

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**CONTROLE ALTERNATIVO DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS
CAUSADA POR *Plasmodiophora brassicae* EM BRÓCOLIS
ATRAVÉS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.**

Andreza Tavares Tomé Penalber

**Tese apresentada ao Departamento de
Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como requisito
para obtenção do Grau de Doutor em
Fitopatologia.**

**Brasília - DF
2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**CONTROLE ALTERNATIVO DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS
CAUSADA POR *Plasmodiophora brassicae* EM BRÓCOLIS
ATRAVÉS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS.**

Andreza Tavares Tomé Penalber

**Tese apresentada ao Departamento de
Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como requisito
para obtenção do Grau de Doutor em
Fitopatologia.**

**Brasília - DF
2009**

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas de Brasília, sob a orientação do professor Carlos Hidemi Uesugi.

Tese aprovada em: 30 / 09 / 2009 por:

Carlos Hidemi Uesugi, Doutor.
(Orientador)

Adalberto Corrêa Café Filho, PhD
(Examinador)

Jean Kleber de Abreu Mattos, Doutor
(Examinador)

Paulo Sérgio Beviláqua de Albuquerque, Doutor
(Examinador)

Sueli Corrêa Marques de Mello, Doutora
(Examinadora)

Ao único que é digno de receber a honra,

a glória a força e o poder.

A DEUS eterno e imortal,

invisível, porém real,

A ELE seja toda honra, glória, todo louvor e

adoração.

Dedico.

Deus de aliança, Deus de promessas,

Deus que não é homem pra fugir.

Tudo pode mudar, Tudo pode passar,

Mas sua palavra vai se cumprir.

Posso enfrentar o que for, eu sei quem luta por mim

Meus sonhos não podem ser frustrados.

Minha esperança está nas mãos do Grande eu sou,

Meus olhos vão ver o impossível acontecer.

Aos meus pais Wandi e Sônia Tomé,
Pelo amor incondicional e exemplo de vida

Às minhas irmãs Tatiany e Wanessa,
Por dividirem comigo
todos os meus momentos.
E ao meu sobrinho Luiz Otávio,
que foi uma benção de Deus em nossas vidas.

Ao Amigo César Castro,
Pelo apoio e incentivo a trilhar os caminhos
que aqui me trouxeram.

Ao meu amor Lourival Penalber,
Pelo amor, companheirismo, compreensão,
Ao longo dessa e de outras jornadas.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À *Deus* pela sua maravilhosa graça e imensa misericórdia. Por me conceder sabedoria para entender o seu imenso amor e por estar sempre à frente de todas as minhas decisões.

Ao meu orientador *Carlos Hidemi Uesugi* pela atenção, paciência, confiança, pelos ensinamentos valiosos, e críticas construtivas durante todas as etapas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelo incentivo constante ao meu trabalho e amizade. Especialmente aos professores *Adalberto Café Filho* e *Cláudio Lúcio Costa* por terem confiado em mim e terem me concedido a oportunidade de continuar este trabalho.

Aos colegas do laboratório de fitopatologia da UnB onde muito aprendi e compartilhei momentos agradáveis, em especial às amigas *Edinalva Patrícia*, *Rita de Cássia* e *Ângela Sathiko*.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, *Arenildo Soares*, *Marivaldo Almeida*, *Dona Francisca* e em especial *Ribamar Frazão*, que sempre me ofereceram ajuda para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Estação Biológica da UnB, *Fábio*, *Chicão* e *Olinda* pela grandiosa ajuda na avaliação dos experimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores e colegas do Laboratório de Genética e Microorganismos da ESALQ/USP pelo apoio e carinho dispensados a mim. Em especial ao colega *Armando Dias* por todo auxílio e paciência na execução da técnica do DGGE, e aos pós-doctors *Paulo Lacava*, pela oportunidade de realização desta técnica e *Fernando Andrerote* pelos ensinamentos sobre a técnica.

Aos colegas do laboratório de genética de microrganismos do CENA/USP, *Acácio Navarrete* e *Ademir Durrer*, pelas análises dos géis e paciência no ensinamento dos programas *GelCompar II* e *Canoco 4.5*.

Ao produtor de hortaliças, *Luiz Oshida*, pela disponibilização da área para este estudo, informações e excelente recepção na ocasião das visitas.

Ao colega *Celso Tomita* por todo o apoio dispensado durante todas as etapas deste trabalho.

Ao meu eterno amigo *Cezar Castro*, neste tempo juntos no laboratório de fitopatologia eu quero te dizer que sem sua amizade, sua força eu já teria desistido deste trabalho, obrigada por cada momento, cada palavra e mais ainda, eu quero que você saiba que a nossa amizade vai além de qualquer distância. Valeu amigo e obrigada por tudo.

À minha grande amiga *Michele Fayad* e família, pelo amor e sincera amizade, pelos conselhos, por terem me proporcionado momentos felizes e por compartilharem momentos difíceis e pelas constantes orações.

Ao amigo *Paulo Albuquerque* pela ajuda na discussão do trabalho, pelas sugestões valiosas e cuidadosa leitura da tese.

À amiga e chefe de trabalho *Wilda Pinto Pacheco* pela compreensão, força e incentivo para concretização deste trabalho.

Finalmente agradeço a Deus pela minha família: alicerce seguro sobre o qual eu tenho edificado cada etapa de meu desenvolvimento como ser humano. Meus pais, *Wandi Negrão Tomé* e *Sônia Regina Tavares Tomé*, com seu amor incondicional, representam a origem e o estímulo constante de minha jornada. Minhas queridas irmãs *Tatiany* e *Wanessa* que depositaram em mim o seu sincero apoio. *Lourival Penalber*, meu amor e grande companheiro de jornada é quem compartilha comigo as alegrias e as frustrações, pelo amor, paciência e confiança, agradeço.

Uma tese é o resultado do esforço e trabalho de muitas pessoas unidas e por isso os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concretizado.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	01
LISTA DE TABELAS	04
RESUMO	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO GERAL	07
REVISÃO DE LITERATURA	10
Importância das Brássicas	10
Descrição da doença Hérnia das Crucíferas	11
Medidas de controle	18
Uso de compostos orgânicos no controle de fitopatógenos	21
Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante	24
Referência Bibliográfica	28
CAPÍTULO I	
EFEITO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS	36
Resumo	36
Abstract	37
Introdução	38
Material e Métodos	41
Resultados	47
Discussão	54
Conclusões	58
Referência Bibliográfica	59

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE PLANTIOS CONSECUTIVOS DE BRÓCOLIS NA SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS SOB SISTEMA CONVENCIONAL, INTEGRADO E ORGÂNICO	63
Resumo	63
Abstract	64
Introdução	65
Material e Métodos	68
Resultados	75
Discussão	88
Conclusões	92
Referência Bibliográfica	93

CAPÍTULO III

INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CALAGEM E COMPOSTOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS	98
Resumo	98
Abstract	99
Introdução	100
Material e Métodos	102
Resultados	104
Discussão	114
Conclusões	116
Referência Bibliográfica	117

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA DIVERSIDADE BACTERIANA NA SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS -----	119
Resumo -----	119
Abstract -----	120
Introdução -----	121
Material e Métodos -----	124
Resultados -----	130
Discussão -----	148
Conclusões -----	152
Referência Bibliográfica -----	153
CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	154

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1. Escala de severidade de *Plasmodiophora brassicae* em brócolis cultivados em casa de vegetação (0 = sem hérnia; 1 = até 25% de hérnia; 2 = 26 a 50% de hérnia; 3 = acima de 50% de hérnia).----- 45
- FIGURA 1.2. Efeito dos compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido; CBL – Composto bioativo líquido) no índice da hérnia das crucíferas em brócolis cultivados em casa de vegetação. ----- 50
- FIGURA 1.3. Efeito de diferentes fertilizantes no desenvolvimento das plantas de brócolis e no controle da hérnia das crucíferas.----- 51
- FIGURA 1.4. Crescimento das mudas de brócolis em solos suplementados com compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido; CBL – Composto bioativo líquido), em casa de vegetação. As letras indicam diferenças nos valores médios de crescimento, em cada dia após o plantio. ----- 52
- FIGURA 1.5. Efeito dos compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido e CBL – Composto bioativo líquido) no índice da hérnia das crucíferas em brócolis, em condições de campo. ----- 53
- FIGURA 2.1. Efeito dos sistemas de produção (SI – Sistema integrado; SO – Sistema orgânico; SC – Sistema convencional) no índice da hérnia das crucíferas, em brócolis cultivados em casa de vegetação.----- 76
- FIGURA 2.2. Efeito dos compostos orgânicos no índice da hérnia das crucíferas incorporados ao solo sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em brócolis cultivados em casa de vegetação. CBL – Composto Bioativo Líquido e CBS – Composto Bioativo Líquido. ----- 78
- FIGURA 2.3. Efeito da fumigação do solo no índice da hérnia das crucíferas. ----- 80

FIGURA 2.4. Efeito dos compostos orgânicos no peso da hérnia fresca incorporados em plantios consecutivos de brócolis em solos sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em condições controladas. -----	83
FIGURA 2.5. Efeito dos compostos orgânicos no peso da matéria fresca incorporados em plantios consecutivos de brócolis sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em casa de vegetação. -----	84
FIGURA 3.1. Experimento A. Efeito de doses moderadas compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcinado no índice da hérnia das crucíferas, em condições de campo. -----	106
FIGURA 3.2. Experimento B. Efeito de doses elevadas de compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcinado no índice da hérnia das crucíferas, em condições de campo. -----	108
FIGURA 3.3. Efeito dos compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcítico na produção de matéria seca, em condições de campo. -----	110
FIGURA 3.4. Efeito dos compostos orgânicos (A) e diferentes concentrações de calcário (B) na relação percentual entre raiz sadia seca e hérnia seca. -----	113
FIGURA 4.1. Impacto dos compostos orgânicos no perfil da comunidade bacteriana total do solo avaliada pela técnica do DGGE. -----	131
FIGURA 4.2. Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de solos incorporados com diferentes fertilizantes e sob diferentes sistemas de produção. --- -----	133
FIGURA 4.3. Análise de componentes principais (PCA) baseada nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de solos incorporadas com diferentes fertilizantes.----- -----	134

- FIGURA 4.4. PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de solos incorporados com diferentes fertilizantes e sob diferentes sistemas de produção. Grupos bacterianos componentes da comunidade total do solo foram acessados por meio de *primers* específicos para Alphaproteobacteria (A), *Pseudomonas* (B), Betaproteobacteria (C) e Actinobacteria (D). ----- 138
- FIGURA 4.5. Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Alphaproteobacteria. ----- 140
- FIGURA 4.6. Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Betaproteobacteria. ----- 141
- FIGURA 4.7. Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Actinobacteria (A) e *Pseudomonas* (B). ----- 142
- FIGURA 4.8. Índice de riqueza baseado nos perfis de DGGE gerados por meio de *primers* universais e de *primers* para grupos específicos de Betaproteobacteria, *Pseudomonas*, Actinobacteria e, Alphaproteobacteria para os fertilizantes (A) e para os sistemas de produção (B). ----- 144
- FIGURA 4.9. Relação entre o índice de hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana, medida a partir do número de bandas dos perfis de DGGE para o domínio Eubacteria com $r^2 = 0,0359$. ----- 145
- FIGURA 4.10. Relação entre o índice de hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana, medida a partir do número de bandas dos perfis de DGGE para os grupos Alphaproteobacteria (A), Betaproteobacteria (B), Actinobacteria (C) e *Pseudomonas* (D). ----- 147

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Composição e quantidades das matérias primas utilizadas para produção de composto bioativo sólido e de composto bioativo líquido. -----	41
TABELA 1.2. Características químico-orgânicas dos compostos utilizados.-----	42
TABELA 1.3. Propriedades químicas e físicas do solo antes da incorporação dos compostos, e ao final do experimento, em casa de vegetação. -----	48
TABELA 1.4. Efeito dos tratamentos na massa aérea e raiz de brócolis e hérnia fresca de <i>Plasmodiophora brassicae</i> , em casa de vegetação. -----	49
TABELA 1.5. Efeito dos tratamentos na massa aérea e raiz de brócolis e hérnia fresca de <i>Plasmodiophora brassicae</i> , em condições de campo. -----	54
TABELA 2.1. Localização, sistema de produção e práticas culturais adotadas nos locais em que foram coletados os solos para os experimentos. -----	70
TABELA 2.2. Características químico-orgânicas dos solos utilizados nos experimentos. -----	72
TABELA 2.3. Propriedades químicas e físicas dos solos após quatro aplicações consecutivas de fertilizantes mineral e orgânico. -----	86
TABELA 3.1 - Efeito de diferentes concentrações de compostos orgânicos e calcário na produção de massa aérea e raiz fresca de brócolis e hérnia fresca de <i>Plasmodiophora brassicae</i> , em condições de campo, Brazlândia - DF. -----	112
TABELA 4.1 - <i>Primers</i> usados para diferentes alvos de amplificação a partir do DNA de isolados de amostras de solos. -----	129

RESUMO

A hérnia das crucíferas, causada pelo patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin está entre as doenças de plantas de mais difícil controle, e o uso de compostos orgânicos é apresentado como uma alternativa de controle, pois promove o enriquecimento do solo contribuindo em suas propriedades químicas, físicas e biológicas resultando na supressão de doenças de solo. No presente trabalho foram avaliados diferentes fatores que estão diretamente relacionados a este assunto. Desta maneira, foi demonstrado que sob condições controladas, a combinação de dois compostos orgânicos, CBL (Composto Bioativo Líquido) + CBS (Composto Bioativo Sólido) foi a melhor estratégia de controle da hérnia das crucíferas, com o CBL promovendo a supressividade da doença e o CBS contribuindo para o aumento de peso de parte aérea. Entretanto, sob condições de campo de produção comercial altamente infestado, 10^8 esporos/g de solo, estes compostos não reduziram o índice da doença. A combinação CBL + CBS associada com 400g de calcário/m² de solo, sob a mesma densidade de inóculo, reduziu em 98% o índice da doença. Não houve redução significativa neste índice quando o calcário foi aplicado isoladamente ou em combinação com o NPK. Utilizando os mesmos adubos em sistemas de produção orgânico, integrado e convencional, sob plantios consecutivos, foi verificado que a redução do índice da doença promovida pelo CBL + CBS foi maior no sistema de produção orgânico, e que o histórico de produção afetou significativamente o índice da doença, o qual foi maior em solos sob sistema convencional. Mesmo em plantios consecutivos, onde a fonte de inóculo tende a aumentar a cada novo plantio, os tratamentos CBL e CBL + CBS reduziram o peso da hérnia fresca ao final de quatro plantios consecutivos, em relação ao controle, nos três sistemas de produção. A estrutura da comunidade bacteriana foi estudada e os perfis de PCR-DGGE obtidos com o uso de *primers* universais foram avaliados por meio de dendrogramas que mostraram diferenças na comunidade microbiana do solo com a adição de compostos orgânicos, quando comparada com fertilização química. A adição do composto orgânico CBL ao solo aumentou o índice de riqueza dos grupos específicos de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e, principalmente, Actinobacteria e *Pseudomonas*, que são amplamente utilizados como agentes de controle biológico. O índice da hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana foram negativamente correlacionados para o domínio Eubacteria, as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, e o grupo *Pseudomonas*.

Palavras chave: *Plasmodiophora brassicae*, supressão de doença, bokashi, diversidade bacteriana, DGGE, *Brassica oleracea* var. *italica*.

ABSTRACT

The clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Woronin is one of the most difficult controls of plant diseases and the use of organic compounds is presented as an alternative for controlling because of the enrichment of the soil, contributing to improve their properties chemical, physical and biological resulting in suppression of soilborne diseases. In the present study were evaluated different factors that are directly related to this matter. Thus, it was demonstrated that under conditions of greenhouse, the combination of two organic compounds, CBL (bioactive compound liquid) + CBS (bioactive compound solid), was the best strategie for the control of the clubroot, with CBL promoting the suppressive effect of the clubroot and the CBS contributing to increase plant top weight. However under conditions of commercial production field highly infested, 10^8 spores/ g of soil, these compounds did not reduce the index of disease. The combination CBL+CBS associated with 400g of limestone/m² of soil, under the same density of inoculum, reduced in 98% the disease index. There was no significant reduction in this index with the application of lime alone or in combination with NPK. Using the same fertilizer in organic production systems, integrated and conventional, under consecutive crops, has been found that the reduction of the index of the disease promoted by CBL + CBS was higher in organic production system. The historical of production affected the index of disease in which was higher in soils under the conventional system. Even in consecutive plantations where the source of inoculum tends to increase with each new planting, the treatments CBL and CBL + CBS reduced the fresh weight of galls at the end of four consecutive crops in relation to control in three production systems. The structure of the bacterial community was evaluated and the PCR-DGGE profiles obtained with the use of universal primers were evaluated by dendrograms that showed differences in soil microbial community with the addition of organic compounds compared with mineral fertilizers, corresponding to a higher richness of bacterial community. The addition of organic compound CBL increased the richness index of the specific groups of Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria and *Pseudomonas* mainly that are widely used as biological control agents. The disease index of clubroot and bacterial diversity were negatively correlated for the domain Bacteria, the class Betaproteobacteria and Alphaproteobacteria, and *Pseudomonas* group,

Additional Keywords: bokashi, disease suppression, *Plasmodiophora brassicae*, bacterial diversity, DGGE, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as espécies oleráceas cultivadas no Brasil, as da família Brassicaceae constituem as mais numerosas destacando-se por sua expressão econômica; riqueza em sais minerais e vitaminas. Seu alto valor nutritivo deve-se principalmente pela presença de glicosinolatos com reconhecidas propriedades anticancerígenas. Além disso, seu custo de produção é relativamente baixo quando comparado ao de outras espécies olerícolas (Kimoto, 1993).

O fator limitante para o cultivo das brássicas tem sido a doença hérnia das crucíferas, cujo agente causal é o protozoário *Plasmodiophora brassicae*, que reduz a produtividade e, às vezes, destrói totalmente a cultura. As características de cultivo das hortaliças em geral favorecem o desenvolvimento da doença dificultando a sua erradicação, pois com a existência de variedades de brássicas adaptadas a qualquer época do ano, o cultivo destas olerícolas se torna sucessivo, o que possibilita a presença de hospedeiro no campo em diferentes estádios fenológicos, aumentando assim, o potencial de inóculo a cada plantio. Além disso, o patógeno produz esporos de resistência com capacidade de permanecer por longo tempo no solo, facilitando sua manutenção e disseminação na lavoura.

A agricultura orgânica vem se consolidando desde o início da década de 1960 como uma resposta aos crescentes questionamentos dos rumos da agricultura moderna, principalmente em relação aos fatores negativos como prejuízos à saúde humana e desequilíbrio do ecossistema provocado pelo uso de agrotóxicos. Tais produtos orgânicos atingem cotações muito atraentes no mercado, representando em alguns casos 30% a mais nos preços dos produtos convencionais, 2000), fato que vem estimulando produtores e horticultores a usarem compostos orgânicos para produção de hortaliças.

Os fatores determinantes para o uso de compostos orgânicos estão diretamente relacionados a seus vários aspectos qualitativos. Primeiramente, os compostos são comumente usados na agricultura como condicionadores orgânicos para manter ou aumentar o conteúdo de matéria orgânica, que é essencial para a manutenção da qualidade do solo por promover melhoras nas suas condições biológicas, físicas e químicas. Segundo, o crescimento da planta pode ser beneficiado com o uso dos compostos que aumentam a atividade microbiana antagonista a patógenos, suprimindo as doenças e, reduzindo assim, as perdas causadas por patógenos habitantes de solo. Terceiro, o aumento na produção é atribuído ao elevado conteúdo de matéria orgânica e, conseqüente melhora nas propriedades físicas do solo após a adição de compostos orgânicos.

No capítulo I da tese, o efeito de dois compostos orgânicos e suas combinações foram avaliados para o controle da hérnia das crucíferas na cultura do brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) objetivando verificar a possibilidade do uso desses compostos no manejo da doença e relatar as propriedades físico-químicas dos compostos associadas a severidade da doença.

No capítulo II foi avaliada a influência de plantios consecutivos com o uso de compostos orgânicos na severidade da hérnia das crucíferas em brócolis sob sistema convencional, integrado e orgânico de produção, visando à recomendação de um sistema de produção adequado para o controle, e uma fertilização que reduza a severidade da doença.

No capítulo III foi estudada a integração de diferentes concentrações de calagem e compostos orgânicos no controle da hérnia das crucíferas em brócolis objetivando determinar as concentrações de calagem e de compostos orgânicos ideais para campos de produção comercial altamente infestado pelo patógeno.

No capítulo IV foi avaliada a diversidade e estrutura da comunidade bacteriana avaliada em solos sob sistemas de produção orgânica, integrada e convencional com a incorporação de compostos orgânicos por meio da técnica do DGGE com o objetivo de determinar os efeitos dos compostos orgânicos na comunidade de Eubacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e *Pseudomonas* em relação à supressão da hérvia das crucíferas.

REVISÃO DE LITERATURA

IMPORTÂNCIA DAS BRÁSSICAS

A horticultura vem buscando o seu espaço no agronegócio brasileiro respondendo em 2008 com 3,5% do PIB Agrícola, possuindo 773,19 mil hectares de área plantada com produtividade de 22,503 t/ha (IBGE, 2008). Responsável por mais de 7,5 mil empregos diretos, essa atividade agroeconômica é altamente intensiva e praticada por pequenos produtores. Cerca de 80% dos estabelecimentos têm área menor do que 50 hectares, com predominância da agricultura familiar (Karam, 2001). Dentre as hortaliças mais cultivadas as variedades de brássicas se destacam pela sua expressão econômica, pois representam 25% da produção hortícola (Calcob, 2004).

A família Brassicaceae (ou, como também eram antes designadas, as Cruciferae – crucíferas) é composta por 348 gêneros e 3200 espécies vegetais (Grin, 2008), dentre as quais se destacam as de maior importância econômica dentro da olericultura brasileira: brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* L.), couve-chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinnensis* L.), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). São hortaliças com alto valor nutricional, principalmente pela presença de glicosinolatos, com reconhecidas propriedades anticancerígenas, além de apresentarem custo de produção relativamente baixo, quando comparado ao de outras espécies olerícolas (Filgueira, 2000).

Os brócolos ou brocos são originários da couve selvagem (*Brassica oleracea* L.), planta nativa da Europa e, provavelmente, também da Ásia Ocidental. Esta variedade botânica se

diferencia da couve-flor pelo seu alto teor de vitamina A, que é cento e vinte vezes maior, e morfológicamente pela produção de uma inflorescência central de coloração verde, compacta (tipo cabeça) ou então inflorescências laterais (tipo ramoso). Existem cultivares de primavera-verão, como a Precoce de Piracicaba, e outras de ampla adaptabilidade termoclimática, como a Flórida.

O desenvolvimento de brócolis é favorecido por temperaturas baixas. Embora possa crescer satisfatoriamente em diferentes partes do mundo. Temperaturas acima de 30 °C podem provocar deformações na cabeça (Bjorkman, 1998).

DESCRIÇÃO DA DOENÇA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS

Histórico

Os primeiros registros desta doença datam desde o século XV na Espanha. Sua identificação ocorreu em meados do século XVIII na Inglaterra, e meados do século XIX na Escócia e Rússia (Hirai, 2006; Hirai *et al.*, 2004). Segundo Karling (1968) a doença foi reportada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1852. E de acordo com esse autor, Woronin identificou com sucesso a causa da hérnia das crucíferas como um “organismo plasmodiophorus” em 1875, e chamou de *Plasmodiophora brassicae*.

A hérnia das crucíferas foi reportada no Japão em 1890 (Ikegami *et al.* 1981), e é hoje um dos principais problemas na produção de couve-chinesa e repolho no Japão e na Coreia (Hirai, 2006; Hirai *et al.*, 2004). No Brasil o primeiro registro desta doença foi em 1949, no Estado do Paraná, em couve-chinesa (Nowacki, 1993).

Importância Econômica

A hérnia das crucíferas é a mais séria doença para o cultivo de brássicas no mundo, reduzindo a produtividade e, às vezes, destruindo totalmente a cultura. Uma vez estabelecida no campo, é muito difícil erradicá-la, pois o patógeno produz esporos de resistência, o que possibilita sua permanência por longo tempo no solo, facilitando sua manutenção e disseminação na lavoura.

Em média, a doença causa perdas de 10 a 60% na produção, mas os prejuízos variam de acordo com o tipo de solo e a susceptibilidade do hospedeiro (Agroatlas, 2009).

Pesquisadores suecos concluíram que infestações severas em canola, próximas a 100% de plantas atacadas, ocasionam aproximadamente 50% de perda na produção, enquanto que infestações de 10 a 20% de plantas atacadas, as perdas são de 5 a 10% (Agri-facts, 2007). Estes dados, onde a perda na produção estimada é a metade do percentual de plantas infectadas são similares aos ocasionados pela doença podridão-de-sclerotinia, haja vista que ambas as doenças restringem o fluxo de água e nutrientes para o desenvolvimento da planta.

Nos anos de 1998, 1999 e 2000, em Quebec, as perdas na produção de grãos de canola (*Brassica napus*) foram 80%, 91% e 85% , respectivamente, para a cultivar Argentina. E para a cultivar Polonês, as perdas na produção foram de 69%, 91% e 89%, respectivamente, para os mesmos anos (Pageau *et al.*, 2006).

Entre 2004 e 2006 uma severa epidemia de hérnia das crucíferas destruiu grandes cultivos de couve-flor em áreas produtoras do Nepal, com perdas de 40% na produção (Timila, *et al.*, 2008). Em nabo (*Brassica rapa*), na China, a incidência da doença foi de 17% quando as plantas estavam em estágio de mudas, e 15% após seu completo desenvolvimento, ocasionando perdas de 10,2% de produção (Jing *et al.*, 2008). No Brasil não há registros de dados de perdas de

produção, entretanto, as perdas econômicas são elevadas em áreas com cultivo intensivo de repolho, couve-flor, couve-chinesa e brócolis.

Distribuição, Hospedeiros e Sintomas da doença.

A hérnia das crucíferas ocorre na Europa, norte da África, norte e sul da América, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China e Coreia. No Brasil existem poucos trabalhos publicados sobre a ocorrência da doença hérnia das crucíferas (Viegas e Teixeira, 1943; Café Filho e Reifschneider, 1986; Ventura e Costa, 1995; Paz Lima *et al.*, 2004; Karling, 1968).

As regiões brasileiras mais propícias para o desenvolvimento da doença são as Regiões Sul e Sudeste, principalmente nas localidades serranas dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, em épocas de temperaturas amenas e alta umidade relativa do solo (Maringoni, 1995).

O patógeno infecta 300 espécies em 64 gêneros de crucíferas e pode ser encontrado em plantas cultivadas ou não, como *Capsella bursa-pastoris* (Buczacki e Ockedon, 1979), *Cardamine* sp. (Tanaka *et al.*, 1993), e *Arabidopsis thaliana* (Mithen e Magrath, 1992).

Hospedeiros economicamente importantes incluem repolho, couve-flor, couve-chinesa, brócolos, e nabo (*Brassica rapa* L.). A fase primária de *P. brassicae* pode ocorrer também em raízes de várias outras hospedeiras não crucíferas pertencentes às famílias Graminae, Rosaceae, Papaveraceae, Polygonaceae, Resedaceae e Leguminosae (Webb 1949; MacFarlane, 1952; Buczacki, 1979), mas o seu significado na ecologia da doença é desconhecido.

O sintoma característico da hérnia das crucíferas é a formação de galhas no sistema radicular em decorrência da rápida e desordenada multiplicação das células, em tamanho e número, induzidas pelo patógeno. Estas galhas inibem o fluxo de nutrientes e água provocando

redução no crescimento da planta e aumento da susceptibilidade à murcha. As galhas resultantes da hérnia das crucíferas são semelhantes às oriundas de infecção por *Meloydogine* spp., sendo estas menores e mais uniformemente distribuídas nas raízes laterais.

Os sintomas variam levemente de hospedeiro para hospedeiro e dependem do estágio de crescimento da cultura em que a infecção ocorre. As infecções no estágio de muda podem resultar em murcha, enfezamento e amarelecimento das folhas, enquanto infecções nos estágios mais avançados da planta podem não expressar estes sintomas. Morte prematura e redução no tamanho e qualidade das cabeças de brócolos também são sintomas associados com a hérnia das crucíferas.

Alguns membros da família brassicácea, tais como nabo (*Brassica napus* L.) e rabanete (*Raphanus sativus*), não formam galhas nas raízes quando infectadas, e sim lesões deprimidas ao longo da superfície das raízes. De acordo com os resultados publicados por Suwabe *et al.*, (2003), a resistência à hérnia das crucíferas em *B. napus* é oligogênica, e no mínimo dois loci são necessários para a resistência.

Taxonomia

Atualmente o patógeno *P. brassicae* é classificado no reino Protozoa, classe Plasmodiophoromycetes, ordem Plasmodiophorales e família Plasmodiophoracea. Junto com outros patógenos de plantas como *Spongospora subterranea*, agente causal da sarna pulverulenta de tubérculos de batata, e *Polymyxa graminis*, conhecido como vetor de vírus de plantas, estes têm sido considerados como um grupo monofilético, também conhecido por plasmophorídeos baseado, de acordo com Ludwig-Muller e Schüller (2008): (1) em uma forma não usual de divisão nuclear chamada de divisão cruciforme, (2) na presença de zoósporos biflagelados,

heterocônticos, (3) na presença de plasmódio multinucleado e, (4) na presença de esporos de resistência.

Historicamente alguns autores têm considerado os plasmodiophorideos como protistas, e outros como fungos primitivos, mas estudos filogenéticos baseados em pequenas subunidades de RNA ribossomais sugerem a classificação deste patógeno no filo Cercozoa, pertencente ao reino Protozoa ou Protoctista (Archibald e Keeling, 2005).

Etiologia do patógeno

O patógeno é um endoparasita obrigatório de plantas vasculares que causa hiperplasia das células, caracterizado por apresentar movimentos amebóides devido à ausência de parede rígida para delimitar o protoplasma. Produz plasmódio, zoosporângios, zoósporos biflagelados e esporos de resistência.

Não obstante o fato de *P. brassicae* ter sido identificado como o agente causal da hérnia das crucíferas no fim do século XIX, o ciclo de vida deste patógeno ainda não é claramente definido, em virtude da natureza obrigatória do patógeno. O ciclo de vida de *P. brassicae* consiste em duas fases: a fase primária, restrita aos pêlos radiculares e células epidermais do hospedeiro terminando com a produção de zoósporos secundários, e a fase secundária, que ocorre no córtex da raiz e hipocótilo ocasionando a produção de galhas e esporos de resistência (Ingram e Tommerup, 1972).

A fase primária tem início com a germinação dos esporos de resistência, em resposta à presença de exudados radiculares do hospedeiro, e liberação dos zoósporos biflagelados, que através do filme de água presente no solo se movimentam e aderem a um pêlo radicular oposto ao ponto de inserção flagelar (Aist e Williams, 1971).

Os zoósporos, então, encistam e formam um apressório para penetrar na parede celular dos pêlos radiculares, originando um plasmódio primário. Durante o seu desenvolvimento, o plasmódio aumenta em tamanho e várias divisões nucleares ocorrem, formando um plasmódio multinucleado que se fragmenta e se transforma em um zoosporângio (Ingram e Tommerup, 1972).

O desenvolvimento do patógeno durante o primeiro ciclo de infecção é completado com a liberação de 4 a 16 zoósporos uninucleados para o meio externo (Ingram e Tommerup, 1972), que sofrem plasmogamia de acordo com sua característica genética, originando zoósporos secundários. Estes zoósporos re-infectam os pêlos radiculares migrando em direção às células corticais do hospedeiro.

Uma vez penetrado no córtex, a infecção secundária inicia com a distribuição do patógeno na forma de um plasmódio secundário, diplóide. De acordo com Ingram e Tommerup (1972) as divisões mitóticas do núcleo plasmodial ocorrem no plasmódio binucleado, e plasmódios multinucleados são formados, estes foram localizados nas células do câmbio e parênquima do floema por Kobelt (2000). Este estágio é acompanhado por pronunciadas divisões celulares, e células hipertróficas são formadas pelo aumento de concentração de auxina (ácido indol acético, AIA), hormônio regulador de crescimento, na planta hospedeira (Ludwig-Muller e Schuller, 2008).

Durante o desenvolvimento do patógeno, a clivagem do plasmódio resulta na formação de inúmeros esporos de resistência que são liberados no solo quando o material vegetal sofre decomposição e, tem a capacidade de sobreviver por longo período, de até oito anos, sem hospedeiro (Bedendo, 1995).

Na ausência de um hospedeiro, *P. brassicae* sobrevive como esporos de resistência haplóides com formatos variando entre esférico, 1,6 - 4,3 µm, ou elipsóide, ovóide 4,0 - 6,0 µm, às vezes alongado ou irregular 2,5 - 6,9 µm (Agroatlas, 2009). Estes esporos possuem parede celular espessa constituída de aproximadamente 25% de quitina, 2,5% de outros carboidratos, 34% de proteínas e 18% de lipídios (Moxham e Buczacki, 1983).

Ao contrário da parede espessa dos esporos de resistência, os zoósporos primários são sensíveis a diferentes estresses ambientais, e na ausência de hospedeiro sobrevivem em um curto período de tempo, e migram somente a curtas distâncias (Suzuki *et al.*, 1992; Takahashi, 1994). Possuem o formato de pêra, 2,5 – 3,5 µm de diâmetro; um curto flagelo pontiagudo na extremidade (Jing *et al.*, 2008). Os zoosporângios são pequenos, ovóides a orbiculares, 6,0 - 6,5 µm de diâmetro, com uma fina capa incolor. Os zoósporos secundários possuem 1,9 – 3,0 µm de diâmetro e um curto e longo flagelo de 3,4 µm e 11.8µm de comprimento, respectivamente (Agroatlas, 2009).

Epidemiologia e disseminação

A germinação dos esporos de resistência deste patógeno é favorecida quando o solo é arenoso, com umidade variando entre 60 a 90%. Em estudos realizados por Horiuchi e Hori (1980) o máximo de incidência da doença ocorreu em umidades acima de 46,5%, medida a 20cm da superfície do solo, e nenhuma incidência foi observada em solos com umidade abaixo de 11,8%. Altos níveis de umidade do solo são requeridos durante as duas primeiras semanas após a inoculação, pelo fato que a liberação do zoósporo secundário do patógeno deve ocorrer aproximadamente de 6 a 8 dias depois da infecção dos pêlos radiculares (Ingram e Tommerup, 1972).

A temperatura ambiental mínima para o sucesso da infestação é entre 10 a 12 °C. A máxima entre 30 a 35 °C e a ótima entre 20 a 25 °C (Agroatlas, 2009). A doença é mais severa até pH 5,7; com pH variando entre 5,8 e 6,2 a severidade da doença diminui; e acima de 7,8 o patógeno é completamente inibido (Hasse, 2005). Niwa *et al.* (2008), evidenciaram que a inibição da germinação dos esporos de resistência é a causa primária da supressão da doença em solos com pH neutro.

Por *P. brassicae* ser um patógeno de solo, os seus esporos de resistência são capazes de se movimentar através de mudas e solos contaminados, água de chuva e irrigação, maquinário e implementos agrícolas. O produtor é um dos principais disseminadores da doença, pois na busca de novas áreas para cultivo, sempre carrega maquinários e implementos agrícolas infestados.

MEDIDAS DE CONTROLE

O manejo inadequado associado com o tempo de sobrevivência dos esporos, que podem permanecer viáveis no solo por um longo período, são as principais dificuldades na diminuição do potencial de inóculo no solo.

As medidas de controle atualmente empregadas para a hérnia das crucíferas incluem: rotação de cultura com espécies não hospedeiras; emprego de fungicidas de solo e fumigação; emprego de variedades resistentes e calagem para elevar o pH do solo.

A rotação de cultura com plantas não hospedeiras tem originado bons resultados no controle deste fitopatógeno, pois de acordo com Friberg *et al.*, (2006) algumas plantas não hospedeiras podem até estimular a germinação dos esporos de resistência, através da liberação dos exsudados radiculares, mas em suas raízes só ocorrem a infecção primária, não permitindo a execução completa do ciclo do patógeno.

Os resultados obtidos por Larkin (2008), sobre os efeitos dos agentes de controle biológico e rotação de cultura no solo, na comunidade microbiana e em doenças da batata, indicaram que ambos os tratamentos afetaram significativamente as características da comunidade microbiana do solo, mas o efeito da rotação foi mais dominante. Embora, apresente resultados positivos, esta medida não é praticada pela maioria dos produtores olerícolas, onde 80% possuem pequenas propriedades, sendo então necessário o cultivo de hortaliças durante todo o ano, com espécies economicamente rentáveis (Lima Neto *et al.*, 2005).

O controle químico da doença é difícil, pois *P. brassicae* é um patógeno de solo e completa o seu ciclo de vida no interior das raízes do hospedeiro, diminuindo a ação efetiva dos fungicidas. Para controle da doença, dois princípios ativos têm sido usados fluazinam (3-cloro-N-[3-clor-2,6-dinitro-4-(trifluorometil)fenil]-5-(trifluorometil)-2-piridinamina) e flusulfamida (4-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-3-(trifluorometil)benzenosulfonamida) (Kwanghoon *et al.*, 2007).

Entre os fumigantes, cloropicrina ou metam sódio têm sido usados no controle desta doença. Entretanto, estes produtos são de uso restrito, e sua toxicidade e custo limitam o seu uso em muitas situações (Gorodicki e Hadar, 1990; Munnecke *et al.*, 1982).

A pesquisa tem mostrado avanços no que concerne à busca por novos grupos de agroquímicos, como por exemplo, o epoxydon, composto obtido a partir de suspensão fúngica de *Phoma glomerata* de folhas de *Viola* sp., que tem controlado o patógeno de solo, *P. brassicae*, por sua atividade antitumorogênica, fitotóxica e antimicrobiana (Arie *et al.*, 1998).

