

**Workshop**

# **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**

**Livro de Actas**

**Escola Superior Agrária de Bragança  
24 de Março 2011**



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**  
Escola Superior Agrária



***Uma escola de biociências***

## **Ficha Técnica**

**Título:** Actas do Workshop em Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável

**Editores:** José Alberto Pereira & Albino Bento

Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança

Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança

Portugal

**Tiragem:** 150 Exemplares

**Ano:** 2011

**Depósito Legal:** 325110/11

**ISBN:** 978-972-745-116-6

## Nota introdutória

É com grande entusiasmo que aguardamos a realização do *I workshop “Agroecologia e desenvolvimento sustentável”*, com o envolvimento de diversas Instituições do espaço Ibero-Americano, nomeadamente da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (Portugal), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Brasil), da Universidad León (Espanha), e da Universidad Autónoma do Chapingo (México), e que decorre dia 24 de Março na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

As actividades previstas neste workshop, juntamente com *II workshop de parcerias internacionais*, pretendem cimentar as relações de cooperação, estimular a investigação conjunta na área da Agroecologia e o intercâmbio entre grupos de investigação. As reflexões e discussões sobre temas como: utilização adequada dos recursos e as práticas agrícolas com reduzido impacto no ecossistema, o uso sustentável dos agroquímicos e a protecção do ambiente, a sustentabilidade na agricultura e o desenvolvimento rural, a segurança alimentar e saúde pública, etc., permitem por um lado, conhecer as realidades regionais de cada parceiro e por outro, perceber as diferentes áreas de trabalho e interesse de cada grupo no respeitante à Agroecologia. Com a realização do workshop pretende-se também que os membros das diferentes Instituições, possam apresentar e discutir as linhas de investigação em cursos, definir os temas prioritários a tratar no futuro e perspectivas de actuação conjunta.

De forma a permitir uma ampla divulgação dos temas tratados, são publicados nestas actas as comunicações apresentadas no *I workshop “Agroecologia e desenvolvimento sustentável”*, quer na forma oral, quer em painel.

Bragança, 24 de Março de 2011.

Albino António Bento

Director da Escola Superior Agrária



## Índice

	Pág.
Enemigos naturales de la cochinilla silvestre, <i>Dactylopius</i> spp. (Homoptera Dactylopiidae), en una huerta orgánica de nopal tunero, <i>Opuntia ficus-indica</i> (Cactaceae), en México O. Ramírez-Sánchez, J.A. Cruz-Rodríguez; Á.M. Gamero Gamero.....	5
Meios directos de luta contra pragas da oliveira em modos de produção sustentável J.A. Pereira; A. Bento.....	15
FitoInseticida de <i>Zingiber officinale</i> [Willd] Roscoe no controle de pulgão preto <i>Toxoptera citricida</i> Kirk., 1907 (Hemiptera: Aphididae) na cultura dos citros M.P.L. Silva; F. Silva; R.S. Carvalho; L.S. Alves.....	25
Actinobactérias promotoras de crescimento de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.) e pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) A.C. Fermino Soares; M.A. Marques de Brito; A. Dias de Azevedo.....	37
Situación de la producción integrada en Castilla y León. Aplicación del control biológico de hongos en el cultivo de alubia ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) S. Mayo; A. Lorenzana; M.P. Campelo; P.A. Casquero.....	51
Actinobactérias no biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i> em mudas de tomateiro A.C. Fermino Soares; J.C.A. Damasceno; L.S. Luquine; R.S. Vieira; M.L. Silva.....	63
Estratégias de rega deficitária na vinha em regiões de clima Mediterrânico A. Castro Ribeiro; J. Verdial Andrade.....	75
Gestão da fertilização azotada em agro-ecossistemas M.A. Rodrigues; M. Arrobas.....	89
Biodiversidad y comportamiento agronómico de genciana ( <i>Gentiana lutea</i> , L.) de la montana occidental de Leon O. González; F. Varela; A. Cases; M.P. Campelo; A. Lorenzana; J.B. Valenciano; S. Mayo; A. Rodríguez; O. Rada; P.A. Casquero.....	105
Bases ecológicas para el aprovechamiento y conservación de especies silvestres. Tres ejemplos con especies mexicanas J.A. Cruz-Rodríguez, A. Hernández Tapia, A. Xochipa Padilla; D.A. Carmona.....	119
Qualidade seminal de reprodutores caprinos alimentados com níveis de óleo de licuri [ <i>Syagrus coronata</i> (Martius) Beccari] na dieta L.E.P. Martins; L.P. Barbosa; R.L. Oliveira; B.M.C. Neto; P.A. Dutra; C.K. Kiya; M.C.P. Leite; A.L. Gusmão.....	133
Sistemas agro-pecuários de montanha de Trás-os-Montes. Um caso de estudo J.M. Pires; N. Moreira; J. Cabanas; J.C. Pires; M.A. Rodrigues .....	145
Contribuição da Solarização do solo para uma Agricultura Sustentável A. César; A. Pinto; F. Melo.....	153
A importância das interações entre fungos do solo em agroecologia P. Baptista; E. Pereira; R. Tavares; T. Lino-Neto.....	159
Cancro do Castanheiro - Luta biológica por hipovirulência M.E. Gouveia; J.J. Rocha.....	175
Seleção e caracterização de plantas com potencial para atrair a sirfídeoafauna do olival L. Pinheiro; L. Torres; S.A.P. Santos.....	177

As plantas de bordadura do olival: o papel agroecológico de <i>Ditrichia viscosa</i> (L.) W. Greuter L. Mota; M. Porcel; M. Campos; A. Bento; J.A. Pereira .....	187
Fungos entomopatogénicos na luta contra pragas: o caso das pragas da oliveira I. Oliveira; P. Baptista; T. Lino-Neto; A. Bento; J.A. Pereira.....	189
Estudo da influência do diâmetro dos orifícios de armadilhas OIPE na luta contra a mosca-da-azeitona, <i>Bactrocera oleae</i> (Rossi) V. Coelho; J.A. Pereira; S.A.P. Santos; A. Mexia; A. Bento .....	191
Influência da época de colheita e tipos de secagem no teor e composição dos óleos essenciais de <i>Mentha piperita</i> L. (Menta) e <i>Lippia alba</i> (Mill) n.e.br. (Erva-cidreira) S. Teles; C.H.B. Santos; R.V. Menezes; F. Silva; A.M. Lucchese.....	203
Alimentos do passado, nutrientes de futuro! Inventariação e caracterização de espécies com interesse alimentar presentes nos agroecossistemas da Terra-Fria Transmontana A.M. Carvalho; L. Barros; IC.F.R. Ferreira.....	205
Conhecimento tradicional, biodiversidade e agroecologia: Potencialidades de uso sustentável da flora regional A.M. Carvalho; L. Barros; IC.F.R. Ferreira.....	207
Conservação do Solo: experiência e reflexões sobre duas décadas de ensino na Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal T. Figueiredo; F. Fonseca; A. Almeida.....	209
Gestão de cobertos vegetais em olival na região mediterrânica M. Arrobas; M. Claro; I.Q. Ferreira; M.A. Rodrigues.....	217
Relevância do sistema agro-florestal pastagem-freixo no Nordeste Transmontano E. Pereira.....	227
Utilização dos pombais tradicionais: uma perspectiva agroecológica A.M. Villa-Serrano; M.D. Perez-Murcia; A. Perez-Espinosa; J. Moreno-Caselles; Gálvez-Sola; M.A. Bustamante; N.A. Raposo Martins.....	229
Controlo de populações de microalgas por plantas autóctones: Que relevância em Agroecologia? S. Barros; A.M. Geraldes; C. Fernandes.....	231
Qualidade seminal e morfometria testicular de coelhos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) suplementados com geleia real in natura L.P. Barbosa; P.K.A. Campos; M.M. Neves; B.E.S. Melo; A.C.T. Morais; D.B. Morais....	243
Utilização de diferentes tratamentos com o efeito macho na interrupção do anestro sazonal em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana T. Correia; J. Azevedo; Á. Mendonça; P. Fontes; H. Velasco; R. Maurício; M Cardoso; R. Valentim.....	251
Utilização de diferentes gonadotropinas na interrupção do anestro sazonal em cabras da raça Serrana R. Valentim; J. Azevedo; Á. Mendonça; P. Fontes; H. Velasco; R. Maurício; M Cardoso; T. Correia.....	253
Processo de transformação de Presunto Ibérico, diferenciação com o método utilizado para o Presunto Bísaro R. Barracho; A. Mendonça .....	255

## **Enemigos naturales de la cochinilla silvestre, *Dactylopius* spp. (Homoptera Dactylopiidae), en una huerta orgánica de nopal tunero**

**O. Ramírez-Sánchez<sup>1</sup>; J.A. Cruz-Rodríguez<sup>2</sup>; A.M.G. Gamero<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de estadística y cómputo del Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas

<sup>2</sup>Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Chapingo

### **Resumen**

La agricultura orgánica no utiliza pesticidas para el control de las poblaciones de insectos fitófagos; se espera que los depredadores o los parasitoides realicen dicha acción. En este trabajo se evaluaron, en un sistema bajo manejo orgánico, los cambios en la densidad de la cochinilla silvestre *Dactylupius* sp., que es una importante plaga del nopal. Se determinó el efecto que diferentes especies de depredadores tienen sobre la población de la cochinilla y se comparó la riqueza y abundancia de insectos con una plantación de nopal bajo manejo convencional. La población de cochinilla no mostró variaciones significativas a lo largo de ocho meses (mayo-junio de 2008) y mantuvo una densidad con bajo riesgo para la plantación (densidad máxima alcanzada  $21 \pm 12$  hembras por planta). La densidad de cochinillas tuvo una correlación positiva con la densidad de insectos que actúan como sus depredadores (*Hyperaspis* sp., *Chilocorus* sp., *Baccha* sp. y *Leucopis* sp.), lo que incrementó su mortalidad. La riqueza y abundancia de insectos fue mayor en el sistema orgánico, siendo menor la proporción de insectos que actúan como fitófagos y mayor los que actúan como depredadores o parasitoides. Bajo esta condición se espera una menor probabilidad de aparición de plagas.

**Palabras-clave:** Plagas del nopal, regulación biológica.

## Introducción

En México alrededor de 50,000 ha se destinan a la producción de tuna, siendo el Estado de México el mayor productor de este fruto. La comercialización regional y en el extranjero representa una importante fuente de ingresos para los productores. En este cultivo se presentan, sin embargo, una serie de problemas con las plagas y enfermedades, las cuales disminuyen la calidad y cantidad de los frutos (García, 2000; Altamirano, 2003).

Entre las plagas que más daños causan al nopal se encuentra la cochinilla silvestre, *Dactylopius* spp. (Homoptera: Dactylopiidae), que se alimenta de la savia de la planta (Granados *et al.*, 1991) y para su control se emplean insecticidas organofosforados como el malatión y el paratión metílico, que son de amplio espectro y relativamente económicos (García, 2000). Los insecticidas de amplio espectro afectan a muchas otras especies de insectos, entre los que se encuentran los enemigos naturales de las plagas que se pretenden controlar (Van *et al.*, 1996).

En la actualidad se reconoce la trascendencia de conservar y aumentar las poblaciones de depredadores o parasitoides para el manejo de insectos fitófagos en los agroecosistemas (Debach *et al.*, 1991) y diversos trabajos han documentado la influencia que tienen los enemigos naturales en la dinámica poblacional de especies tanto vegetales como animales (Murdoch, 1994).

El análisis de agroecosistemas tradicionales, en los que no se utilizan insecticidas, muestra que los insectos fitófagos no representan un factor que limite seriamente la producción (Morales, 2002). De acuerdo con Horn (2000), en distintas ocasiones se ha observado que la diversificación de los cultivos favorece la presencia de enemigos naturales de los insectos que son plagas potenciales. La complejidad de estos sistemas permite el establecimiento de relaciones multitróficas que limitan la abundancia de los insectos plaga y de patógenos (Altieri *et al.*, 1999).

Se sabe que diversas especies actúan como depredadores o parasitoides de la cochinilla (Espinoza, 2001). De ellas destacan *Hyperaspis* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Chilocorus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) y *Baccha* sp. (Diptera: Syrphidae) (Aquino, 2000; Portillo *et al.*, 1998).

Con el fin de comparar la incidencia de cochinillas en una plantación de nopal bajo manejo orgánico y en una plantación bajo manejo convencional se pretende responder a las siguientes preguntas: ¿Cuál es el comportamiento de la población de cochinillas bajo manejo orgánico y bajo manejo convencional? ¿Cómo se distribuye la población de cochinillas en las plantas de nopal? ¿Qué especies de insectos actúan como depredadores de la cochinilla en la plantación? ¿La abundancia de depredadores tiene alguna relación con la abundancia de cochinillas? ¿Existe alguna diferencia en la riqueza y abundancia de familias de insectos en ambas huertas debido al manejo?

## **Material y Métodos**

Este trabajo se realizó en dos huertas contiguas de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*, variedad Reina o Alfajayucan), una bajo manejo orgánico y la otra bajo manejo convencional, localizadas en el municipio de Axapusco, Estado de México.

### **Estimación de la densidad de conglomerados por cladodio**

En cada huerta, la orgánica y la convencional, se seleccionaron al azar ocho plantas y cada dos semanas (entre mayo y septiembre de 2007) se contabilizó el número de *conglomerados* por planta. El número de conglomerados por cladodio o penca se estimó a partir de la cantidad de cladodios de cada planta. Se consideró como conglomerado a la masa algodonosa formada por una o más hembras de *Dactylopius* spp. En los conteos fueron descartados los capullos alargados que forman los machos durante su estado de pupa. Las densidades promedio de conglomerados/cladodio, resultantes en cada censo, se compararon mediante un ANOVA y se calculó la tasa de crecimiento poblacional. El patrón de distribución espacial se determinó mediante la relación varianza/media. Al mismo tiempo se colectaron los conglomerados de 12 nopales distintos a los utilizados para medir los cambios de densidad y se estimó el promedio de cochinillas por conglomerado.

### **Identificación y cuantificación de enemigos naturales**

La inspección de conglomerados también permitió cuantificar la presencia de larvas y pupas de insectos que se alimentan de *Dactylopius* spp. Dichas larvas y pupas se separaron y colocaron durante veinte días en cámaras de cría, a temperatura ambiente, para permitir su desarrollo y obtener individuos adultos, los cuales fueron preservados en alcohol (70 %). La determinación se realizó hasta el nivel de género con base en las claves de Gordon (1985) y Borrór (1989); que se basan, principalmente, en la morfología externa de los insectos adultos. Para determinar la relación entre la densidad de conglomerados/cladodio, la cantidad de enemigos naturales (larvas/cladodio) y el número de cochinillas muertas/cladodio se utilizó el Coeficiente de Correlación de Pearson.

### **Estimación de la abundancia de insectos en la huerta orgánica y en la huerta convencional**

En septiembre del 2007 se realizó una colecta de insectos en ambas huertas. Para ello, en cada huerta se ubicaron al azar cinco áreas de muestreo de 7 x 3 m (21 m<sup>2</sup>) y se utilizó una red de golpeo (30 cm de diámetro x 55 cm de largo). Los insectos colectados se colocaron en recipientes de plástico con alcohol al 70 % y se determinaron a nivel de familia mediante las claves de Borrór (1989).

## Resultados

### Fluctuación poblacional

En ninguna de las fechas de muestreo se detectó la presencia de cochinillas en la huerta bajo manejo convencional. En la huerta con manejo orgánico la población de cochinillas presentó una densidad promedio inicial (media  $\pm$  desviación estándar) de  $0.9 \pm 0.6$  conglomerados/cladodio ( $n = 663$ ), la cual se incrementó hasta alcanzar el máximo de  $1.9 \pm 0.8$ , en el censo del 22 de agosto (Figura 1). Sin embargo, al realizar el ANOVA se encontró que la densidad de conglomerados/cladodio no presentó diferencias significativas entre censos. El mayor incremento poblacional se presentó en el primer intervalo de tiempo (48%), mientras que en el mes de septiembre la población tuvo un decremento de 25%.

Las cochinillas presentan un patrón de distribución agregado (razón V/M = 2.621), con un promedio de  $1.5 \pm 0.7$  cochinillas vivas y de  $0.3 \pm 0.3$  cochinillas muertas ( $n = 1329$ ).

### Identificación y cuantificación de enemigos naturales

La inspección de los conglomerados permitió identificar cuatro tipos de larvas de insectos que se alimentaban de ninfas y adultos de *Dactylopius* spp. La confinación de dichas larvas en cámaras de cría permitió obtener individuos adultos de: *Hyperaspis* sp. (Coleóptera: Coccinellidae), *Leucopis* sp. (Díptera: Chamaemyiinae); *Baccha* sp. (Díptera: Syrphidae); y *Chilocorus cacti* Leach (Coleóptera: Coccinellidae). Todas estas especies han sido reportadas por diferentes autores como enemigos de *Dactylopius* spp.

Las larvas de *Hyperaspis* spp. se presentaron durante todo el periodo de evaluación con una densidad promedio que varió entre 0.83 larvas/cladodio en el mes de junio y 3.3 larvas/cladodio en el mes de agosto; esta especie fue la que presentó, en todos los casos, la densidad promedio más alta. Las larvas de los demás enemigos de la cochinilla estuvieron presentes solo en bajas densidades. (Figura 3)

La densidad promedio de las larvas de los enemigos naturales de *Dactylopius* sp. presentó una correlación positiva y altamente significativa ( $r = 0.53$ ;  $p \leq 0.001$ ) en relación a la cantidad de conglomerados/cladodio. Mientras que en el caso de la densidad de larvas de enemigos naturales y la cantidad de cochinillas muertas se encontró una correlación mayor ( $r = 0.69$ ;  $p \leq 0.001$ ).

### Abundancia de insectos

En la huerta bajo manejo convencional se colectaron 163 organismos pertenecientes a seis órdenes y veintidós familias. Las familias mejor representadas fueron: a) Cicadellidae (Homóptera) con el 61 % de los organismos colectados en dicha huerta; b) Chironomidae

(Díptera), con un 14 %; c) Alleculidae (Coleóptera), representan el 3.1 %; d) Chrysomelidae (Coleóptera), con un 2.5 % y e) Eulophidae (Hymenoptera), con un 2.5 %.

En la huerta con manejo orgánico se colectaron 300 organismos pertenecientes a ocho órdenes y veintiocho familias. Aquellas con mayor abundancia de individuos fueron: a) Chironomidae (Díptera) con el 17 % de los organismos colectados; b) Cicadellidae (Homóptera) que representan el 15 %; d) Curculionidae (Coleóptera) con un 9%; e) Pentatomidae (Homóptera) con el 7.6% y f) Alleculidae (Coleóptera), con un 7%.

## Discusión

La cochinilla (*Dactylopius* spp.) no fue encontrada en la huerta con manejo convencional, lo que se debe, muy probablemente, a que su población es controlada mediante la aplicación de insecticidas. En contraste, en la huerta orgánica la cochinilla sí estuvo presente, pero su población se mantuvo en una densidad insuficiente para causar daños importantes a la planta hospedera (1.45 conglomerados/cladodio). Sin desestimar la importancia que puedan tener otros factores, los resultados de este trabajo sugieren que los depredadores de *Dactylopius* spp., impactan negativamente en la población de dicha especie, pues se encontró que cuando la densidad de conglomerados aumenta también lo hace la cantidad de larvas de depredadores; de manera similar, un aumento en la cantidad de larvas de depredadores correspondió con un número mayor de cochinillas muertas. Estos resultados pueden ser considerados como evidencia indirecta de una respuesta funcional y de una respuesta numérica, las cuales sólo han sido estudiadas bajo condiciones de laboratorio (Santana, 2004; Villanueva, 2007).

Los depredadores de *Dactylopius* spp. encontrados en la huerta orgánica representan aproximadamente el 24% de los enemigos naturales reportados por Aquino (2000), Portillo *et al.*, (1998) y Espinoza (2001) en diferentes lugares de México, siendo *Hyperaspis* sp. el depredador que se presentó con mayor frecuencia y abundancia.

Al comparar la abundancia de insectos entre ordenes, se puede observar que la huerta orgánica presentó, en general, una mayor abundancia (Figura 4). Al respecto, Bengtsson *et al.*, (2005) y Hole *et al.*, (2005), señalan que por lo general, la diversidad y abundancia de especies tiende a ser mayor en plantaciones orgánicas con respecto a las convencionales. En el caso de la huerta orgánica, la mayor diversidad y abundancia de insectos encontrados pueden deberse a dos prácticas en particular: a) La no aplicación de insecticidas, mismos que eliminan una gran cantidad de insectos de diversos grupos, lo cual ha sido ampliamente documentado (Edwards, 2000) y b) El deshierbe manual que permite una mayor presencia de arvenses, las cuales proporcionan un hábitat favorable para gran cantidad de insectos (Landis *et al.*, 2000; Gurr *et al.*, 2003).

## Conclusiones

En el cultivo de nopal tunero bajo manejo orgánico la presencia de *Dactylopius* spp. no representa un peligro para la producción. En la huerta bajo manejo orgánico las hembras de *Dactylopius* spp. se distribuyen de manera agregada y son consumidas por larvas de *Hyperaspis* sp., *Baccha* sp., *Leucopis* sp. y *Chilocorus* sp. La huerta orgánica proporciona condiciones que generan una mayor diversidad y abundancia de insectos con respecto a la huerta convencional.

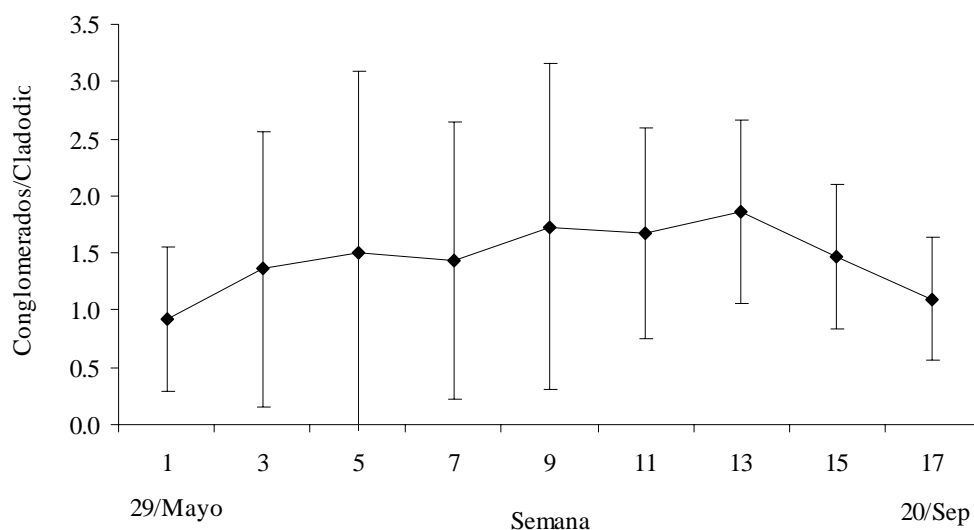


Figura 1. Variación temporal, entre mayo y septiembre de 2007, de la densidad de conglomerados por cladodio (media  $\pm$  d.s.) de *Dactylopius* spp. en una huerta orgánica localizada en el municipio de Axapusco, Estado de México.

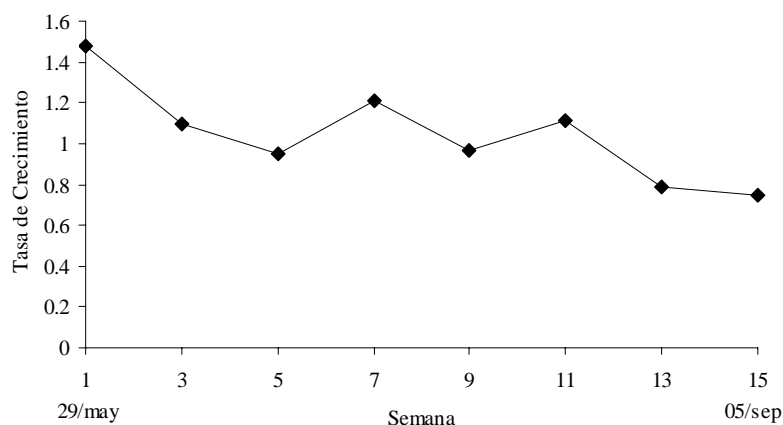


Figura 2. Tasa de crecimiento de *Dactylopius* spp. (conglomerados/planta) en una huerta orgánica localizada en el municipio de Axapusco, Estado de México.

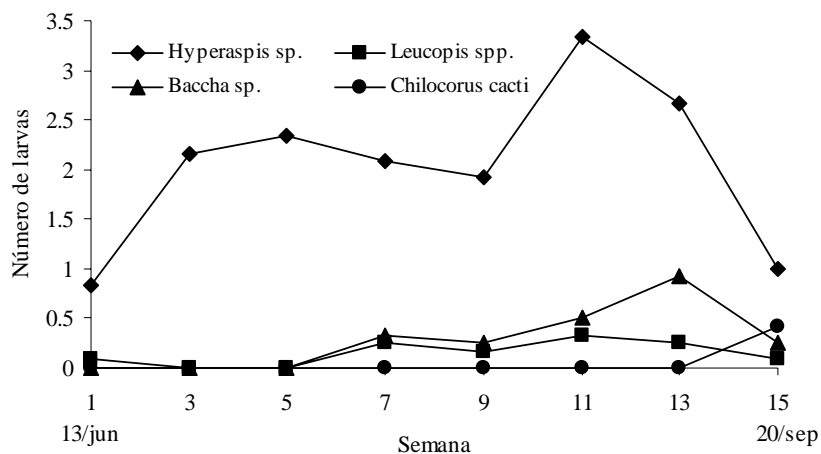


Figura 3. Densidad de larvas de los depredadores de *Dactylopius* spp. (larvas/cladodio), colectadas en el municipio de Axapusco, Estado de México.

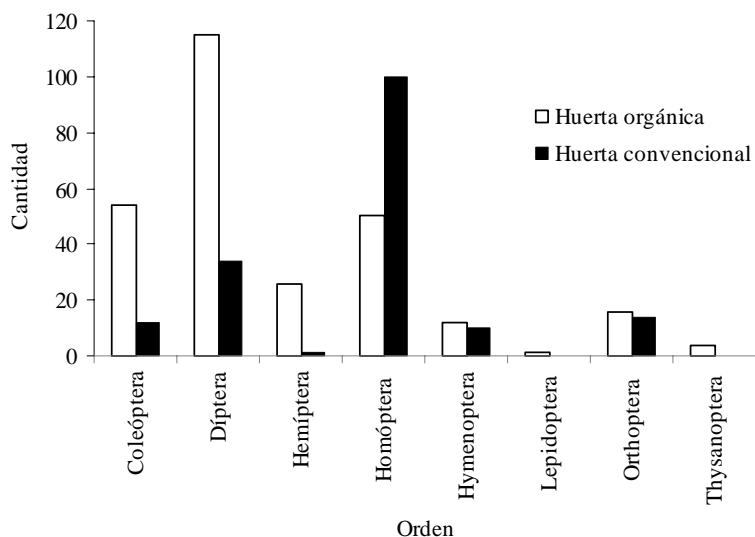


Figura 4. Abundancia de los ordenes de insectos colectados, según el orden al que pertenecen, en una huerta orgánica y en una convencional en el municipio de Axapusco, Estado de México.

