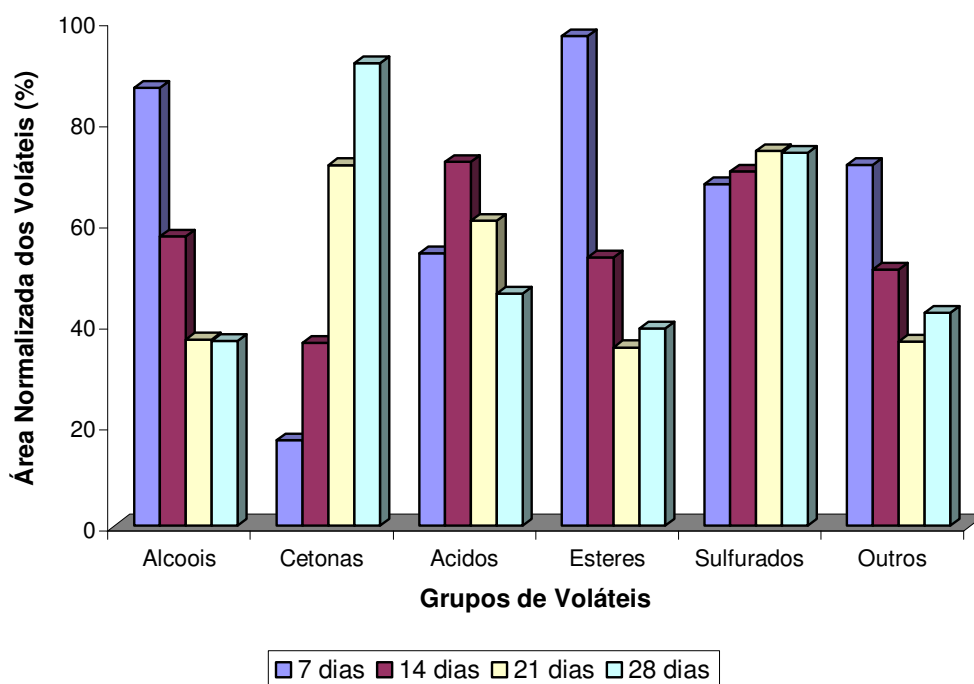


Figura 13. Área normalizada média relativa dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea do brócolis para cada período avaliado.

No caso dos grupos de voláteis presentes na mamona, o que se observa é que, assim como foi constatado para o brócolis, os álcoois, ésteres e outros apresentaram, em média, uma tendência a reduzir sua área normalizada ao longo do tempo. Para os ácidos, o que se verifica é uma tendência a aumentar sua porcentagem, em média,

no decorrer dos períodos (Tabela 14; Figura 15). Vale ressaltar que a área normalizada refere-se a uma estimativa de tentar saber o comportamento do volátil ou do grupo de voláteis quanto a sua concentração no interior do frasco âmbar.