Existem poucas variedades de brássicas resistentes ao patógeno, pois de acordo com Gustafsson *et al.*, (1997) a maioria das fontes de resistência é raça-específica, a qual não é adequada a sistemas onde o patógeno mostra uma larga variação na virulência e um alto índice de recombinação por reprodução sexual, como é o caso do protozoário *P. brassicae*.

Desde o início do século XIX, a calagem tem sido utilizada como medida de controle para diminuir a fonte de inóculo do patógeno, e ainda garantir a incorporação de Ca ao solo, que é um dos nutrientes mais exigidos no cultivo de hortaliças.

Os calcários agrícolas podem ser classificados quanto ao teor de MgO, em três tipos: calcíticos menos que 5% de MgO; magnesianos entre 5 a 12% de MgO, e dolomíticos: mais que 12% de MgO. Em estudo conduzido por Belec *et al.*, (2004) as melhores estratégias de controle encontradas foram a aplicação de cálcio cianamida no pré-plantio com 25 t/ha de calcário calcítico, e cálcio hidratado no plantio em combinação com 5 t/ha de calcário calcítico.

Trabalhos têm mostrado o uso da calagem para elevar o pH do solo como um fator importante a ser considerado no controle da doença. A germinação dos esporos de resistência e a infecção radicular pelo patógeno são desfavorecidas com pH acima de 6.6 (Murakami *et al.*, 2004; Wallenhammar, 1996). Strelkov *et al.*, (2007) obtiveram uma correlação negativa significativa entre o índice da doença e o pH do solo. Entretanto, o efeito do pH no desenvolvimento da hérnia das crucíferas só é satisfatório quando a densidade de esporos é baixa, ou seja, abaixo de 10^5 esporos/g de solo (Narisawa *et al.*, 2005).

Os efeitos do cálcio aplicado ao solo são consideráveis, pois o mesmo atua em diversas fases do ciclo do patógeno, como por exemplo, reduz o número e a taxa de maturação dos esporângios e, diminui a eficiência na reprodução do plasmódio primário no interior do pêlo radicular. Na rizosfera, este elemento pode influenciar a viabilidade e germinação dos esporos de resistência e a mobilidade dos zoósporos primários (Dixon, 2006). Além disso, a presença do cálcio no solo afeta positivamente a expressão dos fatores de resistência pelo hospedeiro (Dixon, 2006).

Outras opções de manejo testadas em uma pequena ou larga escala, com resultados variados, incluem o uso de agentes de controle biológico, tais como: minhoca (Friberg *et al.*, 2008), fungos endofíticos de raiz *Heteroconium chaetospora* (Narisawa *et al.*, 2005) ou *Phoma glomerata* (Arie *et al.*, 1998) e plantas iscas como folha de nabo (Murakami *et al.*, 2000).

USO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Segundo Kirk *et al.*, (2004), o solo é um delicado complexo de diversidade biótica e abiótica em equilíbrio, que está estreitamente relacionado a funções e características essenciais para a manutenção da sua capacidade produtiva.

O manejo da matéria orgânica no agroecossistema é uma estratégia fundamental na conservação da biodiversidade das populações edafobióticas, estabelecendo uma relação sinérgica para o desenvolvimento saudável do sistema solo, planta e ambiente. Conseqüentemente, o uso de adubação verde, cobertura morta ou vegetal, adubações orgânicas via compostagem e/ou adubação líquida (Hoitink e Boehm, 1999) e, compostos bioativos (Tomita, 2002) podem ser um dos instrumentos para recuperar a vitalidade da biodiversidade do solo perdida com o modelo de produção convencional.

Na agricultura convencional não há a vantagem de manter a população microbiana residente no solo, e com isso, não há preservação das habilidades naturais do solo em suprimir doenças e melhorar a produtividade das culturas (Garbeva *et al.*, 2004; Mazzola, 2004; Welbaum *et al.*, 2004).

Entre as diferentes estratégias capazes de garantir uma adequada introdução de matéria orgânica no solo, a fertilização orgânica poderia representar uma solução efetiva, particularmente pela aplicação de compostos de alta qualidade obtidos de resíduos orgânicos de diferentes

origens. Sendo assim, o uso de compostos orgânicos pode contribuir para minimizar o problema, pois enriquecem o solo melhorando sua aeração, viabilidade nutricional e atividade microbiana antagonista ao patógeno. Além disso, aumentos na produção são atribuídos ao elevado conteúdo de matéria orgânica e melhoria nas propriedades físicas do solo resultante da adição de compostos orgânicos.

Os compostos orgânicos contribuem para a sanidade das raízes, pois melhora a estrutura do solo e reduz o impacto negativo de patógenos do solo como, por exemplo, *Rhizoctonia solani* em couve-flor (Kundu e Nandi, 1985), *Fusarium oxysporum* em feijão (Mutitu *et al.*, 1988), *Phytophthora cinnamomi* em plantios de abacate (You *et al.*, 1996), *Sclerotium rolfsii* em tomate (Bulluck e Ristaino, 2002). Baixas incidências de podridão corticosa da raiz causada por *Pyrenochaeta lycopersici* R. Schneider & Gerlach foram encontradas em campos de produção de tomate sob produção orgânica comparada aos campos sob produção convencional (Drinkwater *et al.*, 1995).

Bactérias e fungos de solo desempenham papéis importantes em várias funções e ciclos biogeoquímico do ecossistema. Os microrganismos do solo atuam sobre a fertilidade, a estruturação do solo (Dodd *et al.*, 2000), e na sanidade e nutrição da planta (Smith e Goodman, 1999).

Estudos de agentes de controle biológico promissores vêm sendo desenvolvidos em laboratórios, contudo, dados obtidos em condições de campo são muito incipientes (Handelsman e Stabb, 1996). A supressividade de doenças tem sido obtida em solos enriquecidos com certos compostos orgânicos tanto em sistema de produção de condições controladas (Hadar *et al.*, 1992; Hoitink e Boehm, 1999), como em condições de campo (Keener *et al.*, 2000).

Os estudos das interações dos agentes de controle biológico com a comunidade microbiológica do ambiente são muito complexos, assim como os efeitos da qualidade e quantidade de compostos manejados no solo (Hoitink e Changa, 2004).

Os agentes de controle biológico, quando introduzidos ao ambiente, são afetados pela comunidade edafobiótica ou mesmo pelo local de cultivo (Handelsman e Stabb 1996). Assim, esses autores sugerem um manejo da comunidade microbiológica em condições de campo, através do uso de resíduos orgânicos para obter maior efetividade na supressividade dos fitopatógenos (English e Mitchell, 1988).

A mineralização de compostos orgânicos, sob condições especiais de temperatura, umidade e aeração, promove efeitos benéficos nas características físico-químicas do solo, fundamentada pela manutenção da biodiversidade e dos processos biocenóticos da edafobiota (Hoitink e Bohem, 1999).

Os agentes de controle biológico podem se desenvolver sobre os compostos orgânicos (Hoitink e Bohem, 1999) ou em solos supressivos (Weller *et al.*, 2002), e seus efeitos podem estar relacionados a qualidade e quantidade de matéria orgânica incorporada ao solo. Segundo Lockwood (1988) e Handelsman e Stabb (1996) estes agentes de controle biológico utilizam-se de alguns mecanismos de supressão de fitopatógenos, como: competição por nutrientes e por exudatos como açúcares e aminoácidos; produção de antibióticos efetivos no controle de patógenos de plantas (Ligon *et al.*, 2000); predação; parasitismo; e outros que podem promover a indução de resistência sistêmica da planta (van Loon *et al.*, 1998).

O uso de compostos orgânicos, além de garantir a fertilidade e o controle de patógenos do solo, pode promover outras vantagens para os produtores, entre elas: o custo com a aquisição de fertilizantes sintéticos pode ser reduzido se a produção dos compostos for local; a necessidade do

uso de pesticidas para o controle de doenças pode ser reduzida, promovendo benefícios tanto econômicos como ambientais. Além disso, produtos produzidos organicamente apresentam preços diferenciados no mercado.

GEL DE ELETROFORESE EM GRADIENTE DESNATURANTE

Os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos, no entanto, esta diversidade ainda encontra-se pouco descrita e explorada (Prosser *et al.*, 2007).

O isolamento de microrganismos de solo tem sido o único método para estudar a diversidade e estrutura das populações microbianas. Entretanto, este método somente permite avaliar os microrganismos cultiváveis, o qual representa uma pequena proporção de toda comunidade microbiana do solo (Torsvik *et al.*, 1990a e Torsvik *et al.*, 1990b).

As modernas técnicas de análises moleculares poderão ser aplicadas no intuito de determinar os mecanismos das inter-relações ecológicas das comunidades microbiológicas, assim como suas funções, num ambiente em que 99% desta comunidade microbiológica não é cultivável (Amann *et al.*, 1995).

Para o estudo da diversidade da comunidade microbiana do solo, técnicas baseadas em PCRs, gradientes de desnaturação (DGGE) e temperatura em gel de eletroforese (TGGE) podem ser empregadas analisando DNAs extraídos diretamente do solo. Estas permitem a obtenção de índices numéricos e medidas discretas.

O DGGE gera um perfil da comunidade microbiana depois da extração direta do DNA do solo e amplificação por meio de PCR do DNA da comunidade de interesse, principalmente o DNA ribossomal. Estas técnicas permitem o estudo de ambos os microrganismos cultiváveis ou

não, promovendo uma rápida análise das mudanças ocorridas na estrutura da comunidade microbiana em resposta a diversos fatores ambientais (Janvier *et al.*, 2007).

Diferenças nos perfis de eletroforese entre amostras refletem diferenças na composição da comunidade e na abundância de indivíduos nas populações da comunidade. Embora, o perfil eletroforético de uma amostra ambiental não reflita a composição taxonômica de uma comunidade microbiana, a informação filogenética sobre um membro da comunidade em particular pode ser obtida por isolamento e sequenciamento de fragmentos de DNA de interesse (Kent e Triplet, 2002). Os dados são plotados sobre os pontos da análise espacial do patógeno, onde se pode observar uma flutuação populacional espacial da diversidade biológica sobre a patogênica.

As análises de DGGE são empregadas para a separação de fragmentos de fita dupla de DNA que são idênticas em comprimento, mas diferentes em seqüência. Na prática, isto se refere à separação de fragmentos de DNA produzidos via amplificação por PCR. A técnica explora (entre outros fatores) a diferença na instabilidade do pareamento G-C com o pareamento oposto A-T. Uma mistura de fragmentos de DNA de seqüências diferentes passa por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo um gradiente de aumento de desnaturante de DNA, constituído de formamida e uréia.

Em geral, os fragmentos de DNA ricos em GC serão mais estáveis e permanecerão em fita dupla até alcançarem concentrações mais elevadas de desnaturante. Os fragmentos de fita dupla de DNA migram melhor em gel de poliacrilamida, enquanto, as moléculas de DNA desnaturadas tornam-se eficazmente maiores e lentas ou param no gel. Desta maneira, os fragmentos de seqüências diferentes podem ser separados em gel de poliacrilamida.

A utilidade da técnica de DGGE nas análises das comunidades microbianas consiste na hipótese de que diferentes seqüências migrarão para diferentes posições em géis de DGGE. O DGGE separa as seqüências de DNA baseado em seu comportamento de derretimento, e simulações mostram que em 95% dos casos, uma única seqüência de base diferente será detectada por este método (Jackson *et al.*, 2000). A técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (Muyzer e Smalla 1998).

Análise Multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE

Com a ampla utilização da técnica de PCR-DGGE no estudo de comunidade de microorganismos, a simples comparação visual entre os perfis das comunidades passou a não fornecer todas as informações que são possíveis de serem obtidas por meio da aplicação desta técnica (Andreote, 2007).

Para estudos de diversidade genética, a técnica de análise multivariada (componentes principais, variáveis canônicas e métodos de aglomeração) é recente, e tem como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas. Essa técnica tem sido empregada tanto para características expressas por variáveis quantitativas quanto qualitativas, as quais são comumente utilizadas em caracterizações/avaliações em bancos de germoplasma.

Tunlid *et al.*, (1989) e Boehm *et al.*, (1993) utilizaram análise multivariada de ácidos graxos para demonstrar que várias populações bacterianas contribuíram para a supressão geral de damping-off de pepino ocasionado por *Rhizoctonia* e *Pythium*. Populações microbianas específicas também têm sido envolvidas na supressão de doenças. Por exemplo, populações de

Pseudomonas que são mais abundantes em sistemas de monocultivos de trigo, que exibem supressão a uma variedade de doenças desta cultura (Weller *et al.*, 2002).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGRI-FACT. Practical Information for Alberta's Agriculture Industry, 2007

AGROATLAS. http://www.agroatlas.spb.ru/en/content/diseases/Brassicaceae/Brassicaceae_Plasmodiophora_brassicaceae/, acessado em 2009.

AIST, J.R.; WILLIAMS, P.H. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. **Canadian Journal of Botany**, v.49, p.2023–2034, 1971.

ANDREOTE, F.D. Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Tese de Doutorado. Piracicaba – SP. 201p., 2007.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v. 59, p. 143-169, 1995.

ARCHIBALD, J.M.; KEELING, P.J. Actin and ubiquitin protein sequences support a Cercozoan/Foraminiferan ancestry for the Plasmodiophorid plant pathogens. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.51, n. 1, p. 113–118, 2005.

ARIE, T.; KOBAYASHI, Y.; OKADA, G.; KONO, Y.; YAMAGUCHI, I. Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. **Plant Pathology** v.47, p. 743–748, 1998.

BEDENDO, I. P. Galhas de etiologia fúngica e bacteriana: p: 889-897. In: **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p. 919, 1995.

BELEC, C.; TREMBLAY, N.; COULOMBE, J. Liming and calcium cyanamide for clubroot control in cauliflower. **Acta Horticulturae**, v. 635, p. 41-46, 2004.

BJORKMAN, T.; PEARSON, K. J. High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) **Journal of Experimental Botany**, v.4, n. 318, p. 101-106, 1998.

BOEHM, M.J.; MADDEN, L.V.; HOITINK, H.A. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to Pythium damping-off severity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4171–4179, 1993.

BUCZACKI, S-T IMI-Descriptions-of-Fungi-and-Bacteria, v. 63, p. 621, 1979.

BUCZACKI, S.T.; OCKENDON, J.G. Preliminary observations on variation in susceptibility to clubroot among collections of some wild crucifers. **Annals of Applied Biology**, v. 92, p. 113–118, 1979.

BULLUCK, L. R., III; RISTAINO, J. B. Effect of synthetic and organic soil fertility amendments on southern blight, soil microbial communities, and yield of processing tomatoes. **Phytopathology**, v. 92, p.:181- 189, 2002.

CAFÉ FILHO, A.C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Ocorrência de *Plasmodiophora brassicae* no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 1, .p.35-36, 1986.

CALCOB (Cooperativa Agrícola dos Lavradores do Conselho de Oliveira do Bairro) - Dia de Campo “Melhoria das Tecnologias de Produção das Brássicas (couves) fertilização, rega e controlo de infestantes”. http://www.calcob.com/noticias_show.htm?id=6, 2004.

DIXON, G.R. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. - a review of recent advances. **Acta-Horticulturae**, v. 706, p. 271-282, 2006.

DODD, J.C.; BODDINGTON, C.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALEZ-CHAVEZ,C.; MANSUR, I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: for, function and detection. **Plant and Soil**, v. 226, p. 131-151, 2000.

DRINKWATER, L. E.; LETOURNEAU, D. K.; WORKNEH, F.; van BRUGGEN, A. H.C.; Shennan, C. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California. **Ecology Applied**, v. 5, p.1098-1112, 1995.

ENGLISH, J.T.; MITCHELL, D.J. Influence of an introduced composite of microorganisms on infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Phytopathology**, v. 78, p. 1484-1490, 1988.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.

FRIBERG, H.; LAGERLÖF, J.; HEDLUND, K.; RÄMERT, B. Effect of earthworms and incorporation of grass on *Plasmodiophora brassicae*. **Pedobiologia**, v. 52, p. 29—39, 2008.

FRIBERG, H.; LAGERLÖF, J.; RÄMERT, B. Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 690–695, 2006.

GARBEVA, P.; van VEEN, J.A.; van ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243–270, 2004.

GORODICKI ; HADAR, Y. Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* diseases in container media containing composted separated cattle manure and composted grape marc, **Crop Protection**, v. 9, p. 271–274, 1990.

GUSTAFSSON, M. Why is it so difficult to breed clubroot resistant oilseed varieties? **Vaextskyddsnotiser (Sweden)**, v. 61, n. 3, p. 92-99, 1997

GRIN Taxonomy for Plants, 2008 <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?166>

HADAR, Y.; MANDELBAUM, R.; GORODECKI, B. Biological control of soilborne plant pathogens by suppressive compost. In: Tjamos, E.S., Papavizas, G.C., Cook, R.J. (Eds.), **Biological Control of Plant Diseases**. Plenum Press, New York, p. 79–83, 1992.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of soil borne Plant Pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HASSE, I Quantificação de *Plasmodiophora brassicae* e uso de plantas medicinais para controle da doença. (Tese de doutorado). Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2005.

HIRAI, M. Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. **Breeding Science**, v. 56, p. 223-229, 2006.

HIRAI, M.; HARADA, T.; KUBO, N.; TSUKADA, M.; SUWABE, K.; MATSUMOTO, S. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 639–643, 2004.

HOITINK, H.A.J.; BOEHM, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 427-446, 1999.

HOITINK, H.A.J.; CHANGA, C.M. Production and utilization guidelines for disease suppressive compost. **Acta Horticulturae**, v. p. 87-92, 2004.

HORIUCHI, S.; HORI, M. A simple greenhouse technique for obtaining high levels of clubroot incidence. **Bulletin of Chugoku National Agricultural Experimental Station Serie E.**, v. 17, p. 33-55, 1980.

IBGE, http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/indicadoresagro_19962003/default.shtm. Acessado em 2007

IKEGAMI, H.; ITO, T.; IMURO, Y.; NAIKI, T. Growth of *Plasmodiophora brassicae* in the root and callus of Chinese cabbage. In “Chinese cabbage” Talekar, N.S.; Griggs, T.D. (eds). Asian Vegetal Research and Development Center, Tainan. P. 81-90, 1981.

INGRAM, D.S.; TOMMERUP, I.C. The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woron. **Proceedings of the Royal Society**, v. 180, p. 103–112, 1972.

JACKSON, C.R.; RODEN, E.E. & CHURCHILL, P.F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. **Molecular Biology Today**, v. 1, n. 2, p. 49-51, 2000.

JANVIER, C.; VILLENEUVE, F.; ALABOUVETTE, C.; EDEL-HERMANN, V.; MATEILLE, T.; STEINBERG, C. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1-23, 2007.

JING, W.; YUN, H.; XIAOLING, H.; YINGZE, N.; XIAOLAN, L.; YONG, L. Study on symptom, yield loss of clubroot and modality of *Plasmodiophora brassicae* in rape. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, v. 30, n. 1, p. 112-115, 2008.

KARAM, F. K. Agricultura orgânica estratégia para uma nova realidade. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001. 232p

KARLING, J.S. The Plasmodiophorales. Hafner Publ. Co., New York. p. 239, 1968.

KEENER, H.M.; DICK, W.A.; HOITINK, H.A.J. Composting and beneficial utilization of composted by-product materials. In: Bartels, J.M., Dick, W.A. (Eds.), **Land Application of Municipal, Agricultural, Industrial, and Municipal By-products**. Soil Science Society of America, Book Series 6, p. 315–341, 2000.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, v.56, p. 211-236, 2002

KIMOTO, T. Nutrição e adubação de repolho, couve-flor e brócolo. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P. (Eds.). **Nutrição e adubação de hortaliças**. Piracicaba: POTAFOS, p.149- 178, 1993.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M. MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. & TREVORS, J.T. Methods of studding soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KOBELT, P. Die Verbreitung von sekundären Plasmodien von *Plasmodiophora brassicae* (Wor.) im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach immunhistologischer Markierung des plasmodialen Zytoskeletts. Dissertation, Institut für Angewandte Genetik, Freie Universität Berlin, Germany. 2000.

KUNDU, P. K.; NANDI, B. Control of Rhizoctonia disease of cauliflower by competitive inhibition of the pathogen using organic amendments in soil. **Plant Soil**, v. 83, p. 357-362, 1985.

KWANGHOON, C.; YI, Y.; LEE, S.; KANG, K.; LEE, E.; HONG, S.; YOUNG, J. PARK, Y.; CHOI, G.J.; KIM, B.J.; LIM, Y. Microorganisms against *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 873-877, 2007.

LARKIN, R.P. Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1341-1351, 2008.

LIGON, J.M.; HILL, D.; HAMMER, P.E.; TORKEWITZ, N.R.; KEMPT, H.J.; van PEE, K.H. Natural products with antifungal activity from pseudomonas biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, v. 56, p. 688-695, 2000.

LIMA NETO, V. da C.; LIMA; M.L.R.Z. da C.; SCHUTA, L.R.; NOWACKI, J. de C.; PASQUALIN, D. Projeto Galha das Crucíferas. Relatório apresentado à Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Programa Paraná 12 meses, 86 p. 2005.

LOCKWOOD, J.L. Evolution of concepts associated with soil borne plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 93-121, 1988.

LUDWIG-MULLER, J.; SCHULLER, A. What can we learn from clubroots: alterations in host roots and homeostasis caused by *Plasmodiophora brassicae*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 291-302, 2008.

MACFARLANE, I. Factors affecting the survival of *Plasmodiophora brassicae* Wor. in the soil and its assessment by a host test. **Annals of Applied Biology**, v. 39, p. 239-256, 1952.

MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas. In: KIMATTI, H. *et al.*, **Manual de Fitopatologia**. 3.ed., v.2, São Paulo: Ed.Agronômica Ceres, p. 318-319, 1995.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 35-59, 2004.

MITHEN, R.; MAGRATH, R. A contribution to the life history of *Plasmodiophora brassicae*: secondary plasmodia development in root galls of *Arabidopsis thaliana*. **Mycological Research**, v. 96, p. 877-885, 1992.

MOXHAM, S.E.; BUCZACKI, S.T. Chemical composition of the resting spore wall of *Plasmodiophora brassicae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 80, p. 297-304, 1983.

MUNNECKE, D.E; KOLBEZEN, M.J.; BRICKER, J.L. Effects of moisture, chloropicrin, and methyl bromide singly and in mixtures on sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium albo-atrum*, **Phytopathology**, v. 72, p. 1235 – 1238, 1982.

MURAKAMI, K.; SHINODA, H.; NAKAMURA, F.; GOTO, I. Influence of soil types and soil pH on the incidence of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 75, n. 3, p. 339-345, 2004.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S.; AKIMOTO, T.; MURAKAMI, K.; GOTO, I.; SHISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, p. 584-589, 2000.

MUTITU, E. W.; MUKUNYA, D. M.; KEYA, S. O. Biological control of Fusarium yellows by *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder using organic amendments locally available in Kenya. **Acta Horticulturae**. 218:267-274, 1988.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek – International Journal of General and Molecular Microbiology**, Wageningen v. 73, p. 127-141, 1998.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S.; HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285–290, 2005.

NIWA, R.; NOMURA, Y.; OSAKI, M.; EZAWA, T. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. **Plant Pathology**, v. 57, p. 445-452, 2008.

NOWACKI, M.J. Contribuição ao conhecimento das doenças fúngicas em culturas no município de Curitiba, **Curitiba:UFPR**,1963.

PAGEAU, D.; LAJEUNESSE, J.; LAFOND, J. Impact of clubroot [*Plasmodiophora brassicae*] on the yield and quality of canola. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 137-143, 2006.

PAZ LIMA, M; CAFÉ-FILHO, A.C.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; SCHUTA, L.R. First report of clubroot of *Eruca sativa* caused by *Plasmodiophora brassicae* in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p.573, 2004.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P. *et al.* Essay – The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p. 384-392, 2007.

SMITH, K.P.; GOODMAN, R.M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 473-491, 1999.

STRELKOV, S.E.; MANOLII, V.P.; CAO, T.; XUE, S.; HWANG, S.F. Pathotype Classification of *Plasmodiophora brassicae* and its occurrence in *Brassica napus* in Alberta, Canada. **J. Phytopathology**, v. 155, p. 706–712, 2007.

SUZUKI, K.; MATSUMIYA, E.; UENO, Y.; MIZUTANI, J. Some properties of germination-stimulating factor from plants for resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 58, p. 699–705, 1992.

SUWABE, K.; TSUKAZAKI, H.; IKETANI, H.; HATAKEYAMA, K.; FUJIMURA, M.; NUNOME, T.; FUKUOKA, H.; MATSUMOTO, S.; HIRAI, M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 997–1002, 2003.

TAKAHASHI, K. Biological agents affecting the viability of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* Wor. in soil without host roots. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 60, p. 667–674, 1994.

TANAKA, S.; ITO, S.; KAMEYA-IWAKI, M.; KATUMOTO, K.; NISHI, Y. (Occurrence and distribution of clubroot disease on two cruciferous weeds, *Cardamine flexuosa* and *C. scutata*, in Japan. **Transactions of the Mycological Society Japan**, v. 34, p. 381–388, 1993.

TIMILA, R.D.; CORRELL, J.C.; DUWADI, V.R. Severe and widespread clubroot epidemics in Nepal. **Plant Disease**, v. 92, n. 2, p. 317, 2008.

TOMITA, C.K. Manejo de matéria orgânica no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 2002.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environment Microbiology**, v. 56, pp. 782–787, 1990a.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 776–781, 1990b.

TUNLID, A.; HOITINK, H.A.J.; LOW, C.; WHITE, D.C. Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty-acid biomarkers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p.1368–1374, 1989.

van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VENTURA, A. J.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em crucíferas. **Informe Agropecuário**, v. 17, n. 183, p. 53-54, 1995.

VIÉGAS, A. P.; TEIXEIRA, A.R. Alguns fungos do Brasil (Phycomycetos). **Bragantia**, v. 3, n. 8, p. 23-269, 1943.

WALLENHAMMAR, A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**, v. 45, p. 710-719, 1996.

WEBB, P.C.R. Zoosporangia, believed to be those of *Plasmodiophora brassicae*, in the root hairs of noncruciferous plants. **Nature**, v. 163, p. 608, 1949.

WELBAUM, G.E.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 23, p. 175–193, 2004.

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; McSPADDEN GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 309-348, 2002.

YOU, M. P.; SIVASITHAMPARAM, K.; KURTBÖKE, D. I. Actinomycetes in organic mulch used in avocado plantations and their ability to suppress *Phytophthora cinnamomi*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 22, p. 237-242, 1996.

CAPÍTULO I

EFEITO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS

RESUMO

A matéria orgânica é considerada um dos principais componentes da qualidade do solo por contribuir direta ou indiretamente em suas propriedades química, física e biológica. O enriquecimento do solo com compostos orgânicos é uma prática agrícola comumente utilizada para promover a qualidade do solo e a supressão de doenças. O efeito de dois compostos orgânicos na supressão da hérnia das crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*, foi avaliado em comparação à adubação sintética, em condições controladas e de campo. Os solos testados foram infestados com o patógeno e enriquecidos com Composto Bioativo Líquido – CBL e Composto Bioativo Sólido – CBS. Em condições controladas, os tratamentos CBL, CBL + CBS e CBS foram supressivos à hérnia das crucíferas, pois diminuíram o índice da doença em 90%, 85% e 75%, respectivamente, quando comparado com o controle (NPK). Entretanto, o controle da infecção obtido com CBL foi correlacionado com baixa produção de massa aérea fresca. Já os tratamentos CBS e CBL + CBS promoveram valores de matéria fresca similares ao fertilizante nitrogenado. Em condições de campo, sob alta concentração do inóculo, os tratamentos testados não foram eficientes na supressão da doença, não diferindo estatisticamente do controle. Baseado nestes resultados foi possível concluir que em condições controladas o tratamento CBL + CBS suprime a hérnia das crucíferas promovendo aumento de peso da parte aérea, podendo, então, servir como um componente no manejo integrado de pragas.

Palavras-chave adicionais: bokashi, supressividade a doença, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

EFFECT OF ORGANIC COMPOUNDS IN THE CONTROL OF CLUBROOT IN BROCCOLI

ABSTRACT

Organic matter is considered as one of the major component of soil quality because it contributes directly or indirectly to many physical, chemical and biological soil properties. Thus, soil amendment with compounds is an agricultural practice commonly used to improve soil quality and disease suppression. The effect of two organic compounds on suppression of clubroot, caused by *Plasmodiophora brassicae*, was evaluated in comparison to chemical fertilization, in field and greenhouse conditions. The soils were infested with pathogen and enriched with Bioactive Solid Compost (CBS – bokashi) and Bioactive Liquid Compost (CBL). In greenhouse, the treatments CBL, CBL + CBS and CBS reduced disease index in 90%, 85% and 75%, respectively, when compared with the control (NPK). However, low level of infection in soil amended with CBL was correlated with low production of fresh weight of aerial part. CBS and CBL + CBS promoted high value of fresh weight of aerial part, similar to those produced by nitrogen fertilizer. In field conditions, under high inoculum concentration, the treatments were not effective in disease suppression, being statistically similar to the control. Based on these results, conclude that under greenhouse conditions CBL + CBS treatment reduced the severity of the clubroot and increased the weight of the aerial part. Therefore, can serve as a component in integrated management programs of pests.

Additional Keywords: bokashi, disease suppression, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INTRODUÇÃO

A hérnia das crucíferas, causada pelo parasita obrigatório *Plasmodiophora brassicae* Woronin, é a principal doença da família Brassicaceae. O patógeno apresenta distribuição mundial, reduzindo a produtividade e às vezes destruindo totalmente a cultura. As plantas infectadas apresentam galhas nas raízes, que interferem na translocação de água e nutrientes, ocorrendo posteriormente amarelecimento das folhas, murcha claramente visível no período mais quente do dia, e enfezamento da planta (Voorrips, 1996).

O patógeno uma vez estabelecido no campo, é muito difícil ser erradicado, pois ele produz esporos de resistência com capacidade de permanecer por longo tempo no solo, facilitando assim sua manutenção e disseminação na lavoura. Segundo Smith *et al.*, (1988) o controle da doença é difícil por se tratar de um patógeno de solo adaptado às condições regionais de temperaturas amenas, solos úmidos e ácidos. Adicionalmente, a resistência não é durável, pois de acordo com Gustafsson (1997) a maioria das fontes de resistência é raça-específica a qual não é adequada a sistemas onde o patógeno mostra uma larga variação na virulência e um alto índice de recombinação por reprodução sexual, como é o caso de *P. brassicae*.

Embora os fungicidas sejam comumente usados para o manejo deste patógeno, a necessidade de alta frequência de aplicações, associada ao alto custo, desenvolvimento de populações resistentes do patógeno, e riscos ao ambiente e saúde humana têm estimulado a pesquisa a buscar novas alternativas de controle para o manejo da doença.

O controle biológico através do uso de fungos (Narisawa *et al.*, 2005), actinomicetos (Lee *et al.*, 2008), endofíticos, e plantas não crucíferas (iscas) para reduzir a densidade de esporos de

resistência (Murakami *et al.*, 2000a e 2001) tem sido estudado, mas o efeito do controle destes métodos é dependente da densidade de esporos do patógeno no solo.

Uma alternativa de controle agronomicamente interessante é a utilização de compostos orgânicos que contribuem para a sanidade do sistema radicular da planta, promovendo uma melhor estrutura do solo e aumentando sua atividade microbiana, que tem uma importante função na supressão da hérnia das crucíferas (Murakami *et al.*, 2000b).

Os compostos orgânicos são produtos da decomposição controlada da matéria orgânica, resultando na estabilização e sanitização da mesma, e podem ser usados como condicionadores do solo na agricultura (Termorshuizen *et al.*, 2004). O uso freqüente desses compostos promove melhora na sua aeração, viabilidade nutricional, drenagem, descompactação do solo, resultando em maior qualidade e sustentabilidade da produção, pois melhora as condições físicas favoráveis para o crescimento da planta, estimulando o desenvolvimento das raízes, e aumentando a diversidade biológica do solo (Abawi e Widmer, 2000).

Além de todos estes benefícios, os compostos orgânicos aumentam a atividade microbiana do solo contribuindo para a supressão geral (van Bruggen & Semenov, 2000), que é definida por Whipps, (2001) e Yin *et al.*, (2003) como a redução da severidade ou incidência da doença devida em parte, pelas atividades da diversidade biológica, que direta ou indiretamente inibem a infecção ou sobrevivência do patógeno.

Os mecanismos biológicos para obtenção da supressão geral podem ser através da competição microbiana por nutrientes, antibioses, produção de enzimas líticas ou outras enzimas extracelulares, parasitismo, predação, e indução de resistência no hospedeiro (Garbeva *et al.*, 2004).

Efeitos positivos do uso de compostos orgânicos na redução da hérnia das crucíferas têm sido relatados (Szczecz et al., 1993; Tilston et al., 2002). Liu et al., (2007) reportaram uma diminuição da incidência de *Sclerotium rolfsii* em tomate após a aplicação de composto a base de refugo de algodão descaroçado. O uso de cama de frango diminuiu a densidade populacional do nematóide *Meloidogyne incognita* devido ao aumento da atividade microbiana no solo (Riegel e Noe, 2000). A incorporação de compostos orgânicos ao solo suprimiu a murcha de fusário em espinafre (*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*) (Escuadra e Amemiya, 2008), o cancro bacteriano do Tomateiro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Yogev et al., 2009), e doenças radiculares do feijão (Rotenberg et al., 2007).

O tamanho da partícula, a condutividade elétrica, o pH, o conteúdo de nitrogênio, o conteúdo de celulose e lignina, e os inibidores liberados pelos compostos orgânicos são propriedades físico-químicas dos compostos conhecidas por afetar a supressão de doenças (Hoitink e Fahy, 1986). Entretanto, os efeitos da incorporação de compostos orgânicos ao solo na supressão da doença podem variar de acordo com o tipo de solo e os organismos nativos deste solo, a maturação do composto e o tempo após a sua incorporação (Grunwald et al., 2000; Pérez-Piqueres et al., 2006).

Neste estudo, o efeito de dois compostos orgânicos sobre a hérnia das crucíferas em brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) foi avaliado em experimentos conduzidos em condições controladas e campo. Os objetivos deste trabalho foram verificar a possibilidade do uso de compostos orgânicos no manejo da hérnia das crucíferas e, relatar as propriedades físico-químicas desses compostos relacionadas à severidade da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Características dos compostos

Foram avaliados os seguintes compostos orgânicos: composto bioativo sólido (Bokashi) – CBS e composto bioativo líquido – CBL. O CBS é um composto formado essencialmente por “terra virgem” e a ela incorporados diferentes tipos de tortas e farelos vegetais. Este composto passa pelos processos de fermentação, mineralização e estabilização biológica dos resíduos orgânicos em um período de 10 dias. Desse modo, o CBL é resultante do processo de fermentação anaeróbica, que promove a biodigestão dos resíduos orgânicos. O método utilizado para a compostagem, previamente descrito por Tomita (2002), segue os conceitos e práticas da agricultura natural. A composição e quantidades das matérias-primas utilizadas para produção do CBL e do CBS estão contidas na tabela 1.1.

TABELA 1.1 - Composição e quantidades das matérias primas utilizadas para produção de composto bioativo sólido e de composto bioativo líquido.

(CBS)		(CBL)	
Matéria prima:	Quantidade (kg)	Matéria-prima	Quantidade (kg)
Terra virgem	1.000	Capim elefante triturado	200
Composto	250	Composto	10
Resíduo de leguminosas	250	Farelo de mamona	10
Farelo de arroz	200	Farelo de trigo	10
Farinha de osso	100	Farinha de osso	20
Cinza	100	Cinza	10
Farelo de mamona	50	Rapadura	5
Rapadura	10	Farelo de arroz	20
Amido de milho	5	Amido de Milho	3
Fubá	5	Água	800L
Água	45%		

A tabela 1.2 mostra a variabilidade na composição química dos compostos orgânicos avaliados, principalmente para as concentrações de matéria orgânica, nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio que foram muito superiores no CBS. Evidenciou-se assim, a sua característica como fornecedor de nutrientes. Além disso, verificou-se um alto valor de pH no composto CBS, enquanto que no CBL o pH foi levemente ácido (Tabela 1.2).

TABELA 1.2 - Características químico-orgânicas dos compostos utilizados.

Dados	CBS	CBL
Nitrogênio (%):	3,60	0,024
P ₂ O ₅ (Total) (%):	18,0	0,043
K ₂ O solúvel (%):	4,20	0,020
Cálcio (%):	8,00	0,024
Magnésio (%):	3,00	0,013
Enxofre (%):	1,20	0,010
Mat. Orgânica (%):	22,0	0,500
Umidade (%):	13,5	98,500
Mat. Mineral (%):	64,5	1,000
pH:	7,6	4,800

Determinação do número de esporos de resistência de *P. brassicae* do solo

A densidade de esporos de resistência dos solos foi determinada pela modificação do método de Murakami *et al.* (2000a). Amostras de 1g de solo, selecionadas ao acaso de cada bloco experimental, foram suspensas em 80 mL de água deionizada e agitadas vigorosamente por 5 min. O pH da suspensão foi ajustado para 10 com 1M NaOH e a solução foi agitada novamente

por 5 min. Então, o pH da solução foi reajustado para 9 com 1M NaOH e a solução foi agitada por 1 min, peneirada e centrifugada a 900 x g por 10 min a temperatura ambiente.

O resíduo foi lavado com água deionizada, centrifugado três vezes e resuspendido em água deionizada ao volume final de 50 mL. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi misturada com um volume de 200 µg mL⁻¹ de azul de bromofenol. O número de esporos de resistência foi quantificado em Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico com lente objetiva de 100X.

Parâmetros químicos e granulométricos do solo

O solo do tipo latossolo, naturalmente infestado com *P. brassicae*, utilizado para os experimentos conduzidos em condições controladas, foi coletado em áreas distintas de um grande plantio comercial de brócolis, situada no Núcleo Rural de Brazlândia-DF. A profundidade da coleta foi nos primeiros 20 cm, e as amostras foram acondicionadas em sacolas plásticas, estocadas a 4°C, e submetidas à análise química e granulométrica (Tabela 1.4), antes da aplicação dos compostos. Ao final dos experimentos foram coletadas amostras de cada uma das repetições dos tratamentos (Tabela 1.4).

As análises químicas incluíram: capacidade de troca catiônica (CTC), saturação de bases (V%), saturação de alumínio, pH do solo, matéria orgânica, macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Zn), e as análises granulométricas incluíram o percentual de areia, limo e argila.

Variáveis analisadas

Foram realizadas quatro avaliações semanais medindo-se a altura das plantas, o número de folhas e o diâmetro das hastes (dados das últimas duas variáveis não mostrados). Aos 35 dias após a inoculação, as plantas foram cortadas ao nível do solo e as raízes foram cuidadosamente lavadas e, então, as hérnias destacadas. As raízes, hérnias e o material foliar foram pesados para a

determinação do peso fresco e colocados em saco de papel, separadamente. Após a perda da umidade, foram levados para estufa a 65 °C, por 72 h, para a determinação do peso seco. A incidência da doença foi determinada por meio da observação visual da presença ou ausência de galhas nas raízes das plantas.

Experimento em casa de vegetação

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Estação Biológica da Universidade de Brasília. O solo utilizado foi obtido de campo comercial infestado, cuja concentração inicial do patógeno foi de 1×10^4 esporos de resistência/g de solo.

As mudas de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) foram produzidas em bandeja de isopor de 120 células contendo terra esterilizada. Com aproximadamente 20 dias foi transplantada, uma planta por vaso (unidade experimental) com capacidade para 2 kg de solo.

As dosagens dos compostos utilizados foram: 1) 200 g de CBS; 2) 200 mL de CBL; 3) 100 mL de CBL + 20 g de NPK; 4) 100 mL de CBL + 100 g de CBS e 5) 40 g de NPK 10-10-10 como controle, haja vista ser este o fertilizante convencionalmente utilizado.

Os compostos foram incorporados ao solo dois dias antes do transplântio, com exceção do CBL que foi adicionado à base de cada planta, dois dias após o transplântio. A umidade foi mantida por regas diárias. A temperatura da casa de vegetação no período foi em média de 30 °C.

O delineamento adotado foi em blocos casualizados com cinco tratamentos constituídos de 25 repetições (parcelas experimentais). Os sintomas da doença foram avaliados com o auxílio de uma escala de severidade descrita por Abbasi *et al.* (2006), classificada dentro das categorias 0 – 3 onde 0 = 0% (sem hérnia); 1 = até 25% (hérnias levemente inchadas); 2 = 26 a 50% (hérnias

moderadamente inchadas), 3 = acima de 50% (hérnias severamente inchadas) das raízes cobertas por hérnias. (Figura 1.1).

O número de plantas na classe 1 foi multiplicado por 10, na classe 2 por 60, e na classe 3 por 100 e a soma, dividida pelo número total de plantas para obter o ID (Índice da Doença), previamente reportado por Narisawa *et al.*, (2005).



FIGURA 1.1 – Escala de severidade de *Plasmodiophora brassicae* em brócolis cultivados em casa de vegetação (0 = sem hérnia; 1 = até 25% de hérnia; 2 = 26 a 50% de hérnia; 3 = acima de 50% de hérnia).

Experimento no campo

Para avaliar o efeito dos compostos orgânicos em suprimir a hérnia das crucíferas em condições de campo, um experimento foi conduzido em campo comercial de brócolis localizado no Núcleo Rural de Brazlândia/DF (S: 15° 40' 51,97" e W: 48° 09' 21,35"). O histórico do campo comercial é de monocultura de crucíferas, altamente infestado com *P. brassicae* na concentração inicial de 10^8 esporos/ g de solo.

As dosagens dos compostos utilizados foram: 1) 400 g de CBS; 2) 400 mL de CBL; 3) 200 mL de CBL + 200 g de CBS; 4) 200 mL de CBL + 40 g de NPK e 5) 80 g de NPK (controle). Neste experimento, considerou-se o tratamento com o NPK como testemunha, pois é o que o produtor comumente adota. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 15 repetições de cada planta (unidades experimentais).

Os sintomas da doença foram avaliados usando a escala de severidade adotada por Abbasi *et al.*, (2006) com modificações, classificada dentro das categorias 0 – 4 onde 0 = 0% (sem hérnia); 1 = até 25% (hérnias levemente inchadas); 2 = 26 a 50% (hérnias moderadamente inchadas); 3 = 50 a 75% (hérnias severamente inchadas) e 4 = 100% (hérnias severamente inchadas nas raízes laterais e principal) das raízes cobertas por hérnias. (Figura 1.1). O número de plantas na classe 1 foi multiplicado por 10, na classe 2 por 30, na classe 3 por 60, na classe 4 por 100 e a soma, dividida pelo número total de plantas para obter o ID, previamente reportado por Narisawa *et al.*, (2005).

Análises estatísticas

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o programa Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000). Os valores médios de peso seco da massa aérea e da hérnia, a taxa de crescimento da planta e os índices da doença obtidos foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Parâmetros químicos e granulométricos do solo

As características químicas e granulométricas do solo foram afetadas pela incorporação dos compostos orgânicos. O pH foi ligeiramente mais alto em solos incorporados com compostos orgânicos, diminuindo assim a disponibilidade de Al e H para as plantas, os quais foram encontrados em maior concentração nos solos fertilizados quimicamente.

Os níveis de fósforo, zinco e CTC foram maiores em solos adubados com fertilizantes sintéticos (Tabela 1.3). O valor de saturação de bases foi maior nos solos com CBS e CBL + CBS. Com relação ao K, verificou-se uma significativa redução de sua concentração inicial no solo com a incorporação do CBL. Os níveis de Ca e Mg foram mais altos em solos adubados convencionalmente.

Vale ressaltar que ocorreu redução no teor de matéria orgânica no solo após a incorporação dos compostos orgânicos, devido as amostras de solo terem sido coletadas após a realização dos experimentos, sendo então, a matéria orgânica introduzida e absorvida totalmente pela planta, principalmente nos solos fertilizados com CBS, onde pode se constatar que as plantas obtiveram altos valores de matéria fresca neste tratamento.

Quanto às características granulométricas observadas na Tabela 1.3, evidencia-se que não houve diferenças importantes entre os tratamentos estudados, pois todos aumentaram levemente o percentual de areia e diminuíram o de argila, quando comparados à condição inicial do solo, onde o valor percentual de argila e areia era próximo.

TABELA 1.3 - Propriedades químicas e físicas do solo antes da incorporação dos compostos, e ao final do experimento, em casa de vegetação.

Características		Solo	CBL + solo	CBS + solo	CBL+CBS + solo	CBL+NPK + solo	NPK (controle) + solo
Químicas							
pH (CaCl₂)		4,8	5,0	5,0	5,8	4,6	4,5
Al (cmol/dm³)		0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
H+Al (cmol/dm³)		5,6	3,5	2,2	2,2	5,5	7,5
Ca (cmol/dm³)		3,0	5,0	6,2	6,2	4,5	9,3
Ca+Mg (cmol/dm³)		3,7	5,4	7,9	7,7	4,6	9,5
K (g/dm³)		101	35	115	117	63	115
P (g/dm³)		112	230	364	344	880	1420
Zn (mg/dm³)		15,9	24,7	28,2	22,0	58,0	75,0
CTC		9,56	9,90	10,39	10,20	10,26	17,29
Sat. Bases (%)		41,42	61,07	79,83	79,43	46,39	56,62
Sat. Al (%)		2,46	-	-	-	4,03	2,00
Mat .Org. (%)		5,1	3,0	3,0	2,9	2,9	3,0
TEXTURA							
Areia (%)		50	59	62	62	59	63
Limo (%)		10	9	8	8	9	8
Argila (%)		40	32	30	30	32	29

Supressão da doença em casa de vegetação

Houve diferença significativa entre os tratamentos para a maioria das variáveis examinadas (Tabela 1.4). O CBL, CBS e sua combinação CBL + CBS foram supressivos à doença, pois diminuíram o peso da hérnia fresca. Entretanto, o controle da infecção obtido com CBL foi correlacionado com baixa produção de massa aérea fresca, enquanto os tratamentos CBS e CBL + CBS promoveram valores de matéria fresca similares ao fertilizante nitrogenado.

Os valores da relação hérnia seca versus matéria seca (HS/MS) foram significativamente inferiores quando aplicados os compostos orgânicos em comparação ao controle, que teve aproximadamente 50% do peso da planta tomado por hérnia (Tabela 1.4). O CBS e CBL + CBS incrementaram maiores rendimentos de massa fresca nas raízes, 0,32 g e 0,36 g respectivamente.

TABELA 1.4 – Efeito dos tratamentos na massa aérea, raiz de brócolis e hérnia frescas de *Plasmodiophora brassicae*, em casa de vegetação.

Tratamentos	hérnia fresca (g)	Massa aérea fresca (g)	Raiz fresca (g)	HS/MS** (%)	MS/MF*** (%)
CBL	*0,09a	7,6a	0,15a	2,11 ^a	12,58a
CBL+CBS	0,25a	12,9b	0,36b	3,96 ^a	11,79a
CBS	0,53a	13,0b	0,32b	8,00a	11,58a
CBL+NPK	2,04b	13,0b	0,12a	33,70b	11,20a
NPK	2,80b	12,6b	0,15a	44,15c	9,80a
CV(%)	18,24	15,81	6,90	6,83	12,09

* Valores referentes à média de 25 plantas. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

** Relação percentual entre o peso da hérnia seca e o peso da matéria seca

*** Relação percentual entre o peso da matéria seca e o peso da matéria fresca

O índice de doença calculado foi relativamente baixo para todos os tratamentos em função da reduzida densidade de inóculo encontrada nas amostras de solo coletadas, 10^4 esporos de resistência/g de solo (Figura 1.2). Embora, os compostos orgânicos não tenham diferido significativamente no grau de supressão da doença, o CBL, CBL + CBS e CBS produziram valores de índices de doença de 4, 6 e 10, diminuindo significativamente a severidade da hérnia das crucíferas em 90%, 85% e 75% respectivamente, quando comparado com o controle.

O CBL controlou a doença quando empregado isoladamente ou em combinação com CBS, mas quando aplicado em combinação com NPK perdeu o seu efeito supressivo, aumentando assim o índice da doença para 30, não diferindo estatisticamente do controle, 40.

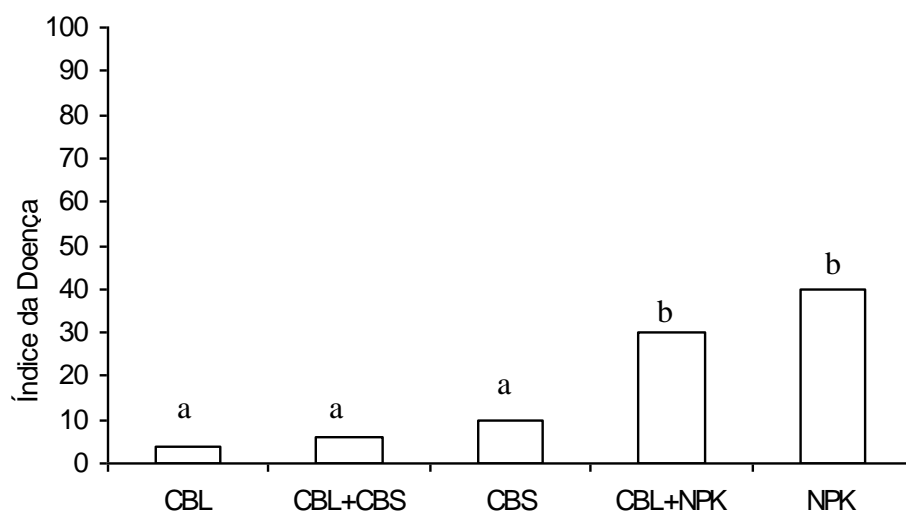


FIGURA 1.2 - Efeito dos compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido; CBL – Composto bioativo líquido) no índice da hérnia das crucíferas em brócolis, cultivados em casa de vegetação. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

As plantas crescidas em solos adubados organicamente apresentavam aspecto saudável, com poucas galhas, a maioria confinada nas raízes laterais, indicando que estes compostos permitem que haja no solo menores quantidades de esporos viáveis. O sintoma de murcha foi evidente nos tratamentos em que foram adicionados NPK, enquanto as plantas que foram suplementadas com compostos orgânicos, principalmente com CBS, apresentaram melhor desenvolvimento de parte aérea (Figura 1.3)

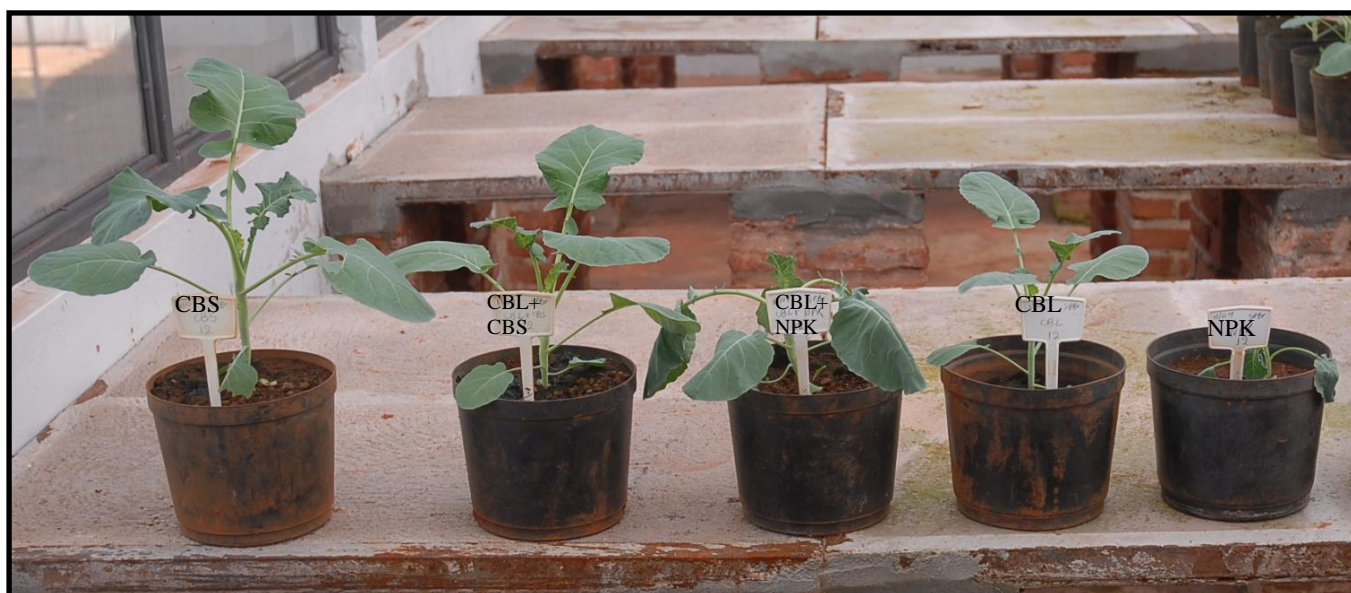


FIGURA 1.3 – Efeito de diferentes fertilizantes no desenvolvimento das plantas de brócolis e no controle da hérnia das crucíferas.

O crescimento da parte aérea de mudas de brócolis foi comparado entre os compostos alternativos e químicos. A Figura 1.4 mostra a altura das plantas durante quatro avaliações. O CBL e o controle promoveram crescimento similar das plantas até 28 dias após o transplante, e após o 35º dia, o CBL foi significativamente menor dentre os tratamentos. As adubações com

CBS, CBL + CBS e CBL + NPK garantiram valores de altura significativamente maiores durante todas as avaliações.

Foram também avaliados, semanalmente, o número de folhas e o diâmetro das hastes, entretanto, estes dados não foram mostrados, por não ter havido diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

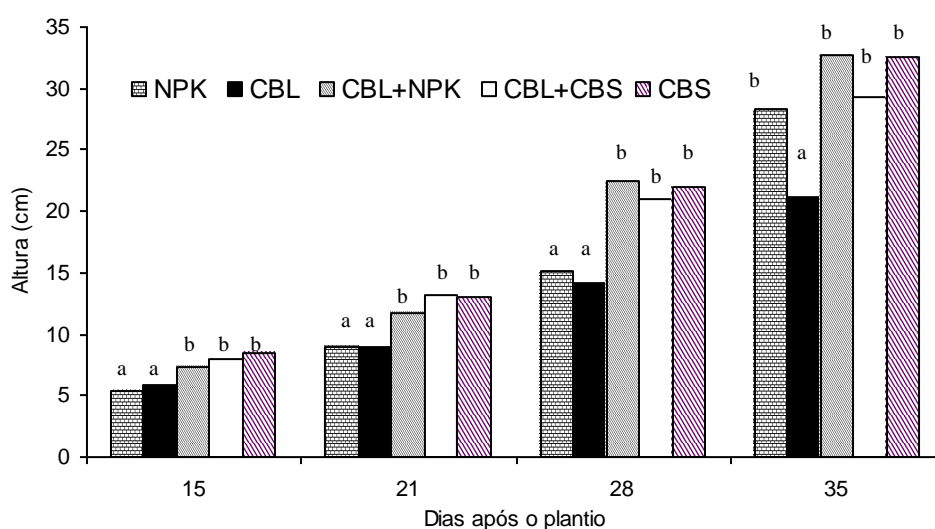


FIGURA 1.4 – Crescimento das mudas de brócolis em solos suplementados com compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido; CBL – Composto bioativo líquido), em casa de vegetação. As letras indicam diferenças nos valores médios de crescimento, em cada dias após o plantio. Dentro de cada dia, letras iguais indicam que não houve diferença ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Efeito dos compostos orgânicos na hérnia das crucíferas em condições de campo

A concentração dos esporos de resistência encontrada foi de 10^8 esporos/ g de solo. Sob esta condição, todas as plantas controle, juntamente com os tratamentos CBL + CBS e CBL +

NPK em todos os blocos ficaram murchas, e apresentaram galhas extensas em tamanho e número, tanto nas raízes laterais como na principal. O CBL e CBS apresentaram índices da doença de 88, mas não diferiram estatisticamente do controle (Figura 1.5).

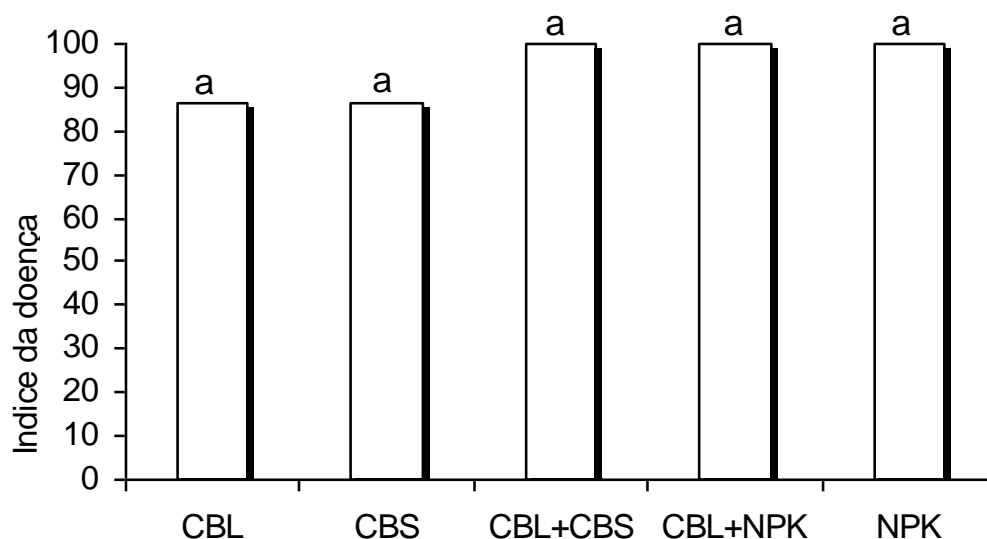


FIGURA 1.5 – Efeito dos compostos orgânicos (CBS – Composto bioativo sólido e CBL – Composto bioativo líquido) no índice da hérnia das crucíferas em brócolis, em condições de campo. A mesma letra indica que não houve diferença pelo teste de Scott-Knott, a 0,05.

Em virtude da alta densidade de inóculo presente no solo, o peso da hérnia fresca foi elevado para todos os tratamentos avaliados resultando no enfezamento das plantas. Assim, o valor do peso fresco da parte aérea das plantas cultivadas no campo foi muito semelhante ao das cultivadas em condições controladas (Tabela 1.4 e Tabela 1.5).

As plantas de brócolis suplementadas com CBS foram as que apresentaram maior valor de massa aérea fresca, 17,97 g (Tabela 1.5), e o menor percentual da relação hérnia fresca versus matéria fresca (HF/MF) da planta, 49,64%, muito embora, o peso fresco da hérnia não tenha

diferido estatisticamente dos demais tratamentos e do controle. Observou-se que a produção de hérnia fresca foi muito elevada para todos os tratamentos avaliados, interferindo drasticamente na produção de raiz.

TABELA 1.5 - Efeito dos tratamentos na massa aérea e raiz de brócolis e hérnia fresca de *Plasmodiophora brassicae*, em condições de campo.

Tratamentos	Massa aérea fresca (g)	hérnia fresca (g)	Raiz fresca (g)	HF/MF** (%)
CBL+NPK	*9,97a	8,85 ^a	0,04a	88,87b
CBL	11,91a	9,29 ^a	0,14a	78,00b
NPK	12,55a	8,93 ^a	0,82a	71,15b
CBL+CBS	12,83a	8,63 ^a	0,83a	67,26b
CBS	17,97b	8,92 ^a	0,19a	49,64 ^a
CV(%)	10,99	26,21	32,01	16,35

* Valores referentes à média de 5 plantas adubadas com CBS – Composto bioativo sólido, CBL- Composto bioativo líquido, NPK – controle. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

** Relação percentual entre o peso da hérnia fresca e o peso da matéria fresca

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a supressão da hérnia das crucíferas com o uso de compostos orgânicos para o controle de patógenos em condições controladas, além dos efeitos benéficos dos compostos orgânicos nas propriedades físicas e químicas do solo.

Os experimentos em casa de vegetação mostraram claramente que a hérnia das crucíferas causada pelo protozoário *P. brassicae* foi reduzida pela incorporação ao solo dos compostos orgânicos, CBL, CBS e a combinação CBL + CBS quando comparada à incorporação de

fertilizante sintético ao solo. Este resultado corrobora os dados de outros estudos, os quais têm mostrado que a adição de matéria orgânica é a causa primária da supressão dos patógenos de solo (Liu *et al.*, 2007, Niwa *et al.*, 2007, Tilston, *et al.*, 2005 e Tilston *et al.*, 2002).

Esta supressão dos patógenos de solo após a incorporação de matéria orgânica é provavelmente decorrente da atividade microbiana e da biomassa que são mais altas em campos com adição de compostos orgânicos do que em campos com adição de fertilizantes convencionais (Drinkwater *et al.*, 1995; Hopkins e Shiel, 1996; Parham *et al.*, 2002, Parham *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2004). Além disso, os compostos orgânicos suprimem doenças de plantas através de interações complexas entre fatores físico-químicos e/ou biológicos controlando tanto patógenos do filoplano (por meio de indução de resistência) como patógenos de raiz (por meio de competição, antibiose, parasitismo, e indução de resistência sistêmica às plantas).

A ação supressiva do CBS pode estar relacionada a suas propriedades químicas (Tabela 1.2), dentre elas: 1) alta concentração de N, que segundo Lazarovits (2001), promove a morte de fitopatógenos de solo pela liberação de amônia pelos microrganismos do solo que degradam os compostos orgânicos ricos em N; 2) alto valor do pH que afeta a germinação dos esporos de resistência, a mobilidade dos zoósporos primários, a reprodução e a eficiência do plasmódio primário nos pêlos radiculares (Dixon, 2006); 3) altas concentrações de cálcio e magnésio que também produz efeito positivo no controle da doença (Tremblay *et al.*, 2005). Este efeito é aditivo ou limitado sob condições de neutralidade do pH (Niwa *et al.*, 2007). Além destes fatores, o CBS atua como fertilizante orgânico, fornecendo nutrientes e elevando a resistência do hospedeiro à infecção de patógenos.

A redução da doença pode estar relacionada ainda com os maiores níveis de Ca + Mg, saturação de bases e pH nos solos suplementados com o CBS e CBL + CBS, contudo, os valores

de cátions e pH encontrados nos solos suplementados com estes compostos ainda são muito inferiores aos considerados por Campbell *et al.*, (1985) como ideais para um bom controle da hérnia das crucíferas, (14 meq/ 100 g e acima de 7,2 respectivamente), sugerindo então, que estes compostos possam também controlar a doença por ação de microrganismos antagonistas.

Não houve correlação consistente entre as propriedades químicas do CBL e a severidade da hérnia das crucíferas. Exceção pode ser verificada com o K, que apresentou sua concentração no solo reduzida com a incorporação do CBL. Esta redução do K pode ter beneficiado de alguma forma a supressão da doença pelo CBL, pois de acordo com Pryor (1940), houve uma redução de 60% do desenvolvimento da hérnia das crucíferas em cultivares susceptíveis, em meios de crescimento deficientes em K.

A redução da doença pelo CBL pode ser atribuída a mecanismos biológicos não claramente definidos, dentre os quais, o aumento da atividade da comunidade microbiana residente no solo, ou a introdução de uma nova comunidade ativa (Mazzola, 2004).

De acordo com Lazarovits (2001), o efeito supressivo e as reduções de danos causados por diversos patógenos se dão em razão dos muitos tipos de agentes de biocontrole que se desenvolve no interior do composto durante o processo de transformação da matéria orgânica, entre eles: *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Bacillus* e *Streptomyces*, todos relatados como agentes de controle biológico.

Os parâmetros químicos do solo foram avaliados antes do plantio e após a colheita das plantas para determinar se mudanças nas propriedades químicas do solo podem ser relacionadas à severidade da doença. Embora, a infecção por *P. brassicae* seja influenciada pelo boro (Sen, 2005), este micronutriente não foi avaliado no experimento. O pH do solo foi levemente mais alto em solos manejados organicamente. Resultado semelhante foi obtido por Clark *et al.*, (1998).

O solo adubado com fertilizante sintético apresentou maiores valores de Ca, Mg, P e K quando comparado ao solo suplementado organicamente. Mader *et al.*, (2002) reportaram baixos valores de N, P, e K no sistema orgânico quando comparados ao convencional. Apesar dos altos níveis de Ca e Mg encontrados em solos adubados com fertilizantes químicos estes macronutrientes não reduziram a severidade da doença, possivelmente por terem tido sua ação inibida pela concentração de Al+H, que foi alta neste tratamento.

A alta concentração de P observada em solos adubados com NPK pode estar relacionada com o baixo teor de matéria orgânica, pois esta diminui a fixação do P no solo e permite um maior aproveitamento pela planta do P oriundo da adubação fosfatada.

O fato do CBL diminuir o peso da hérnia fresca, e promover o menor valor de massa aérea fresca pode ser explicado em função da lenta liberação de nutrientes via mineralização desses materiais para as plantas. Os compostos orgânicos tiveram uma participação positiva no desenvolvimento do sistema radicular, o que favorece o estabelecimento das plantas ao longo do ano e aumenta o potencial de absorção de nutrientes e água do solo, fator importante para manutenção do vigor da planta (Linderman, 1989).

Os compostos orgânicos são basicamente constituídos por material de planta que são decompostos com certa dificuldade e com isso liberam os nutrientes para a solução do solo de forma lenta, apresentando assim, menor potencial de salinidade aos microrganismos do solo. Isto pode explicar o fato do CBL ter controlado a doença quando empregado isoladamente, mas quando aplicado juntamente com NPK ter perdido o seu efeito supressivo. Além disso, a incorporação de 20g de fertilizante químico formulado (10-10-10) junto com o composto orgânico líquido provavelmente desencadeou uma desestabilização da interação planta-patógeno, aumentando o número de plantas doentes.

Nos experimentos conduzidos em campo, observou-se que sob alta concentração de esporos, 10^8 esporos/ g de solo, nenhum dos compostos orgânicos estudados teve efeito sobre a severidade da doença. Este resultado corrobora o encontrado por Murakami *et al.*, (2009), no qual o efeito supressivo dos materiais orgânicos diminuiu quando a densidade de inóculo foi aumentada para 10^7 esporos/ g de solo.

Murakami *et al.*; (2000b) e Narisawa *et al.*, (2005) obtiveram resultados semelhantes entre si, em relação ao valor da concentração do patógeno no solo. No primeiro, os solos foram supressivos à hérnia das crucíferas quando a concentração de esporos de resistência foi de 10^4 até 10^5 , e nas concentrações acima de 10^6 o solo perdeu a supressividade, não diferindo estatisticamente do solo condutivo. No caso do segundo, o uso de *Heterconium chaetospora* (Grove) M.B.Ellis como agente de biocontrole foi efetivo contra a hérnia das crucíferas à densidade de até 10^5 esporos/ g de solo. Desta forma, uma fonte de inóculo com concentração de 10^8 esporos/ g de solo é muito alta para que somente com o uso de compostos orgânicos se obtenha bons resultados.

CONCLUSÕES

A combinação de dois compostos orgânicos, CBL+CBS, ao solo é uma estratégia viável para o controle da hérnia das crucíferas, em condições controladas.

Em campos com altas concentrações de inóculo de *P. brassicae*, a incorporação de compostos orgânicos não teve efeito na supressão da doença.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBASI, P.A.; LAZAROVITS, G. Effect of soil application of AG3 Phosphonate on the severity of clubroot of bok choy and cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1517-1522, 2006.

ABAWI, G.S. & WIDMER, T.L. Impact of soil health management practices on soil-borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 37-47, 2000.

CAMPBELL, R.N; GREATHEAD, A.S.; MYERS, D.F.; de BOER, G.J. Factors related to control of clubroot of crucifers in the Salinas Valley of California. **Phytopathology**, v. 75, p. 665-670, 1985.

CLARK, M.S.; HORWATH, W.R.; SHENNAN, C.; SCOW, K.M. Changes in soil chemical properties resulting from organic and low-input farming practices. **Agronomy Journal**, v. 90, p. 662-671, 1998.

DIXON, G.R The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. – a review of recent advances. **Acta Horticulturae**, v. 706, p. 271-282, 2006.

DRINKWATER, L.E.; LETOURNEAU, D.K.; WORKNEH, F.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; SHENNAN, C. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California. **Ecology Applied**, v. 5, p.1098-1112, 1995.

ESCUADRA, G.M.E.& AMEMIYA, Y. Suppression of Fusarium wilt of spinach with compost amendments. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 267-274, 2008.

FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. *Programas e Resumos...* São Carlos: UFScar. p. 235, 2000.

HOITINK, H.A.J.; FAHY, P.C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 93-113, 1986.

HOPKINS, D.W.; SHIEL, R.S. Size and activity of soil microbial communities in long-term experimental grassland plots treated with manure and inorganic fertilizers. **Biology and Fertility of Soils**, v. 22, p. 66-70, 1996.

GARBEVA P, van VEEN JA, van ELSAS JD. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review Phytopathology**, n. 42, p. 243-270, 2004.

GRUNWALD, N.J. HU, S.; van BRUGGEN, A.H.C. Short-term cover crop decomposition in organic and conventional soils: characterization of soil C, N, microbial and plant pathogen dynamics. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p. 37–50, 2000.

GUSTAFSSON, M. Why is it so difficult to breed clubroot resistant oilseed varieties?. **Vaextskyddsnotiser (Sweden)**, v. 61, n. 3, p. 92-99, 1997.

LAZAROVITS, G. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 23, p. 1-7, 2001.

LEE, S.O.; CHOI, G.J.; CHOI, Y.H.; JANG, K.S.; PARK, D.J.; KIM, C.J.; KIM, J.C. Isolation and characterization of endophytic Actinomycetes from chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1741-1746, 2008.

LINDERMAN, R.G. Organic amendments and soil-borne diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 180-183, 1989.

LIU, B.; GUMPERTZ, M.L.; HU, S.; RISTAINO, J.B. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 2302-2316, 2007.

MADER, P.; FLIEBBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, p. 1694–1697, 2002.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review. Phytopathology**, v. 42, p. 35-59, 2004.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; AKIMOTO, T; SHISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, p.584-589, 2000a.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; SHISHIDO, Y. Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p.1637–1642, 2000b.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; AKIMOTO, T; SHISHIDO, Y. Reduction of spore density of *Plasmodiophora brassicae* in soil by decoy plants. **Journal of General Plant Pathology**, v. 67, p. 85-88, 2001.

MURAKAMI, H.; KUROYANAGI, Y; TSUSHIMA, S.; SHISHIDO, Y. Effects of applications of organic materials on the development of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Microorganisms**, v. 63, n. 1, p. 3-8, p. 2009.

- NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S., HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285-290, 2005.
- NIWA, R.; KUMEI, T.; NOMBRA, Y.; YOSHIDA, S.; OSAKA, M.; EZAWA, T. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes supresión of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p.778-785, 2007.
- PARHAM, J.A.; DENG, S.P.; RAUN, W.R.; JOHNSON, G.V. Long-term cattle manure application in soil. Part I: effect on soil phosphorus levels and activities of enzymes involved in phosphorus transformations in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 328–337, 2002.
- PARHAM, J.A.; DENG, S.P.; RAUN, W.R. Long-term cattle manure application in soil. Part II: effect on soil microbial populations and community structure. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 209–215, 2003.
- PÉREZ-PIQUERES, A.; EDEL-HERMANN, V.; ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. Response of soil microbial communities to compost amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 460–470, 2006.
- PLAZA, C.; HERNANDEZ, D.; GARCIA-GIL, J.C.; POLO, A. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1577–1585, 2004.
- PRYOR, D.E. The effect of some mineral nutrients on the development of clubroot of brassicas. **Journal Agric. Research**, v. 61, p. 149-160, 1940.
- ROTENBERG, D.; WELLSA, A.J.; CHAPMANA, E.J.; WHITFIELD, A.E.; GOODMAN, R.M.; COOPER, L.R. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2936–2948, 2007.
- RIEGEL, C.; NOE, J.P. Chicken litter soil amendment effects on soilborne microbes and *Meloidogyne incognita* on cotton. **Plant Disease**, v. 84, p.1275–1281, 2000.
- SEN, P. Antagonistic of Ca, B and Mo on club-root disease of rape-mustard. **Indian-Agriculturist**, v. 49, n 1-2, p.13-16, 2005.
- SMITH, I. M.; DUNEZ, J.; LELLIOTT, D. H.; ARCHER, S. A. Plant diseases. Midsomer Norton, Avon, Great Britain. **Backwel Scientific Publications**, p. 243-245, 1988.
- SZCZECH, M.; RONDONAN´SKI, W.; BRZESKI, M.W.; SMOLIN´SKA, U.; KOTOWSKI, J.F. Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 10, p. 47–52, 1993.

TERMORSHUIZEN, A.J.; MOOLENAAR, S.W.; VEEKEN, A.H.M.; BLOK, W.J. The value of compost. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, v. 3, p. 343-347, 2004.

TILSTON, E.L.; PITT, D. GROENHOF, A.C. Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of old crops. **New Phytologist**, v. 154, p. 731-740, 2002.

TILSTON, E.L.; PITTA, D.; FULLER, M.P.; GROENHOF, A.C. Compost increases yield and decreases take-all severity in winter wheat. **Field Crops Research**, v. 94, n. 2-3, p. 176-188, 2005.

TOMITA, C.K. Manejo da matéria orgânica no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Dissertação de mestrado. Brasília – DF. 113 p. 2002.

TREMBLAY, N; BÉLECA, C.; COULOMBEB, J.; GODIN, C. Evaluation of calcium cyanamide and liming for control of clubroot disease in cauliflower. **Crop Protection**, v. 24, p. 798-803, 2005.

van BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M., In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, v 15, p.13-24, 2000.

VOORRIPS, R.E. Clubroot in the cole crops: the interaction between *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica oleracea*. - Thesis Wageningen - With ref. - With summary in Dutch, 1996.

WHIPPS, J., Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, 487-511, 2001.

YIN, B., VALINSKY, L., GAO, X.B., BECKER, J.O., BORNEMAN, J. Identification of fungal rDNA associated with soil suppressiveness against *Heterodera schachtii* using oligonucleotide fingerprinting. **Phytopathology**, v. 93, p. 1006-1013, 2003.

YOGEV, A.; RAVIV, M.; KRITZMAN, G.; HADAR, Y.; COHEN, R.; KIRSHNER, B.; KATAN, J. Suppression of bacterial canker of tomato by composts. **Crop Protection**, v. 28, p. 97-103, 2009.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DE PLANTIOS CONSECUTIVOS DE BRÓCOLIS NA SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS SOB SISTEMA CONVENCIONAL, INTEGRADO E ORGÂNICO

RESUMO

Experimentos em casa de vegetação foram conduzidos para examinar os efeitos em plantios consecutivos de fertilizantes orgânicos, sintético e suas combinações, na severidade da hérnia das crucíferas e nas propriedades químicas e biológicas dos solos sob sistema convencional, integrado e orgânico de produção. Tratamentos incluindo fertilizantes orgânicos (composto bioativo líquido – CBL e composto bioativo sólido – CBS) e fertilizante sintético foram aplicados aos três sistemas de produção. O histórico de produção afetou significativamente o índice da doença, que foi maior em solos sob o sistema convencional. Os solos sob sistema de produção orgânico e integrado responderam melhor aos efeitos supressivos dos compostos orgânicos. A hérnia das crucíferas foi significativamente influenciada por baixas temperaturas do ar, pois em plantios consecutivos, no período de julho a agosto, onde a temperatura média do ar foi de 15 °C, o peso da hérnia fresca foi menor. Mesmo em plantios sucessivos onde a fonte de inóculo tende a aumentar a cada novo plantio, os tratamentos CBL e CBL + CBS reduziram o peso da hérnia fresca ao final de quatro plantios consecutivos, em relação ao controle, nos três sistemas de produção. O conteúdo de matéria orgânica foi significativamente maior nos solos sob produção orgânica, do que nos solos cultivados sob produção convencional e integrada, não havendo diferenças entre os tipos de fertilizantes incorporados. A fumigação dos solos com posterior inoculação do patógeno aumentou significativamente o índice de doença.