## Agradecimientos

La presente investigación fue financiada por la Dirección General de Investigación de la Universidad Autónoma Chapingo.

## Referencias

- Altamirano Herrera, M. C. 2003. Plagas presentes en el cultivo del nopal (*Opuntia* spp.) en la zonas productoras del Estado de México. Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 43 h.
- Altieri, M. A.; Nicholls, C. I. 1999. Biodiversity, ecosystem function, and insect pest management in agricultural systems, pp. 69-84. *In: Biodiversity in Agroecosystems*, W. W. Collins; C. O. Qualset (Eds). Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Aquino Pérez, G.; Bárcenas Ortega, N. M. 1999. Cría de la cochinilla para la producción de grana y sus posibilidades de resurgimiento en México. In: VIII Congreso Nacional, VI Congreso Internacional del nopal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. p. 275-296.
- Bengtsson, J.; Ahnstrom, J.; Weibull A. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 42: 261-269.
- Borror, D. J. 1989. An introduction to the study of insects. Ed. Saunders College Publishing. Philadelphia, USA: 875 p.
- Debach, P.; Rosen, D. 1991 Biological control by natural enemies. Ed. Cambridge University Press, London, England. 440 p.
- Espinoza Ortiz, G. E. 2001. Enemigos naturales de la cochinilla (*D. opuntiae*) del nopal cardón en el municipio de Tezontepec, Hidalgo, Méx. Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- García Baltazar, A. 2000. Principales plagas insectiles del nopal tunero en el Estado de México. Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 110 h.
- Granados, S. D.; Castañeda P. A. D. 1991. El Nopal. Historia, Fisiología Genética, e Importancia Frutícola. Ed. Trillas. México D.F. 227 p.
- Gordon, R. D. 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America North of Mexico. *Journal of New York Entomology Society* 93: 911.
- Gurr, G.; Wratten, S.; Luna, J. 2003. Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. *Basic and applied Ecology* 4: 107-116.
- Hole, D. G.; Perkins, A. J.; Wilson, J. D.; Alexander, I. H.; Grice, P. V.; Evans, D. A. 2005. Does organic farming benefit biodiversity? *Biological Conservation* 122: 113-130.
- Horn, D. 2000. Ecological control of insects, pp. 3-21. *In: Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection*. J. E. Reichig; N. A. Reichig (Eds) Ed. Lewis Publishers. Boca Raton, FL.
- Landis, D. A.; Wratten, S. D.; Gurr, G. M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pest in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45: 175-201.
- Morales, H. 2002. Pest management in traditional tropical agroecosystems: Lessons for pest prevention research and extension. *Integrated Pest Management Reviews* 7: 145-163.
- Murdoch, W. 1994. Population regulation in theory and practice. *Ecology* 75 (2): 271-287.
- Portillo, L. M.; Viguera A. L. 1998. Natural enemies of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa): importance in México. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 43-49.
- Santana Ortega, N. 2004. Biología y determinación de la respuesta funcional y numérica de *Hyperaspis trifurcata* Scheaffer (Coleoptera Coccinellidae). Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 69 h.
- Van, D. R. G.; Bellows T. S. 1996. Biological control. Ed. Chapman and Hall. New York 539 p.
- Villanueva Sánchez, E. 2007. Biología y respuesta funcional y numérica del depredador *Chilocorus* spp. (Coleoptera: Coccinellidae) asociado al cultivo del nopal verdura en

Milpa Alta, México D:F. Tesis de maestría. Departamento de Agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 106 h.



## Meios directos de luta contra pragas da oliveira em modo de produção sustentável

J.A. Pereira<sup>1</sup>; A. Bento<sup>2</sup>

Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. <sup>1</sup>jpereira@ipb.pt; <sup>2</sup>bento@ipb.pt

### Resumo

Em Portugal o olival em modo de produção sustentável, que inclui a produção integrada e modo de produção biológica, representa cerca de 20% de toda a superfície olivícola. Actualmente, o sector enfrenta grandes desafios, devido à forte concorrência no mercado mundial, à redução acentuada do preço do azeite, e ao aumento muito acentuado dos factores de produção. Em regiões como Trás-os-Montes, a segunda região olivícola portuguesa, a estrutura fundiária, maioritariamente com pequenas explorações, e o tipo de olival, maioritariamente tradicional e de sequeiro e com reduzidas produções por hectare são factores que põem em causa a sustentabilidade das explorações. Nesta região são produzidos azeites de qualidade excelente, sobretudo os certificados, qualidade reconhecida internacionalmente e exigida por parte de consumidores cada vez mais existentes, que justificam a prioridade que deverá ser atribuída ao desenvolvimento da olivicultura sustentável.

Os modos de produção sustentáveis só terão futuro se concretizada através de práticas agrícolas adequadas, nomeadamente no domínio da protecção contra pragas e doenças. Nesta óptica deverá ser dedicada especial atenção às pragas chave da oliveira, a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi), a traça-da-oliveira, *Parys oleae* (Bern.) e a cochonilha-negra, *Saissetia oleae* (Olivier), pela gravidade dos prejuízos directos que provocam e pela perda de qualidade da azeitona e do azeite podendo por em causa o padrão de qualidade que se pretende.

Na presente comunicação analisam-se as possibilidades actuais no âmbito da protecção contra pragas em olivicultura sustentável, muitas delas postas em prática na região, como a luta biológica por meio de artrópodes entomófagos e microrganismos entomopatogénicos (bactérias, fungos e nematodes), a luta cultural, a luta biotécnica (luta atráctida, captura em massa e confusão sexual) e a luta química.

**Palavras-chave:** artrópodes entomófagos; microrganismos entomopatogénicos, luta atráctida, captura em massa, confusão sexual.

## Introdução

A oliveira é uma planta atacada por mais de quatro dezenas de espécies fitófagas, no entanto, na generalidade das situações, a sua maioria mantém populações a níveis inferiores ao nível económico de ataque. De entre estes inimigos que atacam a oliveira apenas três espécies: a traça-da-oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi) e a cochonilha-negra, *Saissetia oleae* (Olivier), causam prejuízos que em muitos anos ultrapassam, o valor da produção. Algumas espécies, como a euzofera, *Euzophera pinguis* (Haw.), o algodão-da-oliveira, *Euphyllura olivina* (Costa), o caruncho-da-oliveira, *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) e o tripe-da-oliveira, *Liothrips oleae* (Costa), têm importância secundária ou localizada, sendo normalmente limitadas por factores abióticos e por um rico complexo de inimigos naturais, especialmente parasitóides.

Em modo de produção sustentável, a protecção do olival deverá obrigatoriamente visar a manutenção do equilíbrio biológico do ecossistema. Se por um lado não interessa eliminar totalmente as espécies nocivas, para manter os inimigos naturais na cultura, por outro deve impedir-se que a sua densidade populacional ultrapasse o nível económico de ataque. Perante o risco de ocorrência de prejuízos, deverão utilizar-se meios directos de luta, mas na sua selecção devem escolher-se meios pouco agressivos para o Homem e para o ambiente, privilegiam do os meios de luta biológica, culturais e biotécnica.

## Meios directos de luta

### Luta biológica

#### Luta biológica por meio de artrópodes entomófagos

No domínio da **luta biológica** por meio de **artrópodes entomófagos** salienta-se em particular a experimentação levada a cabo em torno do braconídeo *Psytallia* (= *Opius*) *concolor* Szepliget, contra a mosca-da-azeitona, e espécies do género *Metaphycus* contra a cochonilha-negra e diversas espécies de tricogramas contra a traça-da-oliveira.

No caso de *P. concolor*, os resultados obtidos, além de variáveis, ficaram aquém do esperado, devido à falta de sincronismo entre o parasitóide e o fitófago, à competição com parasitóides indígenas e à dificuldade de sobreviver durante o Inverno, em algumas regiões (Delrio *et al.*, 2005; Liaropoulos *et al.*, 2005; Marongiu *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2008, Miranda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Hepdurgun *et al.*, 2009; Rugman-Jones *et al.*, 2009). Mais recentemente têm sido conduzidos estudos em Itália e Estados Unidos sobre a possibilidade de introdução de outras espécies exóticas (*Fopius arisanus*, *Utetes africanus*, *Psytallia lounsburyi*, *Bracon celer*, *Diachasmimorpha kraussii*), cujo resultados preliminares são animadores (Delrio *et al.*, 2007; Moretti *et al.*, 2007; Daane & Johnson, 2010).

A aplicação de parasitóides contra a cochonilha-negra, através de largadas inoculativas ou inundativas, tem sido objecto de trabalho em diferentes regiões do mundo (Bartlett, 1978; Mendel *et al.*, 1984; Daane *et al.*, 1991), sobretudo na Califórnia, onde no decurso do Século 20 foram introduzidas mais de 50 espécies (Lampson & Morse, 1992). Em Portugal, existiram também largadas de parasitóides de *S. oleae*, nomeadamente *M. flavus*, *M. helvolus*, *M. lounsburyi* (Pereira, 2004) no sentido de fomentar a luta biológica contra *S. oleae*. Em Israel a introdução de *Metaphycus helvolus* e *M. lounsburyi* revelou-se um sucesso na luta contra a praga (Argov e Rössler, 1993), apesar de na maioria dos relatos indicar acção limitada sobre a praga. A falta de sincronismo entre o ciclo de vida do hospedeiro e dos parasitóides introduzidos, visto *S. oleae* apresentar apenas uma geração anual e início de outra na maioria das situações na região Mediterrânica; o facto de muitos parasitóides actuarem sobre estados de ninfais; a condições climáticas; a utilização de pesticidas e a competição natural com as espécies indígenas têm sido factores apontados como factores responsáveis para os fracos resultados alcançados (Pereira, 2004).

No que respeita à traça-da-oliveira, tem sido ensaiadas diversas espécies de tricogramas contra as gerações antófaga e carpófaga. Assim, Stavraki (1984), num ensaio em que utilizou seis espécies diferentes de tricogramas, com origem em vários países, obteve valores situados entre 1 e 13%. Na base destes baixos valores terão estado, de acordo com o autor, as altas temperaturas registadas durante o Verão. No final da década de 90, o tratamento biológico com tricogramas foi ensaiado em Portugal contra a geração carpófaga de *P. oleae*, tendo-se neste caso utilizado *T. cacoeciae* Marchal, assim como esta espécie em associação com *T. dendrolimi* Mats, com taxas de parasitismo situadas entre 28,4 e 46,9% (Bento, 1999; 2001). Mais recentemente, no âmbito de um projecto Europeu foram experimentadas diversas espécies em Portugal, Grécia, Tunísia e Egipto, com resultados muito variáveis entre gerações, anos e países (Bento *et al.*, 2001; Herz *et al.*, 2005).

#### Luta biológica por meio de microrganismos entomopatogénicos

Neste domínio é bem conhecida a utilização de bioinsecticidas à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra a geração antófaga da traça-da-oliveira (Broumas *et al.*, 1985; Yamvrias *et al.*, 1986; Bento *et al.*, 1999). Assim, em ensaios levados a cabo por Broumas *et al.* (1985) e Yamvrias *et al.* (1986a; b), a aplicação destes produtos facultou taxas de mortalidade da ordem dos 85 a 97%, nas populações da praga. Bento (1999) e Bento *et al.* (1999), na Terra Quente Transmontana, registaram valores situados entre 60,6% e 81,1%, os quais, de acordo com Panis (1979), se podem considerar satisfatórios, na medida em que os tratamentos não impedem os parasitóides de continuar a actuar, permitindo elevar taxas de mortalidade de 60% para valores situados entre 80 e 90%. Fundamental para a obtenção de bons resultados com estes insecticidas é a oportunidade do tratamento, devendo aplicar-se quando as lagartas se encontram entre o segundo e o quarto instares. Recomenda-se também molhar bem os cachos florais, adicionar açúcar à calda (1kg/100 l) para melhorar a eficácia.

No caso da mosca-da-azeitona, *B. oleae* a atenção dos investigadores concentra-se nas possibilidades de utilização de bio-insecticidas à base de fungos entomopatogénicos, dos géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, e *Mucor* (Anagnou-Veroniki *et al.*, 2005; Konstantopoulou & Mazomenos, 2005; Moya *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008, Iannotta *et al.*, 2008; Quesada-Moraga *et al.*, 2009).

Algumas espécies dos géneros *Entomophthora*, *Myiophagus*, *Cladosporium*, têm sido referidas como fungos entomopatogénicos que atacam cochonilhas, entre as quais *S. oleae*. Também *Verticillium lecanii* (Zimm.) e *Fusarium larvarum* Fukel têm mostrado, em condições laboratoriais e ambientais específicas, originar elevadas mortalidades em ninfas dos primeiros estádios (Passos-Carvalho *et al.*, 2003) contudo a expansão da sua utilização encontra-se limitada devido às exigências microclimáticas que estes fungos têm em termos de temperatura e humidade para se mostrarem efectivos.

O espinosade é o único bio-insecticida homologado, em Portugal, para combater a mosca-da-azeitona (Cavaco & Marcelo, 2009). O espinosade é um sub-produto da fermentação da bactéria actinomiceta *Saccharopolyspora spinosa*, que apresenta grande toxicidade para tefritídeos (Mavrotas *et al.*, 2003; Iannotta *et al.*, 2006; Vossen, 2006; Torne & Miles, 2007; Mavrotas *et al.*, 2009). Actualmente está disponível comercialmente uma formulação desta substância em dose reduzida (0,24g/l) com um atractivo alimentar, a proteína hidrolisada, sob a designação de GF-120 (Poullot & Warlop, 2002; Varela & Vossen, 2003), para a realização de tratamentos localizados. De acordo com Varela & Vossen (2003), no caso de ataques fortes recomenda-se efectuar tratamentos em linhas alternadas, semanalmente entre Julho e a colheita, o que, em nossa opinião, lhes confere pouca viabilidade prática.

## **Luta cultural**

A luta cultural tem sido apontada como um dos métodos mais efectivos na manutenção das populações de *S. oleae* a níveis considerados toleráveis. Assim, em oliveiras com copas densas, a realização de podas de abertura que permitam reduzir a densidade da copa, o arejamento do seu interior e a entrada de luz, são factores que promovem elevadas mortalidades sobretudo nos primeiros estados de desenvolvimento. Estas práticas culturais têm mostrado resultados efectivos nos olivais transmontanos, onde, a baixa humidade relativa e as elevadas temperaturas durante o verão, que em muitos casos atingem valores superiores a 40°C, provocam uma elevada mortalidade nas ninfas do primeiro instar, que são as predominantes nesta época do ano. Alguns autores referem também que o excesso de adubações azotadas e a rega, uma vez que actuam no desenvolvimento vegetativo da oliveira, associada à maior riqueza em aminoácidos da seiva podem contribuir para uma melhor performance de *S. oleae* e para um maior adensamento da copa, contudo, em olivicultura

sustentável a maioria dos olivais são em sequeiro e as fertilizações são equilibradas pelo que tal situação não faz sentido de ser considerada

As azeitonas atacadas que ficam no solo, assim como as pupas que passam o Inverno enterradas, são focos de infestação do olival, pelo que devem ser eliminadas, sobretudo em anos de forte ataque da praga. Aconselha-se a realização de mobilizações superficiais debaixo da copa, após a colheita ou um pouco mais tarde, com o objectivo de expor as pupas a condições climatéricas adversas e entomófagos.

## Luta biotécnica

A mosca-da-azeitona, tal como muitas outras espécies de tefritídeos, responderem a estímulos de natureza visual, alimentar e sexual facto que tem incentivado o desenvolvimento de estratégias de luta que tiram partido dessa característica, como sejam a captura em massa, a luta atracticida e a confusão sexual.

A **captura em massa**, ensaiada desde à longa data contra a praga, consiste na "*captura e destruição de grandes quantidades do insecto*". Em geral, são utilizadas armadilhas tipo "OLIFE". Estes dispositivos resumem-se a uma garrafa de plástico, em cujo interior se coloca um atractivo alimentar, em geral, uma solução aquosa de fosfato biamónico a 3%, à qual se pode adicionar para melhorar a eficácia, uma solução microencapsulada de espiroacetal a 0,2%. Esta técnica tem facultado bons resultados permitindo reduzir o ataque nos frutos para menos de metade e os prejuízos quantitativos para menos de um terço do observado em áreas não tratadas. Como aspecto positivo relevante refere-se ainda o facto de os resultados melhorarem com a continuação da sua aplicação, uma vez que tal técnica origina um decréscimo progressivo das populações da praga.

Além destes dispositivos têm sido ensaiados outros sistemas de captura em massa, entre os quais o "Elkofon-Entomela" (Stavrakis & Stavrakis, 2003), o "Dacus Stick Bio" (Bento *et al.*, 2004), "Elkofon" e "Daidalos" (Tsitsipis, 2007).

A **luta atracticida**, objecto de intensa experimentação nas últimas duas décadas em diversos países Mediterrâneos, como a Grécia (Haniotakis *et al.*, 1991; Broumas *et al.*, 1984, 2002; Ragousis, 2002; Mazomenos *et al.*, 2002; Tsitsipis, 2007), a Itália (Delrio, 1989; Petacchi *et al.*, 2003; Lentini *et al.*, 2007; Noce *et al.*, 2009), a Espanha (Sierras *et al.*, 2009; Ros *et al.*, 2009) e Portugal (Bento *et al.*, 1998, 2003, 2009), consiste na "*morte dos insectos por um insecticida, depois de atraídos...*". De entre os dispositivos mais utilizados nesta estratégia de protecção, encontra-se o modelo "Eco-trap" e o modelo "Attract & Kill Trap". Estes dispositivos consistem num saco ou cartão, contendo bicarbonato de amónio, a que se adiciona um difusor

de feromona (espiroacetal), revestido em ambas as superfícies com um piretróide como a deltametrina.

Os resultados obtidos, embora promissores ainda não permitiram chegar a conclusões definitivas sobre a sua eficácia o que se atribuiu a factores como o deficiente isolamento das parcelas, as grandes intensidades de ataque registadas nalguns casos, etc.. Estes resultados concordam com os referidos por autores como Mazomenos *et al.* (2002) e Noce *et al.*, (2009). Assim os primeiros autores, que ensaiaram a técnica durante cinco anos em duas regiões da Grécia, obtiveram bons resultados em olivais isolados e nos quais as densidades populacionais da mosca-da-azeitona eram baixas a médias, mas não em olivais deficientemente isolados e com altas densidades populacionais da praga. Por outro lado, Noce *et al.*, (2009), em Itália, concluíram que a sua eficácia é muito influenciada pela densidade populacional da praga.

A **confusão sexual** foi ensaiada contra a traça-da-oliveira, na Grécia, durante vários anos (Mazomenos *et al.*, 1997; 1999), tendo-se concluído, na sequência desses ensaios, que a técnica pode ser usada com êxito em densidades populacionais média a baixas, e que a utilização continuada permite melhorar a sua eficácia. Experimentação levada a cabo na Terra Quente Transmontana, aponta também para o interesse desta técnica, embora os resultados obtidos não tenham sido inteiramente satisfatórios, em consequência, segundo se admite, das condições desfavoráveis em que tais estudos decorreram, designadamente: elevada densidade populacional da praga, aplicação numa parcela não isolada de outras fortemente atacadas e ocorrência de condições climatéricas adversas, com ventos e precipitação na época de instalação dos difusores (Bento *et al.*, 2005).

Em relação à mosca-da-azeitona, foram realizados estudos em Espanha, Grécia e Estados Unidos (Jones *et al.*, 1983; Katsoyannos, 1992, Villamil *et al.*, 2007) com vista à implementação desta técnica, os resultados limitados sobretudo devido a aspectos relacionados com a biologia do insecto, o elevado preço económico dos difusores associado a dificuldades de aplicação põem em causa a sua utilização a curto e médio prazos.

## Luta química

Para a **luta química** contra a traça-da-oliveira, em protecção integrada, existem dois insecticidas disponíveis em Portugal, a deltametrina e a lambda-cialotrina. Ambas as substâncias activas são indicadas a título *complementar condicionadas* ao máximo de uma aplicação (Cavaco & Marcelo, 2009).

Contra a cochonilha-negra, em protecção integrada, o único insecticida disponível no País, é óleo de verão. Esta substância activa é indicada a título *recomendada condicionada* ao máximo de uma aplicação (Cavaco & Marcelo, 2009). No entanto devido aos problemas de

fitotoxicidade associados a esta substância activa, recomendam-se cuidados na sua aplicação. Estes problemas são agravados com as altas temperaturas, especialmente durante os períodos de verão, o que coincide também com a maior susceptibilidade do hospedeiro que se encontra nos primeiros estados de desenvolvimento.

No que se refere à mosca-da-azeitona, estavam disponíveis, em Portugal, cinco insecticidas para combater esta praga em protecção integrada: deltametrina, dimetoato, lambda-cialotrina e fosmete, indicados a título complementar e o spinosade como recomendado. Relativamente aos primeiros máximo uma aplicação. Fosmete é restrita a sua utilização à azeitona de mesa e máximo duas aplicações (Cavaco & Marcelo, 2009).

Os tratamentos químicos contra a mosca-da-azeitona são tradicionalmente feitos segundo duas modalidades, uma das quais de natureza preventiva que tem por objectivo eliminar os adultos antes de efectuarem as posturas, enquanto os de natureza curativa, incide sobre as larvas e implica a pulverização da totalidade da copa da árvore. No primeiro caso, adiciona-se ao insecticida um atractivo de natureza alimentar, contendo um sal amoniacal ou uma proteína hidrolisada. Em geral, o tratamento incide sobre a copa da árvore virada a Sul, numa mancha de 2-3 m<sup>3</sup> (López-Villata, 1999), fazendo uma pulverização de gota grossa ou em alternativa aplicação em bandas.

## Referências bibliografia

- Anagnou-Veroniki, M.; Kontodimas, D.; Adamopoulos, A.; Tsimboukis, N.; Voulgaropoulou, A., 2005. Effects of two fungal based biopesticides on *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, **28**, 49-51.
- Argov, Y; Rössler, Y. 1993. Biological control of the mediterranean black scale, *Saissetia olea* (Hom.: Coccidae) in Israel. *Entomophaga*, **38**, 89-100.
- Baptista, P.; Coelho, V.; Bento, A.; Lino-Neto, T.; Pereira, J. A., 2008. *Beauveria bassiana*, fungo entomopatogénico da traça-da-oliveira em Trás-os-Montes: caracterização morfológica e molecular. Actas do *I Encontro Nacional de Produção Integrada / VIII Encontro Nacional de Protecção Integrada*, 418-424.
- Bartlett, B.R. , 1978. Coccidae, pp.57-74. In: Introduced parasites and predators of arthropod pest and weeds: A world review. Agriculture Handbook n.480, 545 pp., ARS. USDA.
- Bento, A.; Pereira, J. A., 2009. 15 anos de estudo da mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* Gmel., no Nordeste de Portugal. *V Simpósio Nacional de Olivicultura, 25 e 26 de Setembro de 2009, Santarém*.
- Bento, A.; Pereira, J. A.; Cabanas, J.E.; Torres, L., 2003. Potencialidades da luta biotécnica contra a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmel.) em Trás-os-Montes. *III Simpósio Nacional de Olivicultura*. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 29 a 31 de Outubro de 2003, 16.
- Bento, A.; Torres, L.; Pereira, J.; Lopes, J., 1999. Avaliação da eficácia de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra a geração anófaga de *Prays oleae* (Bern.) em condições de campo. *Actas do V Encontro Nacional de Protecção Integrada*, 239-244.

- Bento, A.; Torres, L.M.; Lopes, J., 1998b. Resultados da utilização de *Trichogramma cacoeciae* March. contra a geração carpófaga de *Prays oleae* (Bern.) em Trás-os-Montes. *Revista Ciências Agrárias*, **21**, 207-211.
- Broumas, T.; Haniotakis, G.; Liaropoulos, C.; Tomazou, T.; Ragoussis, N., 2002. The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): pilot-scale feasibility studies. *Journal of Applied Entomology*, **126**, 217-223.
- Cavaco, M.; Marcelo, M., 2009. *Produção Integrada do olival*. Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (ISBN: 978-972-8649-85-2).
- Daane, K.M.; Barzman, K.; Caltagirone, L.E., 1991. Augmentative release of *Metaphycus helvolus* for control of black scale, *Saissetia oleae* in olives. *University of California, Kearney Plant Protection Group, Plant Protection Quarterly*, **1**, 6-8.
- Delrio, G.; Lentini, A.; Satta, A., 2005. Biological control of olive fruit fly through inoculative releases of *Opius concolor* Szépl. *IOBC/WPRS Bulletin*, **28**, 53-58.
- Haniotakis, G.E.; Kozyrakis, E.; Fitsakis, T.; Antonidaki, A., 1991. An effective mass trapping method for the control of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, **84**, 564-569.
- Hepdurgun, B.; Turanlı, T.; Zumreoglu, A., 2009. Control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, (Diptera: Tephritidae) through mass trapping and mass releases of parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae) reared on irradiated Mediterranean fruit fly. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 211-224.
- Jones, O. T.; Lisk, I.; Howse, P.; Baker, R.; Bueno, A.; Ramos, P., 1983. Mating disruption of the olive fruit fly (*Dacus oleae*) with the major component of its ex pheromone. In CAVALORO, R. (Eds) Fruit flies of economic importance - *Proc. of the CEC/IOBC International Symposium, Athens*, 500-505.
- Katsoyannos, P., 1992. *Olive pest problems and their control in the Near East*. FAO Plant production and protection paper, 178 p.
- Konstantopoulou, M. A.; Mazomenos, B. E., 2005. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. *BioControl*, **50**, 293-305.
- Lampson, L.J.; Morse, J.G., 1992. A survey of black scale, *Saissetia oleae* (Hom.: Coccidae) parasitoids (Hym.: Chalcidoidea) in Southern California. *Entomophaga*, **37**, 373-390.
- Liopoulos, C.; Mavraganis, V.G.; Broumas, T.; Ragoussis, N., 2005. Field tests on the combination of mass trapping with the release of the parasite *Opius concolor* (Hymenoptera: Braconidae), for the control of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, **28**, 77-81.
- López-Villalta, M., 1999. *Olive pest and disease management*. International Olive Oil Council. Madrid, 207 p.
- Mazomenos, B.E.; Pantazi-Mazomenos, A.; Stefanou, D., 2002. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmel.) in Greece as a part of an integrated control system. In: *Pheromones and other semiochemicals in integrated pest control*. Witzgall, P., Mazomenos, B., Konstantopoulou, M. (eds). *IOBC/wprs Bulletin*, **25**, 137-147.
- Mendel, Z.; Podoler, H.; Rosen, D., 1984. Population dynamics of the Mediterranean black scale, *Saissetia oleae* (Olivier), on citrus in Israel. 4. Natural enemies. *Journal of the Entomological Society of South Africa*, **47**, 1-21.
- Miranda, M.A.; Miquel, M.; Terrassa, J.; Melis, N.; Moneris, M.; 2008. Parasitismo of *Bactrocera oleae* (Diptera: tephritidae) by *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae) in the Balearic Island (Spain). *Journal of Applied Entomology*, **132**, 798-805.
- Navrozidis, E.I.; Vasara, E.; Karamanlidou, G.; Salpiggidis, G.K.; Koliadis, S.I., 2000. Biological control of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus thuringiensis* isolate. *Journal of Economic Entomology*, **93**, 1657-1661.