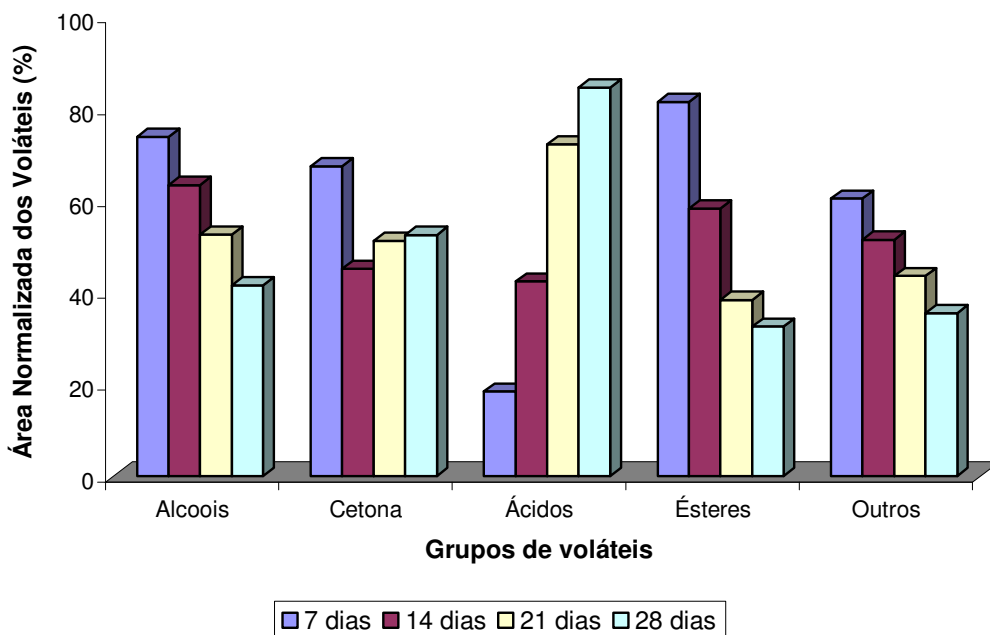


Figura 14. Área normalizada média relativa dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea de mamona para cada período avaliado.

Para a mandioca mansa, os álcoois, cetonas e os outros apresentaram, em média, uma tendência de diminuição ao longo do tempo. Já os ácidos e os ésteres apresentaram, em média, comportamento variável (Tabela 14).

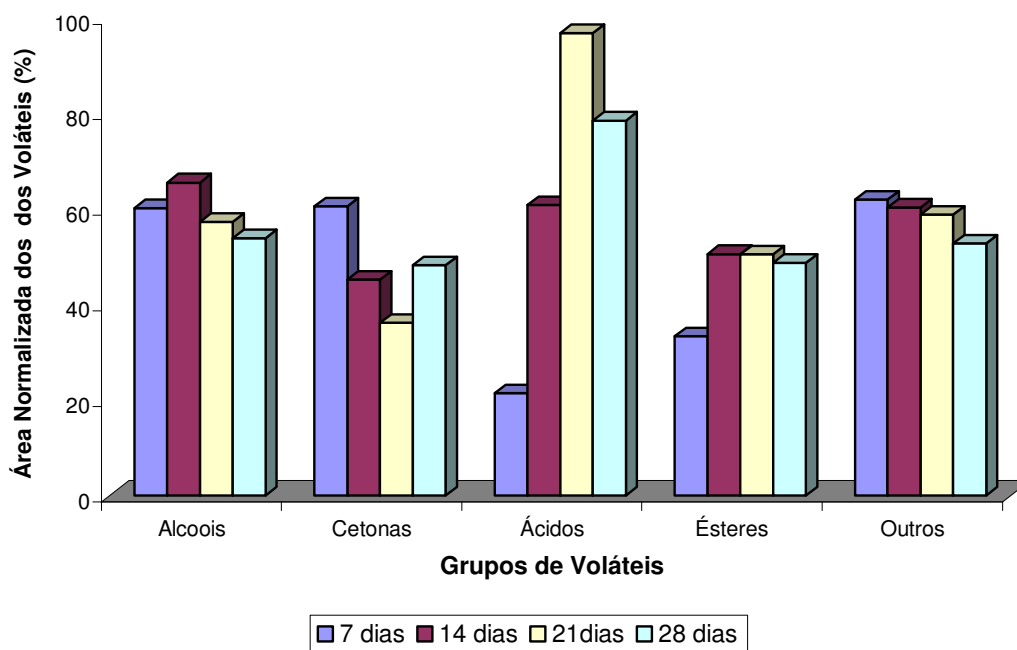


Figura 15. Área normalizada média dos grupos de voláteis oriundos da decomposição da parte aérea de mandioca mansa, para cada período avaliado.

Para todos os materiais foi verificado uma tendência de diminuição ao longo dos períodos avaliados para os alcoóis e “outros”. Assim como a análise comparativa, a análise descritiva pode auxiliar na detecção de possíveis grupos de voláteis ou voláteis responsáveis pela diminuição da sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos testados.

6.2.3. Voláteis *versus* Sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos

Nas Tabelas 15, 16 e 17 podem ser observados todos os voláteis oriundos da decomposição do brócolis, mamona e mandioca mansa, cujas porcentagens ao longo dos períodos se correlacionaram de maneira significativa com a sobrevivência de cada fitopatógeno testado. É importante ressaltar que a correlação pode ser positiva, indicando um comportamento diretamente proporcional entre as porcentagens dos voláteis e os dados de sobrevivência dos fungos, ou negativa, indicando um comportamento inversamente proporcional.

Para o brócolis, no grupo dos álcoois, verificou-se correlação positiva ($p < 0,05$) para os voláteis 1-propanol, 1-butanol e para a média do grupo apenas com relação ao fungo *M. phaseolina* (Tabela 15).

