

ÉLLEN JÚNIA CANEDO

**POTENCIAL DE REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE *Meloidogyne javanica* E
Stromatinia cepivora POR MEIO DA DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO**

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

Orientador: Everaldo Antônio Lopes

Coorientador: Bruno Sérgio Vieira.

RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS

2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Rio Paranaíba

T

C221d
2019 Canedo, Éllen Júnia, 1987-
Potencial de redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e
Stromatinia cepivora por meio da desinfestação anaeróbica do solo /
Éllen Júnia Canedo. - Rio Paranaíba, MG, 2019.
52f : il. ; 29 cm.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Controle de doenças de plantas. 2. Desinfestação biológica do
solo. 3. Nematóide de galhas. 4. *Sclerotium cepivorum*. I. Universidade
Federal de Viçosa. Programa de Pós Graduação em Agronomia -
Produção Vegetal. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).
II. Título.

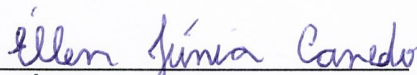
ÉLLEN JÚNIA CANEDO

**POTENCIAL DE REDUÇÃO DA VIABILIDADE DE *Meloidogyne javanica* E
Stromatinia cepivora POR MEIO DA DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO**

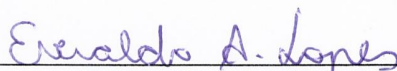
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de dezembro de 2019.

Assentimento:



Éllen Júnía Canedo
Autora



Everaldo Antônio Lopes
Orientador

***Dedico primeiro a Deus, meus pais Valdir
e Elzi, a minha irmã Camila, a minha avó Dirce e
a todos meus amigos que me apoiaram.***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Everaldo Antônio Lopes, pela orientação, apoio, compreensão, ajuda, amizade e valiosos ensinamentos conferidos a mim durante este período em minha vida;

Ao Professor Dr. Bruno Sérgio Vieira, pela participação na banca de defesa e coorientação, além do incentivo para eu fazer mestrado e todo apoio que me deu durante a graduação em Agronomia;

Ao professor Dr. Vinícius Ribeiro Faria pelos ensinamentos durante o mestrado e pela participação na banca de defesa;

Aos inestimáveis amigos Brenda, Thyago, Guilherme, Pedro, Marcos, e Enrique pelas colaborações no experimento.

Aos amigos do grupo de pesquisa em Fitopatologia “Anton De Bary”: Guilherme, Fernanda, Rafaela, Júlia, Otávio, Augusto, Josyane, Lilian, Iago, Erik, Lorena, Lorrane, Paulo e Ademir pelo apoio nas diversas atividades desenvolvidas.

A Stefânia e a Vanessa que deram suporte durante esse período.

Aos técnicos de laboratório Jader e Vinícius, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos grandes amigos que fiz no mestrado, pelo aprendizado, convivência, companheirismo e boas lembranças que levarei.

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Éllen Júnia Canedo, filha de Valdir Eustáquio Canedo e Elzi Antônia de Melo Canedo, nasceu em Patos de Minas, no Estado de Minas Gerais, no dia 30 de maio de 1987.

Em fevereiro de 2005 iniciou o curso de Ciências Biológicas, graduando-se em janeiro de 2009. Em março de 2010, ingressou na segunda graduação em Agronomia, e graduou-se em janeiro de 2013.

Em agosto de 2018, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba.

RESUMO

CANEDO, Éllen Júnia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2019. **Potencial de redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora* por meio da desinfestação anaeróbica do solo.** Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientador: Bruno Sérgio Vieira.

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS) é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo. O método consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos facilmente decomponíveis, seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável. A fonte de carbono estimula o rápido crescimento e a respiração da microbiota do solo, resultando na formação de condições anaeróbicas. A combinação de acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica, antagonismo exercido por organismos anaeróbicos e falta de oxigênio resulta em controle de fitopatógenos habitantes do solo. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial da técnica no manejo de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora*. A hipótese principal deste trabalho é que a DAS pode ser usada na redução da viabilidade desses dois patógenos. No Capítulo 1, foi realizada uma revisão sobre o potencial da DAS no manejo de fitopatógenos. Discutiu-se o histórico, princípios da técnica, vantagens e desvantagens, tipos de fontes de carbono usadas, além de compilar os principais resultados de pesquisa obtidos até o momento. No Capítulo 2, avaliou-se o efeito da DAS com etanol 5% (v:v) e sacarose 5% (m:v) na viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora* em condições de microcosmo (4,5 kg de solo acondicionado em saco plástico). As fontes de carbono foram comparadas com a autoclavagem do solo (120 °C por 1h por dois dias consecutivos), saturação do solo com apenas água e solo não tratado. O período de incubação do solo foi de três semanas. A DAS com etanol ou sacarose reduziu em mais de 75% o número de J₂ no solo e em mais de 90% o número de galhas em plantas indicadoras, com eficiência similar à autoclavagem do solo e superior à saturação apenas com água. A viabilidade de escleródios de *S. cepivora* foi reduzida pela DAS, principalmente usando sacarose, que causou redução similar à autoclavagem do solo. A saturação do solo com água não suprimiu a germinação dos escleródios. Assim, conclui-se que a DAS por três semanas com etanol ou sacarose, ambos a 5%, reduz a viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* em microcosmo. A eficiência de redução de viabilidade da técnica foi similar à

autoclavagem do solo. A saturação do solo com água por três semanas não reduz a viabilidade de escleródios de *S. cepivora* e o efeito desse tratamento em solo com *M. javanica* é inferior ao uso da DAS. Experimentos em campo devem ser conduzidos para validar o uso da DAS no manejo de *M. javanica* e *S. cepivora*.

Palavras-chave: Controle de doenças de plantas. Desinfestação biológica do solo. Nematóide de galhas. *Sclerotium cepivorum*.

ABSTRACT

CANEDO, Éllen Júnia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2019. **Potential of reduction of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora* viability by anaerobic soil disinfestation.** Advisor: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisor: Bruno Sérgio Vieira.

Anaerobic soil disinfestation (DAS) is an ecological alternative to chemical soil fumigation. The method consists in incorporating easily decomposable organic materials into the soil, followed by irrigation to saturation and soil cover with impermeable tarp. The carbon source stimulates the rapid growth and respiration of soil microbiota, resulting in the formation of anaerobic conditions. The combination of accumulation of toxic anaerobic decomposition products, antagonism exerted by anaerobic organisms and lack of oxygen results in control of soil-borne phytopathogens. However, little is known about the potential of the technique in the management of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora*. The main hypothesis of this work is that DAS can be used to reduce the viability of these two pathogens. In Chapter 1, the potential of DAS in the management of plant pathogens was reviewed. The history, principles of the technique, advantages and disadvantages, types of carbon sources used and the main research results obtained so far were discussed. In Chapter 2, we assessed the effect of ASD with ethanol 5% (v:v) and sucrose 5% (m:v) on the viability of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora* under microcosm conditions (4.5 kg of soil conditioned in plastic bag). Carbon sources were compared with soil autoclaving (120 °C for 1h for two consecutive days), soil saturation with water only and untreated soil. The soil was incubated for three weeks. ASD with ethanol or sucrose reduced by more than 75% the number of J₂ in the soil and by more than 90% the number of galls in the indicator plants, with efficiency similar to soil autoclaving and superior to water saturation. The viability of *S. cepivora* sclerotia was reduced by ASD, especially using sucrose, which caused a similar reduction to soil autoclaving. Soil saturation with water did not suppress sclerotia germination. Thus, it is concluded that ASD for three weeks with ethanol or sucrose, both at 5%, reduces the viability of *M. javanica* and *S. cepivora* in microcosm. The viability reduction efficiency of the technique was similar to soil autoclaving. Soil saturation with water for three weeks does not reduce the viability of *S. cepivora* sclerotia and the effect of this treatment on soil with *M. javanica* is lower

than ASD. Field experiments should be conducted to validate the use of ASD in the management of *M. javanica* and *S. cepivora*.

Keywords: Control of plant diseases. Biological soil disinfestation. Root-knot nematode. *Sclerotium cepivorum*.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	11
Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO I - Desinfestação anaeróbica do solo no manejo de fitopatógenos.....	16
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Desinfestação anaeróbica do solo: Primórdios e mecanismos de ação....	19
Considerações finais.....	22
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO II – Potencial da redução da viabilidade de <i>Meloidogyne</i> <i>javanica</i> e <i>Stromatinia cepivora</i> por meio da desinfestação anaeróbica do solo.....	32
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	41
Discussão.....	44
Conclusões.....	47
Referências Bibliográficas.....	48

INTRODUÇÃO GERAL

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS), também conhecida como desinfestação biológica do solo, é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo. A técnica foi desenvolvida de forma independente no Japão (Shinmura, 2000; Shinmura, 2004) e Holanda (Blok et al., 2000) e tem sido usada desde então para o manejo de vários patógenos de solo, a exemplo de *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Ralstonia*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, além de insetos e plantas daninhas (Goud et al., 2004; Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016; Guo et al., 2017; Shrestha et al., 2018).

O método consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos facilmente decomponíveis (relação C:N de 8-20:1), seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). A fonte de carbono estimula o rápido crescimento e a respiração da microbiota do solo, reduzindo o oxigênio disponível. Considerando que os poros do solo estão cheios de água e a cobertura plástica limita a entrada de oxigênio, condições anaeróbicas são criadas no ambiente, estimulando a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016).

Farelos de cereais, melaço, etanol, esterco de animais e resíduos vegetais são as principais fontes de carbono usadas na DAS, com doses variando de 0,3 a 9 kg m⁻² (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). O período em que o solo permanece coberto varia entre três a dez semanas. De forma geral, o período de incubação de três semanas é o mais efetivo no manejo de fitopatógenos (Shrestha et al., 2016). Os principais mecanismos de ação contra fitopatógenos, ou a combinação destes, incluem antagonismo exercido por organismos anaeróbicos, falta de oxigênio, acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica (ácidos acético, butírico e propiônico, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ e N₂O) (Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015).

Uma metanálise publicada em 2016 revelou que o controle de bactérias, oomicetos e patógenos fúngicos com uso da DAS varia entre 59 e 64%, enquanto o efeito da técnica sobre fitonematoides é 15 a 56% (Shrestha et al., 2016). No

entanto, o número de pesquisas disponíveis para análise envolvendo fitonematoides foi aproximadamente sete vezes menor do que aquelas com outros patógenos (Shrestha et al., 2016). Os autores do estudo reconheceram que o baixo número de pesquisas com nematoides pode ter limitado a compreensão do real valor da técnica no manejo desse patógeno, em razão dos amplos intervalos de confiança devido ao erro. Além disso, enquanto que o volume de informações sobre a ação da DAS no manejo de espécies de *Fusarium*, *Verticillium* e *Rhizoctonia* é abundante na literatura (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016), pouco se sabe sobre o seu potencial no controle de outros fungos habitantes de solo, a exemplo de *Stromatinia cepivora* (sin. *Sclerotium cepivorum*). Assim, torna-se necessário avaliar se a DAS pode ser usada no manejo de fitonematoides e *S. cepivora*, uma vez que essa lacuna do conhecimento ainda não foi preenchida desde a publicação do artigo de Shrestha et al. (2016).