- Noce, M.; Belfiore, T.; Scalercio, S.; Vizzari, V., 2009. Efficacy of new mass-trapping devices against *Bactrocera oleae* (Diptera tephritidae) for minimizing pesticide input in agroecosystems. *Journal of Environmental Science and Health Part*, **44**, 442-448.
- Passos-Carvalho, J.; Torres, L.; Pereira, J.A.; Bento, A.; 2003. A cochonilha-negra *Saissetia oleae* (Olivier, 1791) (Homoptera – Coccidae). Instituto Nacional de Investigação Agrária / Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro / Escola Superior Agrária de Bragança, Lisboa, 136 pp.
- Pereira, J.A.P., 2004. Bioecologia da cochonilha negra, *Saissetia oleae* (Olivier), na oliveira, em Trás-os-Montes. *Tese de Doutoramento em Ciências Agrárias, Univ. Trás-os-Montes e Alto Douro*. 288 pp.
- Ragoussis, N., 2002. ECO-TRAP: Efficient tool for the control of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin, in the Mediterranean area. *IOBC/wprs Bulletin*, **25**, 195-202.
- Sierras, N.; Marín, C.; Carrión, M.; Botta, A.; Piñol, R., 2009. A new ready-to-use mass trapping system for the control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *4<sup>th</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Protection of Olive Crops"*, 125.
- Stavrakis, G. N.; Stavrakis, N. G., 2003. The mass-trapping system "Elkofon-Entomela" as self-sufficient or essential component in integrated protection of olive crops. *1<sup>st</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group "Integrated Control in Olives"*.
- Torne, M.; Miles, M., 2007. Spintor isco: an innovating system for the control of the olive fruit fly *Bactrocera olea* in IPM. *3<sup>rd</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Protection of Olive Crops"*, 51.
- Villamil, C.; Burrack, J.; Lewis, E.; Zalom, G., 2007. Study of the courtship and behavior of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae). *The 2007 ESA Annual Meeting*, 455.
- Yamvrias, C.; Broumas, T.; Liaropoulos, C.; Anagnou, M., 1986. Lutte contre la tigne de l'olivier avec une préparation biologique. *Annals. Inst. Phytopath. Benaki*, **15**, 1-10.
- Yokoyama, V.; Rendón, P.; Sivinski, J., 2008. *Psytalia cf. Concolor* (Hymenoptera: Braconidae) for Biological Control of Olives fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in California. *Environmental Entomology*, **37**, 764-773.



## **FitoInseticida de *Zingiber officinale* [Willd] Roscoe no controle de pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirk., 1907 (Hemiptera: Aphididae) na cultura dos citros**

**M.P.L. Silva<sup>1</sup>; F. Silva<sup>1</sup>; R.S. Carvalho<sup>2</sup>; L.S. Alves<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas/BA, CEP 44380-000, \*franceli@ufrb.edu.br. <sup>2</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas/BA.

### **Resumo**

O trabalho teve por objetivo avaliar a ação bioinseticida de gengibre (*Zingiber officinale* [Willd] Roscoe) na forma de extrato aquoso à frio no controle de pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirk em citros. Folhas e galhos contendo os pulgões coletados no campo foram amarrados nas mudas para que ocorresse a infestação artificial de forma tal, que a transferência do inseto-praga ocorresse de forma gradual e sem causar danos ao seu aparelho bucal ou qualquer tipo de estresse. No preparo dos extratos aquosos foram utilizados rizomas *in natura*, pesado e triturado em água destilada e posteriormente, filtragem do material por meio de tecido tipo *voil*. O experimento também foi conduzido em campo. Os valores de mortalidade causado pelo extrato aquoso de gengibre (*Zingiber officinale* [Willd] Roscoe) a partir da concentração 0,6 g/mL<sup>-1</sup> foi superior a 70% sendo que a concentração de 0,9 g/mL<sup>-1</sup> teve efeito inseticida de 97%. Na avaliação realizada 24, 48 e 72 horas, após a aplicação, todos os tratamentos diferiram da testemunha, mas não entre si, embora a aplicação da dose 0,9 g/mL<sup>-1</sup> tenha provocado efeito letal de 80% após 72 horas da aplicação, o que demonstra permanência do princípio ativo atuando durante este período. Conclui-se que o extrato aquoso à frio de *Zingiber officinale* [Willd] Roscoe provocou mortalidade no pulgão preto dos citros servindo de alternativa aos inseticidas químicos podendo ser indicado no manejo integrado de pragas.

**Palavras-chave:** plantas inseticidas; *Zingiber officinale* [Willd] Roscoe ; Extrato vegetal

## Abstract

This study aimed to evaluate in action bioinsecticide of ginger (*Zingiber officinale* [Willd] Roscoe) in aqueous extract to control aphids in the cold black *Toxoptera citricida* Kirk in citrus. Leaves and twigs containing the aphids were collected in the field strapped to their seedlings to artificial infestation that occurred in such a way that the transfer to insect pest occurred gradually and without causing damage to its mouthparts or any kind of stress. In the preparation of aqueous extracts were used fresh rhizomes, weighed and ground in distilled water and then filtering the material through cheesecloth fabric type. The experiment was also conducted in the field. The values of mortality caused by aqueous extracts of ginger (*Zingiber officinale* [Willd] Roscoe) at concentrations exceeding  $0.6 \text{ g/mL}^{-1}$  was 70% and the concentration of  $0.9 \text{ g/mL}^{-1}$  took effect insecticide 97%. The evaluation at 24, 48 and 72 hours after application, all treatments differed from the control, but not with each other, although the application rate  $0.9 \text{ g.mL}^{-1}$  has caused the lethal effect of 80% after 72 hours of application, which demonstrates in permanence of the active principle act during this period. It is concluded that the aqueous extract *Zingiber officinale* Cold [Willd] Roscoe, mortality in the brown citrus aphid, serving as an alternative to chemical insecticides may be indicated in the integrated pest management.

**Keywords:** plants insecticides, *Zingiber officinale* [Willd] Roscoe, Plant Extract

## Introdução

Os citros compreendem grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae, representado, na maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azedada (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*). São originários principalmente das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África. Foram levados à Europa na época das Cruzadas. Chegaram ao Brasil trazido pelos portugueses, no século XVI (Mattos Junior et al., 2009).

No Brasil, a produção de citros ocorre principalmente no Estado de São Paulo onde se encontram cerca de 80% da produção brasileira de laranjas (aproximadamente 15 milhões t; 584.096 ha); também, na ordem de aproximadamente 510.778 mil toneladas, destaca-se a produção de tangerinas correspondendo a 42,37% do mercado interno, como a Ponkan e o Tangor Murcott (IBGE, 2009).

O destino da produção cítrica no Estado de São Paulo é externo, cerca de 80%, ficando apenas 18% para o mercado interno. A exportação do suco de laranja para o exterior é devida às diversas crises ocorrida na Florida, Estados Unidos, elevando a oferta do produto brasileiro (Almeida, 2004).

Apesar da produção estar concentrada na região sudeste, com destaque ao estado de São Paulo, que é responsável por aproximadamente 80% da produção brasileira, a Região Nordeste responde por 9%. Destacam-se os Estados da Bahia e Sergipe como o 2° e 3° produtores nacionais, respectivamente, onde a Bahia responde por 54% da produção e 45% da área colhida e Sergipe responde por 39% da produção e 43% da área colhida (EMBRAPA, 2008).

*Toxoptera citricida* Kirk., 1907 (Hemiptera: Aphididae) é um inseto sugador, que apresenta formas ápteras e aladas as quais atacam as plantas, principalmente nas brotações, sugando-lhes a seiva. Sua coloração é marrom na forma jovem e preta nos adultos. Reproduzem-se, em nosso meio, exclusivamente por partenogênese telítoca, isto é, sem o concurso do macho, originando-se sempre fêmeas. Os alados são os agentes mais importantes para a dispersão de vírus (Gallo et al., 2002).

Segundo Nascimento et al. (2004), os maiores danos causados pelo pulgão-preto, são provocados em plantas jovens, atacando os brotos terminais, folhas em desenvolvimento e os botões florais. Quando há o ataque através de grandes colônias nas brotações novas, ocorre encarquilhamento das folhas e aparecimento de "fumagina", altamente prejudicial à respiração e fotossíntese da planta, influenciando diretamente na produção.

A utilização de fitoinseticida é relativamente antiga. Entre os diferentes efeitos que os inseticidas botânicos provocam nos insetos estão: impedimento na alimentação, repelência,

alteração no sistema hormonal, alteração no comportamento sexual, mortalidade na fase imatura ou adulta entre outras (Tavares, 2006). Um dos principais incentivos à busca de novos inseticidas de origem vegetal tem sido a percepção da opinião pública de que inerentemente, os produtos naturais são mais seguros que os sintéticos (Bezerra, 2009).

De acordo com Scapin et al. (2010), a utilização de extrato bruto ou óleos essenciais com propriedades antimicrobianas é freqüentemente empregado com sucesso no controle de agentes fitopatogênicos, dentre eles o gengibre. Porém esse importante recurso não tem sido empregado para o controle de inseto-praga.

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação bioinseticida do extrato aquoso a frio de *Zingiber officinale* [Willd] Roscoe no controle de pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirk nos citros.

## **Material e Métodos**

### **Criação dos pulgões em telado**

Foram realizados dois experimentos: um em laboratório e o outro no campo, ambos na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas – BA.

Mudas de citros foram podadas e receberam adubação nitrogenada para acelerar a emissão de brotos. Após duas semanas, galhos de citros infestados com pulgões que foram coletados na área experimental de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e conduzidos ao telado com tela anti-afídica. Folhas e galhos contendo os pulgões (*T. citricida*) coletados no campo foram amarrados nas mudas para que ocorresse a infestação artificial de forma tal que a transferência do inseto-praga ocorresse de forma gradual e sem causar danos ao seu aparelho bucal ou qualquer tipo de estresse.

### **Preparo, aplicação e método de extração dos extratos vegetais**

A definição das concentrações dos extratos foi tomada a partir de um bioensaio onde se avaliou a ação inseticida sobre os pulgões nas seguintes concentrações: 5% a 35% peso/volume até ser obtido um valor inicial de mortalidade. Não se obtendo resultado as concentrações foram aumentadas para 40% a 90%.

No preparo dos extratos aquosos foram utilizados rizomas de gengibre *in natura* na Tabela 1. Utilizou-se balança com capacidade de até 500 g para pesagem das partes das plantas e um liquidificador doméstico contendo volume determinado de água destilada para facilitar a trituração e, posteriormente, filtração do material por meio de tecido tipo *voil*.

Tabela 1. Formulação da concentração do extrato aquoso de *Z. officinalis* do pulgão preto dos citros *T. citricida*.

Vegetal	Parte utilizada (frescas)	Quantidade (g)	Água (ml)	Concentração g/mL <sup>-1</sup>
Gengibre	Rizoma	0; 40; 50; 60; 70; 80; 90.	100	0; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9.

### Experimento em laboratório

#### Aplicação dos extratos no inseto-alvo

Os extratos vegetais de gengibre foram aplicados sobre brotos das mudas de plantas de citros infestadas artificialmente com o pulgão *T. citricida*, com pulverizador de polietileno com capacidade para 10 mL nas faces abaxial e adaxial das folhas até ponto de escorrimento, totalizando 2 mL de extrato aplicado. Na base dos brotos infestados com pulgões foi enrolado algodão e depositado em frasco de vidro contendo água, mantendo os brotos túrgidos para a alimentação dos insetos-alvo. Posteriormente, os frascos contendo os brotos foram colocados em potes de polietileno transparente forrados com papel filtro e vedados com tampas perfuradas. Cada broto continha 30 pulgões.

A mortalidade e sobrevivência dos pulgões foram avaliadas 24 e 48 horas após a aplicação dos extratos.

#### Experimento em campo

Foram confeccionadas e montadas gaiolas de campo com as dimensões de 100 X 70 X 70 cm forradas com tecido *voil*. Os recipientes com as mudas infestadas com pulgões foram colocadas sobre polipropileno branco e na base do saco das mudas se colocou disco de polipropileno branco com o objetivo de facilitar visualização dos pulgões mortos caídos após a aplicação dos extratos.

Os extratos foram aplicados com pequeno pulverizador de polietileno com capacidade para 10 mL de forma direta aos insetos de baixo para cima na face abaxial das folhas de citros e nos brotos infestados até distância de 10 cm. A aplicação foi feita até ponto de escorrimento, totalizando um volume de 5 mL/muda.

#### Análise Estatística

O experimento em laboratório foi delineado em blocos casualizados no esquema fatorial 7 X 5 com sete doses e cinco repetições e trinta pulgões por broto/pote.

Em laboratório foi avaliada a sobrevivência dos pulgões após a aplicação dos extratos nas três formas de extração e calculada a DL<sub>50</sub>. As avaliações foram realizadas 24 e 48 horas após a aplicação dos extratos, realizando-se a quantificação e retirados dos pulgões mortos.

No experimento em campo foi utilizado delineamento em blocos casualizados no esquema fatorial 7 X 5 com sete doses e cinco repetições ao longo do tempo para os extratos a frio de gengibre. Nas avaliações se adotou a seguinte escala de notas de acordo com a quantidade de pulgões mortos encontrados nos brotos: Nota 1: sem presença de pulgões; Nota 2: 1 a 10 pulgões por broto; Nota 3: 11 a 30 por broto; Nota 4: 31 a 50; Nota 5: 51 a 100 e Nota 6: > 100 (máximo). As avaliações foram realizadas 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos extratos, quantificando e retirando os pulgões mortos. Os dados de sobrevivência do experimento em laboratório foram transformados para porcentagem e realizada a correção através da fórmula  $\text{asen}(\sqrt{(\text{sobrev}/100)})$ . As notas de mortalidade do experimento em campo também foram corrigidas por esta fórmula e os valores submetidos a Análise de Variância – ANAVA, ajustando para regressão através do programa SISVAR (Ferreira, 2000). A  $DL_{50}$  foi estimada pelo programa SAS 9.1 (Finney, 1971).

## Resultados e Discussão

### Avaliação inseticida do extrato aquoso de gengibre

A avaliação do extrato aquoso de gengibre, nas primeiras 24 horas após a aplicação, constatou-se sobrevivência de 49%, 57% e 23% nas doses de 40, 0,5 e 0,6 g/ml<sup>-1</sup> (Figura 1), respectivamente.

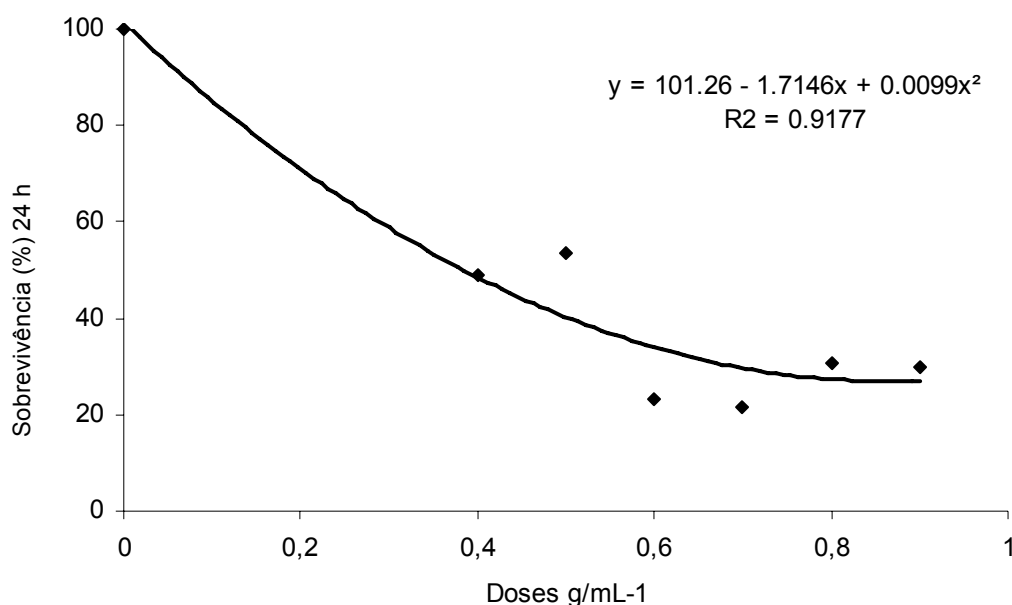


Figura 1. Curva de sobrevivência de *T. citricida* Kirk após 24 horas da aplicação do extrato aquoso de gengibre *Z. officinale* Roscoe.

Após o período de 48 horas da aplicação do extrato, constatou-se que o índice de sobrevivência nas dosagens anteriormente citada diminuíram em 17%, 23% e 11%

respectivamente, o que implica do ponto de vista prático, sua utilização concentrada nas primeiras 48 horas após o preparo (Figura 2).

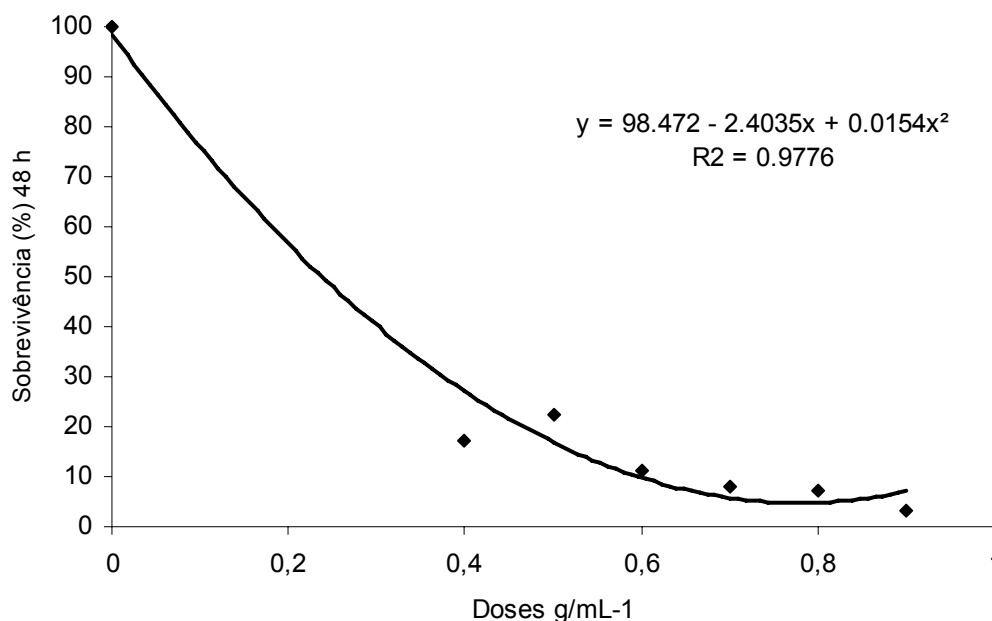


Figura 2. Curva de sobrevivência de *T. citricida* Kirk após 48 horas da aplicação do extrato aquoso de gengibre *Z. officinale* Roscoe.

No entanto, as dosagens 0,7, 0,8 e 0,9 g/mL<sup>-1</sup> após 24 horas já demonstrava o potencial inseticida do extrato com 22%, 30% e 30%, respectivamente de sobrevivência. Após 48 horas os valores do percentual de sobrevivência reduziram para 8%, 7% e 3% (Figura 2). Dentro dessa mesma linha de pesquisa, Ponte (1999) e Gonzaga et al. (2007), utilizando extrato de manipueira, obtiveram resultados semelhantes no controle de pulgão *T. citricida*.

Oliveira et al. (2009) estudando o efeito de diferentes doses de óleo de açafraão, zingiberácea, no controle do pulgão-branco em algodoeiro, observou que o óleo essencial de açafraão a 5 e 10% (v/v), apresentou um efeito inseticida, com 100% de eficiência no controle para *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) porém, com efeito fitotóxico nas folhas pulverizadas; e o mesmo a 1%, constataram efeito inibidor na taxa de crescimento populacional dos pulgões, sem causar fitotóxicidade nas folhas pulverizadas.

Resultado semelhante foi obtido por Oliveira (2009) quando trabalhou com o composto de óleo de açafraão + óleo de nim para controlar *A. gossypii*, observando que a mortalidade dos pulgões apresentou amplitude de 21,4% até 30,13%.

O valor da DL<sub>50</sub> calculado para o extrato de gengibre foi de 69,64 g/ml<sup>-1</sup>. Gonzaga et al. (2007), trabalhando com extrato de manipueira, na concentração de 30mg/ml<sup>-1</sup>, obteve a mortalidade de 80% de *T. citricida* após 39h da aplicação deste extrato e CL<sub>50</sub> 11,85 mg/ml<sup>-1</sup>.

### **Avaliação inseticida do extrato aquoso em campo**

Todos os tratamentos foram eficientes no controle do pulgão-preto a partir da dose 0,4 g.mL<sup>-1</sup> (66,8%) e 0,5 g.mL<sup>-1</sup> (65,4%) (Figura 3), embora o melhor efeito do extrato aquoso de gengibre tenha ocorrido nas doses 0,6 g.mL<sup>-1</sup>, 0,7 g.mL<sup>-1</sup>, 0,8 g.mL<sup>-1</sup> e 0,9 g.mL<sup>-1</sup> ocasionando mortalidade de 70%, o que se supõe ação rápida sobre a fisiologia do inseto alvo, independente de possíveis interferências dos fatores ambientais que possam ocorrer após a aplicação do produto.

Na avaliação realizada 24, 48 e 72 horas, após a aplicação, todos os tratamentos diferiram da testemunha, mas não entre si, embora a aplicação da dose 0,9 g.mL<sup>-1</sup> tenha provocado efeito letal de 80% após 72 horas da aplicação, o que demonstra permanência do princípio ativo atuando durante este período (Figura 3). Esta característica torna-se de importância prática, pois um dos entraves para o uso dos inseticidas botânicos é a sua pouca permanência no ambiente ou inativação do princípio ativo após aplicação.

Correa (2006) utilizando extratos de raízes de timbó *Lonchocarpus floribundus* Benth visando ao controle do pulgão-preto, obteve mortalidade de 88,4% com aplicação de extrato etanólico e 76,4% para extrato aquoso decorrido 72 horas. Venzon et al. (2007), avaliaram a toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde *Myzus persicae* (Sulzer) e observaram que as folhas tratadas com extrato de semente de nim foi significativamente superiores a testemunha.

Os trabalhos desses autores corroboram com os resultados obtidos neste estudo onde foi comprovada a eficácia dos extratos vegetais. No entanto, sob condições de campo, a utilização de extratos de gengibre deve ser acompanhada por amostragens periódicas das plantas pulverizadas no sentido de verificar a necessidade de novas pulverizações, caso a população remanescente após a primeira aplicação aumente, para garantir a manutenção da população de pulgões abaixo do nível de dano e evitar que a praga cause prejuízo econômico.

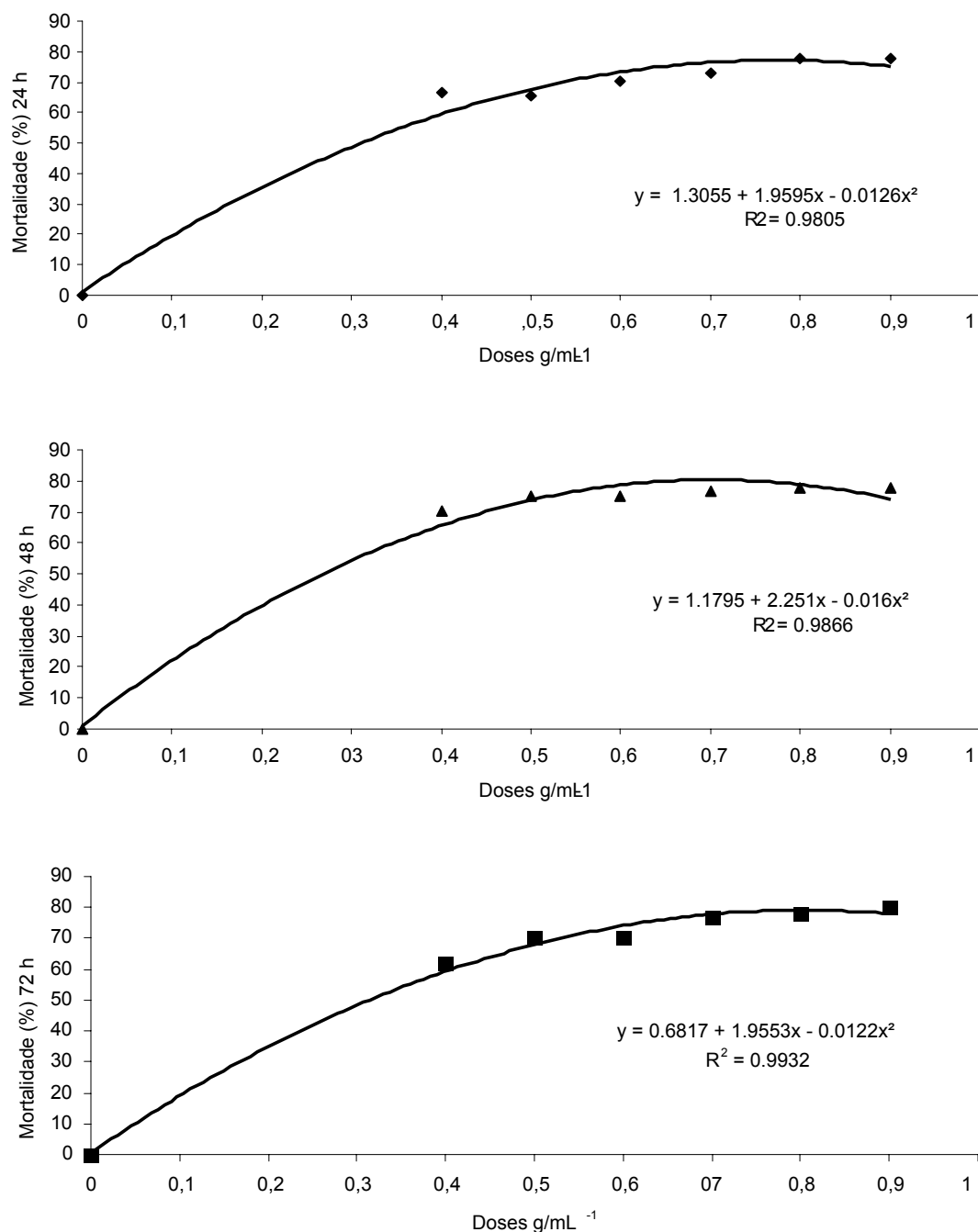


Figura 3. Mortalidade de pulgões *T. citricida* no período de 24, 48 e 72 horas da aplicação do extrato aquoso de gengibre *Z. officinale* Roscoe.