Tabela 15. Análise de correlação de Pearson entre as áreas normalizadas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição do brócolis, com os dados de sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e *Sclerotium rolfsii*, ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias).

Grupos de Voláteis	Voláteis	Fungos Fitopatogênicos Habitantes do Solo							
		Fox ¹		Macro ²		Rhizo ³		Scler ⁴	
		"r" ⁵	"p" ⁶	"r"	"p"	"r"	"p"	"r"	"p"
Álcoois	1-propanol	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	1-butanol	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	Média ⁷	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
Cetonas	acetona	-	-	-0,97*	p<0.05	-0,96*	p<0.05	-	-
	2-butanona	-	-	-0,97*	p<0.05	-0,98*	p<0.05	-0,97*	p<0.05
	2-pentanona	-	-	-	-	-	-	0,99**	p<0.01
	Média ⁸	-	-	-	-	-0,97*	p<0.05	-0,96*	p<0.05
Ácidos	ácido butanóico	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	Média ⁹	0,98*	p<0.05	-	-	-	-	-	-
Ésteres	butanoato de butila	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
Sulfurados	Média ¹⁰	-	-	-0,99**	p<0.01	-0,96*	p<0.05	-	-
"Outros"	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2;

² *Macrophomina phaseolina*;

³ *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI;

⁴ *Sclerotium rolfsii*;

⁵ "r" coeficiente de Pearson - pode variar de -1 a +1, e quanto mais próximos desses valores, mais forte a associação das variáveis em exame. Quando zero, esse coeficiente indica ausência de correlação;

⁶ "p" - probabilidade, referente ao nível de aceitação ou confiabilidade da correlação;

^{7, 8, 9 e 10} Médias respectivas dos grupos dos álcoois, cetonas, ácidos e sulfurados, oriundas da decomposição do brócolis.

No caso das cetonas, observou-se que 2-pentanona apresentou correlação positiva com a sobrevivência do fungo *S. rolfsii*. Os voláteis 2-butanona e acetona apresentaram correlação negativa com a sobrevivência dos fungos *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI e o volátil 2-butanona correlação negativa com o fungo *S. rolfsii* e a

média geral do grupo, também, correlacionou-se negativamente com os fungos *R. solani* e *S. rolfsii*.

No grupo dos ácidos, o ácido butanóico e a média do grupo apresentaram correlação positiva com a sobrevivência dos fungos *M. phaseolina* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2. Já no grupo dos ésteres, o volátil butanoato de butila correlacionou-se positivamente com a sobrevivência do fungo *M. phaseolina*. A média do grupo dos sulfurados, por sua vez, se correlacionou negativamente com *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI, enquanto que os chamados “outros”, não se correlacionaram com a sobrevivência de nenhum dos fitopatógenos testados.

Com relação aos voláteis oriundos da decomposição da mamona, para o grupo dos alcoóis, assim como verificado para o brócolis, na sua maioria, se correlacionaram positivamente com a sobrevivência do fungo *M. phaseolina* (etanol, 1-propanol e 3-hexen-1-ol e a média do grupo). O volátil 3-hexen-1-ol correlacionou-se, também, positivamente com o fungo *R. solani*. Os voláteis 2-butanol e 2-metil-1-butanol correlacionaram-se negativamente com a sobrevivência dos fungos *M. phaseolina* e *S. rolfsii*, respectivamente. A média do grupo apresentou correlação negativa com o fungo *R. solani*.

Tabela 16. Análise de correlação de Pearson entre as áreas normalizadas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição da mamona, com os dados de sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e *Sclerotium rolfsii*, ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias).