O fungo *Stromatinia cepivora* é um patógeno de difícil controle, pois apresenta uma capacidade de sobreviver no campo por até 20 anos por meio de escleródios, estruturas de resistência que são produzidos em grande quantidade (Zewide et al., 2007). Além disso, a agressividade de *S. cepivora* é alta, mesmo quando há baixa densidade do inóculo (Davis et al., 2007, Brewster, 2008; Villalta et al. 2012). Em geral o controle é realizado com a aplicação de fungicidas fumigantes, que não resultam em um controle efetivo (Zewide et al., 2007; Villalta et al., 2012).

Após a proibição do uso de brometo de metila, o controle de populações de organismos que vivem no solo, em especial o gênero *Meloidogyne*, tornou-se ainda mais complicado (Roskopf et al., 2015). A erradicação de fitonematoides é extremamente difícil já que apresenta uma alta capacidade reprodutiva, são agressivos, facilmente dispersos pelo manejo do solo, há uma escassez de cultivares resistentes e ocorre quebra de resistência em temperaturas de solo superiores à 28° C (Dropkin, 1969), que ocorre com frequência em regiões de clima tropical.

A hipótese principal deste trabalho é que a desinfestação anaeróbica do solo pode ser usada no manejo do nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.) e do fungo *S. cepivora*.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro, revisamos o potencial da desinfestação anaeróbica do solo no manejo de fitopatógenos. No

segundo, avaliamos o efeito da técnica na redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *S. cepivora* em microcosmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253–259.

BREWSTER, J.L. 2008. **Onions and Other Vegetable Alliums**, 2nd Ed. Crop Production Science in Horticulture Series, 15.

DAVIS, R.M.; HAO, J.J.; ROMBERG, M.K.; NUNEZ, J.J.; SMITH, R.F. 2007. Efficacy of germination stimulants of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* for management of white rot of garlic. **Plant Disease**, 91:204-208.

DROPKIN, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other host resistant to Meloidogyne: reversal by temperature. **Phytopathology**, 59: 1632-1639.

GOUD, J.K.C.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BLOK, W.J.; van BRUGGEN, A.H.C. 2004. Long-term effect of biological soil disinfestation on Verticillium wilt. **Plant Disease**, 88: 688-694.

GUO, H.; DI GIOLA, F.; ZHAO, X.; OZORES-HAMPTON, M.; SWISHER, M.E.; HONG, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; DELONG, A.N. 2017. Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. **Scientia Horticulturae**, 218: 105-116.

ROSSKOPF, E.N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. 2014. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228.

ROSSKOPF, E.N.; CHELLEMI, D.O.; KOKALIS-BURELLE, N.; CHURCH, G.T. 2005. Alternative to methyl bromide: a Florida perspective. **Plant Health Progress**. Doi: 10.1094/PHP-2005-1027-01-RV.

RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; van den BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMINSKA, M.A.; van der WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. 2014. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177–193.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175.

SHINMURA, A. 2000. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143.

SHINMURA, A. 2004. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 22: 2–12.

SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254, Article 1254.

SHRESTHA, U.; DEE, M.E.; OWNLEY, B.H.; BUTLER, D.M. 2018. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. **Phytopathology**, 108: 342-351.

STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14(11): 2309-2318.

VILLALTA, O.N.; WITE, D.; PORTER, I.J.; McLEAN, K.L.; STEWART, A.; HUNT, J. 2012. Integrated control of onion white rot on spring onions using diallyl disulphide, fungicides and biocontrols. **Acta Horticulturae**, 944: 63-71.

ZEWIDE, T.; FININSA, C.; SAKHUJA, P.K.; AHMED, S. 2007. Association of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic with environmental factors and cultural practices in the North Shewa highlands of Ethiopia. **Crop Protect.** 26:1566-1573.

CAPÍTULO I

Desinfestação anaeróbica do solo no manejo de fitopatógenos

RESUMO

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS), também conhecida como desinfestação biológica do solo, é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo. A técnica foi desenvolvida de forma independente no Japão e Holanda no início do ano 2000 e tem sido usada desde então para o manejo de vários patógenos de solo, a exemplo de *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Ralstonia*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, além de insetos e plantas daninhas. O método consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos facilmente decomponíveis (relação C:N de 8-20:1), seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável. A fonte de carbono estimula o rápido crescimento e a respiração da microbiota do solo, reduzindo o oxigênio disponível. Considerando que os poros do solo estão cheios de água e a cobertura plástica limita a entrada de oxigênio, condições anaeróbicas são criadas no ambiente, estimulando a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos. Farelos de cereais, melaço, etanol, esterco de animais e resíduos vegetais são as principais fontes de carbono usadas na DAS, com doses variando de 0,3 a 9 kg m⁻². O período em que o solo permanece coberto varia entre 3 a 10 semanas. De forma geral, o período de incubação de três semanas é o mais efetivo no manejo de fitopatógenos. Além disso, o acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica, que compreendem ácidos acético, butírico e propiônico, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ e N₂O, antagonismo exercido por organismos anaeróbicos, falta de oxigênio e a combinação de todos esses fatores são os principais mecanismos de ação da técnica contra fitopatógenos. Neste trabalho, revisamos o potencial da técnica no manejo de fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos.

Palavras-chaves: Controle de doenças de plantas. Desinfestação biológica do solo. Manejo sustentável. Patógenos habitantes de solo.

Anaerobic soil disinfestation on the management of plant pathogens

ABSTRACT

Anaerobic soil disinfestation (ASD), also known as biological soil disinfestation, is an ecological alternative to chemical soil fumigation. The technique was developed independently in Japan and the Netherlands in the early 2000s and has since been used for the management of various soil pathogens, such as *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Ralstonia*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, as well as insects and weeds. The method consists in incorporating easily decomposable organic materials into the soil (C: N ratio 8-20: 1), followed by irrigation to saturation and soil cover with impermeable plastic. The carbon source stimulates the rapid growth and respiration of soil microbiota, reducing available oxygen. Considering that the soil pores are full of water and the plastic cover limits oxygen intake, anaerobic conditions are created in the environment, stimulating the activity of facultative anaerobic microorganisms. Cereal bran, molasses, ethanol, animal manure and vegetable waste are the main sources of carbon used in ASD, with doses ranging from 0.3 to 9 kg / m². The period in which the soil remains covered varies from 3 to 10 weeks. Overall, the three-week incubation period is the most effective in the management of plant pathogens. Accumulation of toxic anaerobic decomposition products (acetic, butyric and propionic acids, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ and N₂O), antagonism exerted by anaerobic organisms, lack of oxygen and the combination of all these factors are the main mechanisms of action of the technique. against plant pathogens. In this paper, we review the potential of the technique in the management of plant-pathogenic fungi, bacteria and nematodes.

Key words: Control of plant diseases. Biological soil disinfestation. Sustainable management. Soil-borne pathogens.

1. INTRODUÇÃO

Patógenos habitantes de solo causam prejuízos em várias culturas e são organismos de difícil controle. Podem sobreviver no solo por muitos anos, devido à formação de estruturas de resistência especializadas, a exemplo de escleródios, clamidósporos, oósporos e cistos. Diversos são os microrganismos capazes de causar doenças em plantas, os de maior relevância para as espécies cultivadas são os fungos, oomicetos, nematoides, bactérias e vírus (Michereff et al., 2005).

Os nematoides passam pelo menos parte de seu ciclo de vida no solo e causam danos nas principais plantas cultivadas, as quais incluem soja (Silva et al., 1999), cana de açúcar (Dinardo-Miranda et al., 2019), café (Barbosa et al., 2004) e algodão (Blasingame & Patel, 2013). Espécies dos gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera* e *Globodera* estão entre as mais relevantes em todo o mundo (Ferraz & Brown, 2016). Estima-se que as perdas globais causadas por fitonematoídeos sejam 12,3%, o que corresponde a 157 bilhões de dólares anuais (Singh et al., 2015).

Várias espécies de fungos e oomicetos estão adaptadas a sobreviver no solo e são responsáveis principalmente por tombamento, murchas vasculares e podridões de raiz e de colo de plantas. Do ponto de vista agrícola, os gêneros de maior relevância são *Athelia*, *Fusarium solani*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Stromatinia*, *Sclerotinia* (podridões de raiz e colo), *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* (murchas vasculares), *Phytophthora* e *Pythium* (tombamentos) (Michereff et al., 2005). Todos esses patógenos formam estruturas de resistência. Escleródios são formados por *Athelia*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Stromatinia*, *Sclerotinia* e *Verticillium*; enquanto *Fusarium* forma clamidósporos e espécies de *Pythium* e *Phytophthora* sobrevivem na forma de oósporos. A principal fitobactéria habitante de solo causadora de danos é *Ralstonia solanacearum*, capaz de induzir murchas vasculares em mais de 200 espécies de plantas (Hayward, 1991).

O manejo de patógenos habitantes de solo requer o uso integrado de várias medidas de controle. Desde a suspensão do uso de brometo de metila, o controle efetivo de fitopatógenos que vivem no solo por meio de fumigantes químicos mostra-se limitado. No mercado brasileiro, fumigantes à base de isotiocianato de metila tem sido utilizados como substitutos do brometo de metila no controle de nematoides e

demais patógenos do solo (Charchar et al., 2007); entretanto, com eficiência limitada. Rotação de culturas, controle biológico, uso de variedades resistentes e técnicas de controle físico, como solarização podem ser usados em alguns casos, mas são inviáveis em outros. O manejo da podridão-branca do alho e cebola, causada pelo fungo *Stromatinia cepivora* (= sin. *Sclerotium cepivorum*) é um exemplo dessa complexidade.

O fungo forma escleródios que garantem sua sobrevivência no solo por 20 a 30 anos e só parasita plantas do gênero *Allium*. Apesar da limitada gama de hospedeiros do fungo, a rotação de culturas envolvendo plantas suscetíveis é impraticável. Nenhuma cultivar no Brasil possui resistência ao fungo e os produtos químicos registrados não são tão eficientes (Lourenço Júnior et al., 2018). As opções de manejo incluem medidas de exclusão do patógeno em áreas indenidas e a integração entre métodos em locais infestados, incluindo solarização, biofumigação, inundação, aração profunda, aplicação de indutores de germinação, como o DADS (Dialil dissulfeto) de agentes de controle biológico e fungicidas (Fuga et al., 2012; Lourenço Júnior et al., 2018).