## Conclusão

O extrato aquoso à frio de *Z. officinale* provocou mortalidade no pulgão preto dos citros servindo de alternativa aos inseticidas químicos podendo ser indicado no manejo integrado de pragas.

## Referências bibliográficas

- ALMEIDA, C.O. Agronegócio citrícola no Brasil. Bahia agrícola. v.6 n.3. Nov. 2004.
- BEZERRA, G.C.D.; Efeitos de extratos brutos e frações de meliáceas (Rutales: Meliáceae) na sobrevivência e no comportamento de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro. 2009. 136p Il. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.
- CORRÊA, R.S. Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth (Timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy pulgão preto dos citros (Sternorrhyncha: Aphididae). 2006. 70f. Il. Dissertação (Mestrado). INPA/UFAM. Manaus-AM.
- EMBRAPA. Base de dados. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia\\_2ed/importancia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia_2ed/importancia.htm). Acesso em 06 de junho de 2008.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos. Programas e Resumos... São Carlos: UFSCar, Julho de 2000. p.255-258.
- FINNEY, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge, Cambridge University Press, 255p.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ. 2002. 920p.: Il.
- GONZAGA, A.D. Potencial de manipueira de mandioca (*Manihot esculente* Crantz) no controle de pulgão preto de citros (*Toxoptera citricida* Kirk, 1907). Revista Brasileira de Agroecologia. Out.2007. Vol.2.nº2.
- GONZAGA, A.D.; RIBEIRO, J.D.; VIEIRA, M.F.; ALÉCIO, M.R.; Toxicidade de Três Concentrações de Erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* A. St.-Hill) e Manipueira (*Manihot esculenta* Crantz) em Pulgão Verde dos Citros (*Aphis spiraecola* Patch) em Casa de Vegetação. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 55-56, jul. 2007.
- IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2007. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=11>. Acesso em 20 de maio de 2009.
- MATTOS JUNIOR, D.; De NEGRI, J.D; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm> acesso em 29.09.2009.
- NASCIMENTO, A., S.; SANCHES, N.F.; CARVALHO, R.S. Principais pragas. In: MAGALHÃES, A., F., J. (Org.); Cultivo dos citros. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p87-108. il. 2004.
- OLIVEIRA, M.F.; TAKATSUKA, F.S.; FERNANDES, P.M.; CZEPAK, C. Efeito de diferentes doses do óleo essencial de açafreão no controle do pulgão branco (*aphis gossypii*) na cultura do algodoeiro. Disponível em: [www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/.../059.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/.../059.pdf). Acesso em 20.10.2009.
- OLIVEIRA, F.S.; TAKATSUKA, F.S.; BARROS, R.G.; CZEPAK, C. Óleo de nim indiano (*Azadirachta indica*) e óleo de açafreão (*Curcuma longa*) para o controle do pulgão branco (*Aphis gossypii*) do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/131.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/131.pdf). Acesso em 20.10.2009.
- PONTE, J.J. Cartilha da Manipueira. Uso do composto como insumo agrícola. Fortaleza ceará. 1999.

- SCAPIN, C.R.; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard e Suggs. Revista Brasileira Plantas Mediciniais, Botucatu, v.12, n.1, p.57-61, 2010.
- TAVARES, M.A.G.C.; Busca de compostos em *Chenopodium* spp (Chenopodiaceae) com bioatividade em relação a pragas de grãos armazenados. 2006, 111 il. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.
- VENZON, M.; ROSADO, M.C.; PALLINI, A.; FIALHO, A.; PEREIRA, C.J. Toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopis connexa*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.42, n.5, p.627-631, maio 2007.



## **Actinobactérias promotoras de crescimento de girassol (*Helianthus annuus* L.) e pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**

**A.C.Fermino Soares<sup>1</sup>; M.A.M. Brito<sup>2</sup>; A.D. Azevedo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UFRB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - 44380-000 - Cruz das Almas, BA – Brasil, [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br)

<sup>2</sup>Mestrando em Ciências Agrárias - UFRB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas

### **Resumo**

A busca por alternativas tecnológicas de produção sustentável tem intensificado os estudos com microrganismos benéficos na agricultura. As actinobactérias desempenham importante papel no controle biológico e promoção do crescimento das plantas. Neste trabalho foram avaliados treze isolados de actinobactérias para a promoção de crescimento de plantas de girassol e de pinhão manso, oleaginosas com potencial para produção de biodiesel. Todos os isolados produziram ácido indolacético, 92% produziram a enzima celulase e 77% produziram xilanase, mas nenhum apresentou capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*. Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação, com dois solos de características químicas diferentes, infestados e incubados por quarenta e cinco dias com os mesmos isolados de actinobactérias. No final do cultivo, foram avaliados a altura das plantas e produção de matéria seca. As actinobactérias promoveram incrementos significativos na matéria seca das plantas de girassol e de pinhão manso de até 39% e 36%, respectivamente, quando cultivados em solo de área de pastagem, com baixo teor de nutrientes e de matéria orgânica. No solo mais rico em matéria orgânica, foram observados aumentos de até 36% para o girassol e 33% para o pinhão manso. Os melhores isolados com potencial para a promoção de crescimento dessas plantas foram AC12, AC26C, AC26L, AC39, AC92C, AC92M e AC147. O isolado AC30 foi prejudicial ao crescimento das plantas. As actinobactérias influenciaram expressivamente na produção de biomassa (raiz e parte aérea) das plantas de girassol e pinhão manso, independente das características químicas do solo.

**Palavras-chave:** actinomicetos, oleaginosas, biodiesel.

## **Actinobacteria and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and physic nut (*Jatropha curcas* L.) plants**

### **Abstract**

The search for technological alternatives for sustainable agricultural production, less harmful for the environment, has intensified the studies with microorganisms which have beneficial effects on plants. Actinobacteria have an important role in biological control and plant growth promotion. This work aimed to study the effect of thirteen actinobacteria isolates, on growth promotion of sunflower and physic nut oil plants, which are crops with great potential for biodiesel production. All isolates produced indol acetic acid, 92% produced cellulase and 77% produced xylanase, but none of the isolates showed in vitro capacity for phosphate solubilization. Two experiments were carried out under greenhouse conditions, with two soils with different chemical characteristics, which were inoculated with the actinobacteria isolates and incubated for forty five days. Plant height, shoot and root dry weight were determined after plant harvest. The actinobacteria promoted significant increases in plant dry weight matter of sunflower and physic nut, for up to 39% and 36% respectively, when planted in soil from pasture land, low in nutrients. In soil from an area with jackfruit, with higher nutrient levels, inoculated with streptomycete isolates, increments of up to 36% and 33% were obtained for sunflower and physic nut plant dry matter, respectively. The best isolates with potential for plant growth promotion were AC12, AC26C, AC26L, AC39, AC92C, AC92M and AC147. However, isolate AC30 was harmful for plant growth. The actinobacteria affected significantly biomass (root and aerial parts) production of sunflower and physic nut plants, independent of soil chemical characteristics.

**Keywords:** actinomycetes, oilseed plants, biodiesel.

## Introdução

A preocupação crescente da sociedade com a preservação ambiental aliada à crescente demanda por matéria-prima para a produção do biodiesel aumenta a necessidade de pesquisas que visem o aumento da produtividade de plantas oleaginosas nas condições edafoclimáticas do semiárido e outras regiões no Brasil, com menor impacto ambiental. Neste sentido, a utilização de microrganismos benéficos à agricultura com ação de biocontrole e de promoção de crescimento vem sendo apontada como uma alternativa viável para o desenvolvimento de sistemas de produção agrícolas ecologicamente e economicamente sustentáveis, para diversas culturas de importância econômica (Carrer et al., 2008).

Praticamente todas as espécies de plantas terrestres estudadas estabelecem relações complexas com uma grande variedade de microrganismos (Brundrett, 2009). Alguns são conhecidos por promover o crescimento das plantas e aumentar a tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Muitos microrganismos promotores de crescimento de plantas colonizam a rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes (Lugtenberg & Kamilava, 2009).

Dentre os inúmeros grupos de microrganismos rizosféricos benéficos aos vegetais, as actinobactérias, principalmente as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, compõem um importante grupo de bactérias do solo com a capacidade de colonização do sistema radicular, de adaptação a diferentes condições ambientais, de atuação na decomposição da matéria orgânica e na síntese de várias enzimas extracelulares que degradam moléculas complexas, especialmente celulose, lignocelulose, lignina e xilana, presentes em abundância na biomassa vegetal (Ding et al., 2004; Peláez, 2006). O gênero *Streptomyces spp.*, contém o maior número de espécies identificadas, devido à ação no controle de fitopatógenos, à grande diversidade de metabólitos secundários e pela elevada capacidade competitiva por substratos e ação na promoção de crescimento de plantas (Inbar et al., 2005; Kim et al., 2004).

Em relação às oleaginosas com potencial para produção de biodiesel, destacamos no presente trabalho, o girassol (*Helianthus annuus L.*), que é uma dicotiledônea anual da família Compositae, originária do continente Norte Americano (Oliveira et al., 2004) e o pinhão manso (*Jatropha curcas L.*), que pertence à família das Euforbiáceas, originária da América Central.

A importância econômica mundial do girassol deve-se à excelente qualidade do óleo comestível que se extrai de seus aquênios e ao aproveitamento dos subprodutos de extração, tais como tortas e/ou farinhas protéicas utilizadas na fabricação de ração para animais (Dickmann et al., 2005). O girassol apresenta características agrônomicas importantes, como ampla adaptabilidade às condições edafoclimáticas, podendo ser cultivado em todas as regiões do Brasil. O rendimento é pouco influenciado pelas latitudes e altitudes, assim como pelo foto período, o que facilita a expansão do cultivo (Silva & Tillmann, 2008).

O pinhão manso é uma planta rústica, tolerante à seca e adaptável a diversas condições edafoclimáticas, que vem sendo apontado como uma importante alternativa para fornecimento

de óleo para fabricação de biodiesel, principalmente na região semiárida (Arruda et al., 2004). Conhecendo a grande importância dessas oleaginosas para o desenvolvimento agrícola da região semiárida do Brasil e os efeitos benéficos das actinobactérias na promoção do crescimento das plantas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a potencialidade de actinobactérias na promoção de crescimento de plantas de girassol e de pinhão manso.

## Material e Métodos

Foram avaliados isolados de actinobactérias da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Campus Cruz das Almas, Bahia, Brasil, sendo estes identificados pelos códigos: AC12, AC16, AC26C, AC26L, AC30, AC37, AC39, AC43, AC50, AC92C, AC92M, AC103 e AC147, e pré-selecionados com potencial para promoção de crescimento de plantas (Sousa, 2006). As actinobactérias preservadas em glicerol 20% a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ , foram multiplicadas em meio de cultura AGS (arginina-glicerol-ágar), por 10 dias a temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Poter, 1960). Em seguida, as colônias de actinobactérias foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado (Soares et al., 2007) e cultivadas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 14 dias.

Os solos foram peneirados em peneira com malha de 2 mm e distribuídos em sacos de plástico com capacidade para 100 litros, revestidos com saco de nylon, colocando-se 16 litros de solo por saco. Para infestação do solo (na proporção de 20 g de arroz colonizado para 16 litros de solo), para cada isolado de actinobactéria, foram pesadas 20 g do arroz colonizado e colocados em sacos de plástico descartáveis com 70 ml de água destilada esterilizada, para agitação, permitindo o desprendimento das actinobactérias do arroz. A suspensão de actinobactérias foi adicionada ao solo, sendo este agitado manualmente para homogeneização. Para o tratamento testemunha, adicionou-se apenas água ao solo. Após infestação, os sacos contendo o solo foram mantidos na estufa agrícola à temperatura ambiente para incubação por 45 dias, sendo estes agitados semanalmente para homogeneização e periodicamente adicionou-se água para manter a umidade. Ao final do período de incubação, foram coletadas amostras de solo de todos os tratamentos para quantificação da população de actinobactérias. Foram pesadas 10 g das amostras de solo e transferidas para frascos de Erlenmeyer com 90 ml de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada, sendo a suspensão agitada por 30 minutos em agitador orbital, para em seguida serem realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 ml da solução salina estéril, obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . De cada diluição foi transferida uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  para placas de Petri contendo meio de cultura AGS sólido, com três repetições, e o inóculo espalhado na placa, utilizando-se uma alça de Drigalsky esterilizada por flambagem. Após incubação a  $28^{\circ}\text{C}$  por sete dias, a população de actinomicetos no solo foi estimada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e utilização da seguinte expressão matemática:  $\text{UFC g}^{-1}$  de solo seco =  $N \times 10 \times F \times Y$ , sendo: N

= número de colônias, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 µl de suspensão por placa), Y = fator de diluição.

Foram utilizados dois solos sob sistemas de manejo diferentes, um solo coletado em área de pastagem e outro solo coletado em área com plantio de Jaqueira, no campus de Cruz das Almas da UFRB, ambos classificados como Latossolo Amarelo Coeso A moderado, textura franco argilo arenosa, fase floresta estacional semidecidual, relevo plano. As amostras foram coletadas na camada de 0-20 cm. A análise química da amostra de solo foi realizada conforme metodologia proposta pela Embrapa (1999). Foram determinadas as seguintes características químicas: pH, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez potencial (H+Al) e matéria orgânica (MO).

Para avaliar o efeito das actinobactérias no crescimento de plantas de girassol e pinhão manso foram instalados dois experimentos em estufa agrícola, com o solo incubado com os diferentes isolados de estreptomicetos, conforme descrito acima. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 14 tratamentos (13 isolados de actinobactérias e a testemunha sem actinobactérias) e sete repetições. Cada repetição foi composta por uma planta cultivada em um saco de polietileno contendo três litros de solo. A semeadura foi realizada no mesmo dia para todos os tratamentos, colocando-se três sementes em cada saco de muda e o desbaste foi realizado quatro dias após a germinação, deixando uma planta por saco. O solo foi mantido sempre úmido, durante todo o cultivo. Na avaliação da altura das plantas, foi considerada a distância compreendida entre a superfície do solo e a base da folha mais jovem.

As plantas foram coletadas aos 60 dias após a germinação, sendo separados os caules, folhas e raízes. As raízes foram lavadas em água corrente sobre peneiras de 1 mm e 2 mm sobrepostas. Posteriormente as raízes, caules e folhas foram acondicionados separadamente em sacos de papel previamente identificados e colocados para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante, para obtenção da massa seca das folhas, caules e raízes.

Foi avaliada a atividade enzimática e de solubilização de fosfato em 13 isolados de actinomicetos: AC12, AC16, AC26C, AC26L, AC30, AC37, AC39, AC43, AC50, AC92C, AC92M, AC103 e AC147, de acordo com a metodologia descrita por Lewis (1988) para celulase e xilanase, Renwick et al. (1991) para quitinase, Bric et al. (1991) para ácido indoleacético e Katznelson & Bose (1959) para solubilização de fosfato. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Sisvar, sendo realizada a análise de variância e posteriormente a comparação de médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

## **Resultados**

O tratamento do solo com actinobactérias promoveu o aumento da população destes microrganismos nesses solos. No tratamento testemunha (solo sem infestação com

actinobactérias), verificou-se que o solo da área de área de jaqueira (SJ) apresentou uma população de actinobactérias nativas superior à do solo de área de pastagem (SP) e apresentou maior número de colônias de actinobactérias em todos os tratamentos (Figura 1).

O SJ apresentou valores superiores de nutrientes e matéria orgânica, quando comparado ao solo SP. O pH de ambos encontrava-se na faixa adequada ao crescimento de actinobactérias e de plantas, destacando que, de modo geral, as actinobactérias preferem solos com pH mais alto (Tabela 1).

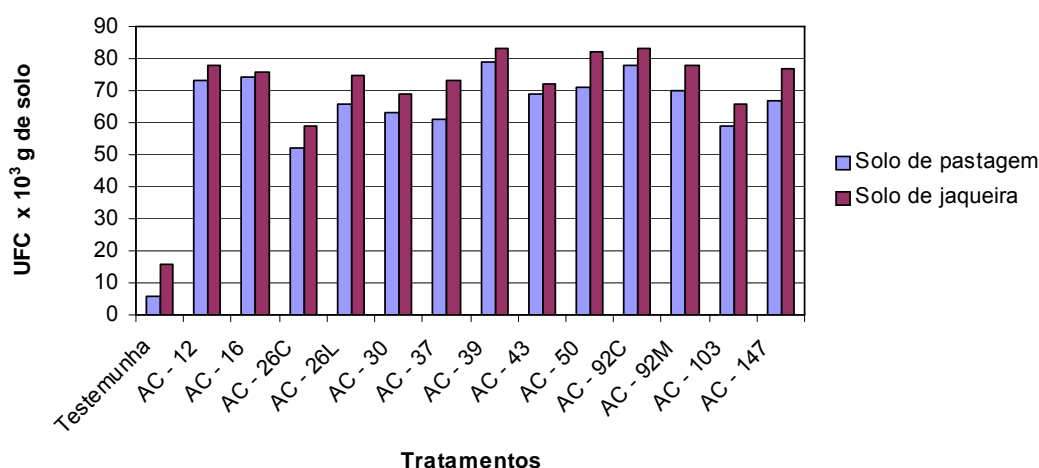


Figura 1. Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC x 10<sup>3</sup>) por grama de solo, em amostras de solo de área de pastagem e solo de área de jaqueira, após infestação com os isolados de actinobactérias (identificados por códigos) e incubação por 45 dias a temperatura ambiente (28±2 °C). O tratamento testemunha não foi infestado, mas foi incubado nas mesmas condições de temperatura e umidade.

Tabela 1. Características químicas de um Latossolo Amarelo Coeso A moderado, textura franco argilo arenosa, fase floresta estacional semidecidual, relevo plano sob dois sistemas de uso e manejo.

pH	P mg dm <sup>-3</sup>	K mg dm <sup>-3</sup>	H+Al	Ca	Mg cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	Ca+Mg	Na	CTC	MO g kg <sup>-1</sup>
<b>Jaqueira</b>									
7,20	24	60	0,90	5,4	3,8	9,2	0,16	10,41	21
<b>Pastagem</b>									
6,23	4	31	1,30	1,6	1,5	3,1	0,10	4,57	13

pH = potencial hidrogênico; P = fósforo; K = potássio; H+Al = acidez potencial; Ca = cálcio; Mg = magnésio; CTC = capacidade de troca catiônica; MO = matéria orgânica.

Na avaliação enzimática verificou-se que doze isolados apresentaram atividade celulolítica, dez apresentaram atividade xilanolítica e oito apresentaram atividade quitinolítica. Todos os isolados apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. Entretanto, nos testes *in vitro* de solubilização de fosfato, não foi verificado nenhum resultado positivo (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético e capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados de actinobactérias.

Isolados de actinomicetos	Enzimas extracelulares			Ácido Indolacético	Solubilização de fosfato
	Celulase	Xilanase	Quitinase		
AC-12	+	+	+	+	-
AC-16	+	-	+	+	-
AC-26C	+	+	+	+	-
AC-26L	+	+	-	+	-
AC-30	-	-	+	+	-
AC-37	+	+	-	+	-
AC-39	+	+	+	+	-
AC-43	+	+	-	+	-
AC-50	+	-	-	+	-
AC-92C	+	+	+	+	-
AC-92M	+	+	-	+	-
AC-103	+	+	+	+	-
AC-147	+	+	+	+	-

Os sinais indicam resposta positiva (+) negativa (-) em relação a produção de enzimas, ácido indolacético e solubilização de fosfato.

### Crescimento de plantas de girassol

Os tratamentos com actinobactérias proporcionaram incrementos significativos na altura, biomassa da folha e do caule e matéria seca da parte aérea das plantas de girassol cultivadas em SP, quando comparados com a testemunha (Tabela 3). Os maiores incrementos na altura das plantas variaram entre 12 e 18% e foram proporcionados pelos isolados AC147, AC26C, AC92C, AC12, AC 43, AC37, AC50 e AC39. Nas folhas, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com AC12 e AC92C (39%), AC26L e AC39 (38%) e AC50 (32%). Já no caule, incrementos significativos foram obtidos com os isolados AC39 (43%), AC12 (38%), AC92C (35%), AC26C e AC147 (33%), AC43 (32%), AC26L e AC50 (29%), AC37 (27%) e AC92M (25%) e na matéria seca da parte aérea, os maiores incrementos foram proporcionados pelos isolados AC39 (40%), AC12 (39%), AC92C (37%) e AC26L (34%) (Tabela 3). Em relação à matéria seca da raiz, verificou-se que somente o tratamento AC30 não diferenciou da testemunha, enquanto que os demais apresentaram aumentos significativos, com destaque para os isolados AC26L (47%), AC92C (42%), AC147 (41%) e AC37 (38%). Todas as actinobactérias proporcionaram aumentos significativos na matéria seca total.

Tabela 3. Crescimento de plantas de girassol cultivadas em solo de área de pastagem com diferentes isolados de actinobactérias.

Trat.*	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca (g planta <sup>-1</sup> )				
		Folha	Caule	Aérea	Raiz	Total
AC - 12	27,53a	2,10a	2,21a	4,31a	2,27b	6,58a
AC - 16	26,33b	1,72c	1,80b	3,52c	2,31b	5,83c
AC - 26C	28,09a	1,89b	2,14a	4,03b	2,39b	6,42b
AC - 26L	26,14b	2,09a	2,07a	4,16a	2,67a	6,83a
AC - 30	26,36b	1,86b	1,82b	3,68c	2,03c	5,71c
AC - 37	27,04a	1,95b	2,04a	3,99b	2,51a	6,50b
AC - 39	26,74a	2,08a	2,29a	4,37a	2,30b	6,67a
AC - 43	27,56a	1,87b	2,12a	3,99b	2,30b	6,29b
AC - 50	26,80a	2,00a	2,06a	4,06b	2,28b	6,34b
AC - 92C	27,72a	2,10a	2,16a	4,26 <sup>a</sup>	2,59a	6,85a
AC - 92M	26,06b	1,83b	2,00a	3,83b	2,34b	6,17b
AC - 103	25,13b	1,72c	1,80b	3,52c	2,27b	5,79c
AC - 147	28,07a	1,89b	2,13a	4,02b	2,57a	6,59a
Testemunha	23,77c	1,51d	1,60c	3,11d	1,82c	4,93d
CV (%)	6,63	6,34	8,08	6,16	9,25	5,18

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.  
\*Isolados de actinobactérias identificados por código. Testemunha – tratamento sem infestação.

Os melhores incrementos de matéria seca total foram proporcionados pelos isolados AC92C (39%), AC26L (38%), AC39 (35%), AC147 (34%) e AC12 (33%) (Tabela 3). O tratamento com o isolado AC92C foi superior aos demais tratamentos, em todos os parâmetros analisados no crescimento de plantas de girassol em SP, sendo seguido pelos isolados AC12, AC26L, AC39 e AC147 (Tabela 3).

### Crescimento de plantas de pinhão manso

Todas as plantas de pinhão manso produzidas em SP com isolados de actinobactérias apresentaram incrementos significativos na altura das plantas, destacando-se os tratamentos com os isolados AC39 e AC92C, com 21 e 18% de incremento, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Crescimento inicial de plantas de pinhão manso cultivadas em solo de área de pastagem com actinobactérias.

Trat.*	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca (g planta <sup>-1</sup> )				
		Folha	Caule	Aérea	Raiz	Total
AC - 12	21,42b	3,57a	7,31a	10,88a	3,14a	14,02a
AC - 16	21,41b	3,42b	6,73b	10,15b	2,86b	13,01b
AC - 26C	20,84c	3,15b	6,43b	9,58b	2,88b	12,46b
AC - 26L	20,53c	3,16b	6,57b	9,73b	2,62b	12,35b
AC - 30	19,89c	2,55d	5,23c	7,78c	2,49b	10,27c
AC - 37	20,19c	2,96c	5,95c	8,91c	2,67b	11,58b
AC - 39	22,98a	3,60a	7,28a	10,88a	3,20a	14,08a
AC - 43	20,26c	2,82c	6,51b	9,33b	2,73b	12,06b
AC - 50	19,42c	2,84c	5,97c	8,81c	2,64b	11,45b
AC - 92C	22,53a	3,64a	7,31a	10,95a	3,20a	14,15a
AC - 92M	21,33b	3,39b	6,89b	10,28b	3,06a	13,34a
AC - 103	20,44c	2,89c	6,58b	9,47b	2,82b	12,29b
AC - 147	21,41b	3,18b	6,66b	9,84b	3,02a	12,86b
Testemunha	19,00d	2,75c	5,43c	8,18c	2,25c	10,43c
CV (%)	5,21	9,7	13,49	11,48	14,36	10,63

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.  
\*Isolados de actinobactérias identificados por código. Testemunha – tratamento sem infestação.

Os maiores incrementos de matéria seca (MS) das folhas foram proporcionados pelos isolados AC92C (32%), AC39 (31%) e AC12 (30%) e para MS do caule, os mesmos isolados mostraram efeitos significativos AC12 (35%), AC39 (34%) e AC92C (35%). O AC30 foi prejudicial à produção de MS foliar (Tabela 4). Todos os isolados promoveram o maior crescimento das raízes, destacando-se AC39 e AC92C (42%), AC12 (39%), AC92M (36%) e AC147 (34%). Já na produção de matéria seca total da planta, com exceção do isolado AC30, todos promoveram o crescimento, com melhores resultados obtidos com AC92C (36%), AC39 (35%), AC12 (34%) e AC92M (28%) (Tabela 4).