Grupos de Voláteis	Voláteis	Fungos Fitopatogênicos Veiculados pelo Solo							
		Fox ¹		Macro ²		Rhizo ³		Scler ⁴	
		"r" ⁵	"p" ⁶	"r"	"p"	"r"	"p"	"r"	"p"
Alcoóis	etanol	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	1-propanol	-	-	0,98*	p<0.05	-	-	-	-
	2-butanol	-	-	-0,99***	p<0.001	-	-	-	-
	2-metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-0,99***	p<0.001
	3-hexen-1-ol	-	-	0,99**	p<0.01	0,97*	p<0.05	-	-
	Média ⁷	-	-	0,96*	p<0.05	-0,99**	p<0.01	-	-
Cetonas	2-butanona	-	-	-	-	-0,98*	p<0.05	-	-
	2-heptanona	-	-	0,97*	p<0.05	-	-	-	-
Ácidos	ácido 2-metil-propanóico	-	-	-	-	-0,96*	p<0.05	-	-
	ácido 3-metil-butanóico	-	-	-0,97*	p<0.05	-0,99**	p<0.01	-	-
	ácido 2-metil-butanóico	-	-	-	-	-0,96*	p<0.05	-	-
	ácido hexanóico	-	-	-	-	-0,98*	p<0.05	-	-
	Média ⁸	-	-	-0,96*	p<0.05	-0,96*	p<0.05	-	-
Ésteres	acetato de 2-metil-propil	-	-	-	-	0,96*	p<0.05	-	-
	butanoato de etila	-	-	0,97*	p<0.05	-	-	-	-
	2metil-2-propenoato de propil	-	-	0,97*	p<0.05	-	-	-	-
	2-butenato de 1-metil-propil	-	-	0,96*	p<0.05	0,97*	p<0.05	-	-
	butanoato de butila	-	-	-	-	0,96*	p<0.05	-	-
	3-metil-butanoato de butila	-	-	0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	2 metil-2-propenoato de metilbutil	-	-	0,98*	p<0.05	-	-	-	-
	hexanoato de 2-metilpropil	-	-	-	-	-0,96*	p<0.05	-	-
	3-metil-butanoato de hexila	-	-	0,98*	p<0.05	-	-	-	-
	hexanoato de 3-metil-butil	-	-	0,97*	p<0.05	-	-	-	-
Média ⁹	-	-	0,97*	p<0.05	-	-	-	-	
"Outros"	nonano	-	-	0,99***	p<0.001	0,96*	p<0.05	-	-
	decano	-	-	0,99***	p<0.001	-	-	-	-
	Média ¹⁰	-	-	0,96*	p<0.05	0,99***	p<0.001	-	-

¹ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2;

² *Macrophomina phaseolina*;

³ *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI;

⁴ *Sclerotium rolfsii*;

⁵ "r" coeficiente de Pearson - pode variar de -1 a +1, e quanto mais próximos desses valores, mais forte a associação das variáveis em exame. Quando zero, esse coeficiente indica ausência de correlação;

⁶ "p" - probabilidade, referente ao nível de aceitação ou confiabilidade da correlação;

^{7, 8, 9 e 10} Médias respectivas dos grupos dos alcoóis, ácidos, esterres e "outros", oriundos da decomposição da mamona.

Para as cetonas, constatou-se correlação negativa para a 2-butanona com *R. solani* AG-4 HGI e positiva para o 2-heptanona com *M. phaseolina* (Tabela 16). Já para os ácidos, todos os compostos verificados na Tabela 16 apresentaram correlação negativa com a sobrevivência de *R. solani* AG-4 HGI. Já o volátil ácido 3-metilbutanóico e a média do grupo correlacionaram-se negativamente com o fungo *M. phaseolina* e a média do grupo correlacionou-se positivamente com a sobrevivência de *R. solani*.

Nos ésteres, ao contrário dos ácidos, constatou-se correlação positiva para a maioria dos compostos (butanoato de etila, 2metil-2-propenoato de propil, 3-metil-butanoato de butila, 2 metil-2-propenoato de metilbutil, 3-metil-butanoato de hexila, hexanoato de 3-metil-butil e média geral do grupo) para *M. phaseolina*, enquanto que o acetato de 2-metil-propil e 2 butenoato de 1-metil-propil para *R. solani* AG-4 HGI e o hexanoato de 2-metilpropil negativamente com o fungo *R. solani*. Os voláteis nonano, decano e a média do grupo chamado de “outros” apresentaram correlação positiva com *M. phaseolina*, enquanto que somente o nonano e a média apresentaram correlação positiva para a sobrevivência do fungo *R. solani* AG-4 HGI (Tabela 16).