Na busca de medidas adicionais de manejo ecologicamente sustentável de fitopatógenos de solo, insetos-praga e plantas daninhas, foi desenvolvida a desinfestação anaeróbica do solo (DAS). De forma geral, esta técnica permite eficiência de controle de 15 a 56 % sobre nematoides, enquanto que para bactérias, oomicetos e patógenos fúngicos a porcentagem varia entre 59 e 64% (Shrestha et al., 2016).

2. DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO: PRIMÓRDIOS E MECANISMOS DE AÇÃO

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS), também conhecida como desinfestação biológica do solo foi desenvolvida, de forma independente, no Japão (Shinmura, 2000; Shinmura, 2004) e na Holanda (Blok et al., 2000). Desde então, tem sido usada no manejo de diversos patógenos de solo (Tabela 1), incluindo fungos, bactérias, nematoides, além de insetos e plantas daninhas (Goud et al., 2004; Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016; Guo et al., 2017; Shrestha et al., 2018). Os custos de implantação da DAS são geralmente

menores e a eficiência de controle de fitopatógenos é similar ou maior do que outros métodos de tratamento de solo, incluindo uso de vapor, solarização e fumigação química (Blok et al., 2000; Momma, 2015; Shennan et al., 2018).

O método consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos facilmente decomponíveis (relação C:N de 8-20:1), seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável de cor escura (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). A fonte de carbono estimula o rápido crescimento e a respiração da microbiota do solo, reduzindo o oxigênio disponível. Considerando que os poros do solo estão cheios de água e a cobertura plástica limita a entrada de oxigênio, condições anaeróbicas são criadas no ambiente, estimulando a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016).

Acredita-se que após a incorporação do material no solo, seguida por irrigação, ocorre um estímulo para os microrganismos aeróbios, que por sua vez, esgotam o oxigênio presente no solo e induzem condições favoráveis para os anaeróbios (Messiha et al., 2007). O tempo em que as condições anaeróbicas do solo são mantidas varia em função da umidade, temperatura, textura e estrutura do solo (Shennan et al., 2014). Sob maiores temperaturas do solo, tanto em viveiro quanto em condições de campo, é possível até mesmo reduzir o período de incubação (Shrestha et al., 2016).

Farelos de cereais, melaço, etanol, esterco de animais e resíduos vegetais são as principais fontes de carbono usadas na DAS (Tabela 1), com doses variando de 0,3 a 9 kg/m² de resíduos sólidos e de 0,5 a 2% de etanol (Momma et al., 2013; Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). Em metanálise publicada por Shrestha et al. (2016), evidenciou-se que fontes líquidas de carbono são mais eficientes do que as sólidas, com destaque para o etanol.

Após o tratamento, o plástico deve ser removido ou furado, para permitir que o oxigênio volte ao solo e estimule a degradação dos subprodutos que restam da decomposição anaeróbica (Blok et al., 2000; Momma et al., 2006; Shennan et al., 2014). O período em que o solo permanece coberto varia entre 3 a 10 semanas (Tabela 1). De forma geral, o período de incubação de três semanas é o mais efetivo no manejo de fitopatógenos (Shrestha et al., 2016). Com duas semanas de tratamento é possível obter resultados satisfatórios (Strauss & Kluepfel, 2015; Guo

et al., 2017). Geralmente, plásticos de cor escura são usados, por serem mais baratos e a técnica não ser dependente da ação da radiação solar, como é o caso da solarização. No entanto, Shrestha et al. (2016) sugeriram que o período de incubação pode ser menor do que três semanas caso o solo seja coberto com plástico transparente ao invés de plástico de cor escura, principalmente quando as temperaturas do solo são superiores a 16 °C.

Acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica (ácidos acético, butírico e propiônico, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ e N₂O), antagonismo exercido por organismos anaeróbicos, falta de oxigênio e a combinação de todos esses fatores são os principais mecanismos de ação da técnica contra fitopatógenos (van der Wurf, 2010; Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Momma, 2015; Strauss & Kluepfel, 2015; Guo et al., 2017). Acredita-se que os compostos orgânicos voláteis desempenham importante função na supressão natural de doenças de solo. Entretanto, os fatores que influenciam a produção desses compostos supressores ainda não são claros.

A composição das comunidades microbianas do solo é profundamente alterada pela DAS. Com o uso de pirosequenciamento de fragmentos de genes ribossômicos 16S, observou-se que havia estresse anaeróbico na comunidade bacteriana do solo aos três meses após a DAS, com aumento do filo Bacteroidetes e redução significativa dos filos Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Nitrospirae e Planctomycetes (van Agtmaal et al., 2015).

Essa alteração na comunidade microbiana pode ocorrer em função da fonte de carbono orgânico incorporada ao solo (Guo et al., 2017). Por exemplo, o farelo de arroz possibilita o aumento da população de Acidobacteria e Burkholderia (Strauss & Kluepfel, 2015), enquanto a alfafa favorece Flavisolibacter, Rhodanobacter e Ruminococcaceae (Huang et al., 2016). Além disso, vários antagonistas são conhecidos por ocorrerem tipicamente sob condições anaeróbicas, como *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (Blok et al., 2000).

O possível impacto da DAS na comunidade de organismos benéficos no solo e o efeito sobre a composição e o funcionamento das comunidades microbianas do solo após o tratamento e a implantação de novas culturas ainda não foram completamente elucidados (Guo et al., 2017). De Boer et al. (2003) mostraram que pode ocorrer redução drástica da fungistase (inibição temporária da germinação e/ou

crescimento do fungo) após mudanças induzidas por estresse nos microrganismos do solo. Desta forma, é possível que a DAS e outros tratamentos de desinfestação causem efeitos semelhantes nas atividades supressoras de patógenos das comunidades microbianas do solo.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda por métodos ecologicamente sustentáveis de tratamento de solo é crescente e a DAS tem surgido como opção adicional para fumigação biológica do solo. A técnica tem demonstrado potencial para manejo de vários fitopatógenos, incluindo organismos causadores de doenças com poucas alternativas de controle químico eficiente. No entanto, algumas questões ainda necessitam ser elucidadas ou parte dos processos devem ser otimizados para que o uso da DAS seja comum em diferentes culturas agrícolas. O efeito da técnica sobre vários patógenos de solo ainda não é muito conhecido, incluindo *S. cepivora* e algumas espécies de nematoides relevantes em condições tropicais, a exemplo de *M. javanica*, *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii* e *Pratylenchus brachyurus*. Inúmeras fontes de carbono também devem ser estudadas, privilegiando materiais amplamente disponíveis em diferentes regiões agrícolas. A DAS é amplamente usada em áreas de produção de morango nos EUA, cultura que demanda a cobertura do solo com plástico. No entanto, os custos com plástico limitam o uso da DAS em áreas maiores. Por isso, os custos de implantação da DAS também devem ser considerados pelos cientistas, assim como a possibilidade de estudo de diferentes cores de plástico, tempo de incubação do solo e a substituição do plástico convencional por filmes derivados de recursos renováveis. A DAS tem potencial de uso principalmente para culturas conduzidas em estufas, para o manejo de reboleiras e na produção de hortaliças.

Tabela 1. Desinfestação anaeróbica do solo (DAS) no controle de fitopatógenos habitantes de solo.

Patógeno	Tempo	Fonte de carbono orgânico	Cultura	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i>	14 dias	Etanol	Solo	Momma et al. (2010)
<i>Fusarium oxysporum</i>	14 dias	Farelo de trigo	Solo	Momma et al. (2010)
<i>Meloidogyne incognita</i>	24 dias	Farelo de trigo	Tomate	Katase et al. (2009)
<i>Verticillium dahliae</i>	3 semanas	Farelo de arroz	Morango	Shennan et al. (2010)
<i>Pratylenchus penetrans</i>	2 semanas	Farelo de arroz	Maçã	Hewavitharana et al. (2014)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7 semanas	Farelo de arroz	Noz	Strauss et al. (2015)
<i>Pythium</i> spp.	7 semanas	Farelo de arroz	Noz	Strauss et al. (2015)
<i>Verticillium dahliae</i>	3 semanas	Farelo de arroz + Farinha de sementes	Morango	Shennan et al. (2010)
<i>Pythium</i> spp.	2 semanas	<i>Brassica juncea</i>	Maçã	Hewavitharana et al. (2014)
<i>Pratylenchus penetrans</i>	2 semanas	<i>Brassica juncea</i>	Maçã	Hewavitharana et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-5	2 semanas	<i>Brassica juncea</i> , etanol, farelo de arroz, grama	Maça	Hewavitharana & Mazzola (2016)
<i>Meloidogyne incognita</i>	3 semanas	Melaço	Berinjela	Butler et al. (2012a)
<i>Meloidogyne incognita</i>	3 semanas	Melaço + cama de frango	Pimentão	Butler et al. (2012a)
<i>Phytophthora capsici</i>	3 semanas	Melaço + cama de frango	Solo	Butler et al. (2012a)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	Melaço	Solo	Butler et al. (2012a)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	Feijão caupi	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Meloidogyne incognita</i>	3 semanas	Feijão caupi	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Athelia rolfsii</i>)	3 semanas	Feijão caupi	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Meloidogyne incognita</i>	3 semanas	Milheto	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	Milheto	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Athelia rolfsii</i>)	3 semanas	Milheto	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Meloidogyne incognita</i>	4 semanas	Sorgo	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5 semanas	Sorgo	Tomate	Butler et al. (2012b)

Continua...

Tabela 1 (Continuação). Desinfestação anaeróbica do solo (DAS) no controle de fitopatógenos habitantes de solo.