Os isolados AC39 e AC92C destacaram-se dos demais, por favorecerem incrementos significativos em todas as variáveis analisadas para o crescimento inicial das plantas de pinhão manso. O tratamento com AC12, apesar de não ter sido o mais eficiente em promover o crescimento da planta em termos de altura, mostrou-se eficiente para todas as variáveis relacionadas à matéria seca da planta. O isolado AC92M proporcionou efeitos significativos na produção de matéria seca das raízes e na matéria seca total das plantas (Tabela 4).

### **Crescimento de plantas de girassol em solo de área de jaqueira (SJ)**

Nas plantas de girassol cultivadas em SJ com diferentes isolados de actinobactérias, foram observados efeitos significativos nos tratamentos com os isolados AC12, AC26L, AC39, AC43, AC92C, AC92M, AC103 e AC147, destacando-se os isolados AC92M e AC39, que proporcionaram os maiores incrementos na altura (Tabela 5).

Tabela 5. Crescimento de plantas de girassol cultivadas em solo de área de jaqueira com actinobactérias.

Trat.*	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Folha	Matéria seca (g planta <sup>-1</sup> )			
			Caule	Aérea	Raiz	Total
AC - 12	40,57b	7,27b	9,56a	16,83a	5,62a	22,45b
AC - 16	37,90c	6,94b	8,18b	15,12b	4,38b	19,50c
AC - 26C	38,57c	7,16b	7,98b	15,14b	4,26b	19,40c
AC - 26L	40,77b	8,04a	10,39a	18,43a	5,88a	24,31a
AC - 30	31,78d	4,97d	4,95c	9,92c	3,82b	13,74d
AC - 37	36,01c	6,36c	7,44b	13,80b	4,46b	18,26c
AC - 39	43,11a	7,34b	10,73a	18,07a	5,77a	23,84a
AC - 43	40,07b	7,48b	9,46a	16,94a	5,33a	22,27b
AC - 50	36,71c	6,85b	8,26b	15,11b	4,44b	19,55c
AC - 92C	40,07b	7,46b	10,20a	17,66a	5,70a	23,36a
AC - 92M	45,37a	7,92a	11,00a	18,92a	5,50a	24,42a
AC - 103	40,48b	6,81b	9,28a	16,09a	5,56a	21,65b
AC - 147	41,24b	8,27a	10,70a	18,97a	5,82a	24,79a
Testemunha	38,00c	6,19c	7,81b	14,00b	4,19b	18,19c
CV (%)	8,11	9,88	19,14	13,77	17,67	12,21

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.  
\*Isolados de actinobactérias identificados por código. Testemunha – sem actinobactérias.

No entanto, as plantas de girassol cultivadas em SJ tratado com os isolados AC16, AC 26C, AC37 e AC50 não apresentaram efeitos significativos para altura das plantas. Diferentemente das demais actinobactérias, o isolado AC30 mostrou-se prejudicial ao crescimento das plantas SJ. Com exceção do AC30 e AC37, os demais tratamentos com actinobactérias apresentaram incrementos significativos na produção de massa seca das folhas de girassol (Tabela 5).

Na avaliação da matéria seca do caule, parte aérea e raízes de plantas de girassol cultivadas em SJ, os isolados AC12, AC26L, AC39, AC43, AC92C, AC92M, AC103 e AC147, promoveram incrementos significativos para todas estas variáveis, com incrementos na produção de matéria seca (MS) do caule em até 41%, MS da parte aérea em até 35%, MS das raízes em até 40% e MS total em até 36%, quando comparados com a testemunha. O isolado AC30 foi prejudicial à produção de MS do girassol cultivado em SJ, exceto a MS das raízes. O tratamento com AC92M foi o que apresentou os melhores resultados em todas as variáveis analisadas (Tabela 5).

### **Crescimento de plantas de pinhão manso em solo de área de área de jaqueira (SJ)**

Foram observados incrementos significativos na altura das plantas de pinhão manso cultivadas em solo SJ tratado com os isolados AC12, AC26C, AC26L, AC39, AC43, e AC92C, AC103 e AC147. O AC30 foi prejudicial ao crescimento do pinhão manso em SJ (Tabela 6).

Tabela 6. Crescimento de plantas de pinhão manso cultivadas em solo de área de jaqueira com actinobactérias.

Trat.*	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Matéria seca (g planta <sup>-1</sup> )				Total
		Folha	Caule	Aérea	Raiz	
AC - 12	33,99b	8,47b	14,48b	22,95b	4,60b	27,55b
AC - 16	33,20c	8,09c	14,35b	22,44b	4,49b	26,93b
AC - 26C	34,44b	8,90a	16,51a	25,41a	4,98a	30,39a
AC -26L	34,87b	8,66b	14,66b	23,32b	4,55b	27,87b
AC - 30	28,85d	6,56e	12,12c	18,68c	4,31b	22,99c
AC - 37	33,24c	7,83c	14,88b	22,71b	5,12a	27,83b
AC - 39	36,78a	9,05a	15,98a	25,03 <sup>a</sup>	5,04a	30,07a
AC - 43	34,23b	8,33b	15,34b	23,67b	5,02a	28,69b
AC - 50	32,17c	7,58d	14,76b	22,34b	5,22a	27,56b
AC - 92C	35,94a	9,11a	16,51a	25,62 <sup>a</sup>	5,23a	30,85a
AC - 92M	33,16c	7,94c	15,05b	22,99b	4,53b	27,52b
AC - 103	34,11b	8,12c	15,61b	23,73b	4,80b	28,53b
AC - 147	36,66a	9,27a	17,11a	26,38 <sup>a</sup>	5,25a	31,63a
Testemunha	31,20c	6,87e	13,38c	20,25c	3,60c	23,85c
CV (%)	4,74	5,77	8,32	6,59	13,11	7,02

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.  
\*Isolados de actinobactérias identificados por código. Testemunha – sem actinobactérias

Os isolados AC39, AC92C, AC147 e AC26C destacaram-se dos demais, por promoverem maiores rendimentos em todas as variáveis analisadas no pinhão manso, em SJ.

O cultivo de pinhão manso em SJ tratado com diferentes actinobactérias proporcionou aumentos de até 18% na altura das plantas, de até 35% na MS das folhas, de até 28% na MS do caule, de até 30% na MS da parte aérea, de até 46% na MS das raízes e de até 33% na MS total das plantas, quando comparado com o tratamento testemunha.

## Discussão

As actinobactérias favoreceram significativamente o crescimento das plantas de girassol e pinhão manso cultivadas em solos com características químicas e teores de matéria orgânica diferentes. As plantas de girassol e pinhão manso apresentaram maior crescimento quando cultivadas no solo de área de jaqueira (SJ) (Figuras 2 e 3), devido à maior disponibilidade de nutrientes (Tabela 1). Todavia, essas oleaginosas obtiveram incrementos significativos de até 21% na altura final da planta e de até 39% na matéria seca total, quando cultivadas em ambos os solos com actinobactérias.

A incubação de ambos os solos com isolados de actinobactérias, por 45 dias, proporcionou o aumento da população de actinobactérias nestes solos (Figura 1), demonstrando que ocorreu crescimento desses microrganismos. Também foram observados incrementos significativos na altura e na matéria seca da raiz e parte aérea das plantas de girassol e pinhão manso, cultivadas nos solos com actinobactérias, sugerindo que o crescimento e atividade metabólica dos actinomicetos nesses solos foram benéficos ao crescimento das plantas, possivelmente devido à ação destes organismos na matéria orgânica do solo e na disponibilidade de nutrientes para as plantas. Sousa et al. (2009), em estudos com

plantas de tomateiro cultivadas em solo incubado por diferentes períodos de tempo com isolados de actinobactérias, obtiveram aumentos na altura das plantas na ordem de 57,3% a 79,9% e indicaram a necessidade de incubação do substrato de produção de plantas com os isolados de estreptomicetos para que ocorresse o efeito benéfico no crescimento das plantas. Segundo estes autores, tais efeitos benéficos estão associados ao ciclo de vida dos actinomicetos e ao período necessário para a produção de enzimas extracelulares para a decomposição da matéria orgânica presente no substrato de produção das plantas.

Nos testes *in vitro* foi verificado que todos os isolados apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. Estes dados sugerem que pode ter ocorrido a ação direta dos actinomicetos na promoção de crescimento das plantas de girassol e pinhão manso, por meio da produção deste fitohormônio. Dentre os efeitos proporcionados pelo ácido indolacético, evidencia-se o desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (Oliveira et al., 2003).

As actinobactérias apresentaram a capacidade de produção de enzimas extracelulares. Exceto o AC30, todos os isolados produziram celulase e 77% produziram xilanase. Estas enzimas atuam na decomposição de materiais orgânicos vegetais como celulose e lignina. As actinobactérias podem ter proporcionado o melhor crescimento do girassol e do pinhão manso, por mecanismos de decomposição da matéria orgânica e mineralização de nutrientes. A maioria dos isolados apresentou capacidade de produção de quitinase, enzima que atua na degradação de quitina, um importante componente do exoesqueleto dos invertebrados e da parede celular de fungos.

No presente trabalho pode-se observar a manifestação diferenciada das actinobactérias na promoção de crescimento do girassol e do pinhão manso, em dois solos com características diferentes. Tais variações, provavelmente são atribuídas às interações microrganismo–solo-planta, ou seja, interações entre as actinobactérias com outros microrganismos do solo, com as características diferentes de cada solo e também com a planta e seus exsudatos, considerando que o girassol é uma planta de ciclo curto e o pinhão manso uma cultura perene.

## Referências bibliográficas

- Arruda, F.P. de, Beltrão, N.E. de M., Andrade, A.P. de, Pereira, W.E., Severino, L.S., (2004). "Cultivo do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) como Alternativa para o Semiárido Nordeste". **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.1, p.789-799, Campina Grande, PB.
- Barker, A.V., Pilbean, D.J., (2007). **Handbook of plant nutrition**. New York: Taylor & Francis Group, 613p.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E., (1991). Rapid assay for indolacético acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.535-538.

- Brundrett, M.C., (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v.320, p.37–77.
- Carrer, R.F., Romeiro, R.S., Garcia, F.A.O., (2008). Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides termo lilacinus*. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.6, p.457-460.
- Dickmann, L., Carvalho, M.A.C., Braga, L.F., Sousa, M.P. Comportamento de Sementes de Girassol (*Helianthus annuus* L.) Submetidas a Estresse Salino. **Revista de Ciências Agro Ambientais**, Alta Floresta, v.3, p.64-75, 2005.
- Ding, C.H., Jiang, Z.Q., Li, X.T., Li, L.T., Kusakabe, I., (2004). High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.20, p.7-10.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, (1997). **Manual de Métodos de análise de solos**. 2ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 212p.
- Inbar, E., Green, S.J., Hadar, Y., Minz, D., (2005). Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. **Microbial Ecology**, v.50, p.73-81.
- Kim, B.J., Chun, J., Koh, Y.H., Lee, S.E.H., Hyun, J.W., Cha, C.Y., Kook, Y.H., (2004). Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.593-598.
- Lewis, K.J., (1988). **Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytiumoli gandum* Dreschler**. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu Rev Microbiol**. v.63, p.541–556.
- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Baldani, J.I., (2003). **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 40p.
- Oliveira, M.F., Vieira, O.V., Leite, R.M.V.B.C., (2004). **Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa**. Embrapa, Londrina-PR, n.273, 27p.
- Peláez, F., (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, London, England, v.71, p.981–990.
- Poter, J.N., Wilhelm, J.J., Tresner, H.D., (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**. v.8, p.174-178.
- Renwick, A.; Campbell, R. Coe, S., (1991). Assessment of in vivo screening systems for potencial biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p.524-532.
- Silva, L.X. & Tillmann E.A., (2008). **Viabilizando o desenvolvimento sustentável através do girassol: Discussões analíticas e evidências empíricas para o sul do Brasil**. XVI Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 19p.
- Soares, A.C.F., Sousa, C. da S., Garrido, M. da S., Perez, J.O., (2007). Production of *Streptomyces* inoculum in sterilized rice. **Scientia Agricola**, v.64, p.641 - 644.
- Sousa, C.S., (2006). **Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro**. Dissertação de Mestrado, Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA. 102p.
- Sousa, C. da S., Soares, A.C.F., Garrido, M. da S., (2009). Produção de plantas de tomateiro em substrato orgânico infestado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, v.68, n.1, p.195-203.



## **Situación de la Producción Integrada en Castilla y León. Aplicación del control biológico de hongos en el cultivo de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.).**

**S. Mayo<sup>1</sup>; A. Lorenzana<sup>1</sup>; M.P. Campelo<sup>1</sup>; O. González<sup>1</sup>; S. Gutiérrez<sup>2</sup>; R.E. Cardoza<sup>2</sup>; P.A. Casquero<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Recursos Naturales; Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias.*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología Molecular*

*Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León. Avda. de Portugal, 41; 24071 – León (España), smayp@unileon.es; pacasl@unileon.es*

### **Resumen**

La Producción Integrada se inició en Castilla y León (España) en el año 2000, desarrollándose reglamentos específicos para su implantación en los siguientes cultivos: zanahoria, patata, frutales de pepita (pera y manzana), viñedo, liliáceas (puerro, ajo, cebolla), lechuga, remolacha de mesa, maíz dulce, cereales de invierno para la alimentación humana, cerezo y leguminosas de consumo humano (lenteja, garbanzo y alubia), y registrándose una superficie cultivada de 4.834 ha en el año 2009. Dentro de este sistema adquiere especial importancia la Protección Integrada, destacando el control biológico.

En la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León se está llevando a cabo un trabajo sobre las posibilidades de control de hongos fitopatógenos del cultivo de la alubia mediante el uso del antagonista *Trichoderma* spp.

Así, en el año 2010 se realizaron ensayos para conocer la efectividad de *Trichoderma* spp. *in vitro*. Con este fin, se emplearon aislamientos de este hongo y de los patógenos *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Botrytis cinera* Pers. y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn procedentes de las principales zonas de cultivo. Se realizaron ensayos antifúngicos mediante membranas en los que se evaluó el porcentaje de inhibición que los compuestos y/o enzimas líticas de *Trichoderma* spp. ejercían sobre los patógenos, y ensayos antifúngicos mediante cultivo dual para comprobar la capacidad de biocontrol del antagonista. Gracias a los resultados obtenidos se pudo confirmar que los aislamientos de *Trichoderma* empleados son capaces de controlar en condiciones *in vitro* a todos los patógenos de estudio.

**Palabras-clave:** Castilla y León, Producción Integrada, Protección Integrada, Control biológico, *Trichoderma*, micosis, hongo, *Phaseolus vulgaris*.

## **Introducción**

### **Producción Integrada**

La Producción Integrada (PI) puede definirse como un sistema de producción sostenible de alimentos de alta calidad mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo los ingresos de la explotación. Los objetivos, por tanto, de la PI son la conservación de recursos (edafológicos, hidráulicos, genéticos), el uso racional de insumos (energéticos, fitosanitarios, fertilizantes), la gestión adecuada de residuos (sólidos, líquidos), la conservación y mejora del medio (paisaje, ecosistema, población rural) y el cumplimiento de las exigencias económicas de los agricultores.

Este método de obtención de productos diferenciados se estableció legalmente en España en el año 2002 mediante la aprobación del Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la Producción Integrada de productos agrícolas (BOE nº. 287, de 30/11/02). Actualmente todas las comunidades autónomas cuentan con su propio reglamento de PI, excepto Asturias, Cantabria, Castilla La Mancha, Madrid y País Vasco. En relación a Castilla y León este sistema de producción se venía desarrollando desde el año 2000 en el que se publicó el Decreto 208/2000. En dicha norma se recogen los requisitos generales que deben cumplir los productores y operadores que opten por acogerse a este tipo de producción y hagan uso de la identificación de garantía propia de la PI mediante el correspondiente logotipo. Durante la última campaña de comercialización 2009-2010 figuraron inscritos en el Registro de Productores y Operadores de Producción Integrada de Castilla y León 382 productores y 31 operadores, contando en la provincia de León con 105 productores y 1 operador.

Tras la publicación de la normativa básica a nivel regional se han desarrollado reglamentos específicos para su implantación en los siguientes cultivos: zanahoria, patata y frutales de pepita (pera y manzana) en el año 2002, viñedo en el año 2003, liliáceas (puerro, ajo, cebolla), lechuga, remolacha de mesa y maíz dulce en el año 2004, cereales de invierno para la alimentación humana y cerezo en el año 2005 y leguminosas de consumo humano (lenteja, garbanzo y alubia) en el año 2007, registrándose una superficie total cultivada bajo este sistema que alcanzó las 4.834 ha en el año 2009. En la provincia de León se cultivaron durante ese año 253 ha de frutales de pepita acogidas a este sistema con una producción de 7.068 t.

En cada uno de los mencionados reglamentos de PI se establecen obligaciones, prohibiciones y recomendaciones en relación con los siguientes aspectos: preparación del terreno, siembra o plantación, enmiendas y fertilización, operaciones culturales, poda, riego, protección integrada, maquinaria, recolección, tratamientos post-recolección, conservación y, en algunos casos, condiciones de las instalaciones.

En relación con la Protección Integrada, ésta permite el uso equilibrado de los productos fitosanitarios para el control de plagas y enfermedades, pero utilizando de forma prioritaria

métodos culturales, biológicos y naturales sobre los químicos. Los principios básicos de un manejo integrado de enfermedades (*Integrated Disease Management* o IDM) son: alcanzar un nivel suficiente, pero no necesariamente total, de control de la enfermedad; evaluar la población del patógeno para aplicar las estrategias y medidas de lucha solamente cuando sean necesarias; reducir, pero no necesariamente eliminar completamente, la utilización de productos fitosanitarios; considerar la repercusión ambiental de la aplicación de las medidas de lucha; tener en cuenta todas las enfermedades del cultivo y no solamente aquella que es objeto específico de la acción de control; y considerar las implicaciones legales y sociales de las acciones de control. Por otro lado, las acciones que implica el IDM son: (i) utilización eficiente de cultivares resistentes, independientemente de su nivel de resistencia, (ii) elección del lugar de siembra o plantación; utilización de material vegetal certificado libre de patógenos, (iii) reducción de la densidad y/o potencial del inóculo fúngico mediante prácticas culturales y el uso de agentes microbianos como rizobacterias y especies fúngicas del género *Trichoderma*, y (iv) protección del cultivo contra la infección subsiguiente a la siembra o plantación a través del uso racional de fungicidas y el control biológico.

La Comisión Europea (CE) ha completado recientemente, en el marco de la Directiva 91/414/EEC, la revisión de cerca de 1000 materias activas que existían en el mercado en 1993, de las que sólo el 26% han superado el proceso de armonización y están autorizadas para su uso fitosanitario (Jiménez y Montesinos, 2010). Por otro lado, la Directiva 2009/128/CE, por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, y el Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, adoptan una estrategia que consta de un doble paquete legislativo: por una parte, se establecen procesos más estrictos para el registro y autorización de uso de productos fitosanitarios; y, por otra, se establecen el IDM y los medios no químicos como estrategia fundamental de lucha contra enfermedades, plagas y malas hierbas, que debe ser implementado en cada Estado Miembro mediante Planes Nacionales de Acción en el año 2014.

## **Control biológico de la alubia**

### **El cultivo de la alubia**

La alubia o judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de grano dedicadas al consumo humano más importantes, ya que su cultivo se extiende por todos los continentes y es una gran fuente de proteínas, vitaminas y minerales. En el mundo se cultiva, alrededor de 27.988.400 ha, con una producción de aproximadamente 20.394.900 t. Los principales países productores, en 2008 fueron India, Brasil y Myanmar, con un 35,73 %, 13,51 % y 8,40 % respectivamente de la superficie mundial y un 19,27 %, 16,97 % y 12,26 %, respectivamente de la producción mundial (FAO, 2010). En lo que se refiere a España, la superficie cultivada en 2008 fue de 7.000 ha, de las cuales 5.075 ha eran de cultivo único. La

producción obtenida en dicha superficie superó las 11.000 t. En la Comunidad Autónoma de Castilla y León, la superficie cultivada en 2008 fue de 1.825 ha, de las cuales 1.470 ha estaban en León. En cuanto a la producción obtenida ascendía a 4.752 t, con 4.116 t producidas en León (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010).

La calidad de este cultivo en Castilla y León, fue reconocida en el año 2005 mediante la Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Alubia de La Bañeza-León", figura que ampara a cuatro variedades de las más importantes (Riñón Menudo, Canela, Pinta y Plancheta) y cuyo cultivo se extiende por 120 municipios de León y Zamora.

### **Incidenca de los hongos en el cultivo de la alubia**

El cultivo de la alubia se ve afectado por numerosas micosis (APS, 2009; Index Fungorum, 2009), siendo las más frecuentes en la provincia de León la fusariosis (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder & H.N. Hans y *Fusarium oxysporum* Schelechten. Fr. f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick & W.C. Shnyder), las podredumbres blanca (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Bary) y gris (*Botrytis cinerea* Pers.) y la rizoctoniosis (*Rhizoctonia solani* Kühn).

A nivel mundial se describen otras micosis, de las cuales no se tiene constancia de su importancia en los campos leoneses tales como alternariosis (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara), ascochyta (*Ascochyta boltshauseri* Sacc.), macrofomina (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid), mal del esclerocio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), mancha angular (*Phaeosariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), mildiu veloso (*Phytophthora* sp Bary), oídio (*Oidium balsamii* Mont.) phoma (*Phoma exigua* Sacc.), podredumbre rosa de la vaina (*Trichothecium roseum* (Pers.) Link.) y roya (*Uromyces appendiculatus* F. Strauss.).

### ***Trichoderma* spp. como agente biológico de control en alubia**

Un agente de control biológico se puede definir como un organismo distinto al hombre con capacidad para reducir la población del agente causante de la enfermedad o evitar sus efectos (Hjeljord y Tronsme, 1998). Dicho agente se puede emplear solo o bien junto con dosis reducidas de fungicidas químicos para poder controlar a los patógenos que afecten a la planta y así reducir al mínimo el impacto sobre el medio (Chet y Inbar, 1994; Harman y Kubicek, 1998). Existen agentes biológicos formados por bacterias, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, y por hongos, como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*.

*Trichoderma* (Teleomorfo: *Hypocrea*) es un género de hongos que se encuentra en los suelos. Es un invasor oportunista secundario, de rápido crecimiento, que produce gran cantidad de esporas, de enzimas capaces de degradar la pared celular (celulasas, quitinasas,

glucanasas,...) y de sustancias antibióticas. Sus principales métodos de control de patógenos son el micoparasitismo, la síntesis de antibióticos y la competencia directa.

El micoparasitismo consiste en reconocer al patógeno, atacarlo y penetrar en él con el fin de conseguir su muerte.

*Trichoderma* también produce una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). Este término incluye un grupo heterogéneo de diferentes compuestos químicos naturales relacionados, posiblemente, con las funciones de supervivencia del hongo, así como con la competencia contra microorganismos y macroorganismos, simbiosis, transporte, diferenciación,... (Demain y Fang., 2000). También se incluye en este grupo antibióticos que son de producción natural y podrían inhibir el crecimiento microbiano.

La competencia con el patógeno se establece por nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz,... (Paulitz, 1990). La omnipresencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo (Bisset, 1991) es una prueba de que es un excelente competidor por el espacio y por los recursos nutritivos.

Muchas especies de *Trichoderma* podrían colonizar la superficie de la raíz y causar cambios sustanciales en el metabolismo de la planta (Harman *et al.*, 2004). La interacción física entre *Trichoderma* y la planta se limita a las primeras capas de células de la epidermis y de la corteza de la raíz (Yedidia *et al.*, 1999). En esta relación simbiótica el hongo ocupa el nicho nutricional, protegiendo así a la planta de enfermedades. *Trichoderma* activa la expresión de los genes involucrados en la respuesta de defensa y promueve el crecimiento de la planta, del sistema radicular y la disponibilidad nutricional (Yedidia *et al.*, 2003; Hanson y Howell, 2004; Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma* produce ácidos orgánicos, como el cítrico o el fumárico que reducen el pH del suelo y permiten la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes, como hierro, manganeso y magnesio (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004).

Las interacciones de *Trichoderma* – planta – patógeno se pueden ver resumidas en la Figura 1.

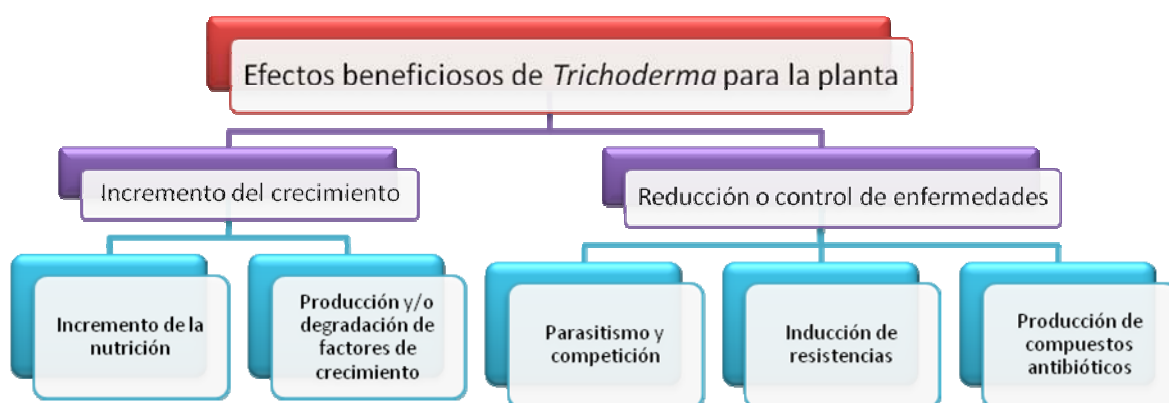


Figura 1. Interacción entre *Trichoderma* – planta – patógeno.

## Material y Métodos

### Aislamientos de hongos fitopatógenos y de *Trichoderma* spp.

En los ensayos realizados se emplearon aislamientos procedentes de la colección de hongos patógenos del Laboratorio de Diagnóstico de Plagas y Enfermedades Vegetales de la Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria (E.S.T.I.A.) de la Universidad de León. Todos los aislamientos fueron obtenidos a partir de alubia producida en la provincia de León.