Na mandioca mansa, um número menor de voláteis apresentou correlação, seja ela negativa ou positiva para com a sobrevivência dos fitopatógenos testados (Tabela 17). No grupo dos álcoois, apenas o volátil 3-hexen-1-ol correlacionou-se positivamente com a sobrevivência dos fungos *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 HGI e *S. rolfsii*, sendo que a média do grupo, também, correlacionou-se positivamente com a sobrevivência do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2. Nas cetonas, a 3-pentanona também apresentou comportamento proporcional a sobrevivência de *M. phaseolina* e *R. solani* AG-4 HGI, enquanto que para o grupo dos ácidos não foi verificada qualquer correlação significativa com relação aos fungos testados (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de correlação de Pearson entre as áreas normalizadas dos voláteis e do grupo de voláteis, oriundas da decomposição da mandioca, com os dados de sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI e *Sclerotium rolfsii*, ao longo dos períodos avaliados (7, 14, 21 e 28 dias).

Grupos de Voláteis	Voláteis	Fungos Fitopatogênicos Veiculados pelo Solo							
		Fox ¹		Macro ²		Rhizo ³		Scler ⁴	
Voláteis		"r" ⁵	"p" ⁶	"r"	"p"	"r"	"p"	"r"	"p"
Alcoóis	3-hexen-1-ol	-	-	0,96*	p<0.05	0,99**	p<0.01	0,97*	p<0.05
	Média ⁷	0,96*	p<0.05	-	-	-	-	-	-
Cetonas	3-pentanona	-	-	0,99***	p<0.001	0,98*	p<0.05	-	-
Ácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ésteres	butanoato de metila	0,97*	p<0.05	-	-	-	-	-	-
	butanoato de etila	-	-	-	-	0,96*	p<0.05	-	-
	3-metil-butanoato de etila	0,98*	p<0.05	-	-	-	-	-	-
	2-metil-propanoato de butila	-	-	-0,96*	p<0.05	-	-	-	-
	2-metil-propanoato de 2-metilpropil	-	-	-0,99**	p<0.01	-	-	-	-
"Outros"	2,5-dimetilfurano	0,99**	p<0.01	-	-	-	-	-	-
	Média ⁸	-	-	-	-	0,96*	p<0.05	0,99**	p<0.01

¹ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2;

² *Macrophomina phaseolina*;

³ *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI;

⁴ *Sclerotium rolfsii*;

⁵ "r" coeficiente de Pearson - pode variar de -1 a +1, e quanto mais próximos desses valores, mais forte a associação das variáveis em exame. Quando zero, esse coeficiente indica ausência de correlação;

⁶ "p" – probabilidade, referente ao nível de aceitação ou confiabilidade da correlação;

^{7 e 8} Médias respectivas dos grupos dos alcoóis e "outros", oriundos da decomposição da mandioca mansa.

Nos ésteres, oriundos da decomposição da mandioca mansa, observou-se um comportamento bastante variável à correlação com a sobrevivência dos fungos testados. Foi constatada correlação positiva entre a porcentagem dos voláteis butanoato de metila e 3-metil butanoato de etila para com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 e butanoato de etila para *R. solani* AG-4 HGI. Correlação negativa foi observada para 2-metil-propanoato de butila e 2-metil-propanoato de 2-metilpropil para *M. phaseolina* e 2-metil-propanoato de 3-metilbutil para *R. solani* AG-4 HGI. A média do grupo dos "outros", por sua vez, apresentou correlação positiva para com a sobrevivência dos fungos *R. solani* e *S. rolfsii*, sendo o 2,5-dimetilfurano, em específico, com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 (Tabela 17).

Além das correlações positiva e negativa do volátil com a sobrevivência dos fungos, constatou-se, em algumas situações, correlação com a média de alguns grupos, indicando associação entre todos os voláteis do grupo com a diminuição da sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos. Os grupos de voláteis ou voláteis que apresentaram correlação negativa com a sobrevivência dos fitopatógenos podem ser apontados como os mais promissores no que diz respeito ao controle das estruturas de resistência dos fungos estudados, uma vez que sua concentração aumenta com o tempo ao ponto que a sobrevivência diminui.

Não há na literatura informações que associem qualquer um dos voláteis que apresentaram correlação (seja ela negativa ou positiva), com a sobrevivência das estruturas de resistência dos fungos estudados. Entretanto, muitos destes voláteis apresentam alta toxicidade dependendo, sobretudo, da concentração e do período de exposição a eles.