Patógeno	Tempo	Fonte de carbono orgânico	Cultura	Referência
<i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Athelia rolfsii</i>)	6 semanas	Sorgo	Tomate	Butler et al. (2012b)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	Aveia	Espinafre	Mowlick et al. (2013)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	<i>Brassica juncea</i>	Espinafre	Mowlick et al. (2013)
<i>Fusarium oxysporum</i>	3 semanas	Rabanete	Espinafre	Mowlick et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i>	4 semanas	Melaço seco	Tomate	Mowlick et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i>	5 semanas	Melaço seco	Pimentão vermelho	Mowlick et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i>	4 semanas	Melaço seco	Pimentão, tomate	McCarty et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i>	4 semanas	Centeio	Pimentão, tomate	McCarty et al. (2014)
<i>Rhizoctonia solani</i>	4 semanas	Mostarda + Melaço seco + Rúcula	Pimentão, tomate	McCarty et al. (2014)
<i>Pratylenchus penetrans</i>	2 semanas	Etanol	Maçã	Hewavitharana et al. (2014)
<i>Pythium</i> spp.	2 semanas	Etanol	Maçã	Hewavitharana et al. (2014)
<i>Meloidogyne</i> spp.	3 semanas	Cama de frango compostada e melaço	Tomate	Di Gioia et al. (2016)
<i>Phytophthora nicotianae</i>	4 semanas	Farelo de arroz, torta de colza, bagaço de uva e resíduos de cervejaria	Pimenta	Serrano-Pérez et al. (2017)
<i>Meloidogyne</i> spp.	3 semanas	Melaço + cama de frango	Tomate	Guo et al. (2017)
<i>Verticillium dahliae</i>	3-6 semanas	Farinha de sementes de mostarda e emulsão de peixe	Morango	Shennan et al. (2017)
<i>Verticillium dahliae</i>	3 semanas	Farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de uva, resíduos de cebola e etanol	Morango	Shennan et al. (2017)
<i>Meloidogyne hapla</i> e <i>M. incognita</i>	3 semanas	Melaço, Etanol e Farelo de trigo	Tomate	Testen & Milller (2018)
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	3 semanas	Farelo de Trigo	Tomate	Testen & Milller (2018)
<i>Colletotrichum coccodes</i>	3 semanas	Etanol	Tomate	Testen & Milller (2018)
<i>Verticillium</i> spp.	3 semanas	Farelo de trigo e etanol	Tomate	Testen & Miller (2018)

Continua...

Tabela 1 (Continuação). Desinfestação anaeróbica do solo (DAS) no controle de fitopatógenos habitantes de solo.

Patógeno	Tempo	Fonte de carbono orgânico	Cultura	Referência
<i>Verticillium dahliae</i>	4 semanas	Farelo de arroz	Morango	Mazzola et al. (2018)
<i>Sclerotium rolfsii</i> (= <i>Athelia rolfsii</i>)	3 semanas	Melaço seco e farelo de trigo	Solo	Shrestha et al. (2018)
<i>M. hapla</i>	4 semanas	Melaço e farelo de trigo	Alface	Testen & Miller (2019)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3 semanas	Farelo de trigo e melaço seco	Solo	Sanabria-Velazquez et al. (2019)
<i>Meloidogyne</i> spp.	3 semanas	Torta de mostarda	Quiabo	Khadka et al. (2019)
<i>Meloidogyne</i> spp.	3 semanas	Melaço, farelo de arroz + melaço, torta de mostarda	Berinjela	Khadka et al. (2019)

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. 2004. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, 28: 49-54.

BLASINGAME, D.; PATEL, M.V. 2013. Cotton disease loss estimate committee report. In: **Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences**, San Antonio, TX. 7-10, National Cotton Council of America, Memphis, TN, p. 1242-1246, 2013. Disponível em: <http://www.cotton.org/beltwide/proceedings/2005-2019/data/conferences/2013/papers/14796.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253–259.

BUTLER, D. M.; KOKALIS-BURELLE, N.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C.; McCOLLUM, T.G.; ROSSKOPF, E.N. 2012a. Impact of anaerobic soil disinfestation combined with soil solarization on plant-parasitic nematodes and introduced inoculum of soilborne plant pathogens in raised-bed vegetable production. **Crop Protection**, 39: 33–40.

BUTLER, D.M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; ALBANO, J.P.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C. 2012b. Exploring warm-season cover crops as carbon sources for anaerobic soil disinfestation. **Plant and Soil**, 355: 149-165.

CHARCHAR, J.M.; VIEIRA, J.V.; OLIVEIRA, V.R.; MOÍTA, A.W. Efeitos de nematicidas fumigantes e não fumigantes no controle de *Meloidogyne* spp. em batata e cenoura. **Nematologia Brasileira**, 31 (2): 1-8.

DE BOER, W.; VERHEGGEN, P.; KLEIN GUNNEWIEK, P. J. K.; KOWALCHUK, G. A.; VAN VEEN, J. A. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 835–844.

DI GIOIA, F.; OZORES-HAMPTON, M.; HONG, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; ALBANO, J.; ZHAO, X.; BLACK, Z.; GAO, Z.; WILSON, C.; THOMAS, J.; MOORE, K.; SWISHER, M.; GUO, H.; ROSSKOPF, E.N. 2016. The effects of anaerobic soil disinfestation on weed and nematode control, fruit yield, and quality of Florida fresh-market tomato. **Hortscience**, 51: 703-711.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; MIRANDA, I.D. 2019. Damage caused by *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus zae* to sugarcane cultivars. **Summa Phytopathology**, 45: 146-156.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. 2016. **Nematologia de plantas: Fundamentos e importância**. Norma Editora: Manaus – AM, 251 p.

FUGA, C.A.G.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S. 2012. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 20: 278-322.

GOUD, J.C.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BLOK, W.J.; van BRUGGEN, A.H.C. 2004. Long-term effect of biological soil disinfestation on *Verticillium* wilt. **Plant Disease**, 88: 688-694.

GUO, H.; DI GIOLA, F.; ZHAO, X.; OZORES-HAMPTON, M.; SWISHER, M.E.; HONG, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; DELONG, A.N. 2017. Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. **Scientia Horticulturae**, 218: 105-116.

HAYWARD, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, 29: 65–87.

HEWAVITHARANA, S.S.; MAZZOLA, M. 2016. Carbon source-dependent effects of anaerobic soil disinfestation on soil microbiome and suppression of *Rhizoctonia solani* AG-5 and *Pratylenchus penetrans*. **Phytopathology**, 106: 1015-1028.

HEWAVITHARANA, S.S.; RUDELL, D.; MAZZOLA, M. 2014. Carbon-source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. **European Journal of Plant Pathology**, 140: 39-52.

HUANG, X.; LIU, L.; WEN, T.; ZHANG, J.; WANG, F.; CAI, Z. 2016. Changes in the soil microbial community after reductive soil disinfestation and cucumber seedling cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100: 5581–5593.

KATASE, M.; KUBO, C.; USHIO, S.; OOTSUKA, E.; TAKEUCHI, T.; MIZUKUBO, T. 2009. Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfestation. **Japanese Journal of Nematology**, 39: 53–62.

KHADKA, R.B.; MARASINI, M.; RAWAL, R.; TESTEN, A.L.; MILLER, S.A. 2019. Effects of anaerobic soil disinfestation carbon sources on soilborne diseases and weeds of okra and eggplant in Nepal. **Crop Protection**, in press.

LOURENÇO JÚNIOR, VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; VILLALTA, O.N. 2018. Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: current knowledge and future directions for Brazil. **Científica**, v. 46, p. 241-256.

MAZZOLA, M.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C. 2018. Anaerobic disinfestation induced changes to the soil microbiome, disease incidence and strawberry fruit yields in California field trials. **Applied Soil Ecology**, 127: 74–86.

McCARTY, D.G.; INWOOD, S.E.E.; OWNLEY, B.H.; SAMS, C.E.; WSZELAKI, A.L.; BUTLER, D.M. 2014. Field evaluation of carbon sources for anaerobic soil disinfestation in tomato and bell pepper production in Tennessee. **Hortscience**, 49, 272–280.

MESSIHA, N.A.S.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; WENNEKER, M.; VAN BEUNINGEN, A.R.; JANSE, J.D.; COENEN, T.G.C.; TERMORSHUIZEN, A.J.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; BLOK, W.J. 2017. Biological soil disinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **European Journal of Plant Pathology**, 117: 403–415, 2007.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. 2005. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária, 398 p.

- MOMMA, N. 2015. Studies on mechanisms of anaerobicity-mediated biological soil disinfestation and its practical application. **Journal of General Plant Pathology**, 81: 480–482.
- MOMMA, N.; KOBARA, Y.; UEMATSU, S.; KITA N.; SHINMURA, A. 2013. Development of biological soil disinfestations in Japan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97: 3801–3809.
- MOMMA, N.; MOMMA, M.; KOBARA, Y. 2010. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. **Journal of General Plant Pathology**, 76: 336–344.
- MOMMA, N.; YAMAMOTO, K.; SIMANDI, P.; SHISHIDO, M. 2006. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). **Journal of General Plant Pathology**, 72: 247–252.
- MOWLICK, S.; INOUE, T.; TAKEHARA, T.; TONOUCHE, A.; KAKU, N.; UEKI, K.; UEKI, A. 2014. Usefulness of Japanese-radish residue in biological soil disinfestation to suppress spinach wilt disease accompanying with proliferation of soil bacteria in the Firmicutes. **Crop Protection**, 61, 64–73.
- ROSSKOPF, E.N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. 2014. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228.
- RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; van den BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMINSKA, M.A.; van der WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. 2014. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177–193.
- SANABRIA-VELAZQUEZ, A.D.; TESTEN, A.L.; ENCISO, G.A.; SOILAN, L.C.; MILLER, S.A. 2019. Effects of anaerobic soil disinfestation on *Sclerotinia sclerotiorum* in Paraguay. **Plant Health Progress**, 20: 50-60.

SERRANO-PÉREZ, P.; ROSSKOPF, E.; SANTIAGO, A.; RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C. 2017. Anaerobic soil disinfestation reduces survival and infectivity of *Phytophthora nicotianae* chlamydospores in pepper. **Scientia Horticulturae**, 215: 38–48.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; KOIKE, S.; BAIRD, G.; FENNIMORE, S.; SAMTANI, J.; BOLDA, M.; DARA, S.; DAUGOVISH, O.; LAZAROVITS, G.; BUTLER, D.; ROSSKOPF, E.; KOKALIS-BURELLE, N.; KLONSKY, K.; MAZZOLA, M. 2017. Anaerobic soil disinfestation is an alternative to soil fumigation for control of some soilborne pathogens in strawberry production. **Plant Pathology**, 67: 51-66.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; KOIKE, S.T.; DAUGOVISH, O. 2010. Optimizing anaerobic soil disinfestation for non-fumigated strawberry production in California. **California Strawberry Commission Annual Production Research Report 2010–2011**, pp. 113–121.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y.; PUGLIESE, M. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175.

SHERESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254

SHINMURA, A. 2000. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143.

SHINMURA, A. 2004. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 22: 2–12.

SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7, article n. 1254.

SHRESTHA, U.; DEE, M.E.; OWNLEY, B.H.; BUTLER, D.M. 2018. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. **Phytopathology**, 108: 342-351.

SILVA, J.F.V. 1999. Um histórico. In: Silva, J.F.V. (Org.) **O nematoide de cisto da soja: a experiência brasileira**. Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 15-23.

SINGH, S.; SINGH, B.; SINGH, A.P. 2015. Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. **Procedia Environmental Science**, 29: 215-216.

STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14: 2309-2318.

TESTEN, A.L.; MILLER, S.A. 2019. Anaerobic soil disinfestation to manage soilborne diseases in muck soil vegetable production systems. **Plant Disease**, 103: 1757-1762.

Van AGTMAAL, M.; van OS, G.J.; HOL, W.H.G.; HUNDSCHIED, M.P.J.; RUNIA, W.T.; HORDIJK, C.A.; BOER, W. 2015. Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. **Frontiers in Microbiology**, 6: 701.

Van der WURFF, A.W.G.; JANSE, J.; KOK, C.J.; ZOON, F.C. 2010. Biological control of root-knot nematodes in organic vegetable and flower greenhouse cultivation. **Wageningen UR Greenhouse Horticulture**: Bleiswijk, The Netherlands. Report n.321, 64 p.

CAPÍTULO II

Potencial da redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora* por meio da desinfestação anaeróbica do solo

RESUMO

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS) é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial da técnica no manejo de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora*. Para testar a hipótese de que a DAS pode ser usada na redução da viabilidade desses dois patógenos, avaliou-se o efeito da DAS com etanol 5% (v:v) e sacarose 5% (m:v) na viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* em condições de microcosmo (4,5 kg de solo acondicionado em saco plástico transparente). As fontes de carbono foram comparadas com a autoclavagem do solo (120 °C por 1h por dois dias consecutivos), saturação do solo com apenas água e solo não tratado. O período de incubação do solo foi de três semanas. A DAS com etanol ou sacarose reduziu em mais de 75% o número de J₂ no solo e em mais de 90% o número de galhas em plantas indicadoras, com eficiência similar à autoclavagem do solo e superior à saturação apenas com água. A viabilidade de escleródios de *S. cepivora* foi reduzida pela DAS, principalmente usando sacarose, que causou redução similar à autoclavagem do solo. A saturação do solo com água não suprimiu a germinação dos escleródios. Assim, conclui-se que a DAS por três semanas com etanol ou sacarose, ambos a 5%, reduz a viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* em microcosmo. A eficiência de redução de viabilidade da técnica foi similar à autoclavagem do solo. A saturação do solo com água por três semanas não reduz a viabilidade de escleródios de *S. cepivora* e o efeito desse tratamento em solo com *M. javanica* é inferior ao uso da DAS. Experimentos em campo devem ser conduzidos para validar o uso da DAS no manejo de *M. javanica* e *S. cepivora*.

Palavras-chave: Controle de doenças de plantas. Desinfestação biológica do solo. Nematóide de galhas. *Sclerotium cepivorum*.

ABSTRACT

Anaerobic soil disinfestation (DAS) is an ecological alternative to chemical soil fumigation. However, little is known about the potential of the technique in the management of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora*. To test the hypothesis that ASD can be used to reduce the viability of these two pathogens, we assessed the effect of ASD with ethanol 5% (v:v) and sucrose 5% (m:v) on the viability of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora* under microcosm conditions (4.5 kg of soil conditioned in plastic bag). Carbon sources were compared with soil autoclaving (120 °C for 1h for two consecutive days), soil saturation with water only and untreated soil. The soil was incubated for three weeks. ASD with ethanol or sucrose reduced by more than 75% the number of J₂ in the soil and by more than 90% the number of galls in the indicator plants, with efficiency similar to soil autoclaving and superior to water saturation. The viability of *S. cepivora* sclerotia was reduced by ASD, especially using sucrose, which caused a similar reduction to soil autoclaving. Soil saturation with water did not suppress sclerotia germination. Thus, it is concluded that ASD for three weeks with ethanol or sucrose, both at 5%, reduces the viability of *M. javanica* and *S. cepivora* in microcosm. The viability reduction efficiency of the technique was similar to soil autoclaving. Soil saturation with water for three weeks does not reduce the viability of *S. cepivora* sclerotia and the effect of this treatment on soil with *M. javanica* is lower than ASD. Field experiments should be conducted to validate the use of ASD in the management of *M. javanica* and *S. cepivora*.

Keywords: Control of plant diseases. Biological soil disinfestation. Root-knot nematode. *Sclerotium cepivorum*.

1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides e o fungo *Stromatinia cepivora* (sin. *Sclerotium cepivorum*) são patógenos habitantes do solo, estão dispersos em importantes regiões agrícolas em todo o mundo e o seu manejo envolve a adoção de várias estratégias de controle. Os fitonematoides causam grandes perdas na agricultura e os prejuízos causados por esses patógenos são resultantes da redução da quantidade e, ou, qualidade de produtos agrícolas, pela sua ação como vetor de viroses e por facilitarem a infecção das plantas por outros fitopatógenos (Nicol et al., 2011; Lopes & Ferraz, 2016).

Por sua vez, *S. cepivora* é causador da podridão-branca, uma das mais devastadoras doenças do alho e da cebola em todo o mundo (Fuga et al., 2012; Villalta et al., 2012; Domingos et al., 2015). Plantas atacadas apresentam sintomas de amarelecimento foliar, podridão dos bulbos, e, com a evolução da colonização do patógeno, podem morrer. O fungo parasita apenas plantas do gênero *Allium*, mas produz escleródios de 0,3 a 0,6 mm de diâmetro garantem sua sobrevivência no solo por até 20 anos na ausência de hospedeiros (Coley-Smith et al., 1990). No Brasil, o patógeno está disperso nas principais regiões produtoras de alho e cebola de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Pinto et al., 1998; Fuga et al., 2012; Reis & Oliveira, 2013).

O controle de nematoides envolve a combinação de rotação de culturas, pousio e revolvimento do solo, aplicação de agentes de controle biológico e, em muitos casos, o uso de nematicidas químicos. Os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) são os economicamente mais importantes na agricultura, com destaque para as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, prevalentes em regiões tropicais e subtropicais. O nematoide de galhas possui ampla gama de hospedeiros, o que limita as opções de culturas agrícolas para adoção em sistema de rotação. O controle químico de fitonematoides pode envolver o uso de fumigantes químicos (metam sódico e dazomete) e de produtos contendo carbamatos e organofosforados. No entanto, os nematicidas químicos são altamente tóxicos para os seres humanos, e quando aplicado ao solo e, provavelmente pode contaminar as águas subterrâneas (Oka, 2010).

O manejo da podridão-branca é dificultado pela habilidade de sobrevivência do fungo no solo, o que limita a adoção de esquemas de rotação de culturas incluindo espécies de *Allium* em período inferior a 20 anos (Fuga et al., 2012). Uma vez que a doença é identificada em campo, os produtores são forçados a cultivar outras culturas não suscetíveis e migrar para áreas não infestadas. Nenhum cultivar resistente está disponível para uso dos agricultores brasileiros. Solarização, biofumigação, aplicação de indutores de germinação de escleródios, uso de agentes de controle biológico e de fungicidas químicos devem ser adotados de forma integrada para reduzir a população do patógeno em áreas infestadas (Fuga et al., 2012). A fumigação do solo com produtos químicos, além de ser cara e não resultar em controle satisfatório em alguns casos, também causa impactos no ambiente e na saúde humana.

Visando diminuir o uso de produtos químicos na agricultura no controle de fitopatógenos habitantes do solo, cientistas em todo mundo tem buscado desenvolver métodos sustentáveis e eficientes. A desinfestação anaeróbica do solo (DAS), também conhecida como desinfestação biológica do solo, é uma alternativa ecológica à fumigação química do solo. A técnica foi desenvolvida no final dos anos 1990 e início dos anos 2000 (Blok et al., 2000; Shinmura, 2000) e tem sido usada desde então para o manejo de vários patógenos habitantes de , incluindo *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Ralstonia*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, além de insetos e plantas daninhas (Goud et al., 2004; Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016; Guo et al., 2017; Shrestha et al., 2018).

A técnica consiste na incorporação de matéria orgânica (sólida ou líquida) ao solo, seguido de irrigação até saturação e cobertura do solo com plástico impermeável por três a quatro semanas (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). As condições anaeróbicas criadas pela saturação do solo e cobertura com plástico estimula a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016). A combinação de falta de oxigênio, acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica (ácidos acético, butírico e propiônico, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ e N₂O) e antagonismo exercido por organismos anaeróbicos é responsável pela redução da viabilidade de fitopatógenos

em áreas submetidas à desinfestação anaeróbica do solo (Mowlick et al. 2013, 2014; Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015).

As principais fontes de carbono orgânicas utilizadas na DAS são líquidas ou sólidas. As fontes sólidas, incluindo farelo de cereais, cama de frango compostada, adubo verde e plantas de cobertura, são frequentemente incorporados ao solo antes da irrigação e em seguida elas são cobertas com plástico impermeável. Em contrapartida, as fontes líquidas, a exemplo de melaço, glicose, sacarose, xilose ou etanol, podem ser aplicadas juntas com a irrigação antes da cobertura com o plástico impermeável. As fontes líquidas penetram nos poros do solo e, com a maior distribuição do carbono orgânico na área, a eficiência do tratamento com materiais líquidos é maior do que com os sólidos (Momma et al., 2013; Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al. 2016). A escolha da fonte de carbono desempenha um papel importante na estrutura da comunidade microbiana do solo, pois afetam populações microbianas diferentes no solo com a DAS (Hewavitharana et al., 2014).

O efeito da DAS no manejo de espécies de *Fusarium*, *Verticillium* e *Rhizoctonia* já é conhecido e a técnica tem se mostrado eficiente, principalmente na cultura do morangueiro (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre o seu potencial no controle de outros patógenos habitantes de solo, a exemplo de *S. cepivora* e *M. javanica*. Assim, torna-se necessário avaliar se a DAS pode ser usada no manejo desses dois importantes patógenos, uma vez que essa lacuna do conhecimento ainda não foi preenchida. Por isso, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da desinfestação anaeróbica do solo na redução da viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* em microcosmo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, Minas Gerais. Os experimentos foram conduzidos duas vezes em casa de vegetação e as análises foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular (BIOFITOMOL).

Para realização deste experimento, 540 kg de solo foram coletados em uma área anteriormente cultivada com feijão em Rio Paranaíba e naturalmente infestada com *Meloidogyne javanica*. A coleta do solo foi realizada no dia 26 de março de 2019, concentrando-se na camada de 0-30 cm de profundidade. Metade do volume (270 kg) do solo coletado foi armazenada em caixas d'água protegidas da luz solar para realização da repetição desse experimento. A outra metade (270 kg) foi homogeneizada em betoneira por cinco minutos e acondicionada em 30 sacos plásticos transparentes (40 x 60 cm), cada um com 9 kg de solo. Cada parcela experimental foi composta por um saco plástico contendo 9 kg de solo (microcosmo).