Los patógenos utilizados en los ensayos fueron:

- *B. cinerea* – B45. Variedad: Canela; Comarca: El Páramo
- *Fusarium* sp. – F52. Comarca: La Bañeza
- *Fusarium* sp. – F53. Comarca: La Bañeza
- *R. solani* – R43 Variedad: Blanca Redonda; Comarca: El Páramo
- *S. sclerotiorum* – S47 Variedad: Pinta; Comarca: El Páramo

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados fueron originarios de la zona de producción de la I.G.P. "Alubia de La Bañeza – León", procedentes de la misma colección que los patógenos. Fueron elegidos por ser obtenidos en áreas que, históricamente, han producido alubia en la provincia y que se aislaron en variedades de judía acogidos a la citada I.G.P.

Los *Trichoderma* empleados fueron:

- *Trichoderma* sp. – T22: Variedad: Riñón menudo; Comarca: El Páramo.
  - *Trichoderma* sp. – T23: Variedad: Canela; Comarca: La Bañeza.
  - *Trichoderma* sp. – T38: Variedad: Canela; Comarca: Astorga.
  - *Trichoderma* sp. – T41: Variedad: Canela; Comarca: Esla - Campos.
  - *Trichoderma virens* – T11
  - *Trichoderma atroviride* – T59
- } Aislados cedidos por el grupo de Fitopatología y Biocontrol (Grupo de Excelencia GR-67) del área de Microbiología de la Universidad de León (Campus de Ponferrada).

### Ensayos antifúngicos mediante el uso de membranas

El objetivo de estos ensayos fue evaluar el porcentaje de inhibición que los compuestos y/o enzimas líticas de *Trichoderma* spp. secretados al medio de cultivo ejercían sobre el crecimiento de los diferentes hongos patógenos y seleccionar aquellos que mostraron un mayor porcentaje de inhibición. Dicho porcentaje se calculó a partir de los datos obtenidos a los 3 días de crecimiento de los patógenos.

En el ensayo, del que se realizaron 4 repeticiones, se emplearon placas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA), cubriendo toda la superficie

del medio con una membrana de celofán. Sobre ésta se sembraron discos de micelio de 6 mm de diámetro de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., incubándose a 28 °C durante 48 h. Pasado dicho tiempo se retiraron las membranas y se sembraron posteriormente discos de micelio de los patógenos de estudio del mismo diámetro que el del antagonista, incubándose nuevamente las placas a 28 °C.

Finalmente, se midió el diámetro de los discos de micelio cada 24 h durante 3 días consecutivos calculando el porcentaje de inhibición como se indicó anteriormente.

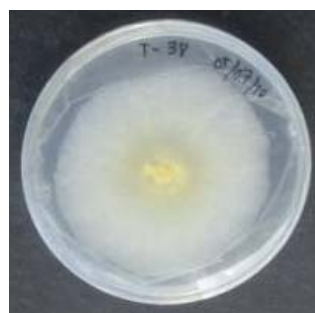
*Trichoderma* sp. – T22



*Trichoderma* sp. – T23



*Trichoderma* sp. – T38



*Trichoderma* sp. – T41



*Trichoderma* sp. – T11



*Trichoderma* sp. – T59



Figura 2. Placas con celofán y aislamientos de *Trichoderma* a las 48 h.

### Ensayos anti-fúngicos mediante cultivos duales

El objetivo de estos ensayos fue comprobar la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. Dicha capacidad se detecta cuando el antagonista sobrecrece al patógeno, destruyéndolo. Cuando no es capaz de biocontrolarlo, el patógeno y *Trichoderma* spp se mantienen separados en la placa.

En el ensayo del que se realizaron 3 repeticiones se llevó a cabo en placas Petri con medio PDA se colocaron 2 discos de micelio de 6 mm de diámetro a una distancia de 5,5 cm

enfrentando de forma individualizada los aislamientos de *Trichoderma* con cada uno de los patógenos. Las placas se incubaron a 28 °C durante 5 días.

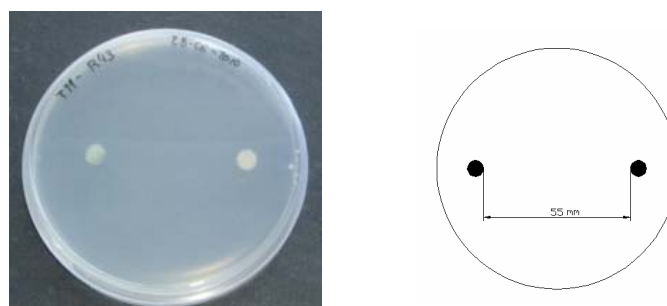


Figura 3. Placa con cepas de patógeno y *Trichoderma*. Plantilla de cultivos duales.

## Resultados y Discusión

### Ensayos anti-fúngicos mediante el uso de membranas

Los datos de porcentaje de inhibición obtenidos a los 3 días de cultivo de los patógenos tras eliminar el celofán con *Trichoderma* aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento de los patógenos.

Porcentaje de Inhibición al 3 <sup>er</sup> día de crecimiento.						
<i>Trichoderma</i>	<i>R. solani</i> R43	<i>B. cinerea</i> B45	<i>S. sclerotiorum</i> S47	<i>Fusarium sp.</i> F52	<i>Fusarium sp.</i> F53	Media
T22	81,03	75,00	73,91	18,33	20,83	53,82
T23	89,66	75,00	73,91	56,67	63,89	71,82
T38	100,00*	54,17	39,13	6,67	22,22	44,44
T41	72,41	52,08	58,70	35,53	38,89	51,52
T11	84,48	75,00	73,91	22,20	16,67	54,45
T59	75,86	75,00	73,91	40,00	63,89	65,73

Observando los datos referidos al aislamientos de *R. solani* – R43, se observa que el porcentaje de inhibición mayor correspondió al producido por el *Trichoderma* T23 (89,66 %). Los datos relativos a T38, se desestimaron porque se produjo un alto nivel de contaminación por *Trichoderma* en el medio, lo que distorsionaría los resultados. Le siguieron, en cuanto a capacidad inhibidora, las cepas T11 (84,48 %), T22 (81,03 %), T59 (75,86 %) y, por último, T41 (72,41 %).

En cuanto a *B. cinerea* – B45, como se puede ver, el porcentaje de inhibición fue el mismo T22, T23, T11 y T59 (75 %), viéndose reducido en el caso de los aislamiento T38 (54,17 %) y T41 (52,08 %).

Con el aislamiento de *S. sclerotiorum* sucede algo parecido al patógeno anterior, ya que T22, T23, T11 y T59 (73,91 %) inhiben todos ellos por igual. Sin embargo, T38 registró un porcentaje de inhibición sensiblemente menor (39,13 %).

En lo referente a *Fusarium* F52, los porcentajes de inhibición sufrieron una reducción importante. El peor resultado correspondió al aislamiento *Trichoderma* T38 (6,67 %), siguiéndole el T22 (18,33 %). El porcentaje mayor fue el proporcionado por T23, aunque no sería muy alto pues sólo controlaría a un 56,67 % del patógeno.

En el caso de *Fusarium* F53, la capacidad inhibidora mostrada por *Trichoderma* spp. fue mayor que la obtenida en el otro aislamiento de esa especie patógena. El mayor porcentaje de inhibición fue el producido por T23 y por T59 (63,89 %). El aislamiento que produjo un porcentaje menor fue T38 (22,22 %).

*Trichoderma* T59 – *R. solani* R43



Control *R. solani* R43

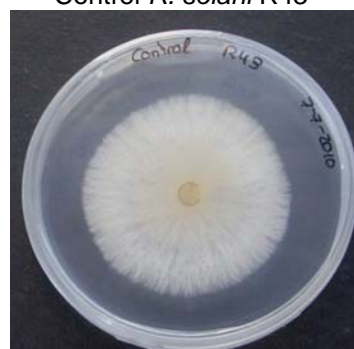


Figura 4. Inhibición de crecimiento de *R. solani* – R43 con el aislamiento *Trichoderma* T59 comparado con el control R43.

En los trabajos previos realizados por Campelo *et al.* (2009), el porcentaje de inhibición de *T. virens* - T11 frente a *R. solani* fue del 100 %, mientras que el de *T. atroviride* – T59 se redujo hasta el 84,7%. En el caso de *B. cinerea* el aislamiento de *T. virens* - T11 permitió controlar en condiciones *in vitro* el 100 % del patógeno mientras que *T. atroviride* - T59 tan solo pudo inhibir el crecimiento en un 64,5 %. En cuanto a *S. sclerotiorum* fue controlada en un 100 % por *T. virens* – T11 y por *T. atroviride* - T59. En cuanto a *Fusarium*, hubo diferentes porcentajes de inhibición según el aislamiento del patógeno del que se tratase. Así *T. virens* – T11 obtuvo porcentajes de inhibición que variaron desde el 36,4 % hasta el 100 %, y en el caso de *T. atroviride* – T59 variaron desde el 15,4% hasta el 54,8%. A la vista de los datos, se pudo observar que los porcentajes se mantuvieron entre esos valores.

### Ensayos anti-fúngicos mediante cultivos duales

Todos los aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de controlar *in vitro* a todos los patógenos. Cabe destacar que T22 creció a un ritmo inferior que el de los otros *Trichoderma* en

el caso de los enfrentamientos con *R. solani* - R43 y *B. cinerea* - B45 permaneciendo separado de los patógenos y mostrándose incapaz de biocontrolarlos. Sin embargo con los otros patógenos sí mostró capacidad de biocontrol. El resto de los aislamientos de *Trichoderma* rodearon a los patógenos, llegando a esporular sobre los mismos.

En ensayos realizados por Campelo *et al.* (2009) ya se demostró que cepas de *T. virens* - T11 y de *T. atroviride* - T59 mostraban un buen control de hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*, siendo los resultados más patentes en caso del primero.

*Trichoderma* T38 – *S.sclerotiorum* S47



*Trichoderma* T11 – *Fusarium* F52



Figura 5. Ejemplo de enfrentamientos duales de 2 aislamientos de *Trichoderma*.

Normalmente la actividad antagónica de *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* constituye un indicativo inicial de su actividad biológica contra hongos fitopatógenos. A partir de los ensayos *in vitro* se seleccionan los mejores aislamientos que son testados en ensayos de cámara de cultivo en invernadero y posteriormente a campo, donde previsiblemente se descartarán un considerable número de aislamientos como agentes de regulación biológica de patógenos por la inconsistencia de actividad de biocontrol en los distintos medios ensayados. Si bien Annes *et al.* (2010) observaron que la actividad antibiótica de los hongos en condiciones *in vitro* no tiene por qué estar relacionada con una reducción de la enfermedad en condiciones *in vivo* ya que entran en juego otras condiciones distintas.

## Conclusiones

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo se ha podido comprobar que los aislamientos de *Trichoderma* empleados, son capaces de controlar, en condiciones *in vitro*, aunque con diferentes resultados en los porcentajes de inhibición, a todos los patógenos de estudio, *B. cinerea*, *Fusarium* sp., *R. solani* y *S. sclerotiorum*.

## Referencias

- APS, 2009: "Diseases of bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". American Phytopathological Society. (<http://www.apsnet.org/online/common/comment/bean.asp>).
- Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. 2004. "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* stains" International Microbiology 7, pg 249-260.
- Bisset, J. 1991. "A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification" Can J Bot 69. Pg 2357-2372.
- Campelo, P., Cardoza R.E., Lorenzana A., Hermosa M.R., Monte E., Reinoso B., Gutiérrez S., Casquero P.A. 2009. "Biological control of phytopathogenic fungi in bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) with *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens*" Bean Improvement Cooperative Fort Collins, Colorado.
- Chet, I.; Inbar, J. 1994. "Biological control of fungal pathogens" Applied Biochemistry and Biotechnology 48, pg 37-43.
- Demain, A.L.; Fang, A. 200. "The natural functions of secondary metabolites" Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 69, pg 1-39.
- Ghisalberti, E.L.; Sivasithamparam, K. 1991. "Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp." Soil Biology & Biochemistry 23, pg 1011-1020.
- Harman, G.E., Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorit, M. 2004. "*Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts" Nature Reviews Microbiology 2, pg 43-56.
- Harman, G.E., Kubicek, C.P. 1998. "*Trichoderma* and *Gliocladium*" Taylor & Francis, London, 278 pgs.
- Hjeljord, L.; Tronsme, A. 1998. "*Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview". Harman, G.E. y Kubicek, C.P. (eds.) "*Trichoderma* and *Gliocladium* (vol.2)" Taylor & Francis, Londres, Reino Unido, pg 131-153.
- Index Fungorum, 2009. "Index Fungorum" CABI Biosciences Databases. (<http://www.indexfungorum.org/>).
- Jiménez, R.M.; Montesinos, E. 2010. "Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado" Ed. Phytoma-España.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. "Estadísticas." ([www.marm.es](http://www.marm.es))
- Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. "Estadísticas. FAOSTAR" ([www.fao.org](http://www.fao.org)).
- Paulitz, T.C. 1990. "Biochemical and ecological aspect of competition in biological control" "New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pest and diseases" Baker, R.R. & Dunn, P.E. (eds). Alan R. Liss. Nueva York, EE.UU.
- Sivasithamparam, K.; Gisalberti, E.L. 1998. "Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*" En: Kubicek, C.P.; Harman G.E. (eds.), "*Trichoderma* and *Gliocladium* Basic Biology, Taxonomy and Genetics" Taylor and Francis Ltd., London, pg 139-191.
- Yeddida, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. "Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*" Appl. Environ. Microbiol. 65. Pg 1061-1070.
- Yedidia, S.; Shores, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003. "Concomitant inductions of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins" Applied Environmental Microbiology 69, pg 7343-7353.



## **Actinobactérias no biocontrole de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood em mudas de tomateiro**

**A.C.F. Soares<sup>1</sup>; J.C.C.A. Damasceno<sup>2</sup>; L.S. Luquine<sup>3</sup>; R.S. Vieira<sup>3</sup>, M.C. Silva<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>UFRB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - 44380-000 - Cruz das Almas, BA – Brasil, [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br);

<sup>2</sup>Doutoranda em Ciências Agrárias - UFRB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas;

<sup>3</sup>Mestrandos em Microbiologia Agrícola - UFRB - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

### **Resumo**

As actinobactérias apresentam características importantes para o biocontrole e crescimento de plantas. No presente trabalho avaliou-se o efeito de metabólitos secundários, produzidos em meio líquido por 42 isolados de actinobactérias, na mortalidade de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e controle da meloidoginose no tomateiro. Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf, com 50µl de uma suspensão com 25 juvenis de *M. javanica* e 500µl de meio de cultura contendo os metabólitos produzidos pelas actinobactérias, com incubação por 24 e 48 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, os nematoides foram transferidos para água e incubados por 24 horas. Determinou-se a percentagem de imobilidade e mortalidade dos nematoides. Para os testes na planta, o solo foi infestado com actinobactérias e incubado por 40 dias, seguido de semeadura do tomateiro. Quinze dias após a germinação, realizou-se a inoculação das raízes com 3000 ovos e juvenis de *M. javanica* por planta e, após 35 dias fez-se a coleta das plantas. Metabólitos secundários produzidos por 34 isolados de actinobactérias causaram mortalidade de *M. javanica* acima de 50%. Houve redução de 73,7% e 72,8% nos números de galhas e massa de ovos por grama de raiz nas plantas desenvolvidas no solo tratado com o isolado codificado como BFT 4. As actinobactérias promoveram incrementos de 31,1%, 35,4%, 70,5% e 312,7% para altura, diâmetro, massa seca da parte aérea e das raízes das plantas de tomateiro, em relação ao controle sem actinobactérias, inoculado com nematoides. As actinobactérias apresentam potencial para o controle de *M. javanica* no tomateiro.

**Palavras-chave:** Controle biológico, metabólitos secundários, nematoide das galhas, *Streptomyces* spp.

## **Actinobactérias no biocontrole de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood em mudas de tomateiro**

### **Abstract**

Actinobacteria are microorganisms with important characteristics for biological control and plant growth. The effect of secondary metabolites produced in liquid culture medium by 42 isolates of actinobacteria was studied for the mortality of *Meloidogyne javanica* and control of root-knot in tomato plants. A bioassay was conducted in Eppendorf tubes with a 50 µl suspension of 25 juveniles of *M. javanica* and 500µl of liquid growth medium with metabolites produced by the actinobacteria, with incubation for 24 and 48 hours. The immobility and mortality of juvenile nematodes were evaluated. The nematodes were then transferred to water and incubated for 24 hours. The percentage of nematode immobility and mortality was determined. For the tests in tomato plants, soil was infested with actinobacteria and incubated for 40 days, and after that, tomato seeds were sown. Fifteen days after seed germination, the roots were inoculated with 3000 eggs and J2 of *M. javanica* per plant, and plants were harvested 35 days after inoculation. Secondary metabolites produced by 34 isolates of actinobacteria caused mortality rates of *M. javanica* above 50%. There was a reduction of 73.7% and 72.8% in the numbers of galls and egg masses per gram of roots in plants grown in soil treated with isolate codified as BFT 4. Actinobacteria promoted increases of 31.1%, 35.4%, 70.5% and 312.7% for plant height, stem diameter, shoot and root dry weight, in comparison to control plants grown in soil without actinobacteria, but with nematodes. The actinobacteria have potential to control *M. javanica* on tomato plants.

**Keywords:** Biological control, secondary metabolites, root-knot, *Streptomyces* spp.

## Introdução

O consumo de hortaliças tem aumentado devido à maior conscientização da população, em busca de uma dieta alimentar mais rica e saudável. Desse modo, o desenvolvimento de sistemas de cultivo de hortaliças, visando à otimização da produção tem exigido dos agricultores esforços no sentido de reduzir, ou até mesmo eliminar deficiências do setor produtivo, como problemas nutricionais e fitossanitários das mudas (Montezano & Peil 2006).

A produção de mudas constitui-se numa das etapas mais importantes do sistema produtivo (Minami, 1995; Silva Júnior et al., 1995). Dela depende o desempenho final das plantas nos canteiros de produção, tanto do ponto de vista nutricional, quanto do tempo necessário para a colheita e, conseqüentemente, do número de ciclos possíveis por ano (Carmello, 1995).

A meloidoginose situa-se entre os mais importantes problemas fitossanitários do tomateiro em quase todas as regiões do mundo. Essa doença é causada por nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como "nematoides das galhas", devido ao sintoma característico de formação de galhas nas raízes da planta. As plantas de tomateiro quando atacadas, severamente pelo nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado e com poucas raízes funcionais. Em áreas com altas infestações do nematoide, no início do cultivo pode ocorrer a morte da planta e nas plantas sobreviventes, a produção é fortemente afetada em quantidade e qualidade (Alvarenga, 2004; Charchar & Aragão, 2005).

Para o manejo destes parasitas de plantas, frequentemente se recorre ao controle químico que tem seu uso cada vez mais limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento, ou baixa eficácia de controle após repetidas aplicações (Dong & Hang, 2006). Neste sentido, o controle biológico surge como uma alternativa viável para o manejo de fitonematóides, por minimizar o dano ambiental e por ser mais vantajoso economicamente, comparado aos nematicidas convencionais (Coimbra & Campos, 2005).

As actinobactérias constituem um importante grupo de bactérias, pertencentes à classe Actinobactéria, aeróbicas estritas, comumente encontradas no solo. O gênero *Streptomyces* é o mais estudado entre as actinobactérias, sendo conhecido mundialmente pela capacidade de produção de antibióticos (Padilha, 1998), enzimas líticas e pela decomposição da matéria orgânica, (Getha et al., 2005).

Estudos têm demonstrado o potencial das actinobactérias como agentes de controle biológico dos nematoides *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus penetrans* (Jonathan et al., 2000). De um total de 42 actinobactérias isolados da rizosfera de plantas, 28 foram eficientes em reduzir o número de galhas e nove isolados reduziram o número de ovos de *M. javanica* em raízes de mudas de tomateiro (Coimbra et al., 2004). Sousa et al., (2006), demonstraram que houve redução do número de galhas (68%) e de massa de ovos (76,8%)

em raízes das mudas de tomateiro produzidas em substrato infestado e incubado com as actinobactérias. Yan et al. (2004) isolaram uma cultura de *Streptomyces* sp. capaz de controlar a formação de galhas e reduzir o número de J2 de *Meloidogyne incognita*, em condições de casa de vegetação.

Este trabalho teve como objetivos, caracterizar fisiologicamente os isolados de actinobactérias, avaliar o potencial desses isolados na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, em condições *in vitro*, e no controle da meloidoginose no tomateiro.

## Material e Métodos

Foram avaliados 42 isolados de actinobactérias provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB. Os isolados de actinobactérias foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido AGS (Poter, 1960) e incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de 28°C por 10 dias. Após este período, as culturas foram transferidas para meio de cultura líquido AGS e incubadas durante 14 dias a 28 ± 2°C, em agitador orbital, a 140rpm. Ao final desse período, as culturas de actinobactérias foram centrifugadas a 15000rpm por 10 minutos para separar as células de actinobactérias (pellet) do meio líquido com os metabólitos secundários (sobrenadante). O sobrenadante foi armazenado em tubos de centrífuga de polietileno com capacidade para 15ml, com tampa de rosca e mantidos em freezer, a - 4°C.

Para obtenção dos J2, raízes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada', cultivado em casa de vegetação, após inoculação com *M. javanica*, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 500 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão montada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso. Para a desinfestação dos J2, a suspensão obtida na câmara de eclosão foi transferida para uma peneira de 500 mesh, na qual os J2 ficaram retidos. A peneira com os J2 foi imersa numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 minuto, seguido de quatro lavagens com água destilada esterilizada.

Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf, esterilizados, com todos os isolados de actinobactérias selecionados anteriormente. Foram adicionados 50 µl de uma suspensão contendo 25 juvenis de *M. javanica*, juntamente com 500 µl de meio de cultura líquido contendo os metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias. Os tubos foram mantidos a 28°C em câmara de crescimento B.O.D. Após 24 e 48 horas de incubação foram contados os nematoides móveis e imóveis, com auxílio do microscópio óptico. Em seguida, os nematoides foram retirados da suspensão de metabólitos e transferidos para água esterilizada, onde permaneceram por mais 24 horas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura

de 28°C. Foram considerados mortos os nematoides que depois desse período em água, não recuperaram a mobilidade. Dessa forma, foi avaliada a porcentagem de J2 imóveis e mortos. Nos tratamentos controle, os J2 foram incubados em água destilada esterilizada e em meio líquido AGS sem cultivo de actinobactérias. Os dados foram transformados em  $\arcsin(x/100)^{0,5}$ , e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Para avaliar o efeito das actinobactérias no controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro cultivadas em solo esterilizado, foi instalado um experimento em blocos inteiramente ao acaso com 12 repetições. Foram selecionados nove isolados de actinobactérias, codificados como BFT 4, BFT 26, BFT 41, BFT 71, BFT 87, PD3, AC 50, AC 92 e AC 147. Inicialmente, as actinobactérias foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado (Soares et al., 2007), com incubação a 30°C por 14 dias. O solo foi esterilizado duas vezes em autoclave a 121°C, por 1 hora, em dias consecutivos, sendo posteriormente infestado com a suspensão de actinobactérias na proporção de 20g de arroz colonizado para 16 litros de solo e incubado por 40 dias, à temperatura ambiente, em sacos de polietileno, mantendo-se a umidade constante, com adição de água esterilizada.

A semeadura do tomateiro foi realizada colocando-se três sementes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada' em sacos de muda (15 x 0,9 cm) contendo o solo infestado e incubado com as actinobactérias, sendo realizado o desbaste uma semana após a germinação, deixando-se uma planta por saco. Aos 15 dias após a germinação das sementes de tomateiro, foi feita a inoculação das mudas com 3000 ovos e/ou juvenis por planta de *M. javanica*, fazendo-se orifícios no solo e colocando-se o inóculo em contato com as raízes, com o auxílio de uma micropipeta de 1ml. Aos 35 dias depois da inoculação com *M. javanica*, foi realizada a coleta das plantas, avaliando-se a altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones, massa seca da parte aérea e das raízes. Para a contagem do número de massa de ovos e galhas, amostras de raízes frescas foram separadas e coloridas por imersão em solução de fucsina ácida a 0,15 %, durante 20 minutos.

A atividade quitinolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Rewick et al., (1991), utilizando quitina coloidal como fonte de carbono. A produção de lipase pelos isolados de actinobactérias foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como substrato.

## Resultados

Os metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias em meio de cultura causaram a imobilidade e mortalidade de juvenis de *M. javanica*, quando comparados aos controles em água e meio de cultura líquido (Tabela 1). Do total de 42 isolados de actinobactérias testados, houve efeito na imobilidade de J2 de *M. javanica* acima de 50% para 32 isolados.

Tabela 1. Efeito de metabólitos de actinobactérias na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* após 24, 48 e 72 horas de exposição.

Isolados*	Juvenis do segundo estágio (J2) de <i>M. javanica</i>							
	Imóveis (%)			Mortos	Imóveis (%)			Mortos (%)
	24	48	72	Isolados	24	48	72	
Controle 1	0,00 i*	0,00 h	4,27 h	BFT 57	25,45 f	19,47 f	19,32 f	
Controle 2	6,20 h	8,25 g	11,57 g	BFT 58	71,25 b	79,35 b	85,75 a	
AC 50	67,85 b	69,72 c	73,70 c	BFT 65	12,12 g	35,30 e	43,62 e	
AC 92	70,05 b	71,85 c	78,80 b	BFT 66	79,05 b	78,20 b	81,82 b	
AC 147	76,20 b	82,15 b	63,72 d	BFT 69	40,95 e	67,85 c	67,52 d	
AR 5	60,67 d	63,80 c	48,07 e	BFT 71	51,65 d	88,67 a	76,97 b	
AR 18	55,12 d	49,65 d	49,10 e	BFT 76	45,92 d	73,57 c	84,12 a	
BFT C	31,30 f	81,30 b	74,20 c	BFT 79	57,05 d	89,25 a	81,92 b	
BFT D	64,65 c	88,00 a	81,92 b	BFT 80	25,37 f	32,00 e	62,37 d	
BFT K	67,85 c	89,30 a	78,80 c	BFT 83	30,15 f	65,52 c	78,97 b	
BFT 4	77,75 b	80,75 b	88,85 a	BFT85	20,22 f	28,92 e	50,80 e	
BFT 7	77,05 b	87,85 a	72,97 c	BFT 87	89,55 a	76,72 b	75,37 c	
BFT11	78,52 b	84,07 a	87,27 a	BFT 88	72,90 b	78,12 b	77,15 b	
BFT 18	42,80 e	57,45 d	67,82 d	BFT 100	66,65 c	66,72 c	86,57 a	
BFT 19	72,40 b	84,30 a	77,00 b	BFT 102	78,97 b	69,92 c	80,05 b	
BFT 25	58,20 d	88,85 a	85,57 a	BFT 104	71,25 b	74,32 b	64,87 d	
BFT 26	83,45 a	79,35 b	63,92 d	BFT 106	71,45 b	76,62 b	81,37 b	
BFT 32	59,57 d	77,15 b	64,52 d	BFT 112	72,10 b	62,22 c	59,87 d	
BFT 36	65,20 c	69,45 c	75,12 c	BM 18	56,60 d	64,92 c	49,85 e	
BFT 40	65,27 c	51,37 d	69,77 c	BM 22	24,32 f	77,87 b	68,42 d	
BFT 41	73,95 b	85,97 a	86,85 a	BM 28	53,00 d	51,97 d	71,92 c	
BFT 48	57,58 d	69,75 c	40,12 e	PD3	84,25 a	85,12 a	86,12 a	
CV (%)	8,58							

\*Controle 1 – em água, controle 2- em meio líquido AGS. Isolados de actinobactérias identificados por códigos. As letras comparam os dados na coluna. Dados seguidos por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knot a 5% de probabilidade.