O conhecimento a respeito da correlação positiva ou negativa e a média do grupo versus a sobrevivência das estruturas dos fungos testados irá auxiliar na elaboração de metodologias para futuros testes com voláteis, isoladamente ou em associação, quanto à sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos, ou seja, há voláteis isolados ou associados que deverão ser incrementados em quantidade ao longo dos períodos testados, enquanto que outros deverão ser colocados em grandes quantidades no início e diminuída a sua porcentagem ao longo dos períodos, visando correlacionar com a diminuição da sobrevivência das estruturas dos fungos ou com a sua erradicação. Assim, identificar-se-á, conclusivamente, o volátil ou os voláteis responsáveis pelo controle das estruturas dos fitopatógenos, fato já constatado por Smolinska e Horbowick (1999) e Kirkegaard e Sawar (1999) com alguns voláteis de isotiocianatos de *Brassicacae*.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A temperatura de 37°C foi o fator responsável pelo efeito fungistático e fungicida observados no micélio de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e de *S. rolfsii* em períodos diferentes;
- ✓ A partir dos 21 dias de exposição para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e 28 dias para *S. rolfsii* foi observado efeito fungicida para com o crescimento micelial destes fungos;
- ✓ Os fungos com efeito fungistático apresentaram alterações na fisiologia de crescimento quando incubados em suas temperaturas ideais de crescimento;
- ✓ Para *M. phaseolina*, mais termo tolerante, a temperatura de 37°C causou efeito inócuo no seu micélio;
- ✓ Todos os tratamentos solo+material vegetal, ao longo dos períodos testados, reduziram, significativamente, a sobrevivência das estruturas de resistência de todos os fungos estudados;
- ✓ Entre os materiais vegetais, destacaram-se os materiais brócolis e mandioca brava, para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2, *R. solani* AG-4 HGI e *M. phaseolina*, além da mandioca mansa para *S. rolfsii*;
- ✓ As reduções de sobrevivência das estruturas de resistência dos fitopatógenos tiveram como causas preponderantes a ação da atmosfera anaeróbica e os voláteis;
- ✓ No tratamento solo+brócolis foram identificados 26 voláteis divididos em seis grupos de compostos: álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, sulfurados e os chamados “outros”. Com

exceção do grupo dos sulfurados, foram identificados 37 voláteis para o tratamento solo+mamona e 29 para solo+mandioca mansa;

✓ Foram observadas correlações positivas e negativas entre alguns voláteis e a média de alguns grupos de compostos com a diminuição da sobrevivência das estruturas de resistência dos fitopatógenos estudados;

✓ No presente trabalho, estudou-se o efeito e importância de cada fator (temperatura, anaerobiose, microorganismos antagonistas e compostos voláteis) no controle dos fitopatógenos estudados;

✓ Com base nos resultados, conclui-se então que o controle ou diminuição da sobrevivência das estruturas dos fitopatógenos estudados é resultante de um conjunto de fatores interagindo entre si (temperatura, anaerobiose, microorganismos antagonistas, compostos voláteis e o tempo do processo) e não atuando isoladamente;

✓ Há necessidade, em futuros projetos, testar o(s) volátil(eis) purificado(s) que se correlacionou(aram) positiva ou negativamente com a sobrevivência das estruturas dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo estudados, de modo a provar sua ação no controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PADOVANI, C. R.; SOUZA, N. L. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n. 3, p. 354-358, 2008.

AMBRÓSIO, M. M. Q. **Sobrevivência de fitopatógenos de solo em microcosmo e em campo solarizado submetido a fermentação acelerada de diferentes materiais orgânicos**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

AMBRÓSIO, M. M. Q; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 364-370, 2004.

AMBRÓSIO, M. M. Q. **Solarização no controle de patógenos e plantas invasoras nas culturas do tomateiro, feijoeiro e meloeiro**. 2000, 26f. Monografia (Graduação) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró-RN, 2000.

AMORIM, L. Sobrevivência do inóculo. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 246-266.

ARTHUR, C.L.; KILLAM, L.; BUCHHOLZ, K.D.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of SPME. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 64, p. 1960-1966, 1992a.

ARTHUR, C. L.; POTTER, D. W.; BUCHHOLZ, K. D.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. SPME for the direct analysis of water: theory and practice. **LC-GC**, Springfield, v. 10, n. 9, p. 656-661, 1992b.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. SPME with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ASSIS, P. M. A.; CORDEIRO, M. A. S.; PAULINO, H. B.; CARNEIRO, M. A. C. Efeito da aplicação de nitrogênio na atividade microbiana e na decomposição da palhada de sorgo em solo de cerrado sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 2, p. 107-112, 2003.