2.2. Determinação da população de *M. javanica*

A partir dos 9 kg de solo, quatro quilogramas e meio foram retirados de cada saco plástico para a determinação da população inicial de nematoides antes da aplicação dos tratamentos. Foram retirados 500 g para determinação do número de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*.

A extração de J₂ foi realizada de 100 cm³ de solo pelo método de flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964). Os juvenis extraídos foram quantificados com auxílio de câmara de Peters sob microscópio de luz. Antes da desinfestação anaeróbica, foram encontrados em média 7 J₂ 100 cm⁻³ de solo no primeiro experimento antes da desinfestação anaeróbica e 9,7 no segundo. A média do número de galhas em plantas indicadoras antes da DAS (tratamento controle) foi de 19,5 no primeiro experimento e 22,5 no segundo.

Outra parte do solo, 1000 g para cultivo de alface (primeiro experimento) e mais 1000g para cultivo do tomateiro (segundo experimento) foi colocado em vasos plásticos de 1 L de capacidade. Estas plantas são indicadoras suscetíveis, usadas para determinação da população de nematoides viáveis totais no solo, incluindo J₂ e

ovos. No primeiro experimento, as plântulas de alface crespa variedade Isadora foram transplantadas para os vasos, uma em cada. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por 30 dias. No segundo experimento, plântulas de tomateiro variedade Cienaga foram cultivadas por 60 dias. Ao final do período de cultivo, as plantas foram removidas e o número de galhas foi contado a olho nu com uso de contador de unidades.

2.3. Viabilidade de escleródios de *S. cepivora*

Os escleródios foram coletados de áreas com plantas de alho doentes no município de Rio Paranaíba. Após a coleta no campo, os escleródios foram mantidos enterrados por mais de três meses, para quebra de dormência constitutiva. Para uso nos experimentos, os escleródios foram desinfestados por um minuto em álcool 70% (v:v), em seguida imersos em hipoclorito de sódio 0,5% (v:v) por três minutos e enxague duas vezes em água destilada autoclavada (120°C por uma hora). Quinze escleródios foram colocados em bolsas de poliéster (16 cm de comprimento x 8 cm de largura, com fibras internas de 0,04 mm²), que foram presas por ilhós de cortina (diâmetro interno de 4 cm) (Figura 1). Em cada saco plástico foi colocado um conjunto a 10 cm de profundidade no solo.



Figura 1. Avaliação de viabilidade de escleródios de *Stromatinia cepivora*.

1 - Sistema desenvolvido para avaliar a ação de agentes externos sobre escleródios de *Stromatinia cepivora*. 2 - Bolsa de poliéster (“voal” de cortina) em formato retangular (16 x 8 cm), aberta nas laterais, dobrada ao meio, contendo 15 escleródios no centro. 3 - O conjunto foi preso por ilhós de plástico.

Após três semanas da aplicação dos tratamentos, os conjuntos foram removidos dos sacos plásticos e os escleródios foram desinfestados por um minuto em álcool 70% (v:v), seguido de imersão em hipoclorito de sódio 0,5% (v:v) por três minutos e enxague por duas vezes em água destilada autoclavada (120 °C por uma hora). Para avaliar a viabilidade, dez escleródios foram colocados na superfície de meio de cultura BDA (Batata dextrose ágar, acidificado com 0,6 mL de ácido láctico em um litro de meio de cultura para evitar o crescimento de colônias de bactérias) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Em seguida, as placas foram acomodadas em B.O.D. a 16 ± 2 °C por 21 dias. Ao fim desse período, a germinação dos escleródios foi avaliada a cada dois por 21 dias consecutivos, identificados pelo crescimento micelial do fungo.

2.4. Desinfestação anaeróbica do solo

Etanol (5%, v:v) e solução de sacarose (5%, m:v) foram as fontes de carbono avaliados neste experimento. Como tratamentos controles, usou-se solo não tratado, solo saturado apenas com água e autoclavagem do solo (120°C por uma hora durante dois dias consecutivos). Na primeira vez que o experimento foi conduzido, o conjunto com os escleródios de *S. cepivora* foi colocado em solo autoclavado por receio de que a alta temperatura danificasse a bolsa de poliéster e liberasse os escleródios. No entanto, na segunda vez, os conjuntos foram colocados antes da autoclavagem e não houve perda de escleródios após o processo.

Para estimar a quantidade de líquido necessária para saturação dos poros do solo foi calculada a capacidade de campo. Cem gramas de solo de cada parcela foram colocados em um funil encaixado na abertura de uma proveta de 100 mL de capacidade. Cem mililitros de água foram adicionados lentamente ao solo no funil, coletando a solução drenada na proveta. Após repouso de 2 h para drenagem da água do solo, o volume coletado na proveta foi registrado. A capacidade de campo (CC) foi calculada pela Equação 1.

$$CC = \text{Água retida no solo (mL)} \times 100 / \text{Volume do solo (mL)} \quad (1)$$

onde: CC = capacidade de campo do solo, em % de solo usado; Água retida no solo = volume de 100 mL - volume de água coletado na proveta (mL); Volume de solo no

funil = 100 mL. Para saturação de 4,5 kg de solo foi necessário aplicar 700 mL de água ou soluções de etanol ou sacarose.

Após a aplicação das fontes de carbono, os sacos foram vedados com fita adesiva, alocados na vertical no interior da casa de vegetação e mantidos na ausência de luz, cobertos por uma lona preta. Após três semanas, os sacos foram abertos e amostras de solo foram retiradas para determinação do número de J_2 e para cultivo das plantas indicadoras, conforme descrito no item 2.2. Os conjuntos contendo escleródios de *S. cepivora* também foram removidos para a avaliação de viabilidade (item 2.3).

A temperatura do solo foi medida com termômetros do tipo ibutton (DS1920-F5, HomeChip, Ltd, Reino Unido), inseridos no solo antes da aplicação dos tratamentos. No primeiro experimento, a temperatura média foi de 20,6 °C, variando entre 18,5 °C e 21,6 °C. No segundo, foi de 18,3 °C, oscilando entre 16,7 °C e 19,1 °C.

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

Foram realizados dois experimentos. Na primeira vez, entre os dias 20/05 a 10/06/2019 e, na segunda, entre 10/07 a 31/07/2019. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (etanol, sacarose, água, autoclavagem e solo não tratado) e seis repetições.

Os dados de números de galhas de *M. javanica* antes e depois da desinfestação anaeróbica do solo foram analisados por meio do teste t para amostras dependentes ($p < 0,05$). Os tratamentos que reduziram os números de J_2 e galhas após a DAS foram comparados entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), assim como a viabilidade de escleródios de *S. cepivora*. Análise descritiva (média e desvio padrão) foi usada para avaliar a redução de J_2 no solo devido à ausência de *M. javanica* em várias parcelas antes da DAS. As análises estatísticas foram realizadas com uso do software R versão 3.6.0 (R Development Core Team, 2019).

3. RESULTADOS

A desinfestação anaeróbica de solo por três semanas com etanol ou sacarose reduziu entre 75 e 93,8% o número de juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. javanica*. Apenas manter o solo saturado com água, sem fonte de carbono adicional, reduziu o número de nematoides entre 33 e 39%, enquanto deixar o solo em repouso por três semanas sem nenhum tratamento (controle) reduziu entre 23 e 24% o número de J₂. Conforme esperado, autoclavar o solo infestado a 120°C por 1 h durante dois dias consecutivos matou todos os J₂ de *M. javanica* (Figura 2).

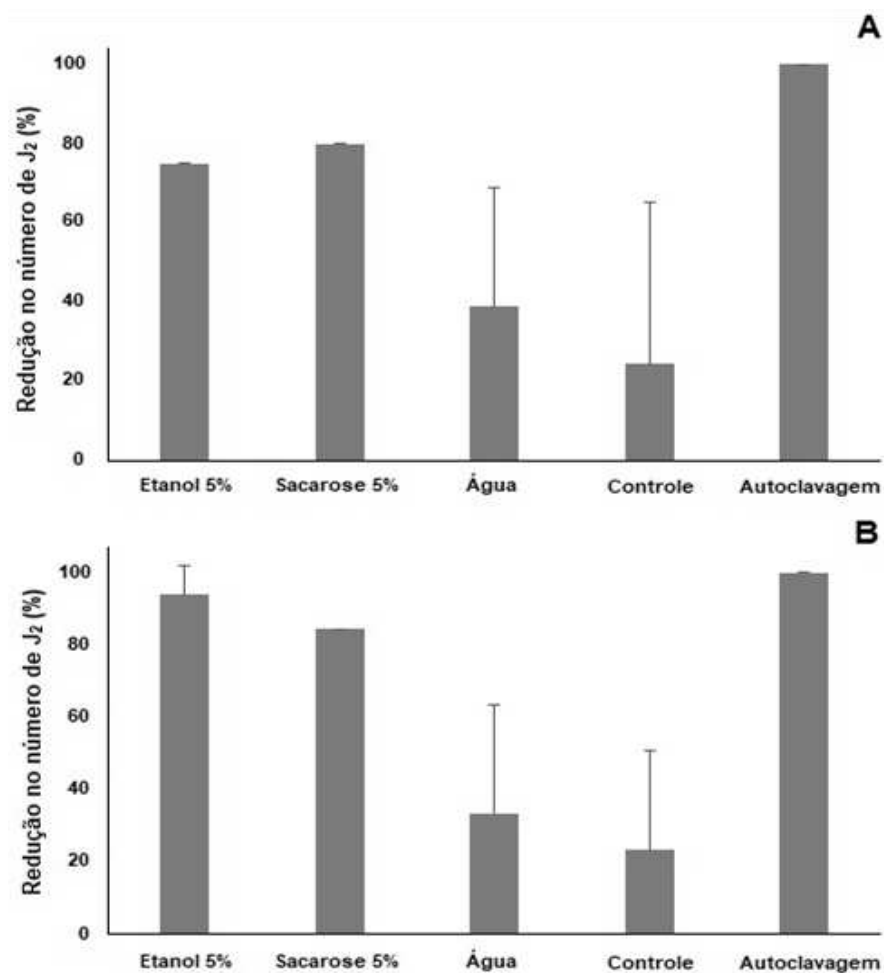


Figura 2. Redução percentual de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica* em solo submetido à desinfestação anaeróbica por três semanas com etanol 5%, sacarose 5% ou apenas água, além da ausência de tratamento (controle) ou autoclavagem do solo a 120°C por 1 h por dois dias consecutivos. Barras sobre as colunas representam desvio padrão da média. A-Experimento 1. B-Experimento 2.