Seis isolados (BM 22, BFT 83, BFT 76, BFT 69, BFT 18 e BFT C) proporcionaram efeito nematicida apenas após 48 horas de exposição aos metabólitos. Houve efeito nematicida de metabólitos produzidos por 34 isolados de actinobactérias, com mortalidade de J2 acima de 50%, destacando-se os isolados de actinobactérias codificados como BFT D, BFT 4, BFT 11, BFT 25, BFT 41, BFT 58, BFT 66, BFT 76, BFT 79, BFT 100, BFT 102, BFT 106 e PD3 (Tabela 1).

O solo tratado com as actinobactérias promoveu redução significativa no número de galhas e massa de ovos nas raízes de mudas de tomateiro (Tabela 2). Os isolados codificados como BFT 4, BFT 41, BFT 87, AC 92 e PD3, causaram significativa redução de 73,5%, 62,4%, 62,4%, 61,5% e 53,8%, respectivamente, no número de galhas por grama de raiz do tomateiro. Para massa de ovos por grama de raiz, os isolados BFT 4, BFT 41, BFT 87, AC 92 e PD3 promoveram reduções significativas de 72,7%, 64,6%, 62,6%, 55,5% e 51,5%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de galhas e de massa de ovos por grama de raiz em mudas de tomateiro inoculadas com *Meloidogyne javanica* e cultivadas em solo infestado e incubado com actinobactérias.

Isolados	Número de galhas (NG)		Massa de ovos (MO)	
	NG/ g de raiz	Redução NG/g	MO/g de raiz	Redução MO/g raiz
Controle	11.7 b	-	9.9 b	-
AC 50	8.2 b	29.9	6.5 b	34.3
AC 92	4.5 c	61.5	4.4 c	55.5
AC 147	10.7 b	8.6	8.3 b	16.2
BFT 4	3.1 c	73.5	2.7 c	72.7
BFT 26	17.9 a	-	16.2 a	-
BFT 41	4.4 c	62.4	3.5 c	64.6
BFT 71	9.5 b	18.8	7.3 b	26.2
BFT 87	4.4 c	62.4	3.7 c	62.6
PD 3	5.4 c	53.8	4.8 c	51.5
CV (%)	24,8		26,2	

Dados seguidos de letras iguais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A infestação e incubação do solo com os isolados de actinobactérias promoveram o crescimento das mudas de tomateiro (Tabela 3). Houve incremento significativo de até 31,0% na altura das mudas desenvolvidas em solo com actinobactérias em relação ao controle sem actinobactérias, mas inoculado com nematoides. Verificou-se incremento de 35,4% no diâmetro caulinar das mudas produzidas no solo tratado com o isolado BFT 4, quando comparado ao controle.

Tabela 3. Altura das plantas, diâmetro do caule, massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) de mudas de tomateiro cultivadas em solo infestado com isolados de actinobactérias e inoculados com nematoide.

Isolado	Altura	Diâmetro	MSPA	MSR
	(cm)	(mm)	------(g) -----	
Controle	41,25 b	4,8 b	2,48 c	0,55 c
AC 50	45,33 b	5,6 a	4,23 a	1,54 a
AC 92	54,00 a	5,3 b	3,57 b	1,86 a
AC 147	47,33 b	4,8 b	1,35 d	1,09 b
BFT 4	49,33 b	6,5 a	4,23 a	2,27 a
BFT 26	33,16 c	4,2 c	0,96 d	0,61 c
BFT 41	48,16 b	6,2 a	3,76 a	1,70 a
BFT 71	44,66 b	5,6 a	2,97 b	1,31 a
BFT 87	44,16 b	5,9 a	3,39 b	1,58 a
PD 3	43,66 b	6,1 a	4,08 a	1,64 a
CV (%)	13,92	9,11	22,28	43,24

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados de actinobactérias AC 50, BFT 4, PD3, BFT 41, BFT71, AC 92 e BFT 87 proporcionaram aumento na produção de massa seca da parte aérea, destacando-se os isolados BFT 4 e AC 50 que promoveram incremento de 70,5%. Houve aumento na produção de massa seca das raízes do tomateiro, para quase todos os isolados avaliados, com valores

entre 10,9% a 312,7% em relação ao controle sem infestação com as actinobactérias e inoculados com os nematoides (Tabela 3).

Com relação à produção de enzimas, os isolados BFT 4, BFT 41, BFT 71, BFT 87, AC 147 e PD3 demonstraram nos testes *in vitro* a capacidade de produção das enzimas quitinase e lipase. O isolado AC 50 demonstrou a capacidade de produzir somente de lipase, enquanto que o isolado AC 92 produziu quitinase (Tabela 4).

Tabela 4. Produção de quitinase e lipase pelos isolados de actinobactérias.

	Quitinase	Lipase	Isolados	Quitinase	Lipase
AC 50	-	+	BFT 58	+	+
AC 92	+	-	BFT 65	+	-
AC 147	+	+	BFT 66	-	+
AR 5	-	+	BFT 69	+	+
AR 18	-	+	BFT 71	+	+
BFT C	+	+	BFT 76	+	+
BFT D	-	-	BFT 79	+	+
BFT K	+	+	BFT 80	+	+
BFT 4	+	+	BFT 83	-	+
BFT 7	-	+	BFT85	+	+
BFT11	-	+	BFT 87	+	+
BFT 18	-	+	BFT 88	+	+
BFT 19	+	+	BFT 100	-	+
BFT 25	+	+	BFT 102	+	+
BFT 26	+	+	BFT 104	+	+
BFT 32	+	+	BFT 106	+	+
BFT 36	+	+	BFT 112	+	+
BFT 40	+	+	BM 18	-	+
BFT 41	+	+	BM 22	-	+
BFT 48	+	+	BM 28	+	+
BFT 57	+	+	PD3	+	+

Os sinais indicam resposta positiva (+) ou negativa (-) em relação à produção das enzimas quitinase e lipase.

## Discussão

Os testes *in vitro* com os metabólitos de actinobactérias e os testes com solo tratado com estes microrganismos demonstram o potencial destes para o biocontrole de *M. javanica* no tomateiro, necessitando do processo de seleção.

De modo geral, a imobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* aumentaram com o aumento do período de exposição aos metabólitos de 24 para 48 horas, conforme observado por Naves et al., (2004), com melhores resultados após 72 horas.

Coimbra & Campos (2005), ao avaliar o efeito de exsudatos de actinobactérias na motilidade e mortalidade de juvenis de *M. javanica*, observaram que seis isolados entre os 37 testados, promoveram efeito nematicida, com mortalidade entre 19 e 100%. Sousa et al., (2009) avaliaram o efeito de actinobactérias no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame e verificaram que metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias promoveram até 100% de mortalidade dos nematoides. O efeito dos metabólitos secundários na mortalidade de nematoides varia de acordo com o isolado de actinobactéria. Diferenças

intrínsecas entre as espécies de actinobactérias e as características do meio de crescimento, (pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes), podem interferir na quantidade e na composição dos metabólitos produzidos por actinobactérias (Moura et al., 1996) e, conseqüentemente, no efeito de biocontrole destes metabólitos.

Os isolados codificados como AC 92, BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3 promoveram resultados semelhantes nos testes *in vitro* e na planta, com efeito nematicida (Tabelas 1 e 2). O solo foi incubado com as actinobactérias por um período de 40 dias antes do plantio. Nesse período, pode ocorrer a colonização e produção de metabólitos secundários no solo, que atuam na mortalidade dos juvenis, conseqüentemente, reduzindo a infectividade nas raízes de tomateiro. Sousa et al. (2006), ao estudar o efeito de actinobactérias no controle de nematóides, verificaram redução significativa no número de galhas e massa de ovos por grama de raiz em plantas de tomateiro inoculadas com *M. incognita*. Redução entre 50% e 85% no número de galhas e de 40% a 100%, na massa de ovos, foram obtidos por Krechel et al., (2002) ao testarem isolados do gênero *Streptomyces*, obtidos da rizosfera da batateira, no controle de *M. incognita*, em condições de casa de vegetação.

Outro possível mecanismo de biocontrole consiste no parasitismo pelas actinobactérias, por meio de enzimas como quitinases e lipases que atuam na destruição da cutícula dos nematoides (Park et al., 2002), e quando secretadas por bactérias promotoras de crescimento, podem reduzir a população de fitopatógenos presentes na região rizosférica (Compant et al., 2009). No solo, a decomposição da quitina libera substâncias tóxicas a fitonematóides como a amônia, uma vez que essa macromolécula possui teor elevado de nitrogênio. As lipases são importantes no controle de nematoides por causar a degradação das reservas energéticas e afetar os lipídios de membrana. Os J2 de *M. javanica* após eclosão possuem 30% do seu peso corporal em lipídios, como fonte de reserva energética, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo na planta (Rocha, 2007). No presente trabalho, vários isolados de actinobactérias demonstraram produzir as enzimas quitinase e lipase (Tabela 4). Miller & Sands (1977), testando os efeitos *in vitro* das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que após 24 horas ocorreram modificações estruturais na cutícula do nematoide, devido a uma provável degradação enzimática.

A infestação e incubação do solo por 40 dias com os isolados de actinobactérias também promoveram o aumento no crescimento do tomateiro. Este período está associado ao ciclo de vida das actinobactérias e ao período necessário para a produção de enzimas extracelulares e degradação de compostos presentes no substrato (Sousa et al., 2006). O efeito no crescimento das mudas pode ter ocorrido devido à produção de substâncias promotoras de crescimento e ação na mineralização da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes para as plantas ou ainda por promover tolerância a *M. javanica*. As bactérias promotoras de crescimento vegetal influenciam no crescimento das plantas por meio da indução de resistência a doenças, produção de substâncias como antibióticos, sideróforos, fitormônios e por meio da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos (Mariano et al., 2004; Freitas, 2007).

## Conclusão

Os isolados de actinobactérias codificados como AC 92, BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3 apresentam potencial para o controle de *Meloidogyne javanica* e o crescimento de mudas de tomateiro.

## Referências bibliográficas

- Alvarenga, M.A.R. (2004). Tomate. Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. Lavras, MG: Perfil, 400 p.
- Bonetti, J.I.S., Ferraz, S. (1981). Modificações no método Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, v.6, p.533.
- Carmello, Q.A.C., (1995). Nutrição e adubação de mudas hortícolas. In: MINAMI, K. Produção de mudas de alta qualidade. São Paulo: T.A. Queiroz, p.27-37.
- Charchar, J.M., Aragão, F.A.S. (2005). Variação anual da população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em cultivos de batata 'Bintje' no campo. Nematologia Brasileira, v.29, n.2, p.225-232.
- Coimbra, J.L., Campos, V.P., Souza, R.M. (2004). Efeito antagônico de actinobactérias isolados de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Nematologia Brasileira, v.28, n.2, p.231-234.
- Coimbra, J.L., Campos, V.P. (2005). Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinobactérias na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. Fitopatologia Brasileira, v.30, n.3, p.232-238.
- Compant, S., Clément, C., Sesstsch. (2009). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry, v.30, p.1-10.
- Dong, L.Q., Zhang, K.Q. (2006). Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil, v.288, p.31-45.
- Freitas, S.S. (2007). Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P.D.; Freitas, S.S. (Eds.). Microbiota do solo e Qualidade ambiental, Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p.1-20.
- Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A., Goodfellow, M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology, v.32, p.24-32.
- Hussey, R. S., Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inoculate of *Meloidogyne* spp. including new technique. Plant Disease Reporter, v.57, p.1025-1028.
- Jonathan, E.L., Barker, K.R., Abdelalim, F.F., Vrain, T.C., DICKSON, D.W. (2000). Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. Nematropica, v.30, n.2, p. 231-240.
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., Berg, G. (2002). Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Canadian Journal of Microbiology, v.48, p.772-786.
- Mariano, R.L.R., Silveira, E.B., Assis, S.M.P., Gomes, A.M.A., Nascimento, A.R.P., Donaro, V.M.T.S. (2004). Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma, v.1, p.89-111.

- Miller, P.M., Sands, D.C. (1977). Effect of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, v.9, n.3, p.192-197.
- Minami, K. (1995). Produção de mudas de alta qualidade em horticultura. São Paulo: T.A. Queiroz, 135p.
- Moura, A. B. (1996). Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. 1996, 64 f., Tese de (Doutorado em Fitopatologia), Viçosa. Universidade Federal de Viçosa.
- Montezano, E.M., Peil, R.M.N. (2006). Sistemas de consórcio na produção de hortaliças. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.12, n.2, p.129-132.
- Naves, R.L., Campos, V.P., Souza, R.M. (2004). Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.4, p.384-387.
- Padilha, G. (1998). Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.). *Ecologia Microbiana*, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.327-343.
- Park, J.O., EL-Tarabily, K.A., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparan, K. (2002). Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v.35, p.361-365.
- Poter, J.N., Wilhelm, J.J., Tresner, H.D. (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Applied Microbiology*, v.8, p.174-178.
- Renwick, A.; Campbell, R.; Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, v.40, p.524-532.
- Rocha, S.F. (2007). Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp. 2007, 148f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, MG.
- Sierra, S.A. (1957). Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.23, n.1, p.15-22.
- Silva Júnior, A.A., Macedo, S.G., Sluker, H. (1995). Utilização de esterco de peru na produção de mudas de tomateiro. Florianópolis: EPAGRI, 28p. (Boletim Técnico, 73).
- Soares, A.C.F., Sousa, C.S., Garrido, M.S., Perez, J.O. (2007). Production of streptomycete inoculum in sterilized rice. *Scientia Agricola*, v.64, n.6, p.241-244.
- Sousa, C.S., Soares, A.C.F., Garrido, M. da S., Almeida, G. M. (2006). Actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.12, p.1759-1766.
- Sousa, C.S., Soares, A.C.F.; Garrido, M. S.; Lima, F.S. (2009). Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. *Revista Ciência. Agronômica*, v.40, n.4, p.486-491.
- Yan X., Lin M., Liu L. (2004). Screening of antagonistic streptomycetes from soils against *Meloidogyne incognita*. *Chinese Journal of Biological Control*, v.20, p.202-205.



## **Estratégias de rega deficitária na vinha em regiões de clima Mediterrânico**

**A. Castro Ribeiro<sup>1</sup>; J. Verdial Andrade<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. antrib@ipb.pt*

<sup>2</sup>*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. verdial@ipb.pt*

### **Resumo**

Nas regiões de clima mediterrânico, em que a cultura da vinha tem uma grande expressão em termos de área cultivada e importância económica, as secas sazonais que ocorrem durante parte do ciclo vegetativo da videira são frequentes e exercem um enorme constrangimento quer na produção quer na qualidade. Com o objectivo de contrariar as quebras de produção e da qualidade da uva, resultantes do decréscimo do teor de água disponível no solo, do aumento das temperaturas e do défice de pressão de vapor de água da atmosfera, que se acentuam ao longo do período estival, têm-se vindo a introduzir, na generalidade das regiões vitícolas mediterrânicas, a prática da rega na vinha.

A videira responde muito marcadamente aos diferentes regimes hídricos em todas as etapas do seu ciclo vegetativo. Uma rega excessiva pode conduzir a um aumento do vigor e da densidade foliar com consequências ao nível das características da uva diminuindo o seu teor em açúcares, intensidade da cor e compostos fenólicos e aumentando a acidez. No entanto, a aplicação de regas moderadas pode conduzir a um aumento da produção mantendo a qualidade ou mesmo incrementando-a. Este compromisso entre a necessidade de assegurar o rendimento dos viticultores e manter ou melhorar a qualidade da produção, num contexto de escassez de água e da necessidade de a gerir de uma forma mais eficiente, tem levado à implementação de diferentes estratégias de rega deficitária na cultura da vinha.

Neste trabalho descrevem-se as diferentes estratégias de rega deficitária que têm vindo a ser implementadas na cultura da vinha e apresentam-se os resultados de um caso de estudo sobre influência da aplicação de rega deficitária no comportamento fisiológico e agronómico da variedade Tinta Roriz, levado a cabo na Região Demarcada do Douro durante os anos de 2006 a 2008.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., rega deficitária, eficiência do uso da água.

## Introdução

Em zonas de clima mediterrânico onde as videiras são plantadas sem rega, verificam-se com frequência no Verão situações de elevado stresse hídrico para a planta. Estas surgem como consequência das baixas reservas hídricas do solo, devido às baixas precipitações estivais, e elevados gradientes de pressão de vapor de água entre as folhas e o ar. A aplicação de diferentes regimes de rega pode alterar substancialmente a fisiologia da videira afectando, desta forma, a produção e a composição da uva.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas algumas técnicas de rega deficitária na vinha que visam o compromisso entre o equilíbrio do crescimento vegetativo e reprodutivo e o aumento da eficiência do uso da água. Duas técnicas têm sido particularmente estudadas: a rega deficitária controlada (RDI- *Regulated Deficit Irrigation*) e a rega parcial da zona radicular (PRI – *Partial Rootzone Irrigation*) (McCarthy *et al.*, 2002).

A rega deficitária controlada, que consiste em aplicar quantidades de água inferiores ao consumo (evapotranspiração) por parte da vinha, ao longo de todo o ciclo vegetativo da videira ou apenas em determinados períodos, tem sido sugerida como uma estratégia para alcançar um equilíbrio entre a produção e a qualidade (Dry *et al.*, 2001). A rega deficitária, ao controlar vigor da videira, modifica o microclima ao nível dos cachos influenciando alguns parâmetros qualitativos dos bagos. Em estudos comparativos entre modalidades de rega deficitária e modalidades regadas de forma a favorecer uma elevada condição hídrica, nas videiras submetidas a rega deficitária verificou-se um aumento do teor de açúcares totais (Lopes *et al.*, 2001; Schultz, 1996), da concentração de antocianinas (Hamman & Dami, 2000; Dry *et al.*, 2001), dos compostos fenólicos (Matthews & Anderson, 1988; Dry *et al.*, 2001; Peterlunger *et al.*, 2005) e na razão película/polpa dos bagos (Roby & Matthews, 2004).

A rega parcial do sistema radicular (PRI) é uma técnica que consiste no humedecimento do solo, onde se localiza aproximadamente metade do sistema radicular da videira, mantendo em sequeiro a outra metade não regada. As zonas regadas e não regadas alternam num período variável e que em geral é de 10 a 15 dias (Chaves *et al.*, 2007). Teoricamente, as raízes da parte regada mantêm a videira num estado hídrico favorável enquanto as raízes da parte não regada e em stresse hídrico enviam sinais químicos para as folhas através do xilema reduzindo a condutância estomática e/ou o crescimento e aumentando a eficiência do uso da água (Souza *et al.*, 2003; Antolin *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2007). Os resultados desta técnica têm sido contraditórios e, nas regiões de clima mediterrânico, os estudos realizados mostram que o tipo de solo é determinante na sua eficácia. Em solos arenosos e pouco profundos, onde é mais fácil implementar os ciclos de alternância entre solo seco e húmido, a técnica resulta mais eficazmente (Souza *et al.*, 2003). Por outro lado, em estudos efectuados em vinhas implantadas em solos mais profundos e de textura pesada, a técnica de PRI não revelou diferenças significativas nos parâmetros fisiológicos, do crescimento, produção e qualidade do vinho, quando comparada com a rega deficitária em que se aplicou a mesma quantidade de água (Marsal *et al.*, 2008; Intrigliolo & Castel, 2009).

Apresenta-se um caso de estudo cujo principal objectivo foi o de avaliar o comportamento fisiológico e agronómico da variedade Tinta Roriz de *Vitis vinífera* L., em condições de clima Mediterrânico, quando sujeita a dotações de rega deficitárias, aplicadas pelo método de rega gota-a-gota.

### **Caso de estudo sobre a influência da aplicação de rega deficitária no comportamento fisiológico e agronómico da variedade Tinta Roriz (*Vitis vinífera* L.) na Região do Douro**

Os ensaios experimentais de campo foram realizados na Quinta de Vila Maior (Latitude 41°11'40" W, longitude 7°6'32" N, altitude de 116m), situada no concelho de Torre de Moncorvo, na sub-região Douro Superior da Região Demarcada do Douro. Os trabalhos experimentais foram realizados nos anos de 2006 a 2008. A parcela onde foram realizados os ensaios localiza-se numa zona de declive moderado, estando os bardos conduzidos segundo as linhas de maior declive, com orientação NW-SW.

Os estudos foram realizados com a variedade Tinta Roriz (*Vitis vinífera* L.) enxertada no porta-enxerto 1103 P. A plantação foi efectuada no ano 2000, com um compasso de 2,2 x 1,1 m (4132 videiras ha<sup>-1</sup>). A condução é feita em cordão Royat unilateral com 4 talões e dois gomos por talão correspondendo a uma carga de 8 gomos por videira (33 056 gomos ha<sup>-1</sup>).

O solo é um fluvisso solo eutrófico de aluvião. É um solo derivado de depósitos aluvionares recentes, localizados em superfícies de deposição de sedimentos. Apresenta uma textura franco-argilosa e sem elementos grosseiros, de reacção ácida e baixo teor de matéria orgânica.

O dispositivo experimental consistiu no estabelecimento de três modalidades de rega em blocos casualizados com quatro repetições com 6 videiras cada. Na parcela experimental foi instalado um sistema de rega gota-a-gota com uma rampa por bardo e com os gotejadores espaçados de 1 metro e com um caudal médio de 2,35 L h<sup>-1</sup>.

No local foi instalada uma estação meteorológica automática (Delta-T Devices, Cambridge, England) para medição das principais variáveis meteorológicas (temperatura do ar, humidade relativa, velocidade e direcção do vento, radiação solar global e precipitação) com o objectivo de determinar a evapotranspiração de referência e posterior cálculo das dotações de rega.

Foram estabelecidas as seguintes modalidades de rega: 0R - sem rega; 2R – dotação de rega correspondente a 20% da evapotranspiração de referência e 4R - dotação de rega correspondente a 40% da evapotranspiração de referência . As regas foram realizadas duas vezes por semana e as dotações de rega calculadas com base na evapotranspiração de referência diária, determinada pela Equação FAO-Penman-Monteith (Allen *et al.*, 1998), acumulada desde a rega anterior. O início da rega, em cada ano, foi determinado pelo valor do potencial hídrico de base. A rega iniciou-se após a paragem do crescimento, quando o valor do

potencial hídrico foliar de base atingiu os -0,3 -0,4 MPa, e foi continuamente realizada até à vindima. As dotações de rega foram calculadas de acordo com as expressões:

$$2R = 0,2 \times ET_0 - Pu$$

$$4R = 0,4 \times ET_0 - Pu$$

em que  $ET_0$  representa a evapotranspiração de referência e  $Pu$  a precipitação útil.

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_f$ ) foi determinado nos três anos de ensaio, ao longo do período estival, nas três modalidades em estudo. As medições do potencial hídrico foliar foram realizadas com uma câmara de pressão (Modelo 1000, PMS Instrument Company, Albany, USA). As medições foram efectuadas imediatamente antes do nascer do sol (potencial de base) e ao meio dia solar (potencial do meio-dia). As folhas (sãs, adultas e bem expostas) foram colhidas em cada um dos blocos de cada modalidade e rapidamente colocadas na câmara para medição minimizando desta forma qualquer possibilidade de desidratação.

As medições das trocas gasosas para o  $CO_2$  e vapor de água foram efectuadas com um analisador de gás por radiação infravermelha (IRGA) funcionando em modo diferencial e em circuito aberto (modelo LCA-4, da Analytical Development Co.Ltd.). As medições das trocas gasosas foram efectuadas em dois períodos diários (10 horas e 14 horas) em 8 folhas expostas (duas por bloco) e em condições de luz saturantes para a fotossíntese (PPFD superior a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Cada leitura era registada logo que a pressão parcial do  $CO_2$  no interior da câmara estabilizasse, o que normalmente acontecia ao fim de 1 minuto, de forma a minimizar o chamado "efeito estufa" dentro da câmara foliar (Moutinho - Pereira, 2000). A partir destas medições, designadamente o  $CO_2$  do ar atmosférico,  $CO_2$  do ar afectado pela folha, humidade relativa do ar à entrada e saída da câmara, temperatura do ar dentro da câmara, intensidade da radiação fotossinteticamente activa (PPFD) e caudais molares, de acordo com as fórmulas de Von Caemmerer e Farquhar (1981), foram calculados os seguintes parâmetros: taxa fotossintética líquida (A), taxa de transpiração (E) e eficiência do uso de água (A/E).

Na vindima foi efectuada a colheita dos bagos (cem por repetição), nos diferentes tratamentos. Os bagos foram colhidos para sacos de plástico que eram colocados numa caixa frigorífica e transportados para o laboratório onde se realizaram as seguintes determinações por espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento equipamento WineScan FT 120 FOSS: acidez total ( $\text{g L}^{-1}$  de ácido tartárico), pH, sólidos solúveis totais ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), intensidade corante e polifenóis totais.

A produção foi avaliada através da contagem e pesagem, em cada modalidade, dos cachos de cada videira. Após a queda total das folhas (Novembro) foi pesada a lenha da poda de cada videira utilizando para o efeito uma balança digital portátil.

A análise estatística dos dados foi efectuada no programa JMP®6 2005 (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA). Efectuaram-se análises de variância para cada uma das variáveis dependentes estudadas, tendo com origem de variação os três regimes de disponibilidade hídrica. Sempre que o resultado da análise de variância foi significativo ( $P < 0,05$ ), procedeu-se

à comparação múltipla de médias usando para o efeito o teste de Tukey HSD e o nível de significância de 5%.