AYCOCK, R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. **North Carolina Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**, Raleigh, n. 174, 1966. 202 p.

BAUDRON, S.; BELIN, J. M.; VOILLEY, A. Main factors affecting headspace analysis of some pyrazines produced by microorganisms. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 39, p. 2176-2179, 1991.

BLOK, W. J.; LAMERS, J. G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; BOLLEN, G. J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 3, p. 253-259, 2000.

BUCHHOLZ, K.; PAWLISZYN, J. "Determination of Phenols by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatographic Analysis", **Journal Environment Science and Technology**, Easton, v. 27, p. 2844-2848, 1993.

BUENO, C. J.; PATRÍCIO, F. R. A.; SINIGAGLIA, C. Solarização associada à matéria orgânica proporciona o controle de fitopatógenos termotolerantes habitantes do solo. 2008. **Infobibos**. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/index.htm. Acesso em: 04.set.2008.

BUENO, C. J. **Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo**. 2004, 101 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em microcosmo simulando solarização com prévia incorporação de couve (*Brassicae oleracea* var. *acephala* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.356-363, 2004.

BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Sonda para gases de subsolo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, p. 215 - 218, 2002.

CARVALHO, V. D.; CARVALHO, J. G. Princípios tóxicos da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 5, n. 59/60, p. 82-88, 1979.

CLOUD, G. L. Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 8, p. 771-772, 1991.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, 1983. p. 539.

CRUZ, J. C. S.; ROCHA, M. M.; SOUZA, N. L.; PADOVANI, C. R.; MINHONI, M. T. A. Aspectos microbiológicos do solo e a técnica de solarização. **Summa Phytopathológica**, Botucatu, v.31, n.1, p. 72-81, 2005.

DeNONOBILLI, M.; CONTIN, M.; MONDINI, C.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass in triggered into activity by trace amounts of substrate. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, n.9, p. 1161-1170, 2001.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. 1978. 166 f. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

DUNCAN, A. Glucosinolates. In: D' MELLO, J. P.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. (Eds.). **Toxic substances in crop plants**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, p. 127-147.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro:Embrapa, 1999. 412 p.

FERRAZ, L. C. L. **Práticas culturais para o manejo de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em feijoeiro**. 2001.154 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FONSECA, A. M. **Caracterização farmacológica das folhas de Palma-christi – *Ricinus communis* L. – Euphorbiaceae**. 2001. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Estudos Pós-Graduados em Farmácia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2001.

FREIRE, M. F. I.; MORRA, M. J.; KNUDSEN, G. R.; Atividade antifúngica de substâncias voláteis presentes em *Brassicas napus* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 73-75, 2004.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds involved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 899-905, 1993 (a).

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Effect of soil amendment with chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms and lettuce growth. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 886-891, 1993 (b).

GHINI, R. Alternativas para substituir o brometo de metila na agricultura. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 162, 2001.

GHORBANI, R.; WILCOCKSON, S.; KOOCHKEKI, A.; LEIFERT, C. Soil management for sustainable crop disease control: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Berlin, v.6, p.149-162, 2008.

HARTZ, T. K.; CARTER, W. W.; BRUTON, B. D. Failure of fumigation and solarization to control *Macrophomina phaseolina* and subsequent muskmelon vine decline. **Crop Protection**, Surrey, v. 6, p. 261-264, 1987.

KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soilborne pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 683-688, 1976.

KIRKEGARRD, J. A.; SAWAR, M. Glucosinolates profiles of Australian canola (*Brassica napus annua* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: implications for biofumigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 50, p. 315-324, 1999.

KO, W.; HORA, F. K. A selective medium for *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 6, p. 707-710, 1971.

KOMADA, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. **Review of Plant Protection Research**, Tokyo, v. 8, p. 114-124, 1975.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 46-95.

KUNIEGA-ALONSO, S.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília – DF, v.30, n. 2, 2005.

LEFÈVRE, A. F.; SOUZA, N. L. Determinação da temperatura letal para *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e efeito da solarização sobre a temperatura do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n. 2, p. 107-112, 1993.

LODHA, S.; SHARMA, S. K.; AGGARWAL, R. K. Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Pathology**, London, v. 46, p. 186-190, 1997.

LORENZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da Mandioca**. 2ª impressão. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1993, 41 p. (Boletim Técnico, 211).