O número de galhas de *M. javanica* em raízes das plantas indicadoras foi reduzido em mais de 90% em solo desinfestado anaerobicamente com etanol ou sacarose (Figura 3). A eficiência de redução do número de galhas após DAS com ambas as fontes de carbono foi similar à autoclavagem do solo e superior a manutenção do solo saturado apenas com água (Figura 3). O número de galhas em plantas indicadoras após o cultivo em solo não tratado e mantido em repouso por três semanas (controle) foi similar ao observado antes da aplicação dos tratamentos, com média de 16,7 galhas por planta.

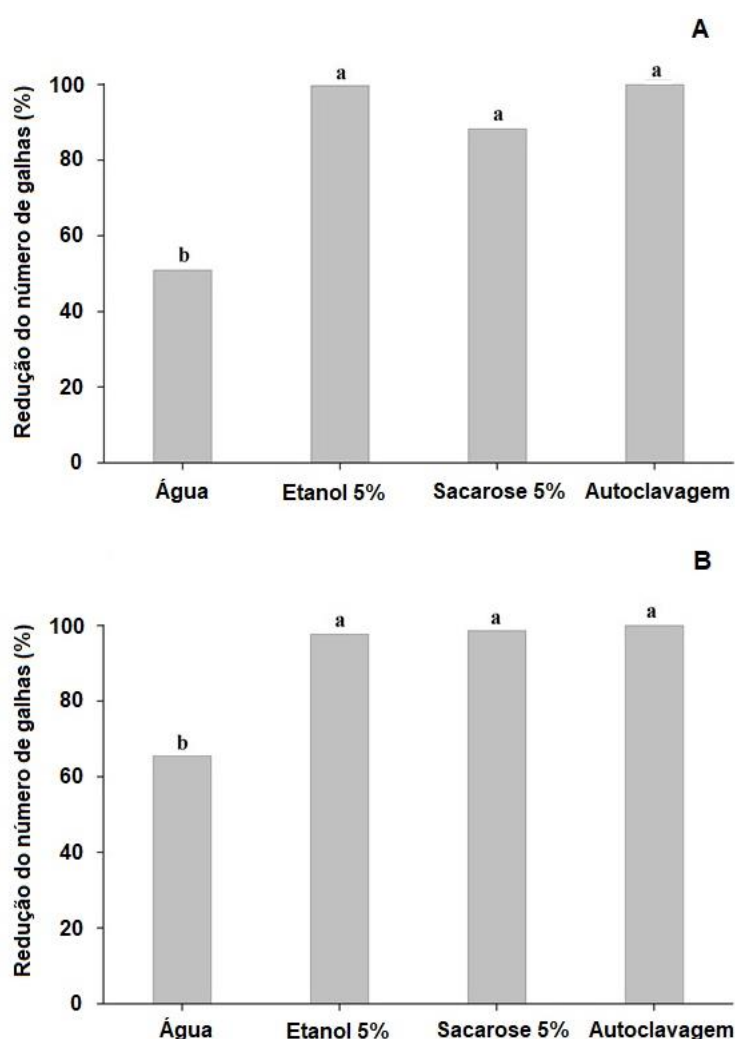


Figura 3. Redução percentual no número de galhas de *Meloidogyne javanica* em raízes de plantas indicadoras. A - Alface Isadora, experimento 1. B - Tomate Cienaga 60, experimento 2. Alface cultivada por 30 dias e o tomate por 60 dias em solo submetido à desinfestação anaeróbica por três semanas com etanol 5%, sacarose 5%, água e autoclavagem (controle) ou autoclavagem do solo a 120°C por 1 h por dois dias consecutivos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A germinação de escleródios de *S. cepivora* foi reduzida após desinfestação anaeróbica com etanol ou sacarose, quando comparado ao solo não tratado (controle) ou saturado com apenas água (Figura 4). De forma geral, a DAS usando sacarose foi mais eficiente na redução da viabilidade de escleródios do fungo do que usando etanol. No primeiro experimento (Figura 4A), a DAS com sacarose inibiu completamente a germinação de escleródios e, no segundo experimento, a eficiência foi de aproximadamente de 90%, com níveis similares ao observado após submeter os escleródios à autoclavagem a 120 °C por 1h por dois dias consecutivos (Figura 4B). Quando o solo foi saturado com água, sem adição de fonte de carbono, não houve redução na germinação de escleródios (Figura 4).

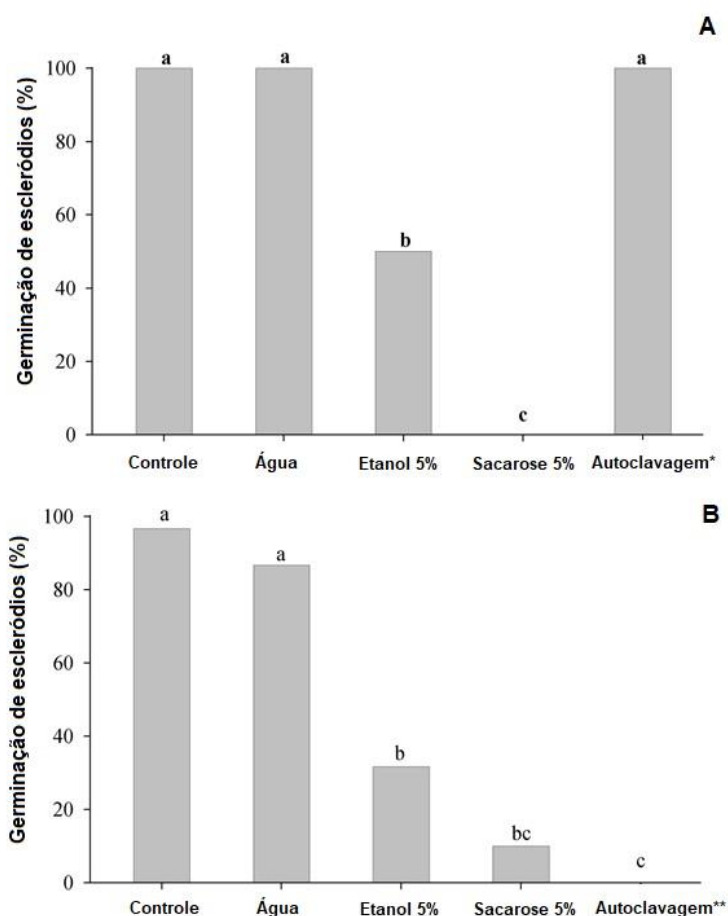


Figura 4. Percentual de germinação de escleródios de *Stromatinia cepivora* mantidos em solo submetido à desinfestação anaeróbica por três semanas com etanol 5%, sacarose 5%, água, sem tratamento (controle) ou autoclavagem do solo a 120°C. A – Experimento 1: o conjunto contendo escleródios em solo previamente autoclavado (*). B - Experimento 2: escleródios colocados em solo e submetidos à autoclavagem (**). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A desinfestação anaeróbica de solo por três semanas com etanol ou sacarose, ambos a 5%, reduz a viabilidade do nematoide *M. javanica* e do fungo *S. cepivora* em microcosmo. Esses patógenos são muito importantes em áreas de produção de hortaliças no Brasil, a exemplo do Alto Paranaíba. Os resultados deste trabalho podem servir como orientação para estudos futuros que visem delinear estratégias de manejo desses patógenos, principalmente com foco na redução da sua sobrevivência na ausência de hospedeiros.

A saturação do solo, sem adição de fonte de carbono, não teve impacto significativo na redução da germinação de *S. cepivora* e, apesar de reduzir a viabilidade de *M. javanica*, foi inferior à DAS. A condição de anaerobiose imposta pela saturação do solo é um fator que pode limitar a sobrevivência desses patógenos, por serem aeróbicos. No entanto, observamos neste trabalho, que apenas a saturação do solo não é eficiente por um período de somente três semanas. Nesse caso, a adição de fontes de carbono é fundamental para a proliferação de organismos anaeróbicos e, com isso, resultar no acúmulo de produtos tóxicos da decomposição anaeróbica (ácidos acético, butírico e propiônico, CO₂, NH₃, H₂S, CH₄ e N₂O), que irão atuar contra os fitopatógenos (Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015).

A desinfestação anaeróbica tem sido apontada como alternativa ecológica para a fumigação química do solo, principalmente para o manejo de espécies de *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, dentre outros (Goud et al., 2004; Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016; Guo et al., 2017; Shrestha et al., 2018). No entanto, pouco se sabe sobre a eficiência da técnica no controle de *M. javanica* e *S. cepivora*, conforme observado em metanálise publicada em 2016 (Shrestha et al., 2016). Assim, o presente trabalho contribui para demonstrar que a DAS com etanol ou sacarose pode ser útil no manejo desses patógenos.

A eficiência da DAS depende de vários fatores, incluindo material usado como fonte de carbono, tempo de cobertura do solo (incubação), doses de resíduo, alvo a ser controlado e sua densidade no solo e tipo de plástico usado para cobertura do solo em campo (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016). Farelos de cereais,

melaço, etanol, esterco de animais e resíduos vegetais são as principais fontes de carbono usadas na DAS (Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016).

De forma geral, fontes líquidas são mais eficientes do que as sólidas, por ocuparem facilmente os poros do solo e ficarem acessíveis para uso dos microrganismos anaeróbicos (Shrestha et al., 2016). Por isso, neste trabalho usamos etanol e saturação de sacarose como fontes de carbono. Elas são relativamente baratas e fáceis de aplicar, são amplamente disponíveis no Brasil e são comumente relatadas entre as mais eficientes no manejo de patógenos, insetos e plantas daninhas (Uematsu et al., 2007; Butler et al., 2012a; Momma et al., 2013; Shrestha et al., 2016).

Além disso, a composição química do etanol e sacarose não é variável, o que é vantajoso para uso na DAS, ao contrário de vários materiais orgânicos com composição variável. Butler et al. (2012b), por exemplo, reportaram inconsistência na eficiência da DAS usando culturas de cobertura como fontes de carbono. Quando etanol foi usado, o controle foi mais eficiente e consistente entre os experimentos (Butler et al., 2012b).

Etanol e sacarose foram similares quanto à redução da viabilidade de *M. javanica*, enquanto sacarose foi mais eficiente contra *S. cepivora*. Na metanálise publicada por Shrestha et al. (2016), o etanol foi a fonte de carbono que resultou em maiores níveis de controle de diferentes patógenos e plantas daninhas. Em muitas pesquisas, a concentração de etanol para uso na DAS tem variado de 0,5 a 2% (Uematsu et al., 2007; Momma et al., 2010; Kobara et al., 2011; Momma et al., 2013; Hewavitharana et al. 2014). Uematsu et al. (2007), por exemplo, relatou que o nematoide *Meloidogyne incognita*, o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* e a bactéria *Ralstonia solanacearum* foram suprimidas em solo submetido a DAS com etanol em concentrações de 0,5 a 1%. De forma geral, esses autores recomendaram aplicação de 100 L de etanol 1% por m² em experimentos preliminares em campo (Uematsu et al., 2007).