### Condições climáticas durante o período dos ensaios experimentais

As condições climáticas durante os três anos de estudo caracterizaram-se pela elevada secura estival acompanhada de temperaturas elevadas associadas por sua vez a elevados défices de pressão de vapor de água. Apesar da relativa homogeneidade das condições durante o período estival, nos três anos de estudo, as diferenças relativamente ao período primaveril foram muito distintas (Fig. 1). Em 2006 os meses de Abril a Junho foram extremamente secos acentuando-se a diminuição das reservas de água no solo ao longo do ciclo vegetativo até à vindima. O ano de 2007 apresentou um período primaveril com uma elevada precipitação. Nos meses de Abril a Junho a precipitação acumulada foi de 225 mm. Em 2006 e 2008 no mesmo período a precipitação acumulada foi de apenas 58 e 125 mm, respectivamente. Em relação à precipitação anual, os anos de 2006 e 2008 foram os mais secos com 403 e 418 mm, respectivamente. Em 2007 a precipitação anual de 519 mm aproximou-se do valor médio anual para o local que é de 566 mm.

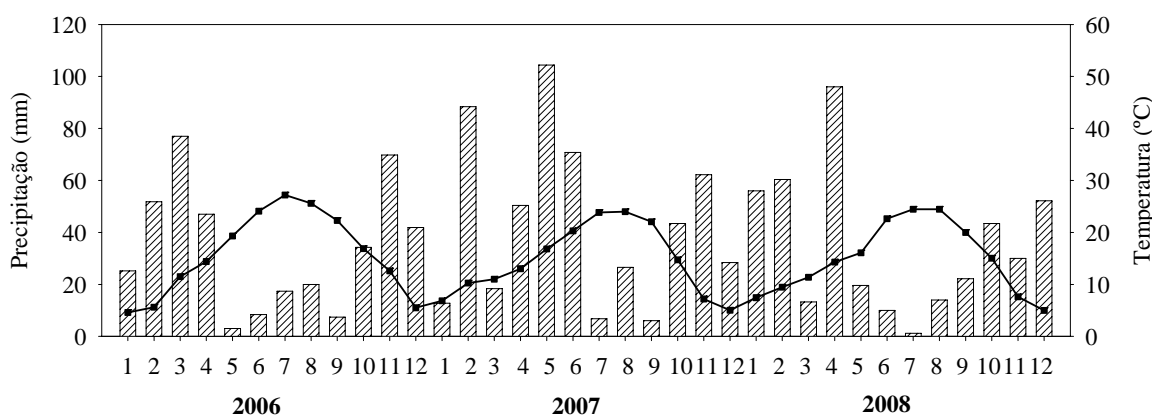


Figura. 1 Temperatura média mensal e precipitação mensal acumulada durante os anos em que decorreram os ensaios experimentais.

No Quadro 1 estão indicadas as datas de início das regas, em cada ano, e a data da última rega que coincidiu com a semana em que se iniciou a vindima. A quantidade de água aplicada por videira em cada modalidade variou entre 44,6 L videira<sup>-1</sup> em 2007 e 37,5 L videira<sup>-1</sup> em 2006, para a modalidade 2R. Estes valores duplicaram para a modalidade 4R. Nos três anos de estudo a rega iniciou-se sempre após o pintor coincidindo assim o período de rega com o período de maturação.

Quadro 1. Datas da primeira e última rega e quantidade total de água de rega aplicada em cada modalidade

Ano	Datas		Água aplicada (L videira <sup>-1</sup> )		
	Primeira rega	Última rega	0R	2R	4R
2006	07/Jul	05/Set	0	37,5	75,0
2007	19/Jul	04/Set	0	24,6	49,2
2008	14/Jul	08/Set	0	31,7	63,4

### Potencial hídrico foliar

O potencial hídrico foliar de base ( $\Psi_{fd}$ ) e do meio-dia solar ( $\Psi_{fmd}$ ) (medidos antes de nascer o sol e ao meio-dia solar, respectivamente) foi determinado ao longo de todo o período estival e em todas as modalidades como sinais, por um lado, da variação das disponibilidades hídricas do solo na rizosfera e da capacidade das videiras para restabelecerem o seu estado hídrico durante a noite e, por outro lado, da capacidade das videiras para impedirem o decréscimo acentuado do estado energético da água das folhas durante os períodos de maior défice de pressão de vapor de água no ar, respectivamente (Moutinho-Pereira, 2000).

As Figuras 2 e 3 representam, para os três anos de estudo, a evolução dos  $\Psi_{fd}$  e  $\Psi_{fmd}$  durante o período estival até à vindima. As videiras regadas mantiveram um  $\Psi_{fd}$  sistematicamente mais elevado do que as videiras não regadas. Entre as modalidades regadas, a modalidade 4R apresentou valores de  $\Psi_{fd}$  superiores aos da modalidade 2R ao longo de todo o ciclo vegetativo. O  $\Psi_{fd}$  das videiras não regadas atingiu valores inferiores a -1,0 MPa que se mantiveram durante a parte final do ciclo vegetativo. Nos anos de 2007 e 2008 o  $\Psi_{fd}$  das videiras regadas com a dotação 4R, ao longo da maturação, variou entre -0,4 e -0,5 MPa apresentado os valores mais baixos no final do ciclo vegetativo. Em 2006, devido às condições de fraca precipitação durante os meses de primavera-verão, os valores do  $\Psi_{fd}$  foram ligeiramente inferiores a partir de meados de Agosto mantendo-se entre os -0,6 e -0,8 MPa. Com excepção das videiras regadas com 4R que apresentaram um défice hídrico moderado (~ -0,4 MPa), as restantes apresentaram, no curso da maturação, um défice hídrico acentuado, em particular as videiras não regadas. Os valores mais baixos (~ -1,1 MPa) são indicativos de um stress hídrico relativamente severo de acordo com Deloire *et al.*, (2004).

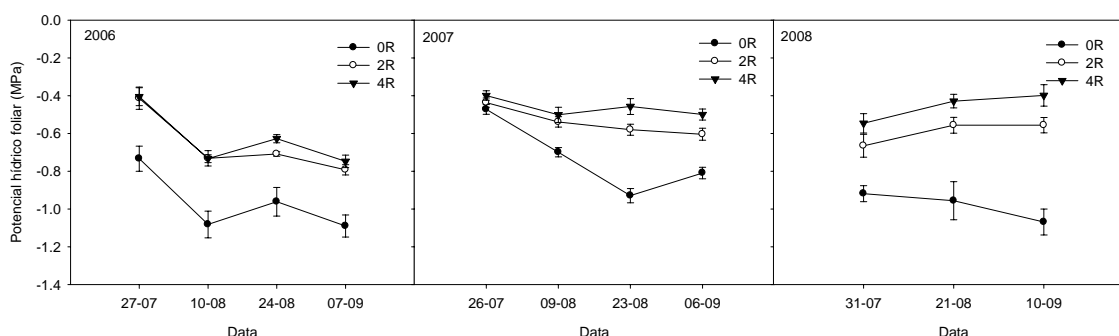


Fig. 2. Evolução do potencial hídrico de base nos três tratamentos de rega em 2006, 2007 e 2008. Cada ponto representa a média de 8 valores com erro padrão. As barras não visíveis indicam valores de erro padrão inferiores à dimensão do símbolo.

O potencial hídrico do meio-dia (mínimo) mostra uma tendência decrescente ao longo do período estival em todas as modalidades. Os valores reflectem as condições de secura extrema que se verificam durante o período estival na Região do Douro. As videiras regadas apresentaram valores de potencial hídrico consistentemente mais elevados do que as videiras não regadas durante todo o período estival. Contudo, constata-se que mesmo os valores de potencial hídrico das videiras com rega deficitária atingiram valores muito baixos e indicativos de um stresse hídrico acentuado.

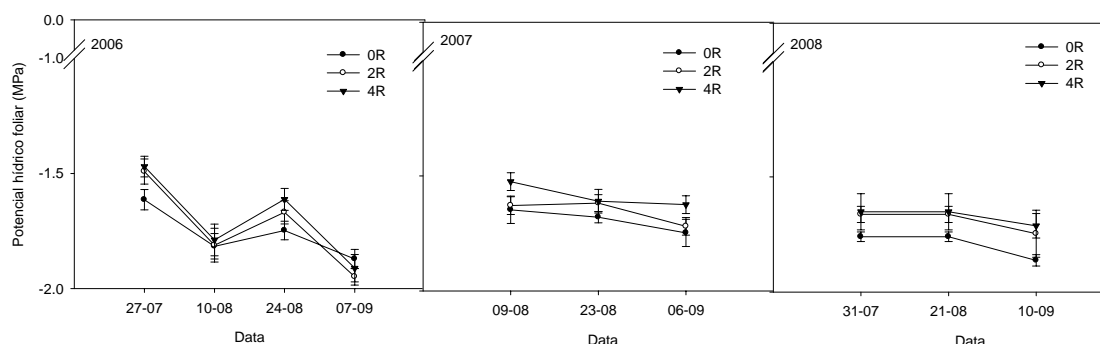


Fig. 3. Evolução do potencial hídrico do meio-dia nos três tratamentos de rega em 2006, 2007 e 2008. Cada ponto representa a média de 8 valores com erro padrão. As barras não visíveis indicam valores de erro padrão inferiores à dimensão do símbolo.

### Desempenho fotossintético e eficiência do uso da água

A maior disponibilidade hídrica das videiras regadas traduziu-se numa maior taxa de transpiração (E) durante o período de maturação (Quadro 2). As diferenças significativas na taxa de transpiração observadas entre as três modalidades reflectem a resposta das plantas, através do aumento da condutância estomática, em condições de maior disponibilidade hídrica.

A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) foi igualmente superior nas modalidades regadas, em particular nas videiras regadas com 4R (Quadro 3). Contudo, a eficiência do uso da água, traduzida pela razão entre a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) e a taxa de transpiração (E) não revelou diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 4) apesar de se ter verificado maiores valores na modalidade 4R. Resultados idênticos já tinham sido observados por Malheiro (2005) em estudos efectuados na Região do Douro na casta Tinta Roriz regada com dotações de rega correspondentes a 0,6 x ET<sub>0</sub>.

Quadro 2. Efeito da rega na taxa de transpiração (E) medida no período da maturação em dias típicos de verão. As letras em cada coluna correspondente a uma data, quando diferentes, separam as médias (n=8) pelo teste de Tukey HSD (ns - não significativa; \* - 0,01 < P < 0,05; \*\* - 0,001 < P < 0,01; \*\*\* - P < 0,001).

Ano	Rega	E (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )			
		27 Jul	10 Ago	24 Ago	7 Set
2006	0R	2,79 <sup>a</sup>	2,39 <sup>a</sup>	2,32 <sup>a</sup>	2,26 <sup>a</sup>
	2R	3,90 <sup>b</sup>	3,84 <sup>b</sup>	2,94 <sup>b</sup>	3,28 <sup>b</sup>
	4R	4,23 <sup>b</sup>	3,80 <sup>b</sup>	2,51 <sup>b</sup>	3,50 <sup>b</sup>
	Sig.	*	***	*	***
2007			9 Ago	23 Ago	6 Set
	0R		1,83 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>
	2R		2,80 <sup>b</sup>	2,28 <sup>b</sup>	2,46 <sup>b</sup>
	4R		4,62 <sup>c</sup>	4,30 <sup>c</sup>	4,32 <sup>c</sup>
Sig.		***	***	***	
2008				21 Ago	10 Set
	0R			1,47 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>
	2R			4,46 <sup>b</sup>	4,16 <sup>b</sup>
	4R			7,62 <sup>c</sup>	5,57 <sup>b</sup>
Sig.			***	***	

Quadro 3. Efeito da rega na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) medida no período da maturação em dias típicos de verão. As letras em cada coluna correspondente a uma data, quando diferentes, separam as médias (n=8) pelo teste de Tukey HSD (ns - não significativa; \* - 0,01 < P < 0,05; \*\* - 0,001 < P < 0,01; \*\*\* - P < 0,001).

Ano	Rega	A (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )			
		27 Jul	10 Ago	24 Ago	7 Set
2006	0R	8,99	7,33	4,61	1,15 <sup>a</sup>
	2R	11,92	9,13	4,93	4,91 <sup>b</sup>
	4R	13,74	9,23	4,16	4,81 <sup>b</sup>
	Sig.	ns	ns	ns	*
2007			9 Ago	23 Ago	6 Set
	0R		4,15 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup>
	2R		6,31 <sup>b</sup>	5,51 <sup>b</sup>	4,80 <sup>b</sup>
	4R		11,32 <sup>c</sup>	9,68 <sup>c</sup>	8,19 <sup>c</sup>
Sig.		***	***	***	
2008				21 Ago	10 Set
	0R			0,52 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>
	2R			1,48 <sup>b</sup>	1,80 <sup>b</sup>
	4R			2,38 <sup>b</sup>	2,35 <sup>b</sup>
Sig.			**	***	

As relações entre o estado hídrico das videiras (antes do nascer do sol e ao meio dia solar), a taxa de transpiração (E) e a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> estão representadas nas Figuras 4 a 7. O potencial hídrico de base correlaciona-se de uma forma mais estreita com os parâmetros fisiológicos. A menor correlação observada entre o potencial hídrico foliar do meio-dia solar e os parâmetros fisiológicos são uma indicação da influência menor influência do potencial hídrico foliar do meio-dia na redução na fotossíntese e transpiração e a possível

influência de outros factores, como a temperatura do ar e défice de pressão de vapor, através de respostas estomáticas e não estomáticas, na redução na fotossíntese (Baeza *et al.*, 2007).

Quadro 4. Efeito da rega na eficiência do uso da água (WUE) medida no período da maturação em dias típicos de verão. As letras em cada coluna correspondente a uma data, quando diferentes, separam as médias (n=8) pelo teste de Tukey HSD (ns - não significativa; \* -  $0,01 < P < 0,05$ ; \*\* -  $0,001 < P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ ).

Ano	Rega	WUE ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )			
		27 Jul	10 Ago	24 Ago	7 Set
2006	0R	3,22	3,05	1,71	0,37 <sup>a</sup>
	2R	3,04	2,24	1,66	1,33 <sup>b</sup>
	4R	3,27	2,20	1,56	1,27 <sup>a</sup>
	Sig.	ns	ns	ns	*
2007			9 Ago	23 Ago	6 Set
	0R		1,82	1,98	1,98
	2R		2,23	2,36	1,87
	4R		2,61	2,59	2,00
	Sig.		ns	ns	ns
2008				21 Ago	10 Set
	0R			2,67	1,45 <sup>a</sup>
	2R			3,00	2,46 <sup>b</sup>
	4R			3,57	2,16 <sup>a</sup>
	Sig.			ns	*

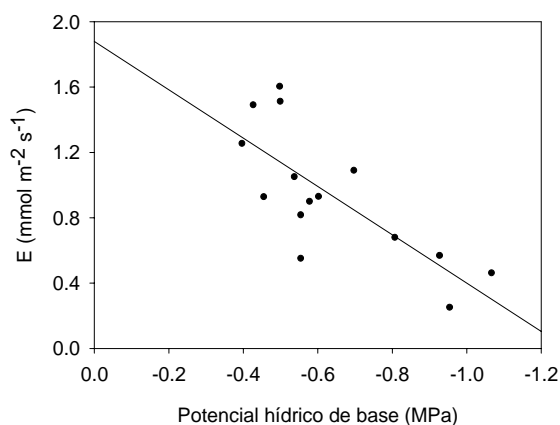


Fig.4. Relação entre a taxa de transpiração (E) e o potencial hídrico foliar de base.  
 $y = 1,44 + 1,88x$ ;  $r^2 = 0,58$  ( $P=0,001$ )

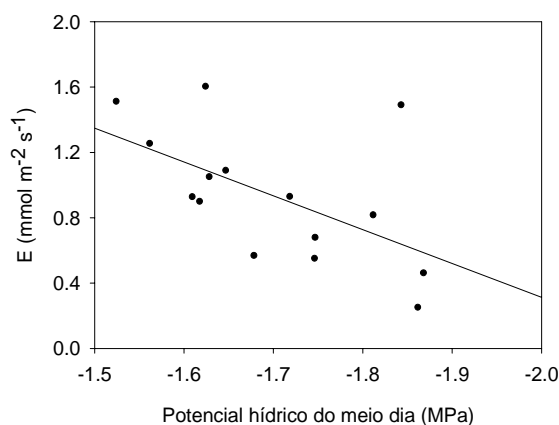


Fig.5. Relação entre a taxa de transpiração (E) e o potencial hídrico foliar do meio-dia.  
 $y = 2,07 + 4,45x$ ;  $r^2 = 0,32$  ( $P=0,027$ )

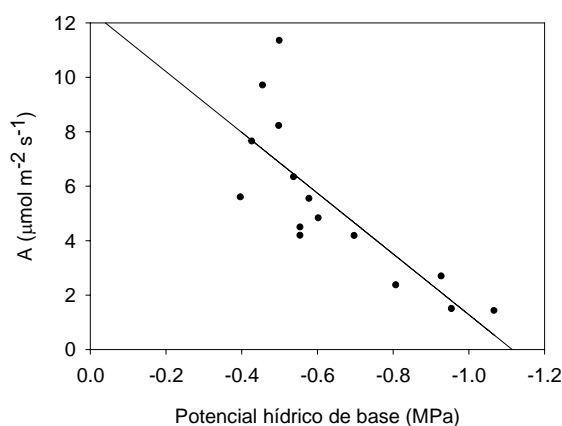


Fig.6. Relação entre a absorção líquida de CO<sub>2</sub> (A) e o potencial hídrico foliar de base.  
 $y = 11,16 + 12,44x$ ;  $r^2 = 0,63$  ( $P=0,0004$ )

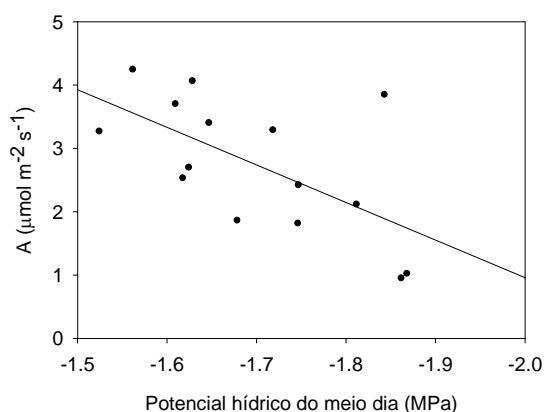


Fig.7. Relação entre a absorção líquida de CO<sub>2</sub> (A) e o potencial hídrico foliar do meio dia.  
 $y = 5,93 + 12,82x$ ;  $r^2 = 0,38$  ( $P=0,013$ )

### Produção e composição do mosto

No presente estudo, o efeito significativo da rega na produção e no crescimento só se verificou no ano de 2008 (Quadro 5). A maior disponibilidade de água traduziu-se num acréscimo da produção, pelo aumento do volume dos bagos, e do crescimento vegetativo, expresso pelo aumento do peso da lenha de poda. Ainda no ano de 2008, a razão produção/peso da lenha de poda foi significativamente superior na modalidade 4R indicando que a maior disponibilidade de água traduziu-se num maior acréscimo da produção em detrimento do crescimento vegetativo.

Quadro 5 Efeito da rega na produção/videira, nº de cachos videira, peso/cacho, lenha de poda e índice de Ravaz (produção/lenha de poda) em *Vitis vinífera* L., cv Tinta Roriz, nos anos de 2006 a 2008 (valores médios de 24 repetições). As letras em cada coluna correspondente a uma data, quando diferentes, separam as médias pelo teste de Tukey HSD (ns - não significativa; \* - 0,01 < P < 0,05; \*\* - 0,001 < P < 0,01; \*\*\* - P < 0,001).

Ano	Modalidade	Produção (kg/cepa)	Cachos		Lenha de poda (kg/cepa)	I. Ravaz
			nº/cepa	Peso (g)		
2006	0R	2,7	14,5	183,3	0,58	5,3
	2R	2,7	15,8	169,7	0,55	5,2
	4R	3,0	15,0	193,8	0,53	6,2
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns
2007	0R	2,1	12,0	166,2	0,71	4,7
	2R	2,1	11,7	179,6	0,72	3,6
	4R	2,1	12,4	175,4	0,81	3,6
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns
2008	0R	1,9 <sup>a</sup>	13,3	139,1 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>
	2R	2,7 <sup>a</sup>	12,4	207,0 <sup>b</sup>	0,64 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>
	4R	4,3 <sup>b</sup>	15,2	271,0 <sup>c</sup>	0,66 <sup>b</sup>	6,8 <sup>b</sup>
	Sig.	***	ns	***	*	*

O efeito da rega na qualidade dos mostos à vindima tem gerado muita controvérsia dada a grande variabilidade dos resultados obtidos nos estudos efectuados nas últimas décadas. Assim, os efeitos da rega têm-se mostrado positivos (Ferreyra *et al.*, 2003; Escalona *et al.*, 2003) ou negativos (Bravdo *et al.*, 1985; Hepner *et al.*, 1985; Matthews *et al.*, 1990; Williams, 1996) dependendo das dotações de rega aplicadas, do período de realização da rega, das castas, das condições ambientais e de outras práticas culturais. Enquanto nalguns ensaios de rega se obtiveram aumentos na concentração dos açúcares e antocianas (Garcia-Escudero *et al.*, 1994; Bartolomé *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 1999), noutros verificaram-se decréscimos nestes mesmos parâmetros qualitativos do bago (Van Leeuwen & Seguin, 1994; Pire & Ojeda, 1999). Para esta discrepância pode ter contribuído o efeito da rega no tamanho do bago. Um stresse hídrico acentuado após o vingamento afecta negativamente a divisão celular do bago reduzindo o seu tamanho final o que aumenta a concentração de antocianas como consequência do aumento da razão película/polpa (Coombe & MacCarthy, 2000; McCarthy *et al.*, 2002).

Neste estudo a composição do mosto não foi significativamente afectada pela maior disponibilidade de água (Quadro 6). Apesar de uma tendência para um aumento do teor de sólidos solúveis e da acidez total nas modalidades regadas esse aumento não é estatisticamente significativo. Em relação ao pH, a tendência para a diminuição do seu valor nas modalidades regadas também não se revelou estatisticamente significativa.

Quadro 6 Efeito da rega na acumulação de açúcares (°Brix), acidez total (g ac. tartárico), pH, intensidade corante e polifenóis totais em *Vitis vinifera* L., cv Tinta Roriz, nos anos de 2006 a 2008. As letras em cada coluna correspondente a uma data, quando diferentes, separam as médias pelo teste de Tukey HSD (ns - não significativa; \* - 0,01 < P < 0,05; \*\* - 0,001 < P < 0,01; \*\*\* - P < 0,001).

Ano	Modalidade	°Brix	Acidez total (g ac. tartárico)	pH	Intensidade corante	Polifenóis totais
2006	0R	21,08	2,43	3,76	1,97 <sup>a</sup>	62,87
	2R	20,87	2,19	3,67	3,43 <sup>a</sup>	56,27
	4R	21,91	2,22	3,75	4,53 <sup>b</sup>	61,22
	Sig.	ns	ns	ns	*	ns
2007	0R	20,57	3,21	3,98	5,33	76,53
	2R	21,10	3,68	3,84	3,43	63,07
	4R	21,53	4,05	3,79	3,33	65,23
	Sig.	ns	ns	ns	ns	ns
2008	0R	21,55	3,18	3,72	4,57	55,97 <sup>a</sup>
	2R	21,87	2,86	3,60	4,17	44,17 <sup>b</sup>
	4R	21,75	3,40	3,69	4,07	43,50 <sup>b</sup>
	Sig.	ns	ns	ns	ns	*

A tendência para a diminuição da intensidade corante e diminuição do teor de polifenóis totais nas modalidades regadas não foi igualmente significativa com excepção do teor de polifenóis totais na modalidade regada com 4R, em 2009. Resultados idênticos foram obtidos por Centeno *et al.* (2005) para a variedade Tempranillo e com tratamentos de rega idênticos.

## Conclusões

Os resultados deste estudo mostram que a aplicação de regas moderadas teve um efeito significativo no aumento do potencial hídrico foliar. As videiras regadas apresentaram uma taxa de transpiração (E) e uma taxa de absorção de CO<sub>2</sub> (A) superiores às não regadas ao longo do período de maturação. Em relação à eficiência do uso da água, expressa como a razão entre A e E, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as videiras regadas e não regadas.

As modalidades regadas apresentaram um aumento significativo do peso dos bagos e do vigor (apenas em 2008) relativamente à modalidade não regada. Este acréscimo de produção não foi acompanhado por nenhuma alteração significativa na qualidade do bago. A maior acidez total e menor valor de pH observados nas modalidades regadas não foi estatisticamente significativa. A intensidade da cor e os polifenóis totais, embora tendencialmente inferiores nas videiras regadas relativamente às não regadas, a diferença não se revelou estatisticamente significativa.

As regas deficitárias aplicadas nas condições de meteorológicas prevaletentes nos anos em estudo, revelaram-se ser excessivamente deficitárias não conduzindo, por isso, a modificações significativas nos parâmetros agrónomicos, com excepção do ano de 2008 em que se verificou um acréscimo da produção e do vigor e diminuição significativa do teor de polifenóis. Considerando que as condições climáticas verificadas durante os ensaios se aproximam das condições médias do local onde decorreu o estudo, a aplicação de dotações de rega deficitárias ligeiramente superiores à máxima dotação aplicada neste estudo (4R), será avaliada futuramente com o objectivo de avaliar o comportamento desta casta em condições de maior conforto hídrico.

## Referências bibliográficas

- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M (1998) Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper 56, Rome.
- Antolín M. C., Ayari M., Sanchez-Diaz M, 2006. Effects of rootzone drying on yield, ripening and berry ABA in potted Tempranillo grapevines with split roots. Australian Journal of Grape and Wine Research, 12: 13-20.
- Baeza, P., Sánchez-de-Miguel, P., Centeno A., Junquera P., Linares R., Lissarrague J.R., 2007. Water relations between leaf water potential, photosynthesis and agronomic vine response as a tool for establishing thresholds in irrigation scheduling. Sci. Hortic. 114:151–158.
- Bartolomé M.C., Sotés V., Ruiz C., Baeza P., Lissarrague J.R., 1995. Efectos del deficit hidrico sobre el desarrollo vegetativo y fructifero del cultivar 'Tempranillo' de vid (*Vitis vinifera* L.). Investigacion Agrícola: Produccion Vegetal, 10: 245-261.

- Bravdo B., Hepner Y., Loinger C., Cohen S., Tabacman H., 1985. Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 132–139.
- Centeno A., Sánchez-de-Miguel P., Linares R., Lissarrague J.R., 2005. Changes in must composition during ripening of "Tempranillo" grapevines as a function of two irrigation treatments. *Acta Horticulturae*, 689: 391-395.
- Chaves M.