MACGILLIVRAY, B.; PAWLISZYN, J.; FOWLEI, P.; SAGARA, C. "Headspace Solid-Phase Microextraction Versus Purge and Trap for the Determination of Substituted Benzene Compounds in Water", **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 32, p. 317-322, 1994.

McCAIN, H.; BEGA, R. V.; JENKINSON, J. L. Solar heatings fails to control *Macrophomina phaseolina* from soil. **Phytopathology**, St Paul, v. 72, p. 985, 1982.

MIHAIL, J. D.; YOUNG, D. J.; ALCORN, S. M. *Macrophomina*: A plant pathogen of concern in arid lands. In: INTERNATIONAL RESEARCH AND DEVELOPMENT CONFERENCE, 1985, Tucson, Arizona. **Proceedings...** Tucson: 1988. p. 1305-1310.

MIHAIL, J. D.; ALCORN, S. M. Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*. **Plant disease**, St. Paul, v. 68, p. 742-746, 1984.

MORRA, M. J.; KIRKEGAARD, J. A. Isothiocyanate release from soil-incorporated brassica tissues. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 34, p. 1683-1690, 2002.

NILSSON, T.; LARSEN, T. O.; MONTANARELLA, L.; MADSEN, J. O. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 245-255, 1996.

PARK, D. Survival of microorganisms in soil. In: Baker, K.F. e Snyder, W.C. (Eds.) **Ecology of soil-borne plant pathogens**. Berkeley. University of California Press. 1970. p.82-98.

PONTE, J. J. Uso da manipueira como insumo agrícola: Defensivo e fertilizante. In: CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**, Série culturas e tuberosas amiláceas Latino Americanas, Fundação Cargill. 2001, v. 6, p. 80-95.

RAMIREZ-VILLAPUDUA, J.; MUNNECKE, D. E. Control of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f.sp. *coughlutinans*) by solar heating of field soil amended with dry cabbage residues. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 289-295, 1988.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; HOFFMENN, L. L. Controle cultural de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 2005, p. 279-301.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito Inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1267-1271, 1999.

ROOBS, C. F. Controle biológico de doenças de plantas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 167, p. 63-72, 1991.

ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; FENWICK, G. R. Glucosinolates in crop plants. **Horticultural Reviews**, New York, v. 19, p. 99-215, 1997.

RUSSEL, E. J.; RUSSEL, E. W. Descomposicion del material vegetal. In: _____. **Las condiciones del suelo y el crecimiento de las plantas**. 4 ed. (traduz. da 9a ed. inglesa por GasparGonzalez y Gonzalez). Madrid : Aguilar, 1968. p. 279-305.

SOUZA, N. L. Interação entre solarização e incorporação prévia de matéria orgânica no solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 142-145, 2004.

SOUZA, N. L.; BUENO, C. J. Sobrevivência de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 e *Sclerotium rolfsii* em solo solarizado incorporado com matéria orgânica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 153-160, 2003.

SOUZA, N. L. **Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Sclerotium rolfsii* em solo solarizado incorporado com matéria orgânica**. 2001. 46 f. Tese (Livro Docência em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SOUZA, N. L. Solarização do solo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, n. 2, p. 3-15, 1994.

SMOLINSKA, U.; HORBOWICK, M. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 119-124, 1999.

SUBBARAO, K. V.; HUBBARD, J. C. Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and on wilt in cauliflower. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 12, p. 1303-1310, 1996.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em Fase Sólida. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VENÂNCIO, W. S.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. Efeito da solarização e do brometo de metila sobre a comunidade de fungos do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n.2, p.183-185, 2006.

VERGNAIS, L.; MASSON, F.; MONTEL, M. C.; BERDAGUE, J. L.; TALON, R. Evaluation of solid-phase microextraction for analysis of volatile metabolites produced by staphylococci. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 1, p. 228-234, 1998.

WYLLIE, T. D.; GANGOPADHYAY, S.; TEAGUE, W. R.; BLANCHAR, R. W. Germination and production of *Macrophomina phaseolina* microsclerotia as affected by oxygen and carbon dioxide concentration. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 81, p. 195-201, 1984.

ZAR, J. H. **Bioestatistical Analysis**. 4th ed. Prentice-Hall, New Jersey. 1999, 663p.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace SPME. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, p. 1843-1852, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)