Palavras-chave adicionais: Agricultura sustentável, controle biológico, fatores químicos e biológicos do solo, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INFLUENCE OF CONSECUTIVE PLANTING OF BROCCOLI IN THE SEVERITY OF THE CLUBROOT UNDER SYSTEM CONVENTIONAL, INTEGRATED AND ORGANIC

ABSTRACT

Experiments at greenhouse in the University of Brasilia – DF were conducted to evaluate the effects of consecutive planting cultivation with organic and synthetic fertilizers, and his combinations, in the severity of the clubroot and in the chemical and biological properties of soils under conventional, integrated and organic system of production. Treatments including organic fertilizers (Bioactive Solid Compost – CBS and Bioactive Liquid Compost - CBL) and synthetic fertilizer were applied to three production systems. The historical of production area affected significantly the index of the disease which was higher in soils under the conventional system. The soils under alternative and integrated production systems reacted better to the suppressive effects than organic compounds. The clubroot was significantly influenced by low air temperatures in which the period July to August reduced the weight of fresh gall because the mean air temperature was 15°C. Even in consecutive plantations where the source of inoculum tends to increase with each new planting, treatments CBL and CBL + CBS reduced the fresh weight of gall at the end of four consecutive crops compared to the control in three production systems. The content of organic matter was significantly higher in the soils under organic production, than in the soils cultivated under conventional and integrated production, having no differences between the types of incorporated manure. The fumigation of soil with subsequent inoculation of the pathogen significantly increased the index of disease.

Additional Keywords: Sustainable agriculture, biological control, soil chemical and biological proprieties, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INTRODUÇÃO

A contaminação do sistema água-solo-planta com pesticidas e fertilizantes, além da compactação do solo devido ao uso intensivo de maquinário e implementos e a falta de manejo da diversidade biológica do solo, são uns dos problemas causados pelo manejo convencional das culturas promovendo aumento da ocorrência de doenças (Conner *et al.*, 1996) e consequentemente o aumento das perdas de produção (Adee *et al.* 1994).

A implementação de sistemas produtivos integrados tem sido sugerido para minimizar estes problemas. O sistema de produção orgânica é definido, por Bettioli *et al.* (2002), como um sistema sustentável no tempo e no espaço devido ao manejo e proteção das fontes naturais, sem o uso de químicos, proporcionando o aumento da fertilidade e da diversidade biológica do solo. Cook *et al.* (1995), postulou que muitas espécies de plantas, cultivadas em solos manejados organicamente, têm desenvolvido estratégias de defesa a fitopatógenos de solo, que envolve um estímulo seletivo capaz de manter uma comunidade de microorganismos antagônicos rizosféricos, suprimindo a incidência e a severidade da doença.

Alguns autores têm encontrado evidências de que doenças de raízes são geralmente menos severas em solos manejados organicamente do que convencionalmente (Workneh, 1993; van Bruggen, 1995). Em uma extensiva revisão, sobre 40 características do solo (bióticas e abióticas) e suas correlações positivas, negativas e a não correlação com a supressividade dos solos, a doenças tem sido sumarizadas por Janvier *et al.*, 2007. Em muitos casos, uma característica do solo pode estar correlacionada positiva ou negativamente com a supressividade, dependendo do patógeno e do agroecossistema envolvido (Postma *et al.*, 2008). O entendimento da influência do

manejo agrícola nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo é imperativo para o estudo da supressão de doenças.

O sistema agrícola convencional se caracteriza pelo controle sistemático de pragas e doenças mediante uso de agrotóxicos, o que implica em efeitos nocivos à biologia do solo, ao equilíbrio nutricional das plantas e ao controle biológico natural (Claro, 2001). A agricultura orgânica tem como base principalmente a recuperação e conservação do solo, métodos naturais de controle de pragas e doenças, cultivo mínimo, manejo de ervas daninhas, cobertura morta e rotação de culturas (Paschoal, 1994).

Já o sistema integrado de produção tem sido desenvolvido com alternativas menos rigorosas do que a produção orgânica. Neste sistema, a rotação de cultura tem um maior período de duração em relação a produção convencional, o uso de pesticidas e fertilizantes é minimizado, e o uso de compostos orgânicos e agentes de controle biológico é recomendado (Ariena e Bruggen *et al.*, 1995).

As práticas agrícolas convencionais causam significativos distúrbios e contaminação no solo e concomitantemente perdas na biodiversidade (Abawi e Widmer, 2000; Bailey e Lazarivits, 2003; Krupinsky *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2000). Entretanto, práticas agrícolas sustentáveis que aumentem a diversidade e fertilidade do solo, incluem: rotação de cultura, plantio direto e adição de compostos orgânicos (Knudsen, *et al.*, 1999; Mader *et al.*, 2002). Em geral, estas práticas são mais frequentes em sistemas orgânicos que convencionais (Bengtsson *et al.*, 2005).

A adição de compostos orgânicos ao solo favorece o desenvolvimento da planta e promove a qualidade do solo, bem como suprime doenças causadas principalmente por patógenos de solo (Abawi e Widmer 2000; Bailey e Lazarovits 2003; Cotxarrera *et al.*, 2002; Erhart *et al.*,

1999; Huber e Watson 1970). Os compostos orgânicos mantêm e aumentam a produtividade e fertilidade dos solos agricultáveis, permitindo o uso sustentável da terra.

Dentre estes benefícios, a supressividade a patógenos de solo é um dos mais importantes. Estudos têm sido realizados com vários tipos de compostos suprimindo uma ampla gama de patógenos de solo (Hunter *et al.*, 2006; Reuveni *et al.*, 2002; Schonfeld *et al.*, 2003; Serra-Wittling *et al.*, 1996; Termorshuizen *et al.*, 2004; Yogev *et al.*, 2006).

Efeitos positivos do uso de compostos orgânicos na redução da hérnia das crucíferas têm sido reportados (Szczech *et al.*, 1993; Tilston *et al.*, 2002). A incorporação de compostos orgânicos ao solo suprimiu a murcha de fusarium em espinafre (*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*)(Escuadra e Amemiya, 2008), o cancro bacteriano do tomateiro (*Clavibacter michiganensis* subsp.*michiganensis* (Yogev *et al.*, 2009), e doenças radiculares do feijão (Rotenberg *et al.*, 2007).

Os estudos foram realizados com a hérnia das crucíferas, causada pelo parasita obrigatório *Plasmodiophora brassicae* Woronin, que é a principal doença da família Brassicaceae. Causa grandes perdas na produção, se não for devidamente controlada. O patógeno produz galhas nas raízes das plantas infectadas, que interferem na translocação de água e nutrientes, ocorrendo posterior amarelecimento das folhas, murcha claramente visível no período mais quente do dia e enfezamento da planta (Voorrips, 1996).

O controle da doença com o uso de brometo de metila foi proibido a partir do século XXI, em função de seus efeitos tóxicos ocasionados à saúde humana e ao meio ambiente. Desta forma, o emprego de outras medidas de controle integradas se faz necessário para que se tenha um sistema de produção que atenda aos consumidores mais exigentes, com o mínimo de poluição ambiental, protegendo o solo da degradação e recuperando sua qualidade e sustentabilidade.

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da adição de fertilizantes orgânicos em plantios consecutivos de brócolis, sob sistemas com histórico de produção convencional, orgânica e integrada, visando ao controle da hérnia das crucíferas.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de esporos de resistência e inoculação de *P. brassicae*

Os esporos de resistência de *P. brassicae* foram obtidos de hérnias presentes nas raízes de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) coletadas em campo de produção comercial localizado no Núcleo Rural de Brazlândia - DF.

As hérnias foram lavadas, destacadas e trituradas no liquidificador por 3 min, com 100 ml de água destilada e esterilizada. A suspensão foi filtrada e centrifugada a 3.000 g por 10 min. O sedimento foi ressuspenso em água destilada, e centrifugado três vezes. A suspensão de esporos de resistência foi diluída a 1×10^7 esporos/ml e quantificada em Câmara de Neubauer. A inoculação foi feita adicionando 50 mL da suspensão de esporos de resistência, três dias após o transplante, na base de cada planta cultivada de brócolis em solos sob sistema convencional, integrado e orgânico de produção, em vasos.

Determinação do número de esporos de resistência de *P. brassicae* do solo

Como o solo sob sistema de produção integrada estava naturalmente infestado por *P. brassicae* foi necessário quantificar a densidade de esporos de resistência do solo, a qual foi determinada pela modificação do método de Murakami *et al.*, (2000a).

Amostras de 1 g de solo, randomicamente coletadas de cada bloco experimental, foram suspensas em 80 mL de água deionizada e agitadas vigorosamente por 5 min. O pH da suspensão foi ajustado para 10 com 1 M NaOH e a solução foi agitada novamente por 5 min. Então, o pH da solução foi reajustado para 9 com 1 M NaOH e a solução foi agitada por 1 min, peneirada e centrifugada a 900 x g por 10 min a temperatura ambiente.

O resíduo foi lavado com água deionizada e centrifugado três vezes e suspenso em água deionizada em um volume final de 50 mL. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi misturada com um volume igual de 200 µg mL⁻¹ de azul de bromofenol. A concentração de esporos de resistência encontrada no solo foi de 10⁴ esporos/ g de solo, a qual foi quantificada com o auxílio da Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico.

Características dos solos

Os experimentos foram conduzidos em três solos com histórico de produção orgânica, convencional e integrada. O solo do sistema de produção orgânica (SO) foi coletado de áreas da Associação Mokiti Okada – Brazlândia-DF, com dez anos de manejo sob sistema de agricultura natural, rotação de cultura e uso de compostos orgânicos para garantir a produtividade e controle das doenças. Neste solo foi depositada a suspensão de 10⁷ esporos de resistência/ g de solo, já que o mesmo estava isento de *P. brassicae*.

O solo manejado convencionalmente (SC) foi adquirido da Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília com no mínimo 20 anos de uso de fertilizantes sintéticos, pesticidas e fumigantes. Neste solo também foi depositada a suspensão de 10⁷ esporos de resistência/ g de solo.

O solo do sistema de produção integrada (SI) foi coletado de um cultivo comercial de brócolis, localizado no Núcleo Rural de Brazlândia no Distrito Federal, naturalmente infestado

com *P. brassicae*, com no mínimo cinco anos de monocultura, uso de pesticidas, e fertilizantes sintéticos e orgânicos. A concentração de esporos de resistência no solo foi de 10^4 esporos/ g de solo. As características dos solos, os compostos orgânicos utilizados e o sistema de manejo empregado estão mostrados na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 - Localização, sistema de produção e práticas culturais adotadas nos locais em que foram coletados os solos para os experimentos.

Características	SISTEMAS DE PRODUÇÃO		
	SO	SC	SI
Localização	Associação Mokiti Okada (MOA) – Brazlândia - DF	Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília	Núcleo Rural de Brazlândia – DF
Sistema de produção	Orgânico	Convencional	Integrado
Anos de cultivo	10	30	5
Rotação de cultura	Sim	Sim	Monocultura
Pesticidas	Não	Sim	Sim
Fumigantes	Não	Brometo de Metila	Não
Adubação	Compostos orgânicos adubação verde, cobertura morta.	NPK, uréia e sulfato de amônia	Cama de frango, CBS e NPK
Correção do solo	Sim	Sim	Sim
Infestação do solo com o <i>P. brassicae</i>	Artificialmente infestado: 10^7 esporos/g de solo	Artificialmente infestado: 10^7 esporos/g de solo	Naturalmente infestado: 10^4 esporos/g de solo

SO – Solo sob Sistema Orgânico; SC – Solo sob Sistema Convencional e SI – Solo sob Sistema Integrado.

Parâmetros biológicos do solo

O envolvimento da biota do solo na supressão da doença foi investigado usando solos fumigados com brometo de metila. Metade das amostras dos solos sob SI e SO foram colocados separadamente em sacos de plástico com capacidade de 50 L, e fumigados com 2 mL de brometo de metila para cada saco, fechado hermeticamente. Após um período de 10 dias, foi realizada uma segunda fumigação, novamente com 2 mL do gás, para se obter esterilização mais efetiva dos compostos orgânicos. Os sacos foram abertos somente no momento da montagem do experimento. Após a fumigação dos solos foi adicionada a suspensão de 1×10^7 esporos/ ml.

Parâmetros químicos e granulométricos dos solos

A coleta dos solos de cada tratamento nos três sistemas de produção foi realizada a 20 cm de profundidade, e as amostras armazenadas em sacolas plásticas, estocadas a 4 °C, e submetidas à análise química e granulométrica (Tabela 2.2), antes da aplicação dos compostos e ao final do experimento, ou seja, após a colheita das plantas.

As análises químicas incluíram: capacidade de troca catiônica (CTC), saturação de bases (V%), saturação de alumínio, pH do solo, matéria orgânica, macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Zn), e as análises granulométricas incluíram o percentual de areia, limo e argila.

TABELA 2.2 - Características químico-orgânicas dos solos utilizados nos experimentos.

Características Químicas	Sistemas de produção		
	SO	SC	SI
pH (CaCl ₂)	5,4	4,6	4,8
Al (cmol/dm ³)	0,0	0,1	0,1
H+Al (cmol/dm ³)	3,1	5,8	5,6
Ca (cmol/dm ³)	4,1	4,2	3,0
Ca+Mg (cmol/dm ³)	6,1	4,8	3,7
K (g/dm ³)	115	89	101
P (g/dm ³)	31,7	255	112
Zn (mg/dm ³)	2,3	17	15,9
CTC	9,49	10,83	9,56
Sat. Bases (%)	67,33	46,45	41,42
Sat. Al (%)	0,0	1,95	2,46
Mat .Org. (g/dm ³)	51	31	51
Areia (%)	45	49	50
Limo (%)	11	10	10
Argila (%)	44	41	40

SO – Solo sob Sistema Orgânico; SC – Solo sob Sistema Convencional e SI – Solo sob Sistema Integrado.

Desenho experimental

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Estação Biológica da Universidade de Brasília - DF, em três solos com histórico de produção orgânica, convencional e

integrada, no período entre janeiro a dezembro de 2007, em quatro plantios consecutivos, com a seguinte disposição: O primeiro experimento foi realizado no período de janeiro a fevereiro, o segundo entre abril e maio, o terceiro entre julho a agosto e o quarto nos meses de outubro a novembro.

Durante o período dos experimentos a temperatura média do ar variou entre 15 a 27,5 °C. As coletas dos solos foram efetuadas durante o mês de dezembro de 2006, sendo que de cada local foram removidas, aleatoriamente, 36 sub-amostras de 10 kg de solo a uma profundidade de 0-20 cm, totalizando 360 kg de solo/ área. Todas as sub-amostras foram misturadas e colocadas em vasos de 2 kg de capacidade.

As mudas de brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) foram produzidas em bandeja de isopor de 120 células contendo substrato inerte. Com aproximadamente 20 dias foi transplantada, uma planta por vaso com capacidade para 2 kg de solo (unidade experimental).

Os tratamentos consistiram de: 1) 200 g de composto bioativo sólido – CBS; 2) 200 mL de composto bioativo líquido – CBL; 3) 100 mL de CBL + 20 g de NPK; 4) 100 mL de CBL + 100 g de CBS e 5) 40 g de NPK 10-10-10 (controle), haja vista ser este o fertilizante convencionalmente utilizado. Os tratamentos foram aplicados nos solos procedentes dos três sistemas de produção a cada plantio consecutivo.

Os compostos foram incorporados ao solo, dois dias antes do transplântio, com exceção do CBL que foi adicionado na base de cada planta, dois dias após o transplântio. A composição e as análises químicas e granulométricas dos compostos orgânicos utilizados estão presentes respectivamente, nas tabelas 1.1 e 1.2, do capítulo I.

O delineamento experimental estabelecido foi o fatorial 5 x 5, em blocos casualizados com 5 repetições contendo 5 vasos com uma planta cada (unidades experimentais). Os cinco

tratamentos foram representados pelas amostras de solos dos três diferentes sistemas de produção (SC, SO e SI) e mais amostras de solo orgânico e integrado com aplicação de brometo de metila (SOBr e SIBr), e cinco subtratamentos representados pela incorporação ou não de compostos orgânicos (CBL, CBS, CBL + CBS, CBL + NPK e NPK). Este experimento foi repetido mais uma vez para confirmar os resultados e as tendências.

Os sintomas da doença foram avaliados usando a escala de severidade adotada por Abbasi *et al.*, (2006) com modificações, classificada dentro das categorias 0 – 4 onde 0 = 0% (sem hérnia); 1 = até 25% (hérnias levemente inchadas); 2 = 26 a 50% (hérnias moderadamente inchadas); 3 = 50 a 75% (hérnias severamente inchadas) e 4 = 100% (hérnias severamente inchadas nas raízes laterais e principal) das raízes cobertas por hérnias. (Figura 1.1, capítulo I). O número de plantas na classe 1 foi multiplicado por 10, na classe 2 por 30, na classe 3 por 60, na classe 4 por 100 e a soma foi dividida pelo número total de plantas para obter o ID, previamente reportado por Narisawa *et al.*, (2005).

Variáveis analisadas

Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram cortadas ao nível do solo e as raízes foram cuidadosamente lavadas e depois as hérnias destacadas. As raízes, hérnias e o material foliar foram pesados para a determinação do peso fresco e colocados em saco de papel, separadamente, para perder a umidade, depois levados para estufa a 65 °C, por 72 h para a determinação do peso seco. A incidência da doença foi determinada por meio da observação visual quanto à presença ou ausência de galhas nas raízes das plantas.

Análises estatísticas

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o programa Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000). Os valores médios de peso seco da massa aérea e da hérnia, e os índices da doença foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Supressividade da doença

Observou-se que o índice da doença foi maior em solos cultivados sob sistema de produção convencional (53,2), diferindo estatisticamente do solo sob sistema orgânico (28,8) e integrado (18) que reduziram em 45,87% e 66,16%, respectivamente, o índice da doença quando comparado ao convencional (Figura 2.1).

A concentração de esporos de resistência encontrada nos solos sob sistema integrado foi 10^4 esporos/ g de solo e a inoculada nos solos orgânicos e convencionais 10^7 esporos/ g de solo. Desta forma, ressalta-se que mesmo o solo orgânico possuindo uma concentração de esporos 10.000 vezes maior que o solo sob sistema de produção integrada, não houve diferença estatística do índice da doença entre estes dois sistemas (Figura 2.1).

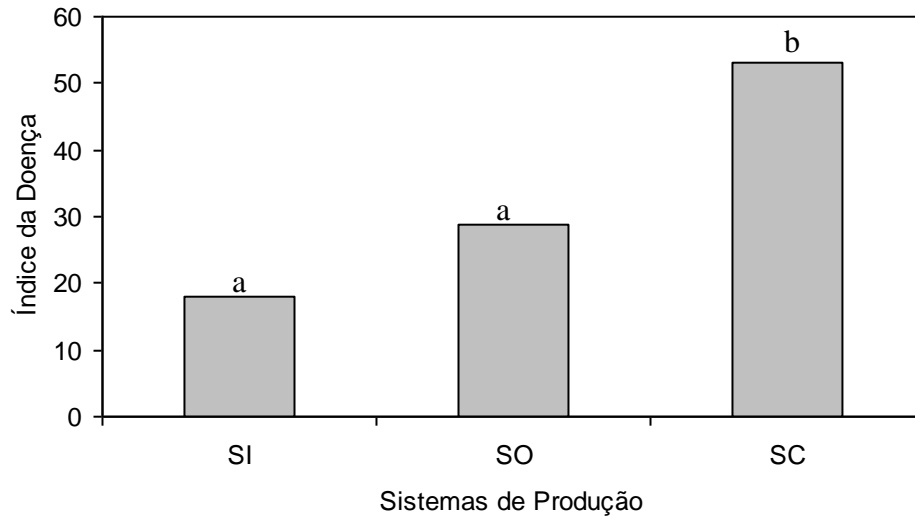


FIGURA 2.1 - Efeito dos sistemas de produção (SI – Sistema integrado; SO – Sistema orgânico; SC – Sistema convencional) no índice da hérnia das crucíferas em brócolis cultivados em casa de vegetação. Mesma letra significa que os índices não diferem ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Embora os compostos orgânicos não tenham diferido significativamente entre si na supressividade contra a hérnia das crucíferas, os solos incorporados com fertilizantes sintéticos desenvolveram mais doença, enquanto a severidade foi menor ou suprimida nos solos suplementados com compostos orgânicos, nos três diferentes tipos de manejos estudados (Figura 2.2).

Os solos sob sistema de produção orgânico (Figura 2.2A) e integrado (Figura 2.2C) responderam melhor aos efeitos supressivos dos compostos orgânicos incorporados, os quais reduziram os índices de doença para valores abaixo de 10. Enquanto, no solo manejado convencionalmente, os compostos orgânicos produziram índices que variaram entre 30 e 40 (Figura 2.2B).

No solo convencional, o índice da doença para os compostos orgânicos CBL, CBS e CBL + CBS foi de 28, 30 e 40 reduzindo a severidade da hérnia das crucíferas em 63%, 60% e 47% respectivamente, quando comparado ao NPK (76). Quando os mesmos compostos orgânicos, CBL, CBL + CBS e CBS foram incorporados em solos sob produção integrada, os índices de doença foram 4, 6 e 10 e na produção orgânica foram 10, 8 e 8, respectivamente, evidenciando uma redução na severidade da doença de 90%, 75% e 85%, respectivamente, para produção integrada, e 83%, 87% e 87%, respectivamente, para a produção orgânica, quando comparada ao NPK.

Até mesmo os fertilizantes químicos produziram menores valores de índice de doença em solos orgânicos quando comparados ao manejo convencional. O controle e o CBL + NPK incorporados ao solo orgânico produziram índices de 60 e 58, respectivamente, e quando a mesma dosagem destes tratamentos foi incorporada ao solo convencional, produziram índices de 76 e 92, respectivamente, aumentando o índice da doença em 26,67% para o controle 58,62% para o CBL + NPK (Figura 2.2), em função do sistema de cultivo adotado. Os resultados mostram que o solo originário de sistema de produção orgânico apresentou tendência a conter a evolução da hérnia das crucíferas em brócolis, em todos os tratamentos.

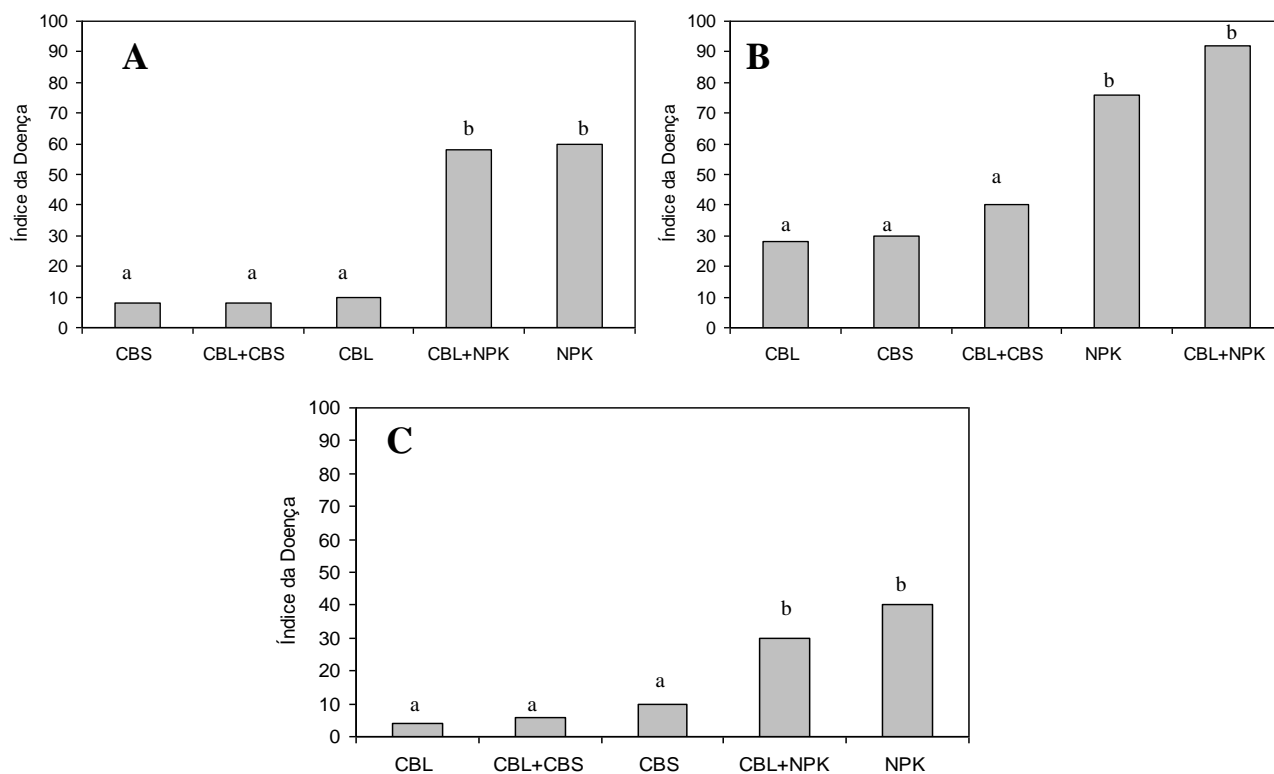


FIGURA 2.2 - Efeito dos compostos orgânicos no índice da hérnia das crucíferas incorporados ao solo sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em brócolis cultivados em casa de vegetação. CBL – Composto Bioativo Líquido e CBS – Composto Bioativo Líquido. Valores das médias seguidos da mesma letra em cada sistema de produção não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott .

Propriedades bióticas do solo na supressividade da doença

Foi investigado o envolvimento da biota do solo na supressão da hérnia das crucíferas nos solos orgânico, convencional e integrado. A infecção das raízes ocorreu em todos os solos brometados ou não brometados (controle), entretanto o índice da doença foi significativamente maior nos solos fumigados com brometo do que no controle (Figura 2.3).

Os solos sob SI e SO produziram baixo índice da doença, 18 e 28,8, respectivamente, mas após a fumigação e posterior infestação do patógeno no solo este índice aumentou para 80 e 64, respectivamente. Portanto, há uma grande expectativa de que a redução do índice da doença em brócolis por meio de compostos orgânicos seja devida à existência do fator biótico atuando na matéria orgânica para o controle da hérnia das crucíferas. Não houve controle para o solo sob sistema de produção convencional, pois antes de cada início de plantio é rotina a aplicação do brometo para a fumigação do solo.

Este resultado valida o obtido na figura 2.2 onde em função da baixa densidade de esporos encontrada no solo integrado este produziu índice de doença menor que o solo orgânico. Pois quando os mesmos solos são comparados na mesma densidade de inóculo, 10^7 esporos/ g de solo, o solo integrado elevou significativamente o índice da doença em relação ao orgânico.

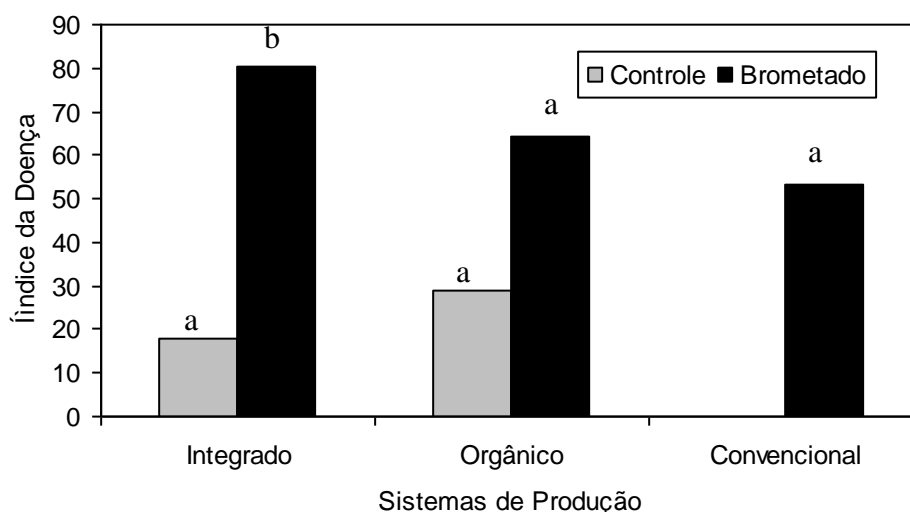


FIGURA 2.3 - Efeito da fumigação do solo no índice da hérnia das crucíferas. O solo controle não foi fumigado. Valores das médias seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Plantios consecutivos na severidade da doença sob diferentes sistemas de produção

A figura 2.4 mostra o peso da hérnia fresca ao longo de quatro plantios consecutivos de brócolis, realizados em condições controladas de janeiro a outubro de 2007. Foi evidenciado que no terceiro plantio realizado em julho houve menor produção de hérnia fresca para todos os adubos e sistemas de produção avaliados em função da redução da temperatura do ar que atingiu a média de 15 °C, neste período.

Nos três sistemas de produção analisados, os tratamentos com os compostos orgânicos, CBL, CBS e CBL + CBS, tenderam a produzir menores valores de peso de hérnia fresca em comparação ao controle, desde o 1º plantio até o final de quatro plantios sucessivos, com exceção

do 3º plantio realizado no período de julho, onde o controle foi drasticamente afetado pela redução da temperatura, não produzindo hérnia fresca em nenhum dos três sistemas de manejos (Figura 2.4).

No solo orgânico os tratamentos, CBL, CBS e CBL + CBS mantiveram reduzido o peso da hérnia fresca ao longo dos plantios sucessivos, contudo o CBS tendeu a aumentar o peso desta variável ao final do quarto plantio. O CBL + NPK aumentou abruptamente o peso da hérnia fresca no segundo plantio, reduzindo o peso desta variável nos plantios posteriores.

O controle manteve constante o peso da hérnia fresca, e sempre superior ao dos compostos orgânicos, ao longo dos plantios consecutivos, não sendo possível observar o efeito acumulativo deste tratamento na severidade da doença em solos sob sistema de produção orgânica (Fig.2.4A).

Nos solos sob manejo convencional, o CBL produziu 1,1; 0,19 e 0,65g de hérnia fresca no 2º, 3º e 4º plantios sucessivos, reduzindo em 33%, 88% e 61% o peso desta variável, respectivamente, em relação ao 1º plantio (Figura 2.4B). O tratamento CBL + NPK tendeu a reduzir o peso da hérnia fresca a cada plantio realizado. O CBL + CBS reduziu o peso da hérnia fresca ao longo dos plantios sucessivos, entretanto, aumentou o peso desta variável após o quarto plantio, enquanto, o CBS tendeu a manter constante o peso da hérnia fresca em plantios sucessivos (Figura 2.4B).

Nos solos sob manejo integrado de produção foi mais evidente a manutenção do controle da hérnia das crucíferas pelos compostos orgânicos, embora, não tenha sido verificado um efeito acumulativo, isto porque, os valores de peso de hérnia fresca alcançados na primeira aplicação já foram reduzidos. O controle produziu maiores valores de peso de hérnia fresca os quais foram

crecentes a cada plantio sucessivo 2,8; 3,6 e 5,3g, respectivamente, com exceção do 3º plantio. (Figura 2.4C).

No 1º, 2º e 4º plantios consecutivos o CBL + CBS reduziu o peso da hérnia fresca nos solos orgânicos em 69%, 33% e 41% respectivamente, nos solos convencionais em 48%, 97% e 29% respectivamente, e nos solos sob sistema de produção integrada em 91%, 91% e 89% respectivamente, quando comparados ao controle.

Todos os tratamentos com compostos orgânicos e NPK também foram adicionados nos solos orgânicos e integrados após a fumigação com brometo de metila, em plantios consecutivos, e o peso da hérnia fresca foi muito superior (dados não mostrados).

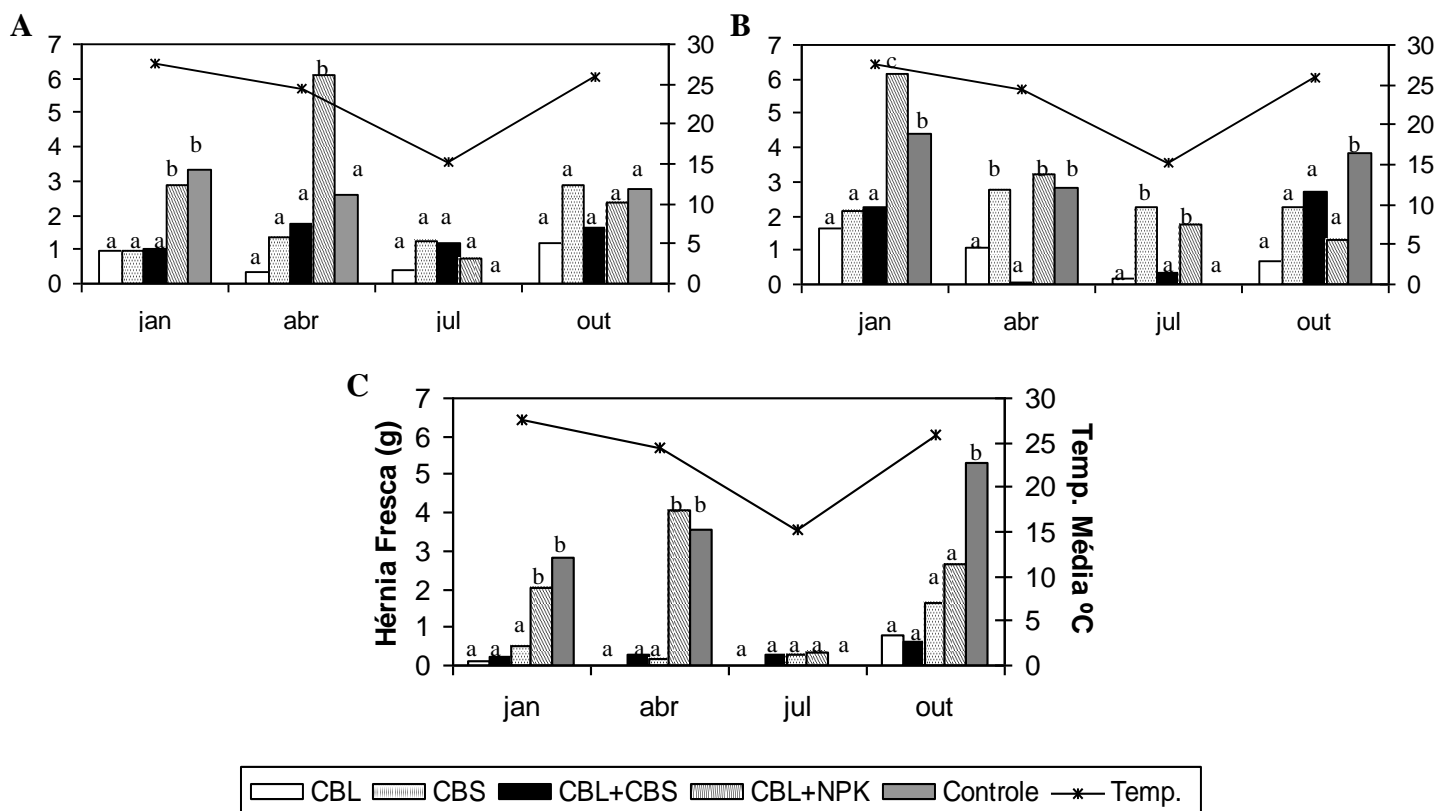


FIGURA 2.4 – Efeito dos compostos orgânicos no peso da hérnia fresca incorporados em plantios consecutivos de brócolis sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em condições controladas. Valores das médias seguidos da mesma letra, dentro de cada mês, não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

A figura 2.5 mostra o peso da matéria fresca ao longo dos plantios sucessivos nos três sistemas de produção estudados. Foi demonstrado que houve maior produção de matéria fresca no sistema de produção integrado, possivelmente em função da reduzida densidade de inóculo presente neste solo, quando comparado aos demais sistemas (Figura 2.5C).

Embora, o CBL tenha mantido reduzido o peso da hérnia fresca nos três sistemas de produção estudados, este tratamento não aumentou o peso da matéria fresca, mesmo aplicado

sucessivamente. Já o CBS aumentou ou manteve elevado o peso da matéria fresca ao longo de plantios sucessivos, na maioria das vezes, não mostrando diferenças significativas em relação ao controle.

A combinação CBL + CBS mostrou ser uma estratégia viável no controle da doença em plantios sucessivos, reduzindo ou mantendo reduzido o peso da hérnia fresca e proporcionando elevados valores de matéria fresca ao longo de quatro plantios consecutivos (Figura 2.5).

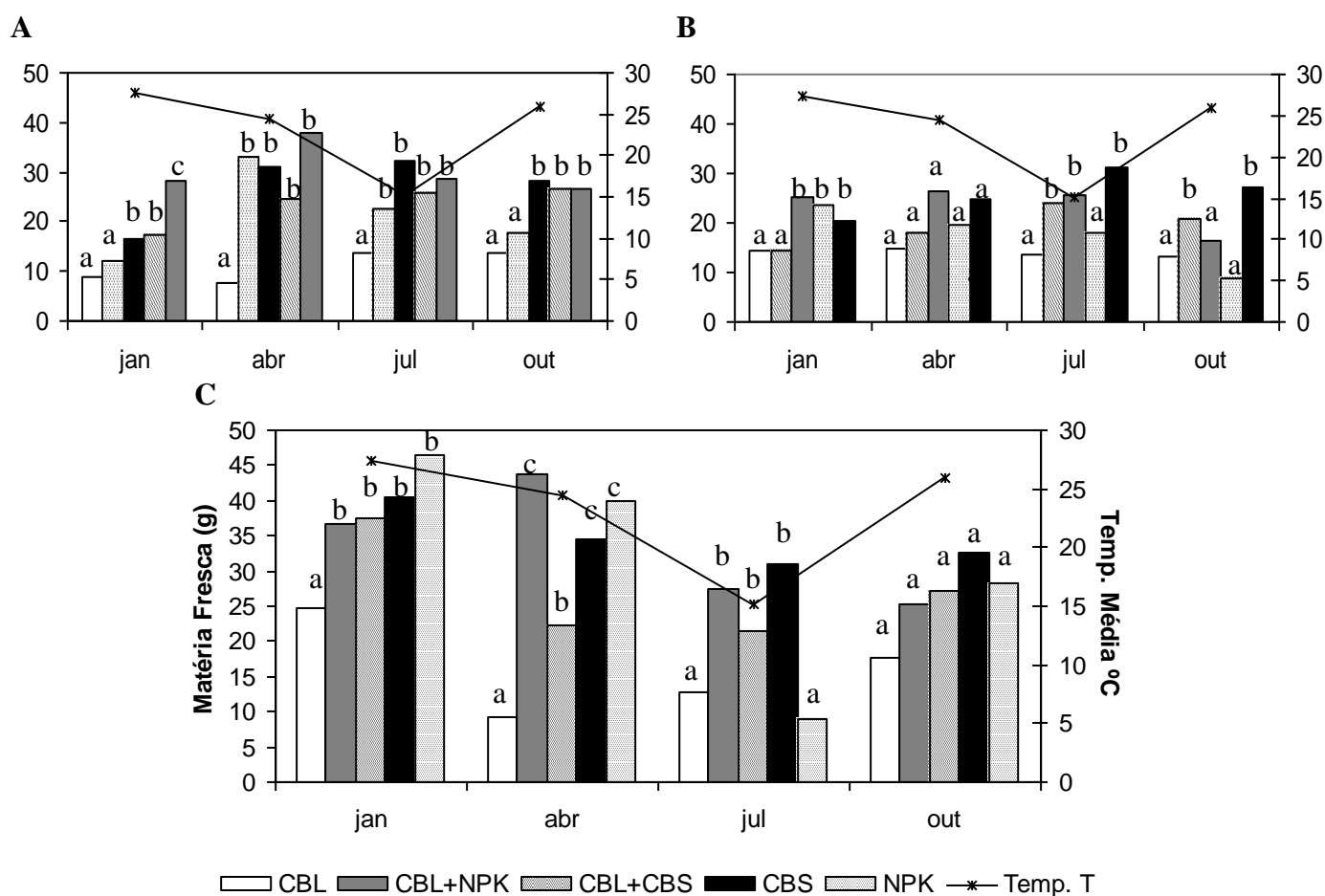


FIGURA 2.5 – Efeito dos compostos orgânicos no peso da matéria fresca incorporados em plantios consecutivos de brócolis sob diferentes tipos de manejo (A – Sistema orgânico; B – Sistema convencional; C – Sistema integrado), em casa de vegetação. Valores das médias seguidos da mesma letra, dentro de cada mês, não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Propriedades químicas dos solos

Na tabela 2.2 estão apresentadas as características químicas das amostras de solos coletadas de campos de produção orgânica, integrada e convencional, antes da aplicação dos compostos orgânicos. As diferenças apresentadas entre os sistemas de manejo refletiram em maior concentração de P nos solos convencionais mostrando as diferenças de quantidades de adubos minerais historicamente aplicados neste tipo de manejo.

A saturação de bases foi maior em solos orgânicos. Apesar das diferenças apresentadas entre os sistemas de manejo, os solos foram em geral ácidos, com o solo orgânico mais próximo da neutralidade. Com relação à análise granulométrica, os solos apresentaram valores similares quanto ao percentual de areia, limo e argila.

As características químicas, orgânicas e granulométricas dos solos sob diferentes sistemas de produção, após a incorporação de compostos orgânicos e colheita das plantas estão presentes na tabela 2.3. Alguns fatores químicos foram afetados pelo tipo de manejo e fertilizantes utilizados.

Antes da aplicação dos tratamentos, o solo sob sistema de produção convencional, que mostrou efeitos negativos na supressão da doença, apresentou baixo conteúdo de matéria orgânica quando comparado aos solos sob cultivo orgânico e integrado (Tabela 2.2). Ao final dos plantios consecutivos, o conteúdo de matéria orgânica foi significativamente maior nos solos sob produção orgânica, do que nos solos cultivados sob produção convencional e integrada, independente do tipo de fertilizantes incorporados (Tabela 2.3).

O pH não foi influenciado pelo tipo de sistema de produção e sim pelo tipo de fertilizante incorporado, pois os solos tratados com compostos orgânicos apresentaram maiores valores de

pH quando comparados com os sintéticos, nos três sistemas de produção estudados. A concentração de Ca + Mg foi maior nos solos tratados com NPK seguido pelo CBS e menor nos solos tratados com CBL para os três tipos de manejo.

Os valores de fósforo e zinco foram fortemente influenciados pelo tipo de fertilizante incorporado ao solo, sendo maiores no NPK e CBL + NPK, e menores no tratamento com o CBL, não havendo interferência do tipo de sistema de produção adotado. O alumínio só foi encontrado em solos com a incorporação de NPK. Os valores de CTC foram maiores com a incorporação de NPK para os três sistemas de produção estudados. O potássio teve sua concentração aumentada com a incorporação do CBS, e diminuída com o CBL.

De acordo com as análises granulométricas do solo, observa-se que após a aplicação dos tratamentos, os solos dos três sistemas de produção estudados tenderam a tornarem-se arenosos sendo que os de produção orgânica apresentaram um percentual levemente maior de areia do que o solo convencional, provavelmente pela melhora da estrutura do solo proporcionada pela matéria orgânica incorporada..

TABELA 2.3 - Propriedades químicas e físicas dos solos após quatro aplicações consecutivas de fertilizantes mineral e orgânicos.

Características	SOLO ORGÁNICO					SOLO CONVENCIONAL					SOLO INTEGRADO				
	CBL	CBS	CBL + CBS	CBL + NPK	NPK	CBL	CBS	CBL + CBS	CBL + NPK	NPK	CBL	CBS	CBL+ CBS	CBL + NPK	NPK
pH (CaCl ₂)	5,2	5,7	5,7	4,6	4,8	5,2	5,8	5,8	4,4	4,6	5,0	5,8	5,8	4,6	4,5
Al (cmol/dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
H+Al (cmol/dm ³)	3,0	2,3	2,7	6,1	4,5	3,1	2,2	2,0	6,0	6,4	3,5	2,2	2,2	5,5	7,5
Ca (cmol/dm ³)	4,7	6,4	6,4	5,3	7,1	3,7	6,3	5,3	3,3	11,7	5,0	6,2	6,2	4,5	9,3
Ca+Mg (cmol/dm ³)	5,8	8,2	8,0	5,6	7,4	4,2	8,2	6,5	3,4	11,9	5,4	7,9	7,7	4,6	9,5
K (mg/dm ³)	59	142	132	105	155	43	134	115	87	155	35	115	117	63	115
P (mg/dm ³)	70	500	364	1000	1720	110	364	385	1030	1540	230	364	344	880	1420
Zn (mg/dm ³)	8,5	12,5	11,5	39,3	91,0	9,9	11,8	17,8	41,3	126,0	24,7	28,2	22,0	58,0	75,0
CTC	8,95	10,86	11,04	11,97	12,30	7,41	10,74	8,79	9,62	18,70	8,99	10,39	10,20	10,26	17,29
V (%)	66,48	78,82	75,54	49,04	63,41	58,16	79,52	77,25	37,63	65,78	61,07	78,83	78,43	46,39	56,62
Sat. Al (%)	0,00	0,00	0,00	3,29	1,27	0,00	0,00	0,00	7,65	4,03	0,00	0,00	0,00	4,03	2,00
Mat .Org. (%)	6,1	6,5	6,3	7,3	6,5	3,5	3,5	4,6	2,4	2,2	3,0	3,0	2,9	2,9	3,0
TEXTURA															
Areia (%)	59	63	63	64	63	42	59	62	45	57	59	62	62	59	63
Limo (%)	9	8	8	8	8	11	9	8	11	9	9	8	8	9	8
Argila (%)	32	29	29	28	29	47	32	30	44	34	32	30	30	32	29

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o sistema de produção adotado influenciou o índice da hérnia das crucíferas. De fato, o solo sob manejo orgânico, reduziu significativamente o índice da doença quando comparado com o solo manejado de forma convencional, pois os solos enriquecidos tradicionalmente com matéria orgânica possivelmente já teriam uma maior diversidade microbiana.

Este resultado corrobora os encontrados por van Bruggen e Termorshuizen (2003) onde as doenças de raízes causadas por fungos foram suprimidas em solos sob produção orgânica. Workneh *et al.*, (1993) obtiveram resultados semelhantes quando estudaram os sistemas de produção orgânico e convencional de tomate no Central Valley, Califórnia, e observaram que a doença podridão corticosa da raiz, causada por *Pyrenochaeta lycopersici*, foi menos prevalente na produção orgânica do que na convencional.

Ao comparar os efeitos do sistema orgânico e integrado no índice da doença foi possível observar que o sistema orgânico consiste em uma excelente alternativa de controle da hérnia das crucíferas, pois mesmo sob alta densidade de inóculo, 10^7 esporos/ g de solo, as amostras de solos do sistema de cultivo natural de hortaliças, manejadas intensivamente por mais de 10 anos, de acordo com o sistema produtivo de agricultura natural, reduziram significativamente o índice da doença, não diferindo estatisticamente das amostras de solo sob manejo integrado com baixa densidade de inóculo, 10^4 esporos/ g de solo.

Estes resultados demonstram a estabilidade no controle da doença demonstrando tendência deste solo em reter o desenvolvimento da hérnia das crucíferas, em comparação com os outros sistemas de produção. Da mesma forma, a incorporação da matéria orgânica natural ao

solo pode conter o desenvolvimento da doença, tornando evidente o potencial do manejo da biologia do solo e uso da matéria orgânica em sistemas produtivos de hortaliças.

Este resultado está em conformidade com os encontrados por Voorrips (1996) o qual demonstrou que a redução da concentração de esporos de resistência afeta significativamente o índice da doença e, por Murakami *et al.*, (2002) o qual demonstrou que a densidade de inóculo foi menor que 10^2 esporos de resistência/ g de solo, e produziu índice de doença abaixo de 30, ocasionando pouco impacto na produtividade e na manifestação dos sintomas.

Os compostos CBL, CBS e a sua combinação CBL+CBS reduziram significativamente o índice da doença em todos os solos, quando comparados com o NPK, independentemente do manejo aplicado, provavelmente devido aos efeitos benéficos nas propriedades biológicas do solo, produzidos por estes compostos.

Após análise do efeito do composto em cada sistema de produção, observou-se que o CBL, CBS e CBL+CBS adicionados aos solos orgânico e integrado apresentaram maior redução no o índice da doença, que quando adicionados ao solo convencional. Além disso, NPK e CBL+NPK incorporados ao solo manejado convencionalmente elevaram o índice da doença. Estes resultados corroboram os dados encontrados por Liu *et al.*, (2007) que ao estudarem os efeitos da incorporação de fertilizantes orgânicos na incidência de podridão-de-esclerócios observaram uma redução do desenvolvimento da doença quando comparados com os fertilizantes sintéticos.

Todos estes estudos enfatizam o aumento da elasticidade biológica como uma característica fundamental que influencia a severidade das doenças causadas por patógenos de solo. Isto foi claramente evidenciado nos resultados apresentados na figura 2.4, onde o grau de supressão da doença aumentou quando comparado ao solo esterilizado, demonstrando o envolvimento da biota do solo na supressão da hérnia das crucíferas.

Este resultado corrobora o encontrado por Murakami *et al.*, (2000b) e Niwa *et al.*, (2007) que compararam a ocorrência da hérnia das crucíferas em solos supressivos e condúctivos com ou sem esterilização e encontraram o efeito supressivo da biota do solo. Os microrganismos do solo, dentre eles os antagonistas, devem ter contribuído para a redução da hérnia das crucíferas em nosso estudo através de parasitismo direto dos esporos de resistência, competição ou antibiose.

Em plantios sucessivos de brócolis ao longo de um ano, foi possível observar uma forte influência da temperatura na severidade da hérnia das crucíferas. A redução do peso de galhas ocorreu no período de julho a agosto, para todos os tratamentos avaliados, onde a temperatura média do ar foi de 15 °C. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Thuma *et al.*, (1983) onde a severidade da hérnia das crucíferas em repolho, couve-chinesa e mostarda foi mínima quando a temperatura foi abaixo de 14 °C e maximizada com a temperatura variando entre 20 e 22 °C.

Neste período, a redução da temperatura do ar afetou drasticamente a produção de hérnia fresca de plantas adubadas com NPK, o mesmo não ocorrendo para as plantas suplementadas com os compostos orgânicos, isto porque, os compostos orgânicos protegem a superfície do solo de forças erosivas, retêm a umidade do solo e estabilizam a temperatura da superfície do solo, dificultando variações abruptas de temperatura (Winkel *et al.*, 1991; Chambers, 2000).

Nos solos sob manejo integrado de produção foi claramente evidenciado que em plantios sucessivos, a produção de galhas por *P. brassicae* em raízes de brócolis foi efetivamente reduzida pelos compostos orgânicos, desde o primeiro plantio até ao final de quatro plantios sucessivos e que o controle (NPK) aumentou a severidade doença ao longo de um ano. Nos demais sistemas e tratamentos não houve aumento no nível da doença. Mesmo resultado não foi alcançado por Escudra e Ameniya (2008) onde a Murcha de Fusário em espinafre só foi suprimida pelos compostos orgânicos a partir do segundo e terceiro plantios consecutivos.

Wallenhammar (1996) verificou que alta incidência da hérnia das crucíferas (82%) foi encontrada em campos com cinco plantios consecutivos de couve-chinesa por ano durante o período de 1969-1985, e quando os plantios consecutivos foram reduzidos para três e dois por ano, a incidência da doença foi reduzida para 58 e 42%, respectivamente. Neste trabalho foi demonstrado que mesmo em plantios consecutivos com hospedeiras susceptíveis, onde a fonte de inóculo tende a aumentar a cada novo plantio, os tratamentos CBL e CBL + CBS reduziram o peso da hérnia fresca ao final de quatro plantios no mesmo ano, em relação ao controle, nos três sistemas de produção. Este resultado é interessante quando consideramos o cultivo de olerícolas que é intensivo na utilização do solo em plantios consecutivos, permitindo ao produtor uma melhor exploração econômica da terra.

O sistema de produção orgânico não deve satisfazer somente a necessidade de redução dos impactos ambientais, incidência e severidade de doenças, ele deve ser economicamente competitivo, e em função disto foi demonstrado que não houve diferença na produção de matéria fresca entre os sistemas orgânico e convencional de produção, ao longo de plantios sucessivos. Este resultado está de acordo com os obtidos por Drinkwater *et al.*, (1995) que não observaram diferença entre a produção orgânica e convencional de tomate na Califórnia. Reganold *et al.*, (2001) verificaram que a produção de maçãs sob sistema de produção integrada, orgânica e convencional foi equivalente.

As diferenças nas propriedades químicas dos solos foram mais influenciadas pelo tipo de fertilizante do que pelo histórico de produção, enquanto o conteúdo de matéria orgânica foi visivelmente maior nos solos sob produção orgânica, indicando que este sistema pode contribuir para o aumento do teor de matéria orgânica e, conseqüentemente, da fertilidade do solo.

Os mecanismos de supressão de doenças causadas por patógenos de solo podem variar de acordo com o tipo de solo. Messiha *et al.*, (2007) estudando a incidência e severidade da Murcha

Bacteriana da batata sob diferentes manejos e regimes de adubação em diferentes tipos de solos observaram que somente nos solos arenosos, o manejo orgânico reduziu levemente a doença quando comparado ao convencional, e que nos solos argilosos o manejo orgânico aumentou a incidência da doença. Hasse (2005) e Murakami *et al.*, (2000b) observaram que o solo com alto teor de areia contribuiu para o aumento da severidade da hérnia das crucíferas. Contudo, os resultados deste trabalho demonstraram a importância do manejo orgânico na redução da doença, pois mesmo o solo apresentando teores de areia maiores que o de argila, o que favorece a penetração e desenvolvimento do patógeno, reduziu o índice da doença.

CONCLUSÕES

O histórico de produção de campo com brócolis afeta significativamente o índice da hérnia das crucíferas, que é maior em solos sob o sistema convencional;

O sistema de produção orgânica de brócolis aliado à aplicação combinada dos compostos orgânicos, CBL+CBS, reduz a severidade da doença e mantém a alta produtividade;

Em plantios comerciais consecutivos de brócolis, é possível manter o índice da hérnia das crucíferas reduzido com a incorporação de compostos orgânicos, e obter produções economicamente viáveis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABAWI, G.S.; WIDMER, T.L. Impact of soil health management practices on soil-borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 37–47, 2000.
- ABBASI, P.A.; LAZAROVITS, G. Effect of soil application of AG3 Phosphonate on the severity of clubroot of bok choy and cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1517-1522, 2006.
- ADEE, E.A.; OPLINGER, E.S; GRAU, C.R. Tillage, Rotation Sequence and Cultivar Influences on Brown Stem Rot and Soybean Yield. **Journal of Production Agriculture**, v. 7, p. 341-347, 1994.
- ARIENA, H.C.; van BRUGGEN Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. **Plant Disease**, v. 79, p. 976-983, 1995.
- BAILEY, K.L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil Tillage Research**, v. 72, p. 169–180, 2003.
- BENGTSSON, J.; AHNSTROM, J.; WEIBULL, A.C. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a metaanalysis. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, p. 261–269, 2005.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J.A.H.; LIGO, M.A.V.; MINEIRO, J.L. DE C. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.565-572, 2002.
- CHAMBERS, J.C. Seed movements and seedling fates in disturbed sagebrush steppe ecosystems: implications for restoration. **Ecological Applications**, v. 10, 1400–1413, 2000.
- CLARO, S.A. Referencias tecnológicas para a agricultura familiar ecológica: a experiência da região Centro-Serra do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, EMATER/RS-ASCAR, 250 p., 2001.
- CONNER, R.L.; DUCZEK, L.J.; KOZUB, G.C.; KUZYK, A.D. Influence of crop rotation on common root rot of wheat and barley. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.18, p.247-254, 1996.
- COOK, R.J.; THOMASHOWLS.; WELLER, D.M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M. Molecular mechanisms of defense. *Proceeding of National Academy Science*, v. 92, p.4197-4201, 1995.
- COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 467–476, 2002.

DRINKWATER, L.E.; LETOURNEAU, D.K.; WORKNEH, F.; van BRUGGEN, A.H.C.; SHENNAN, C. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California. **Ecology Applied**, v. 5, p. 1098–1112, 1995.

ESCUADRA, G.M.E.; AMEMIYA, Y. Suppression of Fusarium wilt of spinach with compost amendments. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 267–274, 2008.

ERHART, E.; BURIAN, K.; HARTL, W.; STICH, K. Suppression of *Pythium ultimum* by biowaste composts in relation to compost microbial biomass, activity and content of phenolic compounds. **Journal of Phytopathology**, v.147, p. 299–305, 1999.

FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. *Programas e Resumos...* São Carlos: UFScar. p. 235, 2000.

HASSE, I. Quantificação de *Plasmodiophora brassicae* e uso de plantas medicinais para controle da doença. Tese de doutorado, Universidade do Paraná, Curitiba - PR, 98p, 2005.

HUBER, D.M.; WATSON, R.D. Effect of organic amendment on soilborne plant pathogens. **Phytopathology**, v. 60, p. 22–26, 1970.

HUNTER, P.J.; PETCH, G.M.; CALVO-BADO, L.A.; PETTITT, T.R.; PARSONS, N.R.; ALUN, J.; MORGAN, J.A.W.; WHIPPS, J.M. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping-off disease caused by *Pythium sylvaticum*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 72, p. 6452–6460, 2006.

JANVIER, C.; VILLENEUVE, F.; ALABOUVETTE, C.; EDEL-HERMANN, V.; MATEILLE, T.; STEINBERG, C. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology and Biochemistry**, n. 39, p. 1–23, 2007.

KNUDSEN, I.M.B.; DEBOSZ, K.; HOCKENHULL, J.; JENSEN, D.F.; ELMHOLT, S. Suppressiveness of organically and conventionally managed soils towards brown foot rot of barley. **Applied Soil Ecology**, v. 12, p. 61-72, 1999.

KRUPINSKY, J.M.; BAILEY, K.L.; MCMULLEN, M.P.; GOSEN, B.D.; TURKINGTON, T.K. Managing plant disease risk in diversity cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 94, 198–209, 2002.

LIU, B.; GUMPERTZ, M.L.; HU, S.; RISTAINO, J.B. Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 2302-2316, 2007.

MADER, P.; FLIEßBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, p. 1694–1697, 2002.

MESSIHA, N.A.S.; van BRUGGEN, A.H.C.; van DIEPENINGEN, A.D.; de VOS, O.J.; TERMORSHUIZEN, A.J.; TJOU-TAM-SIN, N.N.A.; JANSE, J.D. Potato brown rot incidence

and severity under different management and amendment regimes in different soil types. **Europe Journal Plant Pathology**, v. 119, p. 367-381, 2007.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; AKIMOTO, T; SHISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, p. 584-589, 2000a.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; SHISHIDO, Y. Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p.1637–1642, 2000b.

MURAKAMI, H; TSUSHIMA, S; SHISHIDO, Y. Factors affecting the pattern of the dose response curve of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p. 421-427, 2002

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S., HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285-290, 2005.

NIWA, R.; KUMEI, T.; NOMBRA, Y.; YOSHIDA, S.; OSAKA, M.; EZAWA, T. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes supresión of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology & Biochemistry** 39: 778-785, 2007.

PASCHOAL, A.D. Produção orgânica de alimentos: agricultura sustentável para os séculos XX e XXI. 1 ed. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 191p., 1994.

PETERS, R.D.; STURZ, A.V.; CARTER, M.R.; SANDERSON, J.B. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 181–192, 2003.

POSTMA, J.; SCHILDER, M.T.; BLOEM, J.; van LEEUWEN-HAAGSMA, W.K. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2394 –2406, 2008.

REGANOLD, J.P.; GLOVER, J.D.; ANDREWS, P.K.; HINMAN, H.R. Sustainability of three apple production systems. **Nature**, v. 410, p. 926–930, 2001.

REUVENI, R.; RAVIV, M.; KRASSNOVSKY, A.; FREIMAN, L.; MEDINA, S.; BAR, A.; ORION, D. Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. **Crop Protection**, v. 21, p. 583–587, 2002.

ROTENBERG, D.; WELLSA, A.J.; CHAPMANA, E.J.; WHITFIELD, A.E.; GOODMAN, R.M.; COOPER, L.R. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2936–2948, 2007.

SCHONFELD, J.; GELSOMINO, A.; OVERBEEK, L.S.; van GORISSEN, A.; SMALLA, K.; van ELSAS, J.D. Effects of compost addition and simulated solarization on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 63–74, 2003.

SERRA-WITTLING, C.; HOUOT, S.; ALABOUVETTE, C. Increased soil suppressiveness to Fusarium wilt of flax after addition of municipal solid waste compost. **Soil Biology Biochemistry**, v. 28, p.1207–1214, 1996.

SZCZECH, M.; RONDONAN´SKI, W.; BRZESKI, M.W.; SMOLIN´SKA, U.; KOTOWSKI, J.F. Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. **Biological Agriculture and Horticulture**, n.10, p. 47–52, 1993.

TERMORSHUIZEN, A.J.; MOOLENAAR, S.W.; VEEKEN, A.H.M.; BLOK, W.J. The value of compost. **Reviews in Environmental Science & Bio/Technology**, n.3, p. 343-347, 2004.

THUMA, B.A.; ROWE, R.C.; MADDEN, L.V. Relationships of soil temperature and moisture to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) severity on radish in organic soil. **Plant Disease**, v. 67, p. 758– 762, 1983.

TILSTON, E.L.; PITT, D. GROENHOF, A.C. Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops. **New Phytology**, v. 154, p. 731–740, 2002.

van BRUGGEN, A.H.C. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. **Plant Disease**, v. 79, p. 976 – 983, 1995.

van BRUGGEN, A.H.C.; TERMORSHUIZEN, A.J. Integrated approaches to root disease management in organic farming systems. **Australasian Journal of Plant Pathology**, v.32, 141-156, 2003.

VOORRIPS, R.E. Clubroot in the cole crops: the interaction between *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica oleracea*. - Thesis Wageningen - With ref. - With summary in Dutch, 1996.

YOGEV, A.; RAVIV, M.; HADAR, Y.; COHEN, R.; KATAN, J. Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium oxysporum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, p. 267–278, 2006.

YOGEV, A.; RAVIV, M.; KRITZMAN, G.; HADAR, Y.; COHEN, R.; KIRSHNER, B.; KATAN, J. Suppression of bacterial canker of tomato by composts. **Crop Protection**, v. 28, p. 97–103, 2009.

WALLENHAMMAR, A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**, v. 45, p. 710-719, 1996.

WINKEL, V.K; ROUNDY, B.A.; COX, J.R. Influence of seedbed microsite characteristics on grass seedling emergence. **Journal of Range Management**, v. 44, 210–214, 1991.

WOOD, S.; SEBASTIAN, K.; SCHERR, S.J. Pilot Analysis of Global Ecosystems: Agroecosystems. **International Food Policy Research Institute and World Resources Institute**, Washington, DC. 2000.

WORKNEH, F. Variables associated with corky root and *Phytophthora* root rot of tomatoes in organic and conventional farms. **Phytopathology**, n. 83, p. 581 – 589, 1993.

WORKNEH F., van BRUGGEN, A.H.C.; DRINKWATER, L.E.; SHENNAN, C. Variables associated with corky root and *Phytophthora* root rot of tomatoes in organic and conventional farms. **Phytopathology**, v. 83, p. 581-589, 1993.

CAPÍTULO III

INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CALAGEM E COMPOSTOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS

RESUMO

Experimentos de campo foram conduzidos em Brazlândia-DF utilizando diferentes dosagens de compostos orgânicos e níveis de calagem para o controle da hérnia das crucíferas em brócolis (*Brassica oleraceae* var. *italica*). Um campo comercial, com histórico de monocultura de crucíferas, infectado naturalmente na concentração de 10^8 esporos de *Plasmodiophora brassicae*/g de solo foi dividido em dois experimentos. O experimento A contou com os tratamentos, em doses moderadas: 1) 400 g de CBS; 2) 400 mL de CBL; 3) 200 g de CBS + 200 mL de CBL e; 4) 200 mL de CBL + 40 g de NPK, sendo o controle, 80 g de NPK, substituindo os compostos orgânicos. No experimento B foram realizados os tratamentos, em doses elevadas: 1) 800 g de CBS; 2) 800 mL de CBL; 3) 400 g de CBS + 400 mL de CBL e; 4) 400 mL de CBL + 40 g de NPK e o controle. Ambos os experimentos receberam quatro diferentes concentrações de calagem, 0, 100, 200 e 400 g/ m². As mudas de brócolis foram transplantadas 40 dias depois da calagem e cultivadas por 45 dias. O pH do solo, medido antes da aplicação dos compostos orgânicos, foi 6,52, 6,97, 7,24 e 8,46 para as concentrações de 0, 100, 200 e 400 g/ m² de calcário, respectivamente. Os melhores resultados na supressão da doença no campo foram obtidos quando os tratamentos constituídos de 200 mL de CBL + 200 g de CBS e 800 mL de CBL foram integrados com 400 g/ m² de calcário, reduzindo em 98% e 96% o índice da doença, respectivamente. Estas mesmas dosagens de compostos orgânicos quando associadas com 400 g/ m² de calcário aumentaram em 118% e 82% o peso da matéria fresca da planta, quando comparadas com o controle sem a adição de calagem. O índice da doença no controle (sem composto) não reduziu com a aplicação da calagem no solo. Os resultados indicam que a integração de compostos orgânicos com calagem é uma medida eficiente de controle da doença em campos de produção altamente infestados por *P. brassicae*, promovendo também maior desenvolvimento da planta.

Palavras-chave adicionais: Bokashi, pH do solo, supressividade a doença, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleraceae* var. *italica*.

INTEGRATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF LIMING AND ORGANIC COMPOUNDS ON CONTROL OF THE CLUBROOT

ABSTRACT

Field experiments were conducted in Brazlandia-DF using different doses of organic compounds and levels of lime to control the disease clubroot in broccoli. A commercial field, with a history of monoculture of crucifer, naturally infected in the concentration of 10^8 spores of *Plasmodiophora brassicae* / g of soil was divided into two experiments. The experiment A has comprised five treatments: 1) 400 g of CBS, 2) 400 mL of CBL; 3) 200 mL of CBL + 200 g of CBS; 4) 200 mL of CBL + 40 g of NPK, and the control, 80 g of NPK replacing the organic compounds, and the experiment B divided into 1) 800 g of CBS, 2) 800 mL of CBL; 3) 400 mL of CBL + 400 g of CBS; 4) 400 mL of CBL + 40 g of NPK and the control. Both experiments received four different concentrations of lime, 0, 100, 200 and 400 g/ m². The broccoli seedlings were transplanted 40 days after the liming and cultured for 45 days. The soil pH (H²O) measured before the application of organic compounds was 6.52, 6.97, 7.24 and 8:46 for the dosages of 0, 100, 200 and 400 g/ m² limestone, respectively. The best results in the suppression of the disease in the field were obtained when the treatments constituted 200 mL of CBL + 200 g of CBS and 800 mL of CBL were integrated with 400 g/ m² of limestone, reducing in 98 % and 96 % the index of the disease, respectively. These themselves dosages of organic compounds when associated with 400 g/ m² of limestone they increased in 118 % and 82 % the weight of the plant fresh matter, when compared with the control without liming. The index of the disease in the control (without compound) did not reduce with the application of the lime in the soil. The results indicate that the integration of organic compounds with lime in the soil is an efficient measure of control of the disease in production fields highly infested for *P. brassicae*, besides of improving the plant development.

Additional Keywords: Bokashi, disease suppression, soil pH, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INTRODUÇÃO

A hérnia das crucíferas é a principal doença da família Brassicaceae, cujo agente causal é o parasita habitante do solo, *Plasmodiophora brassicae* Woronin. Um controle efetivo e econômico para esta doença é necessário, pois as cultivares resistentes comercialmente não tem resistência durável. A rotação de cultura é inviável economicamente principalmente para pequenos produtores que necessitam que a terra produza o ano todo. De acordo com Wallenhammar (1996) a meia vida do esporo de resistência é de 3,6 anos, então seria necessário um longo período de rotação para reduzir o potencial de inóculo. Existem poucos fungicidas que promovam um efetivo controle da doença. Os fumigantes têm promovido um controle consistente, mas o seu custo é alto, são tóxicos, e prejudiciais ao meio ambiente.

Estes fatores junto com o aumento da consciência ambiental e da demanda por práticas de produção sustentáveis têm conduzido ao desenvolvimento de um sistema integrado de manejo da hérnia das crucíferas, em cultivos de brássicas.

Evidências suportam os benefícios de rotação de cultura (Friberg *et al.*, 2006), aumento do pH do solo com calagem (Niwa *et al.*, 2007), aplicação de fungicidas (Kwanghoon *et al.*, 2007), cálcio (Dixon e Page, 1998), boro (Schuta, 2003) e incorporação de matéria orgânica (Murakami *et al.*, 2009; Pitt *et al.*, 1998) como medidas, que juntas, são capazes de oferecer excelentes resultados no controle da doença (Donald e Porter, 2009). Wimalajea (1975) obteve redução da severidade da doença com a associação da calagem com o uso de pentacloronitrobenzeno.

Em campos experimentais conduzidos na Austrália, a integração de dois ou mais tratamentos foi mais efetiva no controle da hérnia das crucíferas em canola (*Brassica napus*) do que a aplicação de um único tratamento, mesmo em solos com pH básico (Donald *et al.*, 2006).

Nestes experimentos, as estratégias de controle mais efetivas consistiam da combinação de um ou dois tratamentos (nitrato de cálcio, fluazianam ou metam sódio) junto com a calagem.

A calagem tem sido empregada como uma técnica convencional para o controle da doença, em virtude de seus efeitos supressivos através da neutralização da acidez do solo e do aumento da atividade microbiana, favorecendo os processos de mineralização da matéria orgânica, diminuição da adsorção de fósforo no solo e disponibilidade dos micronutrientes como boro, ferro, manganês e zinco. Além disso, o calcário atua como fertilizante, fornecendo cálcio e magnésio às plantas.

A aplicação de calagem não erradica o patógeno, mas reduz a densidade de esporos (Murakami *et al.*, 2002) criando condições desfavoráveis para a realização dos processos de invasão, colonização e manifestação de sintomas (Webster e Dixon, 1991). Os efeitos do cálcio sobre o patógeno *P. brassicae* são dependentes do pH (Myers e Campbell, 1985), sendo este provavelmente o fator mais importante no desenvolvimento da doença.

Solos ricos em matéria orgânica tendem a potencializar os efeitos da calagem sobre a hérnia das crucíferas, pois além da reciclagem de nutrientes, a matéria orgânica consegue também diminuir a acidez do solo pela neutralização do alumínio tóxico.

Assim, o controle integrado por meio de medidas como incorporação no solo de calcário e matéria orgânica parece ser uma estratégia viável para o manejo da hérnia das crucíferas em brassicáceas.

De acordo com os resultados de campo obtidos no capítulo I, as dosagens de compostos orgânicos aplicadas, sem a associação com outra medida de controle, em campos de produção comercial de brócolis com concentração de inóculo de 10^8 esporos de *P. brassicae*/ g de solo, não reduziu o índice da doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da integração da

calagem com compostos orgânicos, no controle da hérnia das crucíferas, em condições de campo altamente infestado pelo patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em um campo comercial de brócolis, localizado no Núcleo Rural de Brazlândia – DF (S: 15° 40'51,97'' e W: 48° 09' 21,35''), com histórico de monocultura de crucíferas, altamente infestado com *P. brassicae*.

Para avaliar o efeito da aplicação de diferentes dosagens de compostos orgânicos na hérnia das crucíferas, dois experimentos foram montados. O experimento A foi dividido em cinco tratamentos com doses moderadas: 1) 400 g de CBS; 2) 400 mL de CBL; 3) 200 g de CBS + 200 ml de CBL e; 4) 200 mL de CBL + 40 g de NPK, sendo o controle somente a incorporação ao solo de 80 g de NPK na formulação 10-10-10. O experimento B foi dividido de forma semelhante ao experimento A, sendo os tratamentos com compostos orgânicos em dosagens elevadas: 1) 800 g de CBS; 2) 800 mL de CBL; 3) 400 g de CBS + 400 mL de CBL e; 4) 400 mL de CBL + 40 g de NPK. A descrição detalhada dos compostos orgânicos, bem como a sua composição química estão de acordo com as tabelas 1.1 e 1.2, do capítulo I.

Com o objetivo de avaliar o efeito da integração de medidas de controle na severidade da hérnia das crucíferas e no desenvolvimento da planta, os tratamentos dos experimentos A e B receberam quatro diferentes concentrações de calagem, 0; 100; 200 e 400 g de calcário/ m², os quais foram aplicadas 40 dias antes do transplântio e incorporadas ao solo a uma profundidade de aproximadamente de 30 cm. O calcário aplicado foi o dolomítico calcítico com 33% de CaO, 16% de MgO e PRNT = 85%.

Para medir o pH, quatro amostras de solo (20 g cada) foram selecionadas randomicamente de cada dosagem de calagem, antes da aplicação dos compostos orgânicos. As amostras foram secas ao ar e peneiradas com malha de 2 mm. As medidas do pH foram feitas usando um copo com eletrodo na razão de solo: água em um raio de 1:2,5, de acordo com Narisawa *et al.*, (2000).

A concentração inicial de esporos no solo foi de 10^8 esporos/ g de solo, e foi obtida de acordo com a metodologia já descrita no capítulo 2. As mudas de brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) foram produzidas em bandeja de isopor de 120 células contendo terra esterilizada. Com aproximadamente 30 dias, as mudas foram transplantadas para o campo e em cada cova foram plantadas duas mudas, com posterior desbaste. Os tratos culturais e os desbrotamentos foram realizados semanalmente.

O delineamento experimental estabelecido foi o fatorial 5 x 4, em blocos casualizados com 3 repetições contendo 5 unidades experimentais representada cada uma por uma planta. Os cinco tratamentos foram representados pela incorporação ou não de compostos orgânicos (CBL, CBS, CBL + CBS, CBL + NPK e NPK) e os quatro subtratamentos representados pelas concentrações de calcário (0, 100, 200 e 400 g/ m²). O mesmo delineamento experimental foi utilizado para os experimentos A e B.

Com 45 dias após o transplântio as plantas foram cortadas ao nível do solo e as raízes foram cuidadosamente lavadas e depois as hérnias destacadas. As raízes, hérnias e o material foliar foram pesados para a determinação do peso fresco e colocados em saco de papel, separadamente, para perder a umidade, depois levados para estufa a 65 °C, por 72 h para a determinação do peso seco.

Os sintomas da doença foram avaliados usando a escala de severidade adotada por Abbasi *et al.*, (2006) com modificações, classificada dentro das categorias 0 – 4 onde 0 = 0% (sem hérnia); 1 = até 25% (hérnias levemente inchadas); 2 = 26 a 50% (hérnias moderadamente

inchadas); 3 = 50 a 75% (hérnias severamente inchadas) e 4 = 100% (hérnias severamente inchadas nas raízes laterais e principal) das raízes cobertas por hérnias. (Figura 3.1). O número de plantas na classe 1 foi multiplicado por 10, na classe 2 por 30, na classe 3 por 60, na classe 4 por 100 e a soma foi dividida pelo número total de plantas para obter o ID, previamente reportado por Narisawa *et al.*, (2005).

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o programa Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000). Os valores médios de peso seco e fresco da massa aérea, da raiz e da hérnia e os índices da doença foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os valores do pH do solo com a aplicação de 0, 100, 200 e 400 g/ m² de calcário dolomítico calcinado foram 6.52; 6.97; 7.24 e 8.46, respectivamente. O índice da doença foi influenciado pelas diferentes concentrações de calagem e de compostos orgânicos incorporados no solo. Os índices variaram de 2 a 100, sendo o controle (adição de NPK e calagem) detendo os maiores valores.

Sem aplicação de calagem no solo, as dosagens moderadas dos compostos orgânicos CBL, CBS e CBL + CBS utilizadas no experimento A reduziram o índice da doença, em comparação ao controle (Figuras 3.1 A-C).

À medida que diferentes concentrações de calcário foram incorporadas ao solo, os efeitos dos compostos orgânicos foram diferenciados (Figuras 3.1 A, B e C). O índice da doença de plantas suplementadas com CBL, sem a aplicação de calcário foi 51, reduzindo para 28 e 32 quando aplicadas as dosagens de 100 g/ m² e 400 g/ m² de calcário no solo, respectivamente. Não foi observada a redução significativa do índice da doença com a aplicação de 200 g/ m². Além

disso, quando comparado ao controle, o CBL reduziu significativamente o índice da doença para todas as concentrações de calcário avaliadas (Figura 3.1 A).

As diferentes concentrações de calcário não alteraram o índice da hérnia das crucíferas para as plantas adubadas com CBS, entretanto, mantiveram valores significativamente reduzidos em comparação ao controle, com exceção da concentração de 400g de calcário/m² em que o índice da doença não diferiu estatisticamente do controle (Figura 3.1 B).

As plantas adubadas com CBL + CBS responderam melhor às diferentes concentrações de calagem, visto que o índice da doença tendeu a reduzir à medida que aumentou a concentração de calcário no solo, diferenciando estatisticamente do NPK (Figura 3.1 C).

Os resultados mostram claramente a influência do NPK no aumento do índice da doença, pois para o tratamento CBL + NPK, não houve diferença estatística no índice da doença, entre as plantas que receberam diferentes concentrações de calcário e as que não receberam a calagem, não havendo diferença também neste índice em comparação às plantas que receberam somente NPK (Figura 3.1 D).

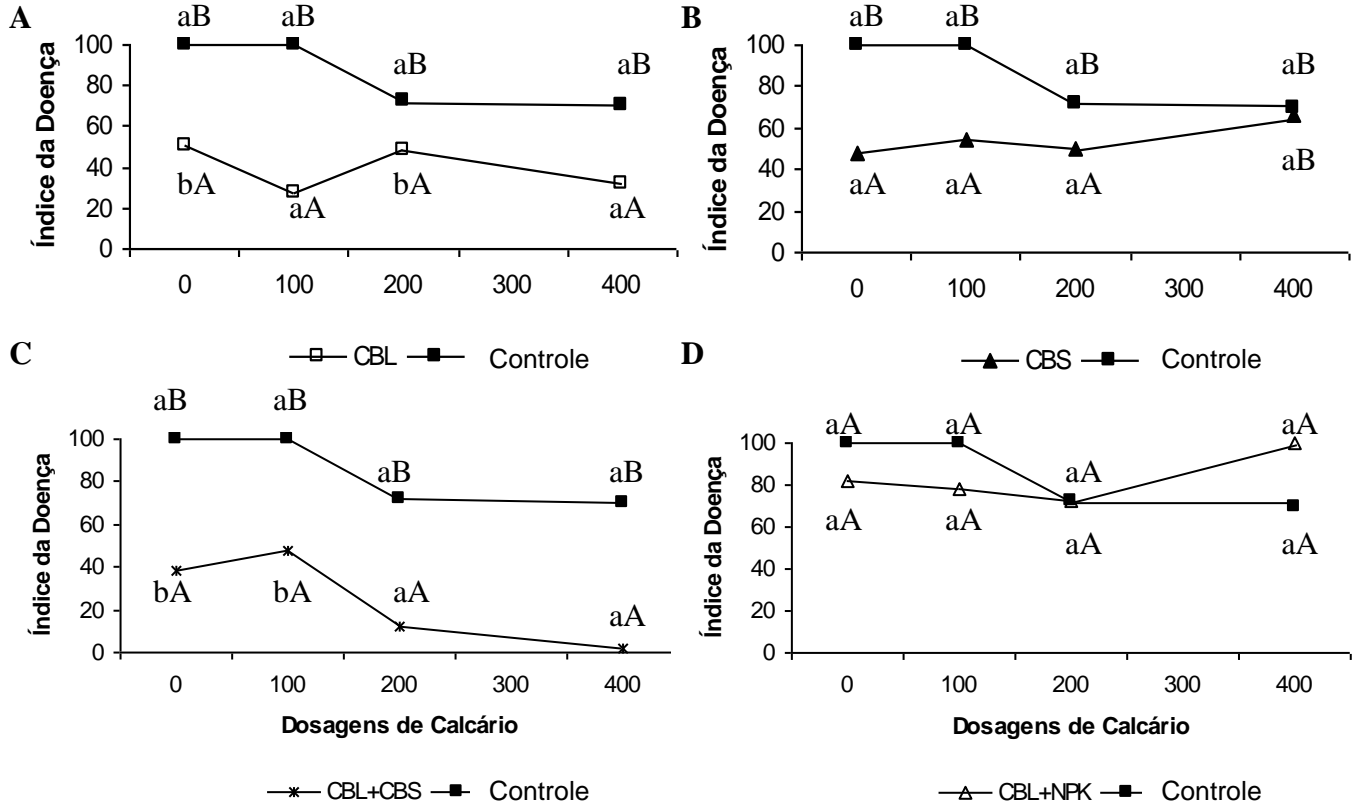


FIGURA 3.1 - Experimento A. Efeito de doses moderadas de compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcítico no índice da hérnia das crucíferas, em condições de campo. **A** – CBL, **B** – CBS, **C** – CBL+CBS e **D** – CBL+NPK **Letras minúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas com o mesmo símbolo (efeito das diferentes das concentrações de calcário no solo); **Letras maiúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas com símbolos diferentes (efeito da incorporação do composto orgânico ao solo); **CBL** - composto bioativo líquido; **CBS** – composto bioativo sólido. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott

No experimento B, onde doses elevadas de compostos orgânicos foram utilizadas, sem aplicação de calagem no solo, somente o CBL reduziu significativamente o índice da doença em

comparação ao controle (Figura 3.2). As plantas adubadas com CBL responderam melhor às diferentes concentrações de calagem, visto que a severidade da doença reduziu à medida que aumentou a concentração de calcário no solo, alcançando índices de doença de 22 e 4 com aplicação de 200 g/ m² e 400 g de calcário/ m², e diferenciando estatisticamente do controle (Figura 3.2 A).

As diferentes concentrações de calcário não alteraram o índice da hérnia das crucíferas para as plantas adubadas com CBS, no entanto promoveu redução significativa do índice de hérnia das crucíferas na concentração de 100 g de calcário/ m² (Figura 3.2 B).

Somente quando a dosagem de calcário foi elevada para 400 g/ m², o CBL + CBS reduziu significativamente o índice da doença de 69 para 30, representando uma redução de 56% na severidade da doença, em comparação ao solo sem aplicação de calagem. Observa-se ainda que na concentração de 400 g de calcário/ m², o índice da doença reduziu de 78 para 30, com aplicação da combinação CBL + CBS, representando uma redução de 62% na severidade da doença, quando comparado ao controle. (Figura 3.1 C).

O CBL aplicado sozinho reduziu o índice da doença, mas quando combinado com o NPK elevou o índice da doença a 90 e 100 à medida que aumentou a dosagem de calcário dolomítico aplicada, e não diferenciou do controle (Figura 3.2 D).

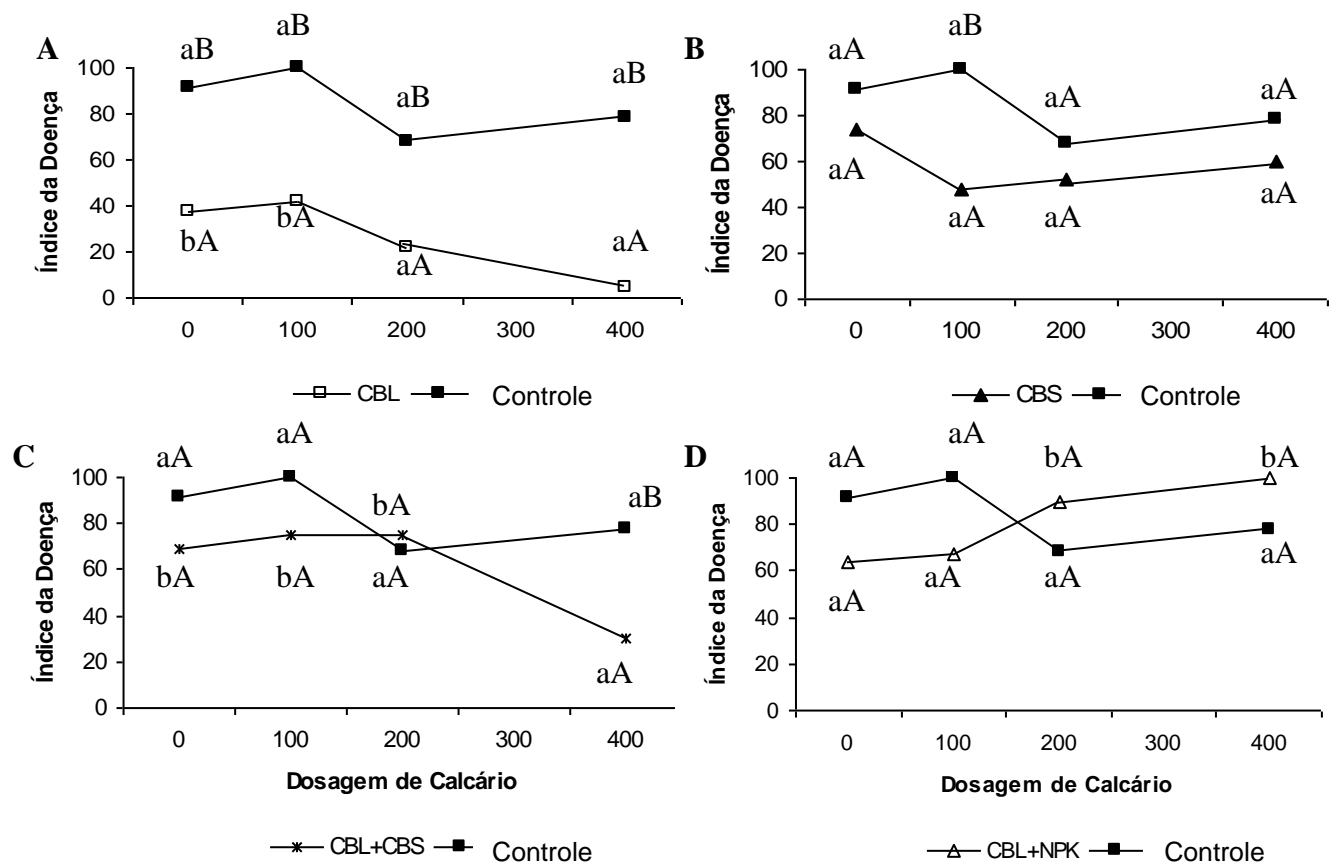


FIGURA 3.2 - Experimento B. Efeito de doses elevadas de compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcítico no índice da hérnia das crucíferas, em condições de campo. **A** – CBL, **B** – CBS, **C** – CBL+CBS e **D** – CBL+NPK. **Letras minúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas com o mesmo símbolo (efeito das diferentes concentrações de calcário no solo); **Letras maiúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas com símbolos diferentes (efeito da incorporação do composto orgânico no solo); **CBL** - composto bioativo líquido; **CBS** – composto bioativo sólido. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott

A produção de matéria seca foi maior no experimento A em relação ao B com ou sem aplicação de calagem, mostrando que a maior dosagem dos compostos orgânicos utilizada no

experimento B foi desnecessária para aumentar a produção (Figura 3.3). Os tratamentos com compostos orgânicos, em especial o CBL + CBS, produziram os maiores valores de matéria seca no experimento A, para todas as concentrações de calcário estudadas.

Sem aplicação de calagem, o peso da matéria seca das plantas adubadas com 800 mL de CBL foi 41 g e com a combinação de 200 mL de CBL + 200 g de CBS foi 65 g, estimulando o desenvolvimento da parte aérea em 33 e 116%, respectivamente em comparação ao controle (30 g) (Figura 3.3 A). E quando associados com 400 g/ m² de calcário, o peso da matéria seca destes mesmos tratamentos foi de 56g e 66g (Figura 3.3 D).

No experimento B, não houve acréscimo significativo no peso da matéria seca entre os fertilizantes na concentração de 0 e 100 g de calcário/ m² (Figuras 3.3 A-B). Com a adição de 200 e 400 g de calcário/ m², o CBS e a combinação CBL + CBS produziram maiores valores de matéria seca, diferindo significativamente dos demais (Figuras 3.3 C-D).

Na concentração de 100 g de calcário/ m², a dosagem de 400 mL de CBL promoveu o maior valor de massa seca (65 g), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 3.3 B). No experimento A quando a concentração de calcário foi elevada para 200 g/ m², houve uma maior produção de massa seca para os compostos orgânicos CBS e CBL+CBS. No ensaio B, a combinação CBL + CBS e o CBS produziram maiores valores de matéria seca 34,2 g e 35,4 g, respectivamente (Figura 3.3 C).

Para a concentração de 400 g de calcário/ m², nos ensaios A e B, todos os tratamentos aumentaram o peso da matéria seca em comparação às demais concentrações de calcário empregadas.

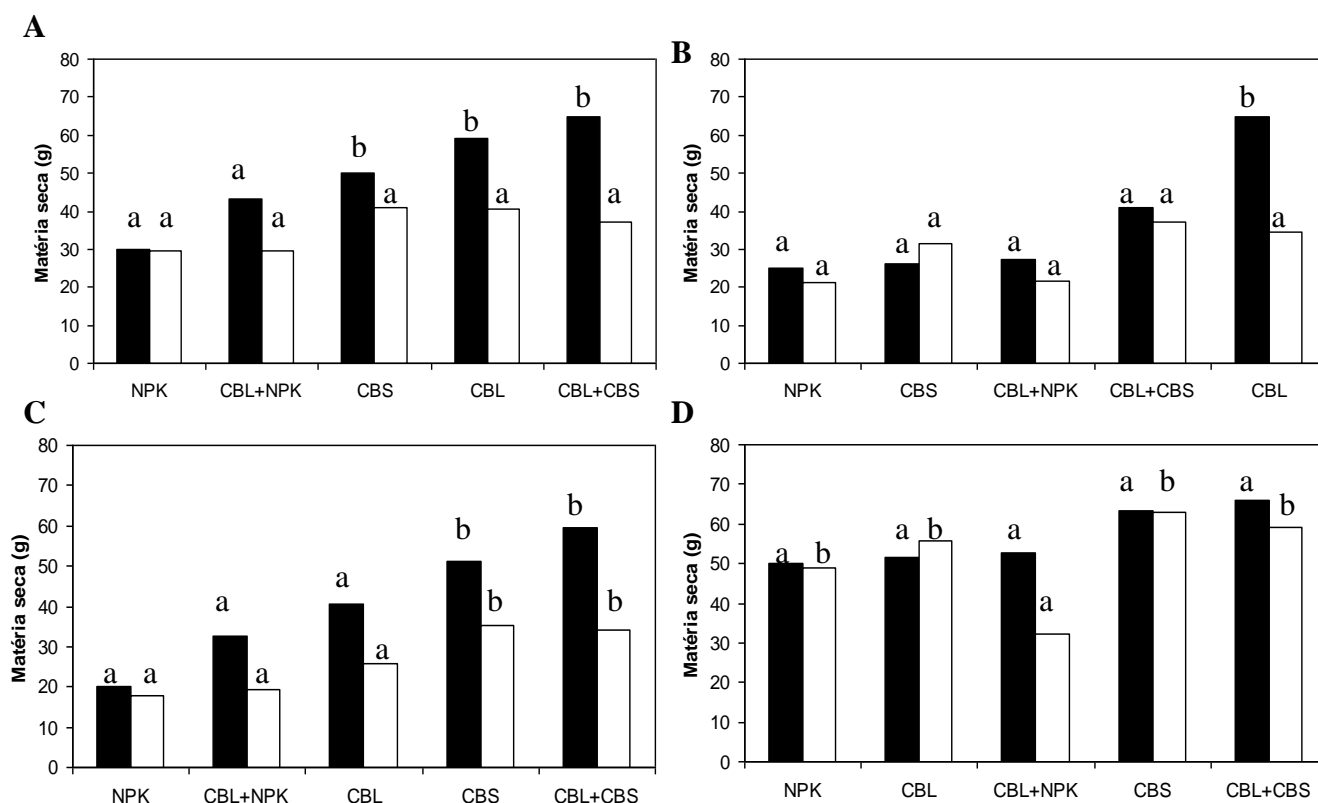


FIGURA 3.3 - Efeito dos compostos orgânicos e diferentes concentrações de calcário dolomítico calcítico na produção de matéria seca, em condições de campo. **A** – 0 g/ m² de calcário; **B** – 100 g/ m² de calcário; **C** – 200 g/ m² de calcário e **D** – 400 g/ m² de calcário. Colunas pretas representam o experimento A (doses moderadas de compostos orgânicos) e colunas brancas o experimento B (doses elevadas de compostos orgânicos). O NPK é o controle. Valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Na tabela 3.1 os resultados dos experimentos A e B foram comparados e observou-se que não houve redução no peso médio da hérnia fresca para as diferentes dosagens de compostos orgânicos utilizadas, com exceção do CBL, que reduziu a média desta variável de 10,6 g para 6,5 g com a incorporação de 800 mL deste composto. No experimento A, os compostos orgânicos reduziram significativamente os valores médios do peso da hérnia fresca em

comparação ao controle, enquanto no experimento B, somente o CBL diferiu estatisticamente dos demais.

O NPK não apresentou reduções significativas no peso da hérnia fresca com a aplicação de diferentes concentrações de calcário no solo, mostrando que mesmo na concentração de 400 g/m² de calcário, a qual elevou o pH para 8,46, não houve controle, sob alta densidade de esporo, 10⁸ esporos/ g de solo.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos nos experimento A, para a variável peso de raiz fresca, e no experimento B, os tratamentos CBS e CBL + CBS diferiram estatisticamente dos demais.

TABELA 3.1 - Efeito de diferentes concentrações de composto orgânicos e calcário na produção de massa aérea e raiz fresca de brócolis e hérnia fresca de *Plasmodiophora brassicae*, em condições de campo, Brazlândia - DF.

Variáveis analisadas	Doses de Calcário	EXPERIMENTO A					EXPERIMENTO B				
		CBL	CBS	CBL+ CBS	CBL+NPK	Controle	CBL	CBS	CBL+CBS	CBL+NPK	Controle
hérnia Fresca (g)	00	15,6bA	12,5aA	9,2bA	21,1aB	37,2aB	10,4bA	24,4bB	25,1bB	18,6aB	28,5aB
	100	6,9aA	16,1aA	11,3bA	22,3aB	28,0aB	8,8bA	7,6aA	11,8aA	30,9bB	30,7aB
	200	13,9bA	12,2aA	3,0aA	14,9aA	15,9aA	5,4aA	9,9aA	22,6bB	26,9bB	25,7aB
	400	6,1aA	12,8aA	0,4aA	24,2aB	24,3aB	1,5aA	20,0bB	7,6aA	16,5aB	20,5aB
	Média	10,6B	13,4B	6,0A	20,6C	26,35C	6,5A	15,5B	16,8B	23,2B	26,3B
Raiz Fresca (g)	00	14,0aA	13,5bA	13,8aA	12,9aA	11,2aA	7,6aA	10,6aA	9,3aA	6,1aA	8,2aA
	100	14,1aB	7,8aA	10,4aA	8,7aA	19,2bB	9,7aA	8,5aA	10,3aA	6,6aA	4,7aA
	200	12,6aA	14,3bA	14,1aA	11,0aA	10,5aA	7,6aA	10,7aA	11,5aA	9,3aA	6,1aA
	400	13,3aA	18,3bA	15,3aA	20,8bA	18,6bA	13,4bB	19,5bB	15,5bB	7,7aA	14,6bB
	Média	13,5A	13,5^a	13,4^a	13,3A	14,9A	9,6A	12,3B	11,7B	7,4A	8,4A
**HF/MF (%)	00	4,2aA	5,1aA	1,7aA	6,5aA	16,9bB	5,4aA	9,3aA	12,9bB	8,6aA	15,4bB
	100	1,5aA	10,0bB	4,3bA	12,8bB	14,0bB	3,1aA	3,3aA	5,0aA	26,4bB	18,6bB
	200	5,7aB	3,3aB	0,5aA	6,0aB	9,9aB	2,7aA	5,0aA	8,6aA	20,2bB	15,0bB
	400	1,6aA	2,6aB	0,1aA	5,3aB	6,0baB	0,3aA	4,0aA	1,4aA	6,0aA	5,2aA
	Média	3,2A	5,2B	1,6^a	7,7B	11,7C	2,9A	5,4B	7,0B	15,3C	13,5C

- Valores referentes a média de 15 plantas Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott. **Letras minúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas na coluna; **Letras maiúsculas** – indicam diferenças das médias estatísticas na linha.
- **hérnia Fresca/Matéria Fresca

Uma relação percentual de raiz sadia seca e hérnia seca tanto para os valores das médias dos fertilizantes como para as médias das concentra es de calcário foi realizada usando como base as dosagens dos compostos do experimento A. A figura 3.4A mostra que mais de 70% do sistema radicular das plantas adubadas com CBL em combina o com CBS foi constituído de raízes sadias, enquanto no controle este valor caiu para 40%.

Quando as médias das concentra es de calcário foram avaliadas, independentemente do fertilizante, observou-se que aproximadamente 65% do sistema radicular das plantas que receberam 400 g/ m² de calcário no solo foi constituído de raízes sadias, e para as plantas que não receberam calagem no solo, este percentual de raízes sadias caiu para aproximadamente 45%.

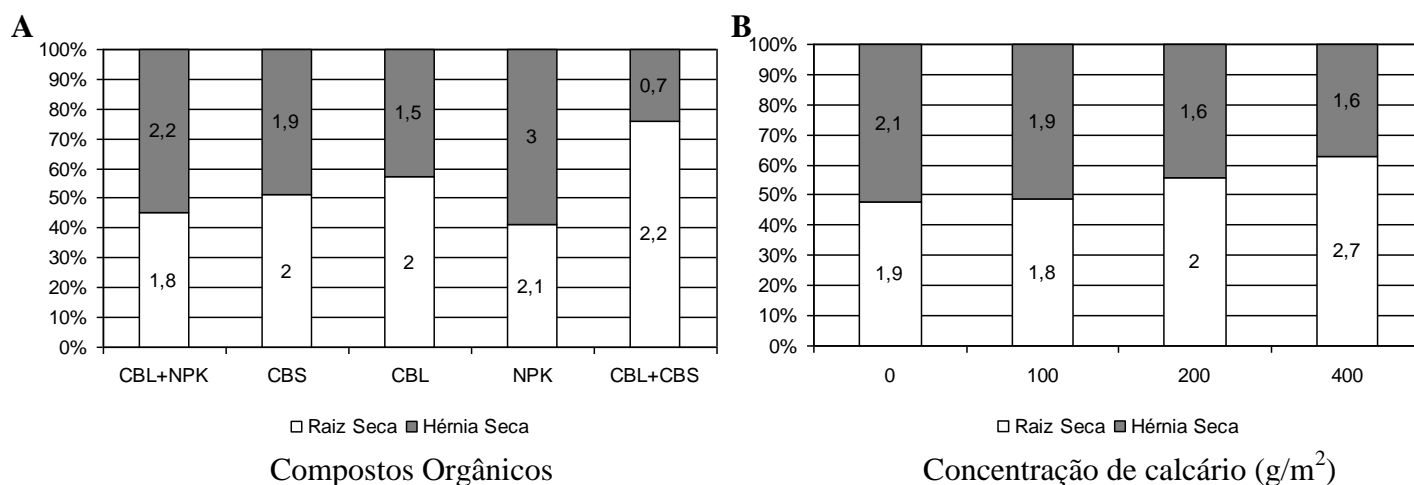


FIGURA 3.4 - Efeito dos compostos orgânicos (**A**) e diferentes concentra es de calcário (**B**) na rela o percentual entre raiz sadia seca e hérnia seca. Os números dentro das colunas representam os valores de raiz seca e hérnia seca obtidos para cada tratamento.

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a hérnia das crucíferas foi suprimida pela incorporação dos compostos orgânicos, CBL e CBL + CBS, e que esta supressão foi acentuada com o aumento da concentração de calcário no solo, resultando conseqüentemente no aumento do pH do solo.

Estudos têm demonstrado que a hérnia das crucíferas é menos agressiva em solos com pH elevado. Webster e Dixon (1991) constataram que os efeitos do pH são independentes da concentração de cálcio, e que o pH alcalino reduziu o número total de infecção e retardou a maturação do plasmódio, esporângio e zoósporos.

No entanto, foi demonstrado neste trabalho que sob alta concentração de esporos, 10^8 esporos/g de solo, a utilização de calagem com fertilização química, como medida de controle, não reduziu o índice da doença, muito embora tenha elevado o pH a 8,46, evidenciando que mesmo em solos alcalinos, a severidade da doença pode ser elevada na presença de alta densidade do patógeno. Resultado semelhante foi encontrado por Schuta (2003) que verificou que ao se elevar a concentração de inóculo (5×10^7 esporos de resistência/g de solo), a severidade da doença aumentou mesmo para níveis de pH do solo igual a 7,3.

Narisawa *et al.*, (2005) demonstraram que com a densidade de esporos de 10^4 e 10^5 esporos/ g de solo, o índice da doença reduziu efetivamente com o aumento do pH no solo, contudo, quando a densidade de esporos foi 10^6 esporos/ g de solo todas as plantas foram severamente atacadas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por McDonald *et al.*, (2004).

Os tratamentos CBL na dosagem de 800 mL, e a combinação de 200 mL de CBL + 200 g de CBS, reduziram respectivamente em 58 e 62% o índice da doença, sem aplicação de calagem.

E quando a dosagem de 400 g de calcário/ m² foi utilizada, esta redução foi elevada para 89% e 95%. Estes resultados corroboram os encontrados por Donald *et al.*, (2006) que verificaram que estratégias de controle mais efetivas consistiam da combinação de um ou dois tratamentos (nitrato de cálcio, fluazianam ou meta sódio) junto com a calagem.

Do experimento B destacou-se o tratamento com 800 mL de CBL do composto orgânico que apresentou menores reduções no índice da doença, entretanto, produziu menores valores de matéria seca em relação a dosagem de 400 mL de CBL (experimento A). Esta dose excessiva de CBL (800 mL), além de não trazer benefícios à cultura, provavelmente inviabiliza economicamente o controle da doença.

Segundo Uesugi e Tomita (2002), o aumento da dosagem de matéria orgânica aplicada ao solo deve ser muito bem analisado, pois estudando o efeito de compostos orgânicos no controle da Murcha Bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, concluíram que altos níveis de matéria orgânica causaram aumento nos sintomas de murcha. De acordo com Pereira *et al.*, (1996), a quantidade de matéria orgânica a ser incorporada ao solo é um dos critérios a serem avaliados, pois interferem na ação dos compostos orgânicos sobre as doenças de plantas.

A utilização de 400 g de calcário/ m², elevando o pH a 8,46, além de ter reduzido o índice da doença, promoveu aumento na produção de matéria fresca das plantas de brócolis. Este resultado corrobora o encontrado por Schuta (2003) onde uma produção de massa seca de couve-chinesa foi maior com pH variando entre 6,2 a 7,3. Segundo Williamson e Dyce (1989) a produção de matéria fresca de repolho aumentou com o aumento da concentração para 1,6 g de calcário/ kg de solo.

A utilização de calagem é muito importante no cultivo de olerícolas, visto que supre a exigência de Ca destas plantas (Filgueira, 2000), e ainda promove a alcalinidade dos solos, fator

primordial no controle da hérnia das crucíferas. E neste processo, a incorporação de materiais orgânicos nos solos, principalmente nos mais arenosos, ajuda a diminuir a perda por lixiviação de quantidades apreciáveis de bases (Ca, Mg, Na e K), pela grande capacidade de retenção e troca de nutrientes que a matéria orgânica possui, ajudando desta forma a manter o pH mais estável e os nutrientes disponíveis para as plantas.

CONCLUSÕES

A integração de compostos orgânicos (CBS+CBL) com calagem é uma medida eficiente de controle da doença, em campos de produção altamente infestados por *P. brassicae*, promovendo também maior desenvolvimento da planta.

Dosagens elevadas de compostos orgânicos como CBS aumentam a severidade da hérnia das crucíferas em brócolis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABBASI, P.A.; LAZAROVITS, G. Effect of soil application of AG3 Phosphonate on the severity of clubroot of bok choy and cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1517-1522, 2006.
- DIXON, G.R.; PAGE, L.V. Calcium and nitrogen eliciting alterations to growth and reproduction of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Acta Horticulture**, v. 459, p. 343-350, 1998.
- DONALD, E.C.; PORTER I.J.; FAGGIAN, R. LANCASTER, R.A. An integrated approach to the control of clubroot in vegetable brassica crops. **Acta Horticulturae**, v. 706, p. 283-300, 2006.
- DONALD, E.C.; PORTER, I.J. Integrated Control of Clubroot. **Journal of Plant Growth Regulation**. DOI 10.1007/s00344-009-9094-7, 2009.
- FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. *Programas e Resumos...* São Carlos: UFScar. p. 235, 2000.
- FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.
- FRIBERG, H.; LAGERLÖF, J.; RÄMERT, B. Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 690-695, 2006.
- KWANGHOON, C.; YI, Y.; LEE, S.; KANG, K.; LEE, E.; HONG, S.; YOUNG, J. PARK, Y.; CHOI, G.J.; KIM, B.J.; LIM, Y. Microorganisms against *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 873-877, 2007.
- McDONALD, M.R.; KORNATOWSKA, B.; McKEOWN, A.W. Management of clubroot of asian brassica crops grown on organic soils. **Acta Horticulture**, v. 635, p. 25-30, 2004.
- MURAKAMI, H., TSUSHIMA, S., KUROYANAGI, Y., SHISHIDO, Y. Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 48, p. 685-691, 2002.
- MURAKAMI, H.; KUROYANAGI, Y.; TSUSHIMA, S.; SHISHIDO, Y. Effects of application of organic materials on the development of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Microorganisms**, v. 63, n. 1p. 3-8, 2009.
- MYERS, D.F., CAMPBELL, R.N. Lime and the control of clubroot of crucifers: effects of pH, calcium, magnesium, and their interactions. **Phytopathology**, v. 75, p. 670-673, 1985.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S., HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285-290, 2005.

NARISAWA, K.; OHKI, T.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot and *Verticillium* yellows in Chinese cabbage in the field by the endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, **Plant Pathology**, v. 49, p.141-146. 2000.

NIWA, R.; KUMEI, T.; NOMBRA, Y.; YOSHIDA, S.; OSAKA, M.; EZAWA, T. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes supresión of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p.778-785, 2007.

PEREIRA, J.C.R.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; CHAVES, G.M. Compostos orgânicos no controle de doenças de plantas. **Review Annual Plant Pathology**, v. 4, p. 353-379, 1996.

PITT, D.; TILSTON, E.L.; GROENHOF, A. Recycled organic materials (ROM) in the control of plant disease. **Acta Horticulture**, v. 469, p. 391-469, 1998.

SCHUTA, L.R. Boro, nitrogênio, concentração de inóculo e pH na expressão da doença causada por *Plasmodiophora brassicae*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. 103p. 2003.

UESUGI, C.H.; TOMITA, C.K. Murcha bacteriana. **Revista Cultivar HF**, Pelotas, ano 2, n.11, p.12-14, dez. 2001/ jan.2002.

WALLENHAMMAR, A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**, v. 45, p. 710-719, 1996.

WEBSTER, M.A., DIXON, G.R. Calcium, pH and inoculum concentration infuencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. **Mycological Research**, v. 95, n. 1, p. 64–73, 1991.

WILLIAMSON, C.J.; DYCE, P.E. The effect of calcium cyanamide on the reaction of swede cultivars to population of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 38, p. 230-238, 1989.

WIMALAJEA, D.L.S. Field investigations on the control of clubroot of cabbage in Sri Lanka. **Annual Applied Biological**, v. 79, p. 321-327, 1975.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA DIVERSIDADE BACTERIANA NA SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM BRÓCOLIS

RESUMO

Os compostos orgânicos são fonte de biomassa, matéria orgânica e nutrientes, e após aplicações consecutivas no solo podem manter ou alterar a população microbiana. Em experimento realizado em casa de vegetação, as comunidades bacterianas de solos sob sistemas de produção orgânica, convencional e integrada com quatro incorporações consecutivas de fertilizantes orgânicos e minerais foram comparadas. A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada utilizando análise multivariada de perfis de bandas gerados por PCR-DGGE de solos referentes às classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, além dos grupos das Actinobacterias e do domínio Eubacteria. Os perfis de PCR-DGGE obtidos com o uso de *primers* universais foram avaliados por meio de dendrograma que mostrou diferenças entre o grupo dos compostos orgânicos e o grupo de fertilizante mineral. A Análise de Componentes Principais (PCA) além de mostrar diferenças nos perfis de comunidades de bactérias totais entre os fertilizantes orgânicos e minerais mostrou também entre os compostos orgânicos utilizados. Os mesmos fertilizantes causaram pouca variação na comunidade biológica dos diferentes sistemas de produção. Foi também comprovado, pela PCA, que as alterações nas comunidades bacterianas totais são determinadas mais intensamente pelo fertilizante incorporado ao solo do que pela alteração do sistema de produção. Os solos orgânico e integrado exibiram a mesma estrutura do perfil de DGGE da comunidade bacteriana total antes e depois da fumigação com brometo de metila. O CBL apresentou maiores valores de índice de riqueza para todos os grupos bacterianos específicos, inclusive para o domínio Eubacteria, diferindo significativamente do controle. Não houve diferenças significativas no índice de riqueza entre os sistemas de produção para o domínio Eubacteria e para os grupos específicos. Porém, houve diferenças entre o índice de riqueza para as comunidades bacterianas nos solos tratados com diferentes compostos orgânicos. Os solos adubados com CBL resultaram em altos índices de riqueza de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e *Pseudomonas* e baixos índices de doença.

Palavras-chave adicionais: Bokashi, sistemas de produção, microbiologia, índice de riqueza, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INFLUENCE OF THE BACTERIAL DIVERSITY IN THE SEVERITY OF THE CLUBROOT IN BROCCOLI

ABSTRACT

The organic compounds are source of biomass, organic matter and nutrients, and further applications consecutives in the soil can maintain or change microbial population. In an experiment conducted under greenhouse, the bacterial communities in soils under organic production systems, conventional and integrated with four consecutive incorporations of organics and minerals fertilizers were compared. The bacterial community structure was evaluated using multivariate analysis of profiles of bands generated by PCR-DGGE of soil for the classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, and of groups of Actinobacteria and Eubacteria. The PCR-DGGE profiles, obtained with the use of universal primers were evaluated by a dendrogram that showed differences between the group of organic compounds and the group of mineral fertilizer. The Principal Components Analysis (PCA) in addition to showing differences in the profiles of communities of total bacteria between the organic and mineral fertilizers systems also showed differences between the organic compounds used. The same fertilizers caused little change in the biological community of the different production systems. PCA has also evidenced that changes in total bacterial communities are determined more strongly by the fertilizer into the soil than by changing the production system. The organic and integrated soils exhibited the same structure of the DGGE profile of the total bacterial community before and after fumigation with methyl bromide. The CBL had higher index of richness for all the specific bacterial groups, including for the domain Eubacteria, differing significantly from control. There were no significant differences in the index of richness between production systems for the domain Eubacteria and for specific groups. However, were differences between the index of richness to the bacterial community in the soils incorporated with differents compounds organic. The soils fertilized with CBL had high index of richness of Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and *Pseudomonas* and low index of disease.

Additional Keywords: Bokashi, farming system, microbiology, richness index, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica oleracea* var. *italica*.

INTRODUÇÃO

Os fertilizantes orgânicos e inorgânicos são usados primariamente para aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, porém tais produtos podem afetar os microrganismos do solo. Os compostos orgânicos são incorporados ao solo como fonte de biomassa, matéria orgânica e nutrientes e, após aplicações, podem manter ou alterar a população microbiana do solo no campo ou sob condições controladas. Estes compostos podem reduzir a severidade de doenças de plantas e promover a fertilidade do solo (El-Din, *et al.*, 2000), e podem também interagir direta ou indiretamente com as plantas, afetando o crescimento, florescimento e a resistência a doenças e pragas. (Roe *et al.*, 1997).

O funcionamento do ecossistema do solo é governado em grande parte pela dinâmica de sua população microbiana, a qual é fortemente influenciada pelos distúrbios a que o solo é submetido. Estes organismos têm importantes funções na sustentabilidade de todo o ecossistema, incluindo reciclagem de nutrientes, degradação da matéria orgânica, seqüestro de carbono, modificação na estrutura física do solo e regimes de água, além do aumento na eficiência de aquisição de nutrientes (Coleman *et al.*, 1978). Mudanças na comunidade microbiana podem ser utilizadas para prever os efeitos das perturbações do ecossistema causadas por práticas de manejo orgânico e convencional (Bending *et al.*, 2000; Poudel *et al.*, 2002; van Bruggen e Semenov, 2000).

Atualmente pouco é o conhecimento sobre o impacto da adição de compostos orgânicos na estrutura e diversidade da comunidade microbiana (Cherif *et al.*, 2007), o que tem ocasionado o aumento de interesse da pesquisa nesta área. Entretanto, tem sido difícil avaliar a maioria dos

microrganismos do solo, devido a deficiências existentes na técnica comum de isolamento (Hjort *et al.*, 2007).

A técnica comum de isolamento é limitada pela dependência de características fenotípicas da composição e diversidade da população microbiana que só podem ser avaliadas após o cultivo. E associado a isto, apenas uma mínima proporção da comunidade habitante do solo pode ser cultivada em laboratório (Mazzola, 2004). Então, há o interesse no desenvolvimento de outros métodos para identificar microrganismos habitantes do solo, de maneira independente do cultivo.

A caracterização dos microrganismos não-cultiváveis com o auxílio de métodos moleculares tem sido amplamente utilizada, e tem como base a seqüência de DNA, que é a ferramenta necessária para identificar e conhecer suas funções e distribuição no ecossistema do solo. Técnicas moleculares tais como gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) possibilitam a rápida análise de múltiplas amostras ambientais bem como a obtenção de informações para identificar os ribotipos individuais na comunidade microbiana por clonagem e sequenciamento das bandas selecionadas do gel. As análises dos grupos taxonômicos podem ser feitas pelo uso de *primers* com genes da região 16S rRNA de táxons específicos durante a amplificação da comunidade do DNA (Berg, *et al.*, 2002, Berg, *et al.*, 2006).

O método de gel de eletroforese em gradiente desnaturante usando o 16S rDNA é comumente utilizado para uma comparação direta da diversidade estrutural entre diferentes comunidades microbianas. Esse método de detecção de microrganismos, sem necessariamente cultivá-los, certamente contribuirá para inferências sobre a significância dos mesmos no solo.

Muitos autores mostraram a eficiência da técnica do DGGE para detectar mudanças na diversidade microbiana e na estrutura de sua respectiva comunidade ocasionadas por práticas agrícolas (Seghers *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004), contaminações com metais pesados (Li *et al.*,

2005), flutuações sazonais (Smit *et al.*, 2001), temperatura (Norris *et al.*, 2002) e tamanho das partículas de solo (Sessitsch *et al.*, 2001). Outros estudos indicam que o tipo e o aumento da matéria orgânica presente no solo influenciam fortemente a atividade (Elliott e Lynch, 1994) e a diversidade microbiana (Girvan *et al.*, 2003, Grayston *et al.*, 2004), bem como a densidade de *Pseudomonas* fluorescentes, bactérias patogênicas, fungos e nematóides (Abawi e Widmer, 2000).

Em função dos resultados de supressão da hérnia das crucíferas pelos compostos orgânicos avaliados, um estudo molecular com os solos incorporados com estes compostos é necessário para compreender os fatores bióticos que regulam estes compostos e, com o aumento de interesse em práticas ambientais sustentáveis, é necessário avaliar como os diferentes regimes podem afetar diretamente a comunidade bacteriana do solo.

Estudos têm examinado o perfil da microbiota de solos manejados organicamente comparado com solos similares sob manejo convencional (Elmholt 1996; Lundquist *et al.* 1999). Enquanto alguns estudos indicam que a prática orgânica é benéfica para o número, processos e atividades da comunidade microbiana, outros concluem que o manejo orgânico não tem nenhum impacto nos microrganismos do solo.

Impactos positivos do manejo orgânico na comunidade microbiana do solo foram notados por Sivapalan *et al.* (1993) que monitorou populações de microrganismos de solos durante a conversão de um sistema convencional de produção vegetal para um orgânico. Eles concluíram que os microrganismos foram mais numerosos e diversos no sistema de produção orgânica do que no convencional.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e estrutura da comunidade bacteriana em solos sob sistemas de produção orgânica, integrada e convencional, com a

incorporação de compostos orgânicos por meio da técnica do DGGE, para determinar os efeitos dos compostos orgânicos na comunidade de Eubacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e *Pseudomonas* em relação à supressão da hérvnia das crucíferas.

MATERIAL E MÉTODOS

Características dos solos e compostos

Os experimentos foram conduzidos em três solos com históricos de produção orgânica, convencional e integrada. O solo do sistema de produção orgânica (SO) foi coletado de áreas do Centro de Produção de Agricultura Natural/ABAS – Brazlândia-DF, com dez anos de manejo sob sistema de agricultura natural, rotação de cultura e uso de compostos orgânicos para garantir a produtividade e controle das doenças. O solo manejado convencionalmente (SC) foi da Estação Biológica da Universidade de Brasília com um histórico de no mínimo 20 anos de uso de fertilizantes sintéticos, pesticidas e fumigantes. O solo do sistema de produção integrado (SI) foi coletado de um cultivo comercial de brócolis, com no mínimo cinco anos de monocultura e uso de pesticidas, e fertilizantes sintéticos e orgânicos, localizado no Núcleo Rural de Brazlândia no Distrito Federal.

Os compostos orgânicos utilizados nos três sistemas de produção estudados foram o Composto Bioativo Sólido (CBS) e o Composto Bioativo Líquido (CBL). O CBS continha terra virgem, composto, resíduo de leguminosas, farelo de arroz, farinha de osso, cinza, farelo de mamona, rapadura, amido de milho, fubá e água. Sua composição químico-orgânica foi constituída de 3,6% de N; 18% de P₂O₅; 4,2% de K₂O; 8% de Ca; 3% de Mg; 1,2% de S e pH

7,6. O CBL foi constituído de capim elefante, composto, farelo de mamona, farelo de trigo, farinha de osso, cinza, rapadura, farelo de arroz, amido de milho e água. E a sua composição químico-orgânica foi constituída de 0,024% de N; 0,043% de P₂O₅; 0,2% de K₂O; 0,24% de Ca; 0,13% de Mg; 0,1% de S; 0,5% de matéria orgânica, 98,5% de umidade; 1% de matéria mineral, e 4,8 o pH.

Extração do DNA total

O DNA total foi extraído de amostras de solos manejados de forma convencional, integrada e orgânica com a incorporação dos seguintes tratamentos: 1) 200 g de CBS; 2) 200 mL de CBL; 3) 100 mL de CBL + 20 g de NPK; 4) 100 mL de CBL + 100 g de CBS e 5) 40 g de NPK. Para extração do DNA foi utilizado *MoBio UtraClean™ soil DNA kit* (MoBio Laboratories, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA foi extraído de aproximadamente 0,5 g de cada solo com cada tratamento. Todos os DNAs extraídos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) em tampão TAE 1X. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e observado em luz-ultravioleta.

Obtenção dos perfis de DGGE

O perfil da composição total da comunidade bacteriana (cultiváveis e não cultiváveis) encontrada nas amostras de solos incorporados com diferentes fertilizantes orgânicos e químicos, sob diferentes sistemas de produção foi determinado por meio da aplicação da técnica do DGGE, acessando a diversidade de bactérias do domínio Eubacteria e das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, além dos grupos de Actinobacteria e *Pseudomonas*.

Primeiramente uma reação de PCR foi realizada contendo 1 µL da amostra de DNA extraído (5-10 ng) com os oligonucleotídeos universais para o domínio Eubacteria e seletivos

para os grupos Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria e, *Pseudomonas*. A primeira reação de amplificação foi realizada com os *primers* universais para o domínio Eubacteria (U968 e R1387) (Tabela 4.1). As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o primer 1492R. Para Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, os oligonucleotídeos AlphaU e Beta-2 foram utilizados, conforme Tabela 4.1. (Gomes *et al.*, 2001) combinados com o primer universal 1492R. Os *primers* seletivos para Actinobacteria (Heuer *et al.*, 1997), e *Pseudomonas* spp. (Garbeva *et al.*, 2004) foram utilizados conforme descrito pela literatura.

As reações de PCR foram realizadas em volume de 50 μ L, contendo 0,5 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e os seguintes reagentes: 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ L de cada primer, tampão 1 X, 0,5 μ L de soro de albumina bovina (BSA 10 mg/mL) e 1 μ L de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar os ciclos de acordo com os grupos selecionados:

a) Domínio Bacteria, uma desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos por meio de três etapas: desnaturação por 20 s a 94 °C; anelamento a 53 °C por 40 s, e extensão de oligonucleotídeos a 72 °C por 40 s, seguida de extensão final a 72 °C por 7 min;

b) Actinobacteria, desnaturação inicial de 4 min a 94 °C seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 58 °C, 2 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por 10 min;

c) *Pseudomonas*, desnaturação inicial de 7 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 63 °C, 2 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por 10 min;

d) Alphaproteobacteria, desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C, 1 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por 10 min e;

e) Betaproteobacteria, desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 5 min a 94 °C; 1 minuto e 30s a 61 °C, 2 min a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, 5 µL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%, a 3 volts/ cm em tampão TAE 1X, juntamente com o marcador de peso molecular *DNA Ladder* 1000 pb para a observação dos fragmentos desejados. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ mL) e fotodocumentado em luz ultravioleta.

O produto de amplificação dos grupos acessados foi utilizado como DNA molde na segunda reação de PCR para amplificação com os *primers* para DGGE. Estas reações foram realizadas em volume de 50 µL contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 400 nM de cada primer universal U968-GC e R1387, utilizando 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 56 °C. O produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão TAE 1 x, com posterior coloração em solução de brometo de etídeo (1,0 mg/L) e visualização sob luz ultra-violeta.

O DGGE foi realizado conforme Heuer *et al.* (1997) com equipamento phorU2 system (Ingeny, Goes, Holanda). O produto de amplificação da segunda reação foi aplicado em gel de poliacrilamida (6,0% p/v) em tampão TAE 1x. Este gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% (onde 100% de desnaturação significa concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida).

Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 16 h, a 100 V à temperatura de 60 °C e, posteriormente, corados por 1 h com SYBR Gold (diluído 1:1.000) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotografado sob luz ultra-violeta.

Análise dos perfis de DGGE

O programa *GelCompar II* (Applied Math, Bélgica) foi utilizado para normalização, conversão e comparação das imagens em matrizes de presença/ausência de bandas. A normalização e a seleção de bandas feitas pelo programa foram cuidadosamente avaliadas e correções manuais foram feitas quando necessárias. Uma tabela contendo a posição das bandas de cada amostra foi exportada para análises posteriores.

As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies. Para identificar a ocorrência preferencial de determinadas espécies nos diferentes solos e fertilizantes avaliados, análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o programa Canoco 4.5. As tabelas exportadas do programa *GelComparII* foram utilizadas como dados de ocorrência de espécies.

A diversidade da comunidade bacteriana representada pelo índice de riqueza foi medida pelo número de bandas obtidas, a partir dos perfis de DGGE gerados por meio de *primers* universais e de *primers* específicos para Betaproteobacteria, *Pseudomonas*, Actinobacteria e, Alfabroteobacteria.

Os dados utilizados para a construção do modelo de regressão linear foram extraídos a partir do índice de riqueza da comunidade bacteriana total e de grupos específicos e, do índice de hénria das crucíferas obtido de solos incorporados com diferentes compostos orgânicos.

TABELA 4.1 – *Primers* usados para diferentes alvos de amplificação a partir do DNA de isolados de amostras de solos.

Primers	Seqüências (5' →3')	Alvo	Referência
R1387	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Gene 16S DNAr bacteriano	HEUER <i>et al.</i> , 1997
U968-CG	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACG GGGGG-CGA ACG CGA AGA ACCTTAC	Gene 16S DNAr bacteriano – análise de DGGE	HEUER <i>et al.</i> , 1997
Alpha-U	CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT	16S das Alphaproteobacterias	GOMES <i>et al.</i> , 2001
Beta-2	CGC ACA AGC GGT GGA TGA	16S das Betaproteobacterias	GOMES <i>et al.</i> , 2001
F243	GGA TGA GCC CGC GGC CTA	16S de Actinobacterias	HEUER <i>et al.</i> , 1997
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT 3'- AAGTCGTAACAAGGTAACC	Universal	STACKEBRANDT <i>et al.</i> , 1993

RESULTADOS

A composição da comunidade bacteriana total foi analisada. Os perfis de PCR-DGGE de extratos de DNA de amostras de solos tratados com compostos orgânicos e fertilizantes minerais de cada sistema de produção foram gerados e comparados por análises de componentes principais e dendrogramas, no qual o agrupamento foi baseado na correlação de Pearson, que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade.

Os perfis que refletem a composição da comunidade bacteriana são mostrados na figura 4.1. Os perfis bacterianos de todos os tratamentos foram altamente complexos e houve alterações nos perfis de bandas de acordo com os tratamentos de incorporação de fertilizantes. A mais marcante foi a emergência de duas bandas (A, B) no perfil de DGGE com a adição do NPK isoladamente, e com o tratamento CBL + NPK no solo, e a presença da banda C nos tratamentos com a adição de compostos orgânicos e ausente nos tratamentos com a aplicação do NPK isoladamente (Figura 4.1).

Os mesmos fertilizantes causaram pouca variação na comunidade biológica dos diferentes sistemas de produção, e diferentes fertilizantes adicionados nos mesmos sistemas de produção causaram diferentes efeitos. Os solos orgânico e integrado exibiram a mesma estrutura do perfil de DGGE da comunidade bacteriana total antes e depois da fumigação com brometo de metila (Figura 4.1)

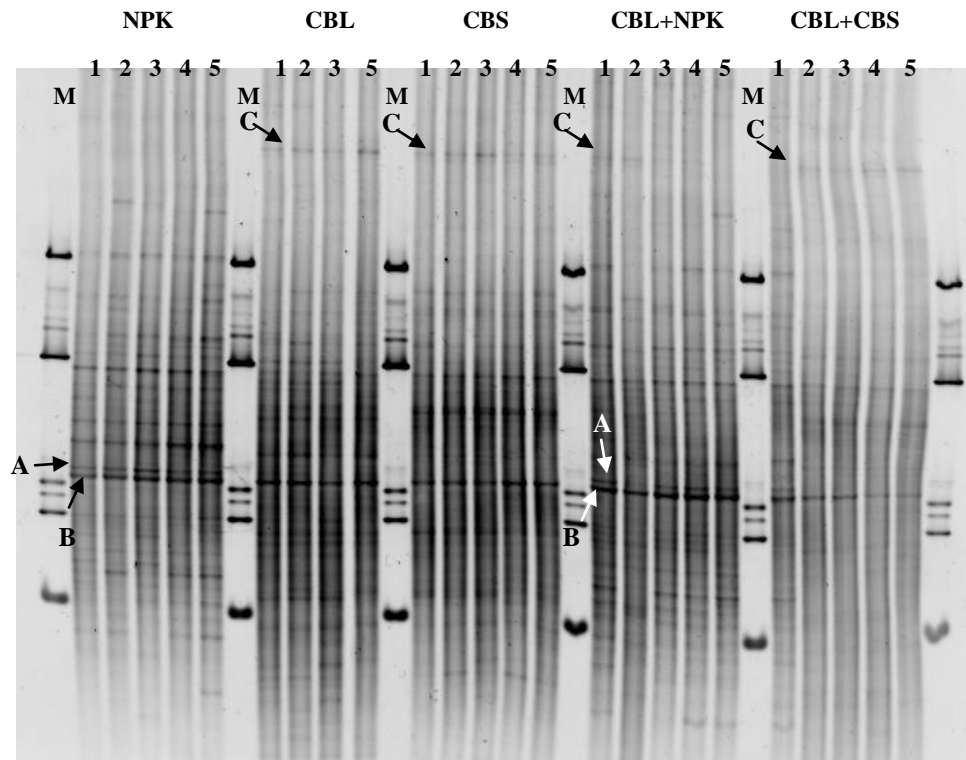


FIGURA 4.1 - Impacto dos compostos orgânicos no perfil da comunidade bacteriana total do solo avaliada pela técnica do DGGE. Legenda: Fertilizantes (Composto Bioativo Sólido – CBS; Composto Bioativo líquido – CBL e NPK – Nitrogênio, Fósforo e Potássio); Solos (1 – Solo Integrado (SI); 2 – Solo Orgânico (SO); 3 – Solo Integrado brometado (SIBr); 4 – Solo Orgânico Brometado (SOBr); e 5 – Solo Convencional (SC)).

Na análise do dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson (Figura 4.2), e considerando as amostras dos tratamentos com fertilizantes, é claramente observada a separação de dois grupos distintos, sendo o primeiro deles formado por amostras de solos incorporados com os compostos orgânicos, CBL, CBS e CBL + CBS (< 50% de similaridade entre si), e o segundo formado por amostras de solos incorporados com os tratamentos com NPK e CBL + NPK (< 60% de similaridade entre si) (Figura 4.2).

Uma análise de componentes principais dos mesmos dados foi realizada, e também, com o vetor índice de doença hérnia das crucíferas, tendo-se observado que os compostos diferiram em sua habilidade de suprimir a doença, confirmando os resultados de campo.

Os primeiros dois eixos da PCA explicaram 68,3 e 31,7% da variação de supressividade da doença nos compostos, respectivamente. Os tratamentos com fertilizantes (representados por bolas coloridas na figura 4.3) que estão distantes da origem, isto é, NPK, CBS, CBL e CBL + NPK tiveram uma maior variação na supressividade, enquanto o CBL + CBS, que está próximo da origem, mostrou relativamente uma baixa variação na supressividade da doença. Houve o aparecimento de cinco grupos, ou seja, uma diferenciação entre todos os tratamentos estudados.

Os resultados obtidos com o uso do *primer* universal correspondem com os obtidos no campo, pois o vetor índice de hérnia das crucíferas está no quadrante do NPK, que no campo estimulou o aumento da doença em 90%, quando comparado com o CBL, mostrando que a composição da comunidade microbiana presente no tratamento com NPK foi condutiva à doença (Figura 4.3).

De maneira geral a análise do DGGE do perfil da comunidade bacteriana total mostrou o efeito da incorporação de fertilizantes, demonstrando que as alterações observadas estão relacionadas com a incorporação de compostos orgânicos no solo. Foi também comprovado pela PCA que as alterações nas comunidades bacterianas são determinadas mais intensamente pelo fertilizante incorporado ao solo do que pela alteração do sistema de produção.

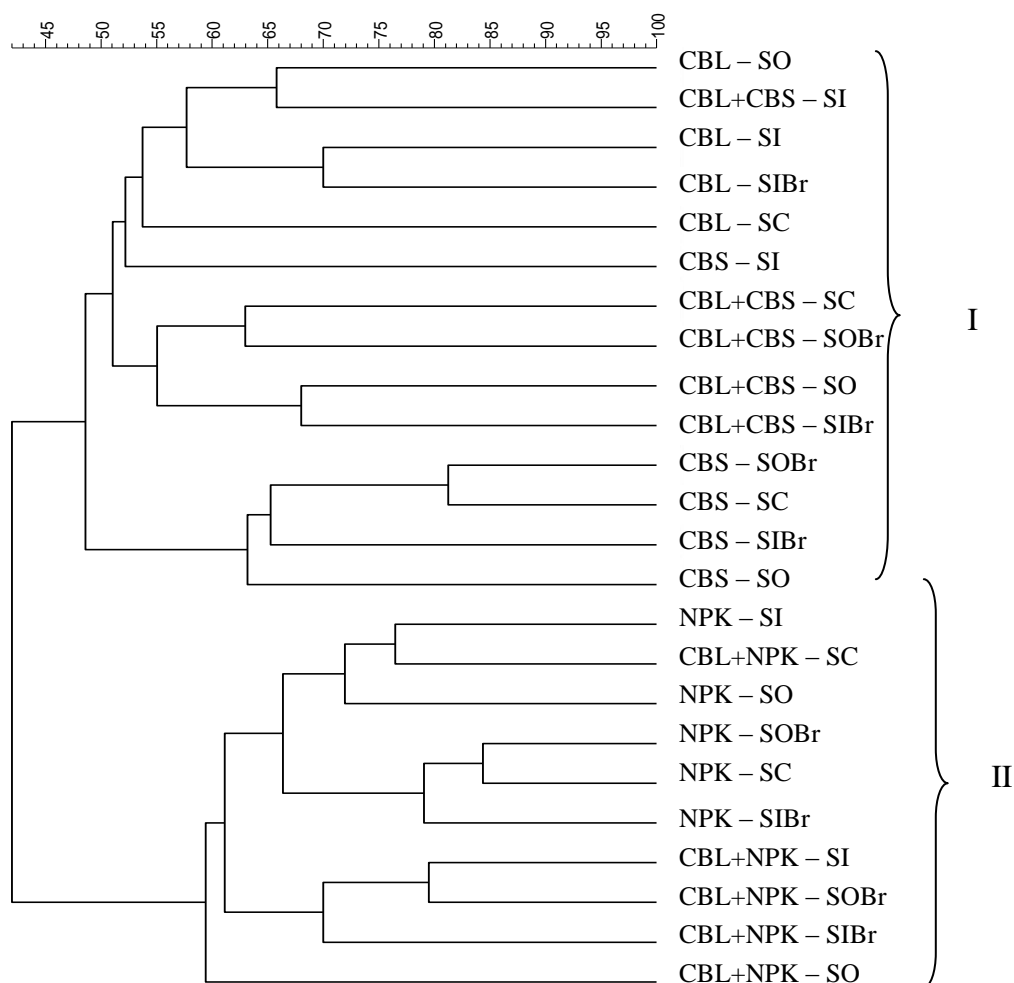


FIGURA 4.2 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de solos incorporados com diferentes fertilizantes e sob diferentes sistemas de produção. O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento. **Legenda:** As letras antes do hífen indicam os tratamentos com os fertilizantes e depois do hífen indicam os sistemas de produção (SI – Solo Integrado; SO – Solo Orgânico; SC – Solo Convencional; SIBr – Solo Integrado brometado; SOBr – Solo Orgânico Brometado).

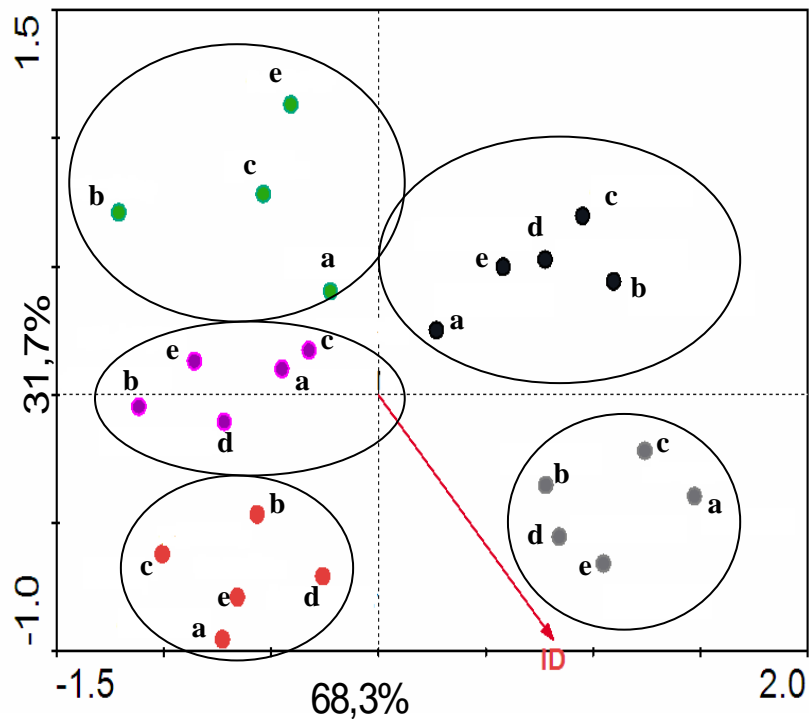


FIGURA 4.3 - Análise de componentes principais (PCA) baseada nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de solos incorporadas com diferentes fertilizantes. Grupos bacterianos componentes da comunidade total do solo foram acessados por meio de *primers* universais. A seta vermelha representa o índice da doença hérnia das crucíferas. Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos. **Legenda:** As cores representam os fertilizantes (Verde – CBL; roxo – CBL + CBS; vermelho – CBS; preto – CBL + NPK e cinza – NPK) e as letras os sistemas de produção (a – Solo Orgânico, b – Solo Convencional, c – Solo Integrado, d – Solo Orgânico Brometado, e – Solo Integrado brometado).

Para reduzir a complexidade dos perfis de DGGE gerados com uso de *primers* universais e para analisar grupos taxonômicos específicos que são conhecidos por serem frequentemente envolvidos em atividades antagônicas a fitopatógenos, perfis de Alphaproteobacteria,

Betaproteobacteria, *Pseudomonas* e Actinobacteria foram gerados. Os perfis obtidos para os grupos bacterianos foram analisados por PCA (Figuras 4.4 A, B, C e D).

Nas amostras de solos, a população de Alphaproteobacteria mostrou-se similar nos tratamentos com a incorporação de CBL+NPK e CBL+CBS, tanto no eixo X como Y, onde 51,8% e 48,2% da variância é explicada, respectivamente. A população de Alphaproteobacteria presente nos solos integrado (c; e), incorporados individualmente com CBL, foi similar com a população presente no NPK. Entretanto, quando este composto foi associado com o CBS (CBL+CBS) no mesmo solo integrado (c; e), a população de Alphaproteobacteria foi diferente do NPK, no eixo X com 51,8% da variância explicada (Figura 4.4 A). A população de Alphaproteobacteria presente nas amostras de solos fertilizados com NPK, e principalmente o CBS não foram antagônicas ao patógeno, permitindo o aumento do índice de hérnia das crucíferas.

O uso do *primer* específico para Betaproteobacteria revelou o efeito muito positivo deste grupo na hérnia das crucíferas, pois a população de Betaproteobacteria presente nas amostras de solos fertilizadas com NPK e CBL+NPK se separam das demais amostras pelo eixo X do gráfico, onde 64,2% da variância é explicada, mostrando serem condúctivas ao patógeno, visto que, o índice da doença cresceu em direção a estes fertilizantes. Além disso, esta mesma população presente no NPK se diferenciou das demais amostras pelo eixo Y do gráfico, onde 35,8% da variância é explicada (Figura 4.4 C).

A separação entre os fertilizantes foi menor para as populações de *Pseudomonas* e Actinobacteria. A população de *Pseudomonas* de todos os fertilizantes analisados apresentaram uma diversidade muito grande, pois foram plotadas em diferentes quadrantes do gráfico, com exceção das amostras de solos incorporadas com CBL + CBS, onde sua presença foi constante no

eixo X (74,8% da variância). A população de *Pseudomonas* presente nas amostras de NPK foram antagonicas ao patógeno, com 25,2% de variância.

Na análise da população de Actinobacteria não foi possível observar similaridades tanto dentro de cada tratamento, como entre os tratamentos com a incorporação de fertilizantes (Figura 4.4 D). Possivelmente, há uma tendência da população de Actinobacteria presente nos solos incorporados com CBL+CBS ser antagonica ao patógeno, com 57,8% da variância explicada no eixo X. Não foram observadas diferenças entre as populações dos grupos bacterianos específicos estudados com relação ao sistema de produção avaliado.

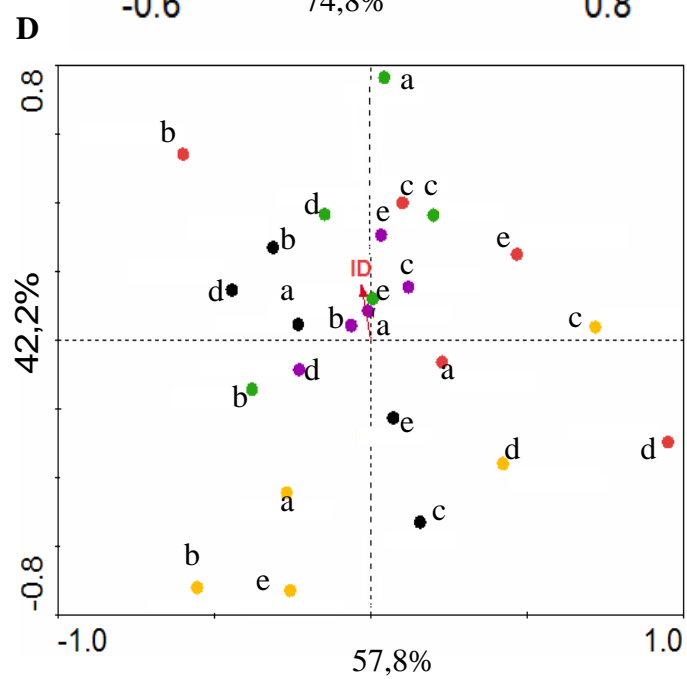
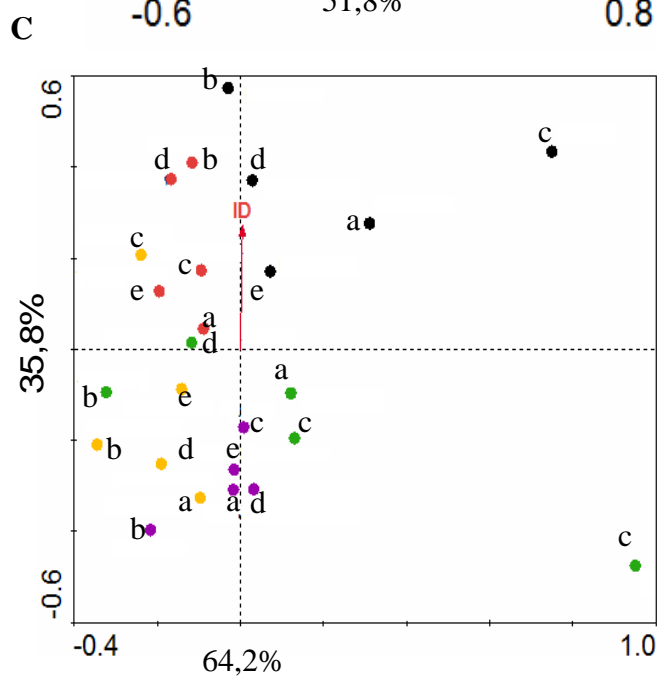
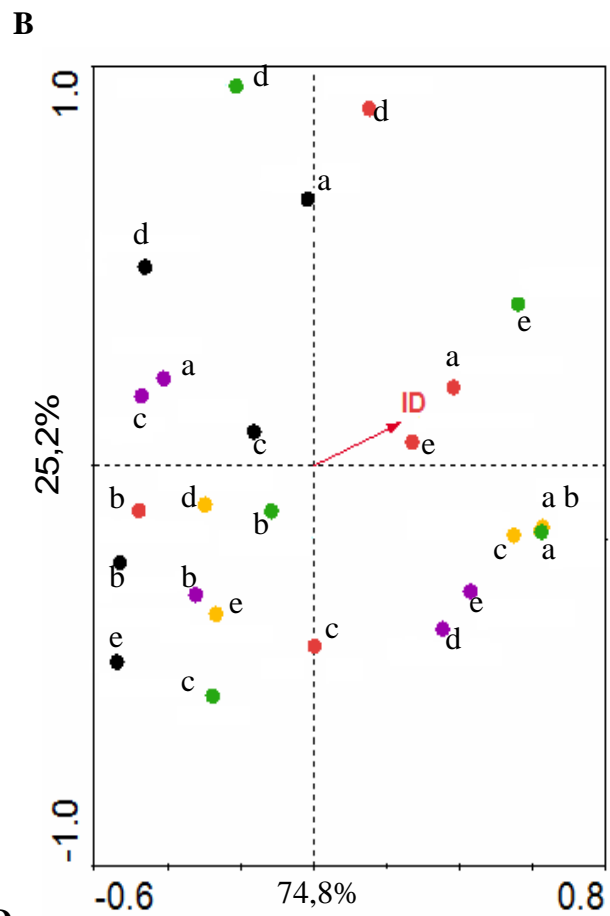
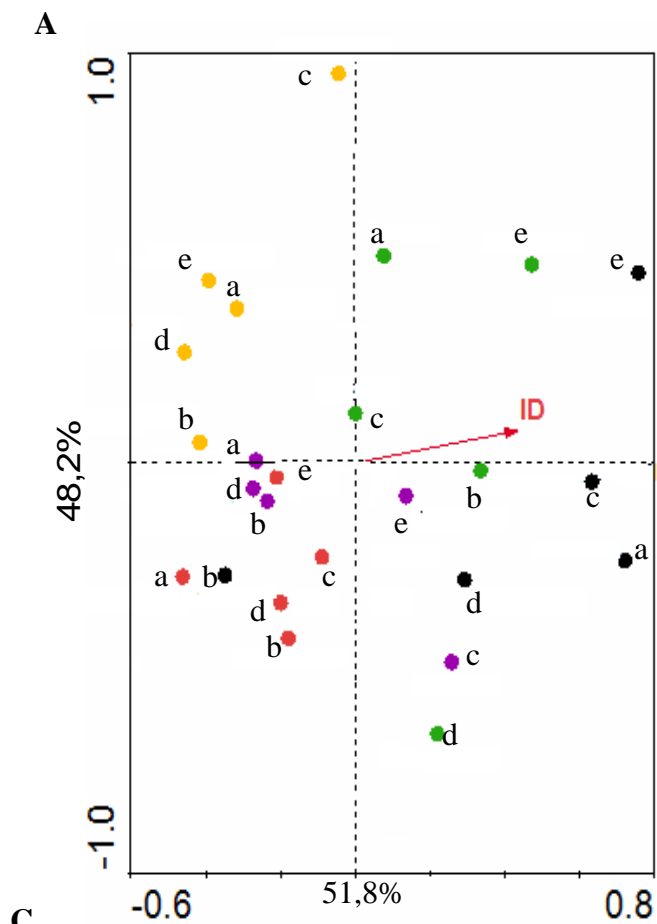


FIGURA 4.4 - PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de solos incorporados com diferentes fertilizantes e sob diferentes sistemas de produção. Grupos bacterianos componentes da comunidade total do solo foram acessados por meio de *primers* específicos para Alphaproteobacteria (A), *Pseudomonas* (B), Betaproteobacteria (C) e Actinobacteria (D). A seta vermelha representa o índice da doença hérnia das crucíferas. Os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos. **Legenda:** As cores representam os fertilizantes (Verde – CBS; roxo – CBL; vermelho – CBL + NPK; preto – NPK e amarelo – CBL + CBS) e as letras os sistemas de produção (a – Solo Orgânico, b – Solo Convencional, c – Solo Integrado, d – Solo Orgânico Brometado, e – Solo Integrado brometado).

A análise de DGGE permitiu avaliar a diversidade bacteriana dos solos incorporados com fertilizantes e sob diferentes sistemas de produção. Considerando as similaridades nos perfis de DGGE obtidos, foram construídos dendrogramas para cada um dos grupos bacterianos acessados Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria e *Pseudomonas*.

Com relação ao DGGE do grupo Alphaproteobacteria, o perfil de banda gerado revelou a formação de dois agrupamentos, que separam os tratamentos em que foram adicionados compostos orgânicos do tratamento controle, somente incorporação de NPK (Figura 4.5). O perfil de banda gerado pelo DGGE, utilizando oligonucleotídeos para acessar a população bacteriana formada pela classe Betaproteobacteria, demonstrou alta similaridade entre a população bacteriana presente nos solos incorporados com compostos orgânicos (Figura 4.6).

A análise de UPGMA dos perfis de DGGE do grupo de Actinobacteria mostrou similaridades entre os fertilizantes e sistemas de produção, não havendo claramente um forte agrupamento entre os tratamentos (Figura 4.7 A). Quando o *primer* específico para *Pseudomonas* foi utilizado, o perfil de banda gerado mostrou similaridades entre as populações bacterianas presentes em cada tratamento, havendo uma clara distinção entre o NPK e os demais tratamentos (Figura 4.7 B).

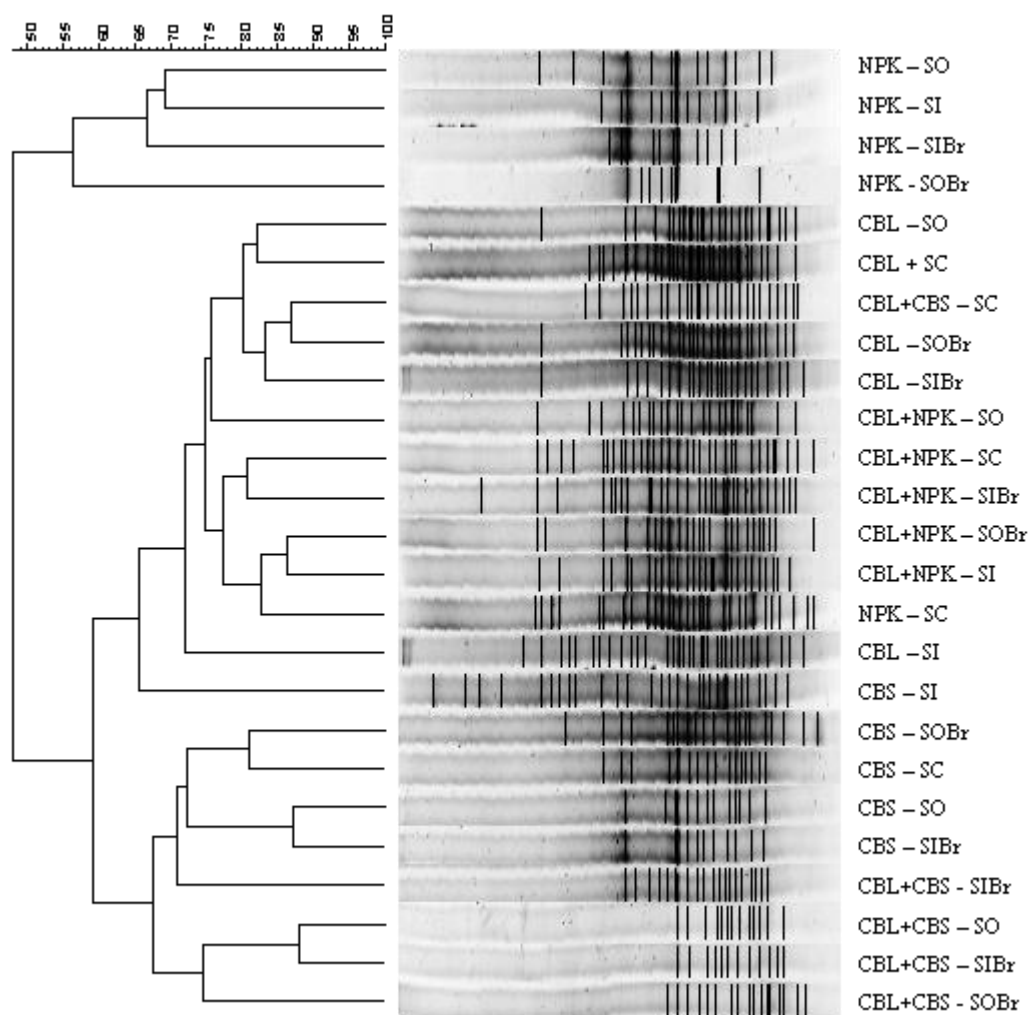


FIGURA 4.5 - Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Alphaproteobacteria. O agrupamento foi realizado por correlação de Pearson das curvas densitométricas das amostras, e o dendrograma foi determinado por UPGMA. **Legenda:** As letras antes do hífen indicam os tratamentos com os fertilizantes e depois do hífen indicam os sistemas de produção (SI – Solo Integrado; SO – Solo Orgânico; SC – Solo Convencional; SIBr – Solo Integrado brometado; SOBr – Solo Orgânico Brometado).

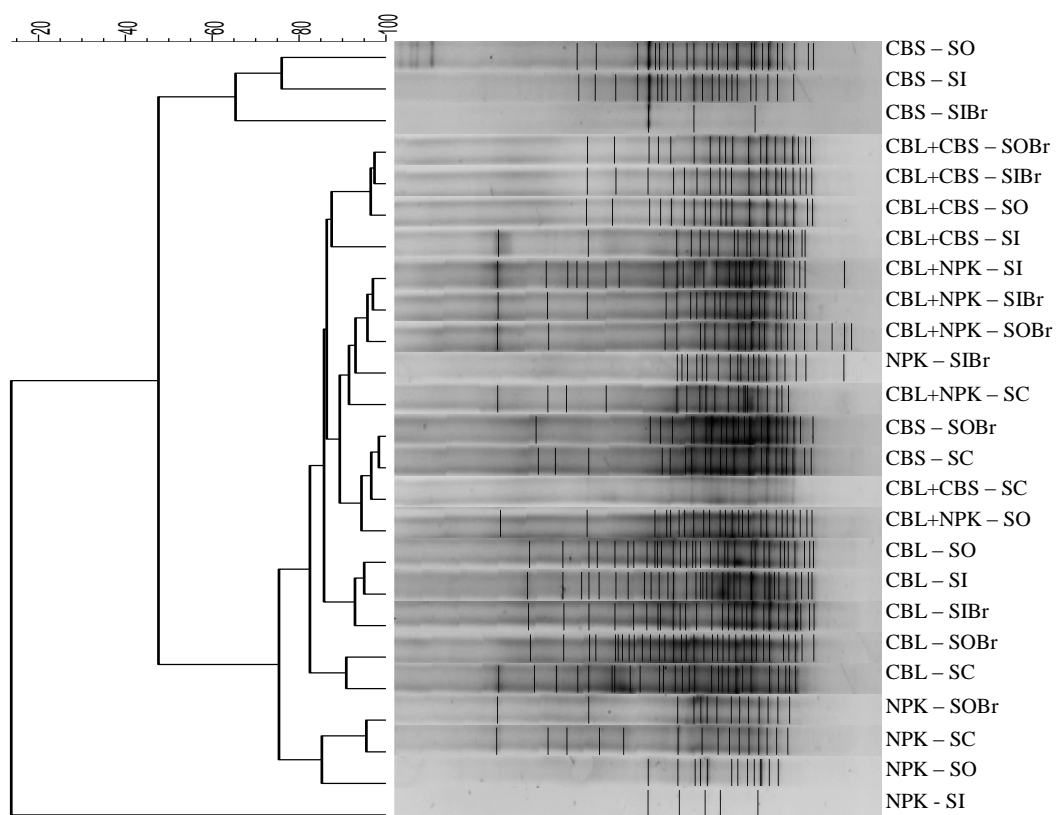


FIGURA 4.6 - Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Betaproteobacteria. O agrupamento foi realizado por correlação de Pearson das curvas densitométricas das amostras, e o dendrograma foi determinado por UPGMA. **Legenda:** As letras antes do hífen indicam os tratamentos com os fertilizantes e depois do hífen indicam os sistemas de produção (SI – Solo Integrado; SO – Solo Orgânico; SC – Solo Convencional; SIBr – Solo Integrado brometado; SOBr – Solo Orgânico Brometado).

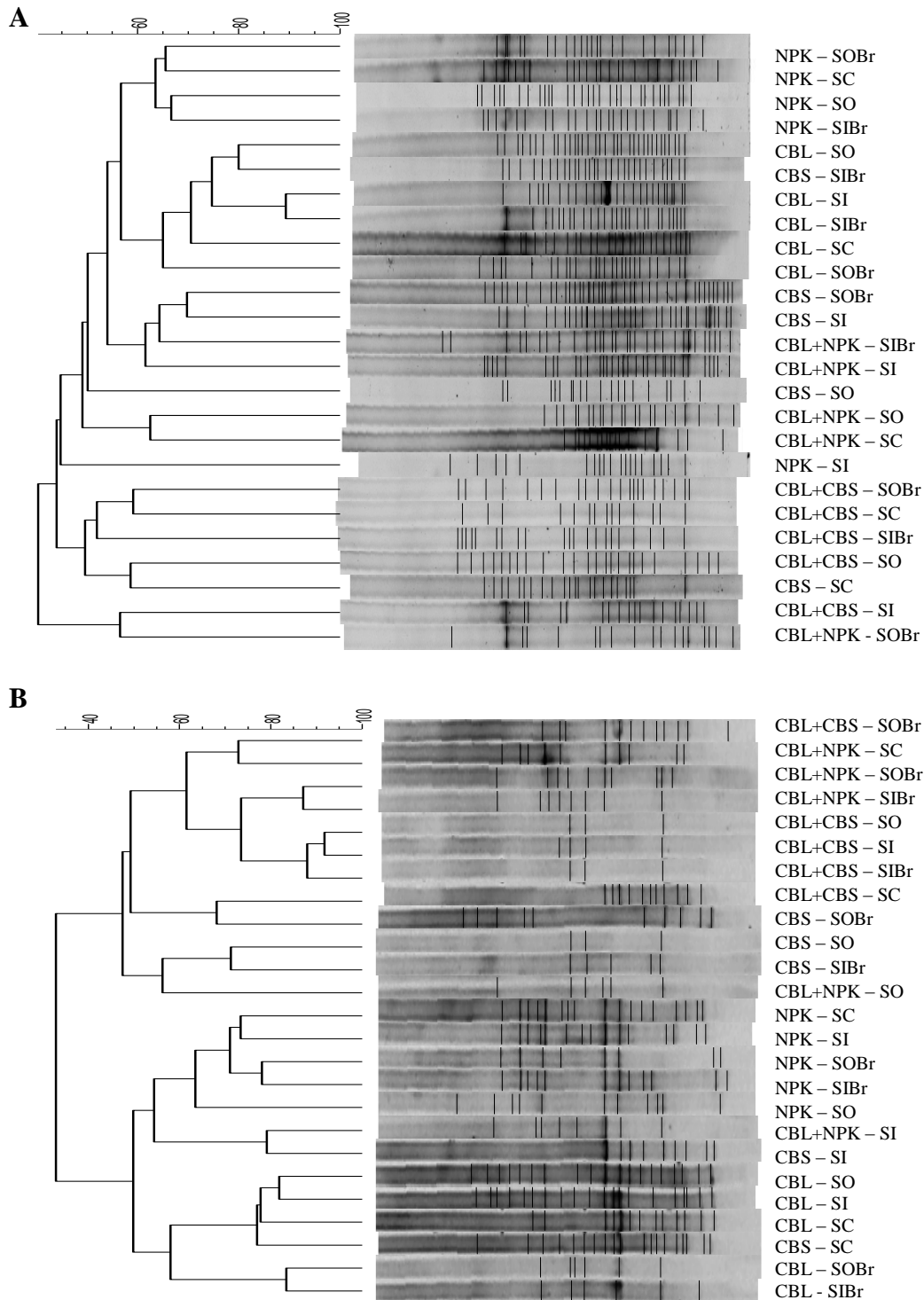


FIGURA 4.7 - Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com *primers* para o grupo Actinobacteria (A) e *Pseudomonas* (B). O agrupamento foi realizado por correlação de Pearson das curvas densitométricas das amostras, e o dendrograma foi determinado por UPGMA. **Legenda:** As letras antes do hífen indicam os tratamentos com os fertilizantes e depois do hífen indicam os sistemas de produção SI – Solo Integrado; SO – Solo Orgânico; SC – Solo Convencional; SIBr – Solo Integrado brometado; SOBr – Solo Orgânico Brometado.

A diversidade aparente representada pelo índice de riqueza, medido pelo número de bandas, foi obtido a partir dos perfis de DGGE gerados por meio de *primers* universais e de *primers* para grupos específicos de Betaproteobacteria, *Pseudomonas*, Actinobacteria e, Alfaproteobacteria (Figura 4.8).

Quando o índice de riqueza do fertilizante foi analisado, independentemente do sistema de produção, observou-se que o CBL apresentou maiores valores para todos os grupos bacterianos específicos, inclusive para o domínio Eubacteria, diferindo significativamente do controle (Figura 4.8 A).

Quando o índice de riqueza dos sistemas de produção foi analisado, independentemente do tipo de fertilizante utilizado, observou-se que não houve diferenças significativas entre os sistemas de produção para o domínio Eubacteria e todos os grupos específicos, com exceção para o grupo de *Pseudomonas*, onde o solo convencional apresentou maiores índices de riqueza, quando comparado com os demais (Figura 4.8 B).

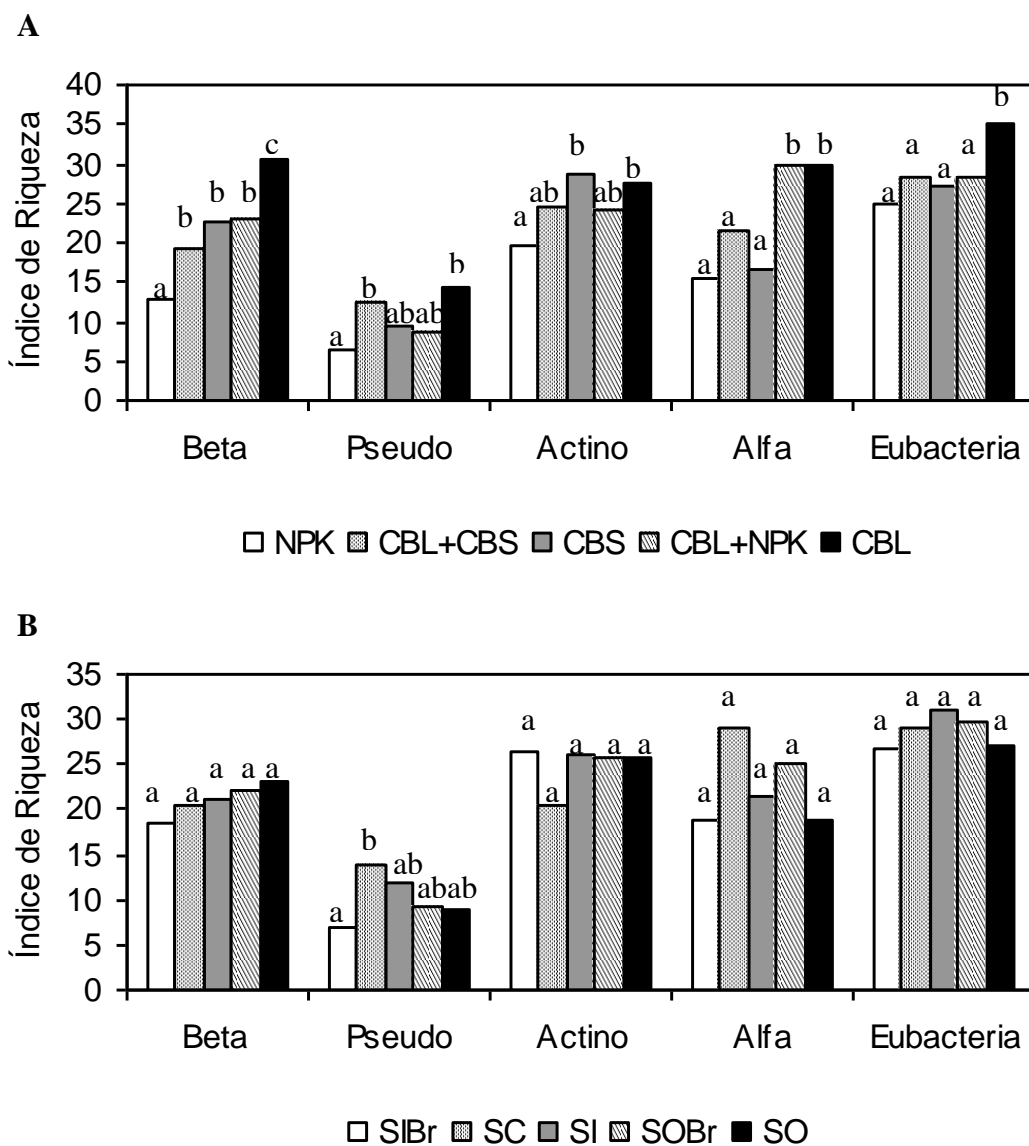


FIGURA 4.8 - Índice de riqueza baseado nos perfis de DGGE gerados por meio de *primers* universais e de *primers* para grupos específicos de Betaproteobacteria, *Pseudomonas*, Actinobacteria e, Alphaproteobacteria para os fertilizantes (A) e para os sistemas de produção (B). Legenda: SI – Solo Integrado; SO – Solo Orgânico; SC – Solo Convencional; SIBr – Solo Integrado brometado; SOBr – Solo Orgânico Brometado. Valores das médias seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Análise de regressão foi feita para examinar a relação entre o índice de hérnia das crucíferas e o índice de riqueza, obtido a partir do perfil de DGGE para o domínio Eubacteria. O índice de hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana foram negativamente correlacionados, ou seja, o índice da doença tendeu a diminuir com o aumento da diversidade bacteriana no solo (Figura 4.9).

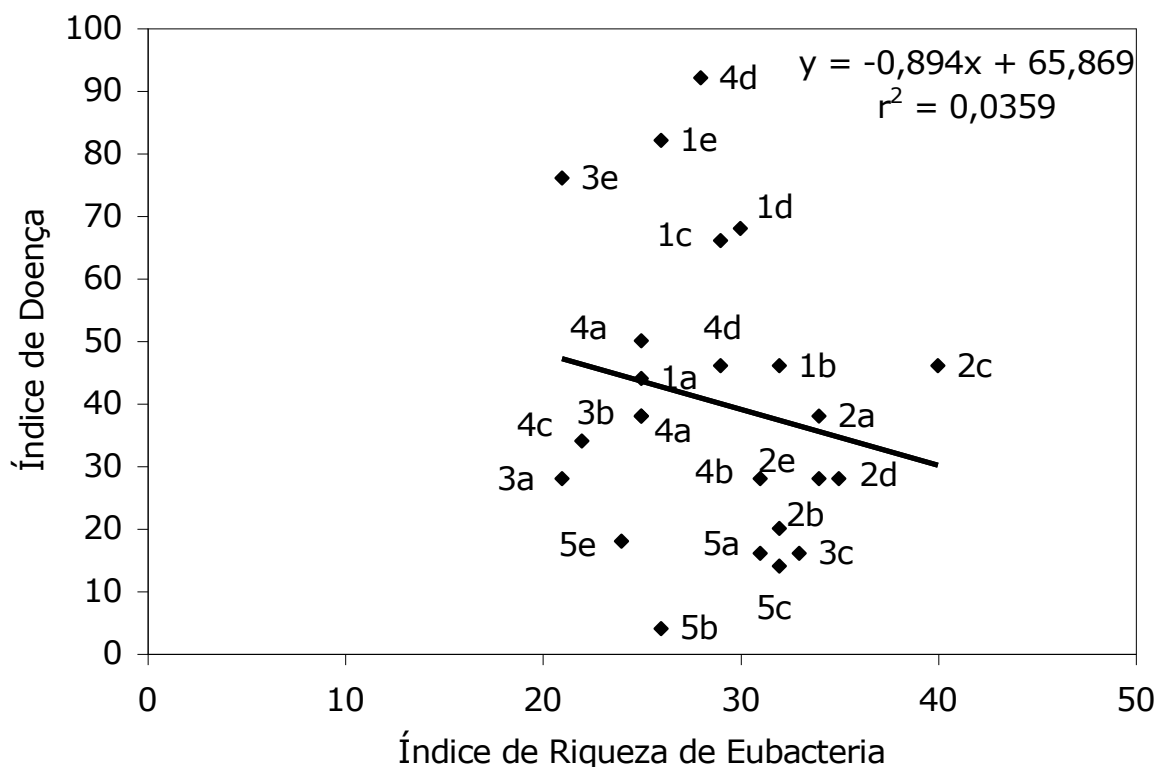


FIGURA 4.9 - Relação entre o índice de hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana, medida a partir do número de bandas dos perfis de DGGE para o domínio Eubacteria com $r^2 = 0,0359$. Legenda: os números representam os fertilizantes (1 = NPK; 2 = CBL + NPK; 3 = CBL + CBS; 4 = CBS E 5 = CBL) e as letras os sistemas de produção (a – Solo Orgânico, b – Solo Convencional, c – Solo Integrado, d – Solo Orgânico Brometado, e – Solo Integrado brometado).

Houve correlação negativa entre índice de riqueza de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e *Pseudomonas* e o índice de da hérnia das crucíferas (Figura 4.10). A severidade da doença aumentou com a redução do índice de riqueza de Alphaproteobacteria (Figura 4.10 A), de Betaproteobacteria (Figura 4.10 B) e de *Pseudomonas* (Figura 4.10 D), no solo, enquanto o índice da doença não foi correlacionado com o de riqueza de Actinobacteria (Figura 4.10 C).

Os solos adubados com CBL tiveram altos índices de riqueza de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e *Pseudomonas* e baixos índices de doença, contrariamente ao que ocorreu com o controle, o qual na maioria dos grupos específicos estudados produziu baixo índice de riqueza e alto índice da doença. Os solos orgânicos e integrados, quando aplicados brometo, apresentaram altos índices de doença, e baixos valores de índice de riqueza, principalmente quando nestes solos foi incorporado NPK, como fertilizante.

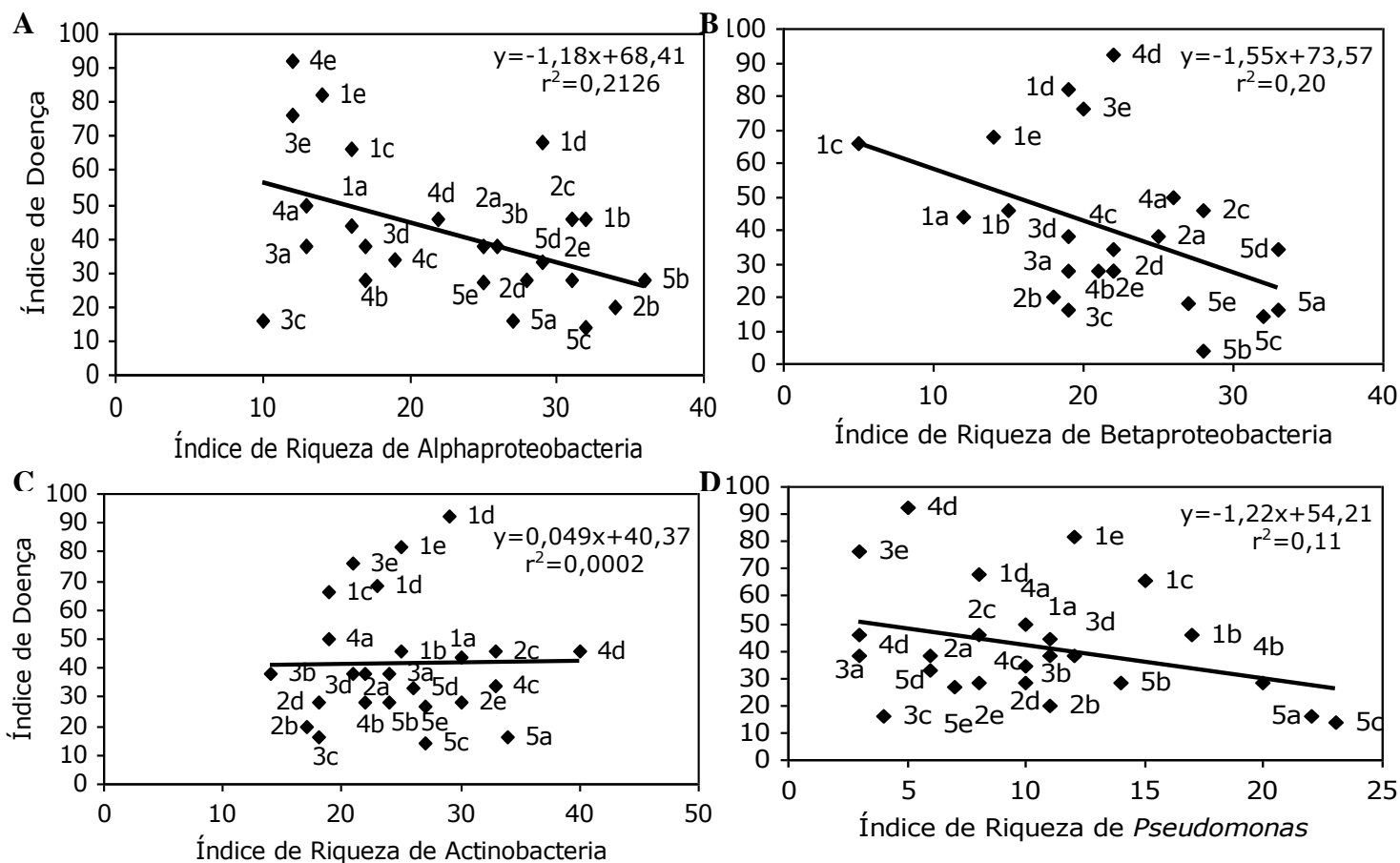


FIGURA 4.10 - Relação entre o índice de hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana, medida a partir do número de bandas dos perfis de DGGE para os grupos Alphaproteobacteria (A), Betaproteobacteria (B), Actinobacteria (C) e *Pseudomonas* (D). Legenda: os números representam os fertilizantes (1 = NPK; 2 = CBL + NPK; 3 = CBL + CBS; 4 = CBS E 5 = CBL) e as letras os sistemas de produção (a – Solo Orgânico, b – Solo Convencional, c – Solo Integrado, d – Solo Orgânico Brometado, e – Solo Integrado brometado).

DISCUSSÃO

A comunidade bacteriana total presente em solos sob diferentes sistemas de produção e incorporados com fertilizantes orgânico e inorgânico foi avaliada e as análises de cada grupo bacteriano foram realizadas separadamente. As propriedades biológicas avaliadas foram modificadas com a adição de compostos orgânicos no solo e estas modificações variaram dependendo do tipo de fertilizante aplicado. Fertilizantes orgânico e inorgânico de diferentes origens e três solos originados de sistemas de produção orgânica, integrada e convencional com diferentes características físico-químicas foram utilizados.

Os agrupamentos por similaridade obtidos dos perfis bacterianos, com o uso de *primers* universais, mostraram que adições consecutivas de compostos orgânicos ao solo alteraram significativamente a comunidade bacteriana geral em comparação aos solos adubados com o NPK, resultando na formação de dois agrupamentos, o de fertilizantes orgânicos e o de inorgânicos.

Os resultados de PCA obtidos a partir dos mesmos perfis bacterianos mostraram que o tipo de composto orgânico influenciou significativamente na composição da comunidade bacteriana total. Esta diferença na modificação do perfil bacteriano é devida aos compostos orgânicos serem oriundos de diferentes processos de compostagem, bem como possuem algumas diferenças na sua composição e propriedades químicas.

Este resultado é consistente com o de Rotenberg *et al.*, (2007) que documentam que os compostos orgânicos revelaram diferenças na composição da comunidade bacteriana geral, e com o de Larkin (2008) o qual indica que os compostos orgânicos podem efetivamente produzir variados efeitos na comunidade microbológica do solo dependendo do processo de compostagem utilizado, bem como dos tipos e formulações dos compostos orgânicos adicionados.

No solo uma ampla gama de fatores afeta a estrutura da comunidade microbiana, dentre eles os mais determinantes são o tipo de planta, principalmente o seu estágio de desenvolvimento em detrimento ao genótipo da planta (Andreote, 2007); o tipo de solo como sua textura e estrutura (Girvan *et al.*, 2003); e o regime de manejo agrícola tais como rotação de cultura (Larkin, 2008) e aplicação de fertilizantes orgânicos e inorgânicos (Chu *et al.*, 2007).

Os resultados do capítulo II demonstram que os solos manejados organicamente aumentam significativamente o nível de matéria orgânica quando comparados com os manejados convencionalmente, contudo, surpreendentemente o índice de riqueza da comunidade bacteriana dentro de cada grupo estudado foi muito similar entre os três sistemas de produção avaliados.

A não alteração da diversidade de comunidades microbianas devido a mudanças no sistema de uso da terra foi observada por Boddington e Dodd (2000). No Rio Grande do Sul, Fochi *et al.*, (2004) estudando a diversidade de pomares de citros, em sistemas de manejo orgânico e convencional, verificaram diferenças apenas na riqueza de espécies entre pomares de diferentes idades, mas não entre os sistemas de manejo.

Apesar das variações em muitas das características químicas e físicas dos três solos, e de serem originados de localizações e de manejos de produção diferentes, os solos exibiram perfis de DGGE muito próximos, possivelmente devido às aplicações consecutivas dos mesmos fertilizantes orgânico e mineral, já que não podemos excluir a possibilidade de que a população microbiana era diferente antes da aplicação dos fertilizantes. Este resultado leva a hipóteses que os solos manejados convencionalmente, após aplicações consecutivas de fertilizantes orgânicos, podem aumentar gradualmente sua biodiversidade, e que as comunidades bacterianas apresentariam um grau considerável de resiliência.

O estudo da diversidade da comunidade microbiana, apesar da obviedade que o conceito representa, tem demonstrado ser complexa. A diversidade refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes espécies biológicas em uma determinada comunidade quanto à abundância relativa (equitabilidade, equidade, igualdade) dessas espécies. Neste trabalho foi escolhido o índice de riqueza como expressão da diversidade, pois as demais medidas de diversidade usam dados de abundância das populações para serem calculadas, e a avaliação da abundância de diferentes *taxa* por meio das técnicas moleculares é dificultada por implicações decorrentes das etapas de extração de DNA e rRNA e ampliações por PCR.

Várias espécies de *Pseudomonas* e Actinobacterias são previamente conhecidas como agentes antagônicos a patógenos de solo, por isso, este trabalho focou nestes grupos com uso de *primers* específicos pelo DGGE, além dos grupos de Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria.

A adição de compostos orgânicos como o CBL propiciou um aumento na riqueza populacional de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, *Pseudomonas* e de Eubacterias, evidenciando que a população bacteriana, principalmente de Actinobacteria, e *Pseudomonas*, são influenciadas pela aplicação de CBL no solo, e sugerindo que a supressão da hérnia das crucíferas promovida por este composto é claramente ocasionada por agentes antagonistas, não podendo neste estudo ser definido qual o mecanismo utilizado.

O fato do índice de riqueza dos microrganismos estudados ter sido negativamente correlacionado com o índice de hérnia das crucíferas e, a composição da comunidade microbiana total do NPK ter sido condutiva à hérnia das crucíferas sugere que o número de microrganismos presentes no solo e as mudanças na composição da comunidade microbiana são importantes ferramentas no controle da doença. Este resultado corrobora os encontrados por Garbeva *et al.*, (2006) onde a densidade de *Pseudomonas* foi correlacionada com a redução da incidência de *R.*

solani em batata, ao contrário dos encontrados por Green *et al.*, (2004) nos quais a quantidade de bactéria e de fungos não foi correlacionada com o nível de “damping-off” causado por *Pythium sylvaticum*.

O perfil obtido da comunidade bacteriana total foi muito similar entre os tratamentos e os índices de riqueza da comunidade bacteriana total e dos grupos de Alpharotobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria e *Pseudomonas* não diferiram estatisticamente entre os solos orgânico e integrado antes e depois do tratamento de fumigação com brometo de metila. Isto pode ser atribuído ao fato de que PCR-DGGE de rDNA de amostras ambientais é limitado a discriminação de membros dominantes da comunidade bacteriana, bem como o fato de que o DNA residual extraído permaneceu no solo após o tratamento de fumigação (Mazzola, 2004), sendo então detectados pela técnica de DGGE. Além disso, o tratamento de fumigação foi realizado nos solos antes da adição de fertilizantes orgânicos e inorgânico no primeiro plantio, e as amostras para as análises de DGGE foram coletadas após quatro adubações consecutivas com compostos orgânicos, possibilitando a recolonização dos microrganismos do solo.

Alguns trabalhos têm estabelecido que a maioria da comunidade bacteriana do solo é inativa, e uma descrição da estrutura da comunidade bacteriana com base na diversidade de rDNA promove tão somente uma imediata informação da presença ou ausência de um determinado indivíduo no solo e não determina se os microrganismos estão atuando e quais os fatores que controlam a dinâmica da comunidade microbiana do solo (Mazzola, 2004; Girvan *et al.*, 2003).

Muitas espécies bacterianas são conhecidas por alterarem o número de seus ribossomos em função da sua atividade celular (Wagner, 1994); então o estudo da comunidade bacteriana com técnicas baseadas no rRNA permite uma descrição da comunidade ativa do solo. Isto pode

explicar a causa dos solos orgânicos e integrados fumigados terem produzido altos índices de hérnia das crucíferas sem haver alteração significativa no índice de riqueza tanto da comunidade bacteriana total como dos grupos bacterianos estudados, quando comparados aos mesmos solos que não sofreram o tratamento de fumigação. Estas informações também explicam a razão da similaridade dos perfis bacterianos dos solos sob diferentes sistemas de produção.

CONCLUSÕES

As alterações nas comunidades bacterianas totais são determinadas mais intensamente pelo fertilizante incorporado ao solo do que pela alteração do sistema de produção;

A adição do composto orgânico CBL ao solo aumenta o índice de riqueza de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria e *Pseudomonas*;

O índice da doença hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana de Eubacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, e *Pseudomonas* são negativamente correlacionados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABAWI, G.S.; WIDMER, T.L. Impact of soil health management practices on soil borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 37–47, 2000.
- ANDREOTE, F.D. Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Tese de Doutorado. Piracicaba – SP. 201p., 2007.
- BENDING, G.D.; PUTLAND, C.; RAYNS, F. Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. **Biology Fertility of Soils**, v. 31, p. 78–84, 2000.
- BERG, G.; OPELT, K.; ZACHOW, C.; LOTTMANN, J.; GOTZ, M.; COSTA, R.; SMALLA, K. The rhizosphere effecton bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. **FEMS Microbiology Ecology**, 2006. Data da publicação on line: 2/11/2005 DOI: 10.1111/j.1574-6941.205.00025.x.
- BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L., ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from the different *Verticillium* host plants. **Applied and Environment Microbiology**, v. 68, p. 3328-3338, 2002.
- BODDINGTON, C.L.; DODD, J.C. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field sutdies in an Indonesian ultisol. **Plant and Soil**, v. 218, n1/2, p. 137-144, 2000.
- CHERIF, H.; OUZARI, H.; MARZORATI, M.; BRUSETTI, L.; JEDIDI, N.; HASSEN, A.; DAFFONCHIO, D. Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 2007. Data da publicação on line: 18/10/2007, DOI 10.1007/s11274-007-9588-z.
- CHU, H.; LIN, X.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; YAGI, K.; HU, J.; ZHANG, J. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, 2971-2976, 2007.
- COLEMAN, D.C.; ANDERSON, R.V.; COLE, C.V.; ELLIOTT, E.T.; WOODS, L.; CAMPION, M.K. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. IV: Flows of metabolic and biomass carbon. **Microbial Ecology**, v. 4, p. 373–380, 1978.
- EL-DIN, S.M.S.B.; ATTIA,M.; ABO-SEDERA, S.A. Field assessment of composts produced by highly effective cellulolytic microorganisms. **Biology Fertility Soils**, v. 32, p. 35-40, 2000.
- ELLIOTT, L.F.; LYNCH, J.M. Biodiversity and soil resilience. In: Greenland, D.J., Szabolc, I. (Eds.), *Soil Resilience and Sustainable Land use*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 353–364, 1994.

ELMHOLT, S. Microbial activity, fungal abundance, and distribution of *Penicillium* and *Fusarium* as bioindicators of a temporal development of organically cultivated soils. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 13, p. 123-140, 1996.

FOCCHI, S.S.; DAL SOGLIO, E.K.; CARRENHO, R.; DE SOUZA, P.V.D.; LOVATO, P.E. Arbuscular mycorrhizal fungi in citrus cultivation under conventional and organic management. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n. 5, p. 469-476, 2004.

GARBEVA, P.; POSTMA, J.; van VEEN, J.A.; van ELSAS, J.D. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 233–246, 2006.

GARBEVA, P.; van VEEN, J.A.; van ELSAS, J.D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 51-64, 2004.

GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; BALL, A.S.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2692–2701, 2003.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, p. 167-180, 2001.

GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D.; MAWDSLEY, J.L.; CLEGG, C.D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S.; RODWELL, J.S.; EDWARDS, S.J.; DAVIES, W.J.; ELSTON, D.J.; MILLARD, P. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p. 63–84, 2004.

GREEN, S.J.; MICHEL Jr., F.C.; HADAR, Y.; MINZ, D. Similarity of bacterial communities in sawdust-and straw-amended cow manure composts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 115-123, 2004.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HJORT, K.; LEMBKE, A.; SPEKSNIJDER, A.; SMALLA, K.; JANSSON, J.K. Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 399-413, 2007.

- LARKIN, R.P. Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1341 – 1351, 2008.
- LI, Z.; XU, J.; TANG, C.; WU, J.; MUHAMMAD, A.; WANG, H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. **Chemosphere**, v. 62, p. 1374–1380, 2005.
- LUNDQUIST, E.J.; JACKSON, L.E.; SCOW, K.M.; HSU, C. Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 221-236, 1999.
- MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 35-59, 2004.
- NORRIS, T.B.; WRAITH, J.M.; CASTENHOLZ, R.W.; McDERMOTT, T.R. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating Event. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6300–6309, 2002.
- POUDEL, D.D., HORWARTH, W.R., LANINI, W.T., TEMPLE, S.R., van BRUGGEN, A.H.C., 2002. Comparison of soil N availability and leaching potential, crop yields and weeds in organic, lowinput and conventional farming systems in northern California. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 90, p. 125–137, 2002.
- ROE, N.E., STOFFELLA, P.J.; GRAETZ, D. Composts from various municipal solid waste feedstocks affect vegetable crops. 1. Emergence and seedling growth. **Journal of American Society Horticulture Science**, v. 122, p. 427-432, 1997.
- ROTENBERG, D.; WELLS, A.J.; CHAPMAN, E.J.; WHITFIELD, A.E.; GOODMAN, R.M. COOPERBAND, L.R. Soil properties associated with organic matter-mediated suppression of bean root rot in field soil amended with fresh and composted paper mill residuals. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2936-2948, 2007.
- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1475–1482, 2004.
- SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4215–4224, 2001.
- SIVAPALAN, A.; MORGAN, W.C.; FRANZ, P.R. Monitoring populations of soil microorganisms during conversion from conventional to an organic system of vegetable growing. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 10, p. 9-27, 1993.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; van DEN BROEK, J.; van MIL, S. WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2284–2291, 2001.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. Nucleic acids and classification, p. 152-189. *In* M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London, England, 1993.

SUN, H.Y.; DENG, S.P.; RAUN, W.R. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5868–5874, 2004.

van BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for plant health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 13–24, 2000

WAGNER, R. The regulation of ribosomal-RNA synthesis and bacterial-cell growth. **Archives of Microbiology** v. 161, p. 100–109, 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância das brassicáceas na produção olerícola e os danos que a hérnia das crucíferas tem causado na produtividade destas culturas, a incorporação de compostos orgânicos mostra ser uma efetiva alternativa ao controle químico, especialmente em países onde tais métodos de controle são economicamente insustentáveis e vem ao encontro do crescente mercado de produtos orgânicos no Brasil.

Sob baixa pressão de inóculo, 10^4 esporos/ g de solo, a combinação de dois compostos, CBL + CBS, aplicados ao solo é ideal para o controle da hérnia das crucíferas, pois o CBL promove a diminuição do índice de hérnia em plantas de brócolis e o CBS contribui para o crescimento da parte aérea. Contudo, em campo de produção comercial altamente infestado, acima de 10^8 esporos/ g de solo, os compostos orgânicos quando aplicados como única medida de controle não reduzem a severidade da hérnia das crucíferas.

O histórico de produção afeta significativamente o índice da doença que é maior em solos sob o sistema convencional. O sistema de produção orgânica aliada à aplicação combinada dos compostos orgânicos CBL + CBS reduz a severidade da doença. Em plantios comerciais consecutivos de brócolis, é possível manter o índice da hérnia das crucíferas reduzido com a incorporação de compostos orgânicos.

A integração de medidas como a combinação de 200 mL de CBL + 200 g de CBS e a aplicação de 400 g/ m² de calcário é um método de manejo que não elimina o patógeno do solo, mas resulta em aumento de produção de matéria fresca, podendo ainda ser economicamente viável.

O perfil genético baseado nas análises de PCR-DGGE a partir do fragmento 16S rDNA mostra que as alterações nas comunidades bacterianas totais são determinadas mais intensamente pelo fertilizante incorporado ao solo do que pela alteração do sistema de produção. A adição do composto orgânico CBL ao solo aumenta o índice de riqueza dos grupos específicos de Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e principalmente Actinobacteria e *Pseudomonas* que são amplamente utilizados como agentes de controle biológico. Para o domínio Eubacteria, as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria e o grupo *Pseudomonas*, o índice da hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana são negativamente correlacionados.