No presente estudo, decidiu-se por usar uma concentração maior do que 1%, uma vez que o etanol é facilmente encontrado no Brasil. No entanto, em estudos futuros, concentrações inferiores a 5% podem ser avaliadas, o que poderia aumentar a viabilidade da DAS.

Melaço tem sido muito estudado como fonte de carbono para DAS, principalmente quando combinado com farelos de cereais (Butler et al., 2014; Strauss & Kluepfel, 2015; Shrestha et al., 2016; Sanabria-Velazquez, 2019; Testen & Millen, 2019). O melaço possui aproximadamente 29% de sacarose, 12% de glicose e 13% de frutose (USDA, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da sacarose pura na técnica. O efeito nematicida da sacarose observado neste estudo pode também ter sido devido aos danos osmóticos do açúcar sobre o nematoide (Feder, 1960; Santiago et al., 2005) e, ou ao aumento de bactérias redutoras de sulfato, responsáveis pela geração de sulfeto de hidrogênio nematicida (Rodríguez-Kábana et al., 1965).

A desinfestação anaeróbica do solo, ao contrário da solarização, não depende de temperaturas elevadas para reduzir a viabilidade de patógenos no solo (Strauss & Kluepfel, 2015). No entanto, a eficiência da DAS diminui em condições de temperaturas mais baixas, o que requer aumentar o período de incubação (Butler et al., 2014b). A temperatura ideal para a DAS varia entre 16-30 °C. Neste trabalho, a temperatura média oscilou dentro da faixa ideal, embora mais próxima do limite inferior (18,3 e 20,6 °C). No entanto, esse fator parece não ter influenciado na eficiência da DAS usando etanol e sacarose na redução da viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora*.

A eficiência da DAS em reduzir a viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* foi similar à autoclavagem do solo por 120°C por 1 h por dois dias consecutivos. Esse resultado é promissor, uma vez que a autoclavagem do solo requer equipamento caro e o volume de solo tratado é pequeno. Em outros estudos, cientistas observaram que a DAS pode ser tão eficiente no manejo de fitopatógenos como fumigantes químicos, incluindo brometo de metila (Butler et al., 2012a). O volume de solo usado no presente estudo foi reduzido, o que limita a abrangência dos resultados. O propósito foi avaliar inicialmente o potencial da técnica em condições mais controladas. Além disso, a densidade populacional de *M. javanica* pode ser considerada baixa (menos de 10 J₂ por 100 cm³ de solo). Estudos futuros em campo mais densamente infestados com *M. javanica* e *S. cepivora* são necessários para validar os resultados que foram observados neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS) por três semanas com etanol ou sacarose, ambos a 5%, reduz a viabilidade de *M. javanica* e *S. cepivora* em microcosmo. A eficiência da técnica foi similar à autoclavagem do solo a 121 °C por 1h por dois dias consecutivos.

A saturação do solo com água por três semanas não reduz a viabilidade de escleródios de *S. cepivora* e o efeito desse tratamento em solo com *M. javanica* é inferior ao uso da DAS.

Experimentos em campo devem ser conduzidos para validar o uso da DAS no manejo de *M. javanica* e *S. cepivora*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253–259.

BUTLER, D. M.; KOKALIS-BURELLE, N.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C.; McCOLLUM, T.G.; ROSSKOPF, E.N. 2012a. Impact of anaerobic soil disinfestation combined with soil solarization on plant-parasitic nematodes and introduced inoculum of soilborne plant pathogens in raised-bed vegetable production. **Crop Protection**, 39: 33–40.

BUTLER, D.M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; ALBANO, J.P.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C. 2012b. Exploring warm-season cover crops as carbon sources for anaerobic soil disinfestation. **Plant and Soil**, 355: 149-165.

BUTLER, D.M.; KOKALIS-BURELLE, N.; ALBANO, J.P.; McCOLLUM, T.G.; MURAMOTO, J.; SHENNAN, C.; ROSSKOPF, E.N. 2014a. Anaerobic soil disinfestation (ASD) combined with soil solarization as a methyl bromide alternative: Vegetable crop performance and soil nutrient dynamics. **Plant and Soil**, 378: 365–381.

BUTLER, D.; OWNLEY, B.; DEE, M.; EICHLER, S.; McCARTY, D.; SHRESTHA, U.; KOKALIS-BURELLE, N.; ROSSKOPF, E. 2014b. Low carbon amendment rates during anaerobic soil disinfestation (ASD) at moderate soil temperatures do not decrease viability of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia or *Fusarium* root rot of common bean. **Acta Horticulturae**, 1044: 203-208.

COLEY-SMITH, J.R.; MITCHELL, C.M.; ANSFORD, C.E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, 39: 58-69.

DOMINGOS, L.B.; BONTEMPO, A.F.; LOPES, E.A. 2015. Podridão-branca do alho e da cebola. In: VISOTTO, L.E.; FERNANDES, F.L.; CARVALHO FILHO, A.; LOPES, E.A.; AQUINO, L.A.; FERNANDES, M.E.S.; GOOD GOD, P.I.V.; RUAS, R.A.A.;

SOUSA JÚNIOR, J.M. (Org.). **Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal**. 1ed. Rio Paranaíba: UFV, p. 139-188.

FEDER, W.A. 1960. Osmotic destruction of plant-parasitic and saprophytic nematodes by the addition of sugar to soil. **Plant Disease Reporter**, 44: 883–885.

FUGA, C.A.G.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S. 2012. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 20: 278-322.

GOUD, J.K.C.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BLOK, W.J.; van BRUGGEN, A.H.C. 2004. Long-term effect of biological soil disinfestation on *Verticillium* wilt. **Plant Disease**, 88: 688-694.

GUO, H.; DI GIOLA, F.; ZHAO, X.; OZORES-HAMPTON, M.; SWISHER, M.E.; HONG, J.; KOKALIS-BURELLE, N.; DELONG, A.N. 2017. Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. **Scientia Horticulturae**, 218: 105-116.

HEWAVITHARANA, S.S.; RUDELL, D.; MAZZOLA, M. 2014. Carbon-source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. **European Journal of Plant Pathology**, 140: 39-52.

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, 48: 692.

KOBARA, Y.; UEMATSU, S.; TANAKA-MIWA, C.; SATO, R.; SATO, M. 2011. Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution. In: OBENAUG, G.L. (Ed.) **Proceedings of 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reduction**, 74.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S. 2016. Importância dos fitonematoides na agricultura. In: OLIVEIRA, C.M.G.; SANTOS, M.A.; SILVA E CASTRO, L.H. (Orgs). **Diagnose de Fitonematoides**. Campinas: Millenium, p. 1-13.

McCARTER, J. 2009. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematode. In: BERG, R.; TAYLOR, C. (Eds). **Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**. Berlin/Heidelberg: Springer, p. 239–267.

MOMMA, N.; MOMMA, M.; KOBARA, Y. 2010. Biological soil disinfestation using ethanol: Effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. **Journal of General Plant Pathology**, 76: 336-344.

MOMMA, N.; KOBARA, Y.; UEMATSU, S.; KITA, N.; SHINMURA, A. 2013. Development of biological soil disinfestations in Japan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97: 3801-3809.

MOWLICK, S.; INOUE, T.; TAKEHARA, T.; TONOUCHI, A.; KAKU, N.; UEKI, K.; UEKI, A. 2014. Usefulness of Japanese-radish residue in biological soil disinfestation to suppress spinach wilt disease accompanying with proliferation of soil bacteria in the Firmicutes. **Crop Protection**, 61, 64–73.

MOWLICK, S.; YASUKAWA, H.; INOUE, T.; TAKEHARA, T.; KAKU, N.; UEKI, K.; UEKI, A. 2013. Suppression of spinach wilt disease by biological soil disinfestation incorporated with *Brassica juncea* plants in association with changes in soil bacterial communities. **Crop Protection**, 54: 185–193.

NICOL, J.M.; TURNER, S.J.; COYNE, D.L.; DEN NIJS, L.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z.T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: JONES, J.T.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Eds). **Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions**. Berlin/Heidelberg: Springer, p. 21–44.

OKA, Y. 2010. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments: a review. **Applied Soil Ecology**, 44: 101e115.

PINTO, C.M.F.; MAFFIA, L.A.; BERGER, R.D.; MIZUBUTI, E.S.G.; CASALI, V.W.D. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. **Plant Disease**, 82: 1142-1146.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

REIS, A.; OLIVEIRA, V.R. 2013. **Identificação e manejo da podridão-branca do alho e da cebola**. Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico, 91), Brasília.

SANABRIA-VELAZQUEZ, A.D.; TESTEN, A.L.; ENCISO, G.A.; SOILAN, L.C.; MILLER, S.A. 2019. Effects of anaerobic soil disinfestation on *Sclerotinia sclerotiorum* in Paraguay. **Plant Health Progress**, 20: 50-60.

SANTIAGO, D.C.; HOMECHIN, M.; MONTALVAN, R.; KRZYZANOWSKI, A.A. 2005. Potential of sucrose and *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon mulch on the management of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48: 873–883.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; JORDAN, J.W.; HOLLIS, J.P. 1965. Nematodes: biological control in rice fields: role of hydrogen sulfide. **Science**, 148: 524–526.

ROSSKOPF, E.N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. 2014. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228.

RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; van den BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMSKA, M.A.; van der WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. 2014. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177–193.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175.

SHINMURA, A. 2000. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143.

SHINMURA, A. 2004. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 22: 2–12.

SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254, Article 1254.

SHRESTHA, U.; DEE, M.E.; OWNLEY, B.H.; BUTLER, D.M. 2018. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. **Phytopathology**, 108: 342-351.

STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14: 2309-2318.

TESTEN, A.L.; MILLER, S.A. 2019. Anaerobic soil disinfestation to manage soilborne diseases in muck soil vegetable production systems. **Plant Disease**, 103: 1757-1762.

USDA – US Department of Agriculture. 2019. Molasses – Nutrients. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168820/nutrients>. Acesso em: 12/11/2019.

UEMATSU, S.; TANAKA-MIWA, C.; SATO, R.; KOBARA, Y.; SATO, M. 2007. Ethyl alcohol as a promising material of reductive soil disinfestation for controlling root knot nematode and soilborne plant diseases. **Proceedings of 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reduction**, 75.

VILLALTA, O.N.; WITE, D.; PORTER, I.J.; McLEAN, K.L.; STEWART, A.; HUNT, J. 2012. Integrated control of onion white rot on spring onions using diallyl disulphide, fungicides and biocontrols. **Acta Horticulturae**, 944: 63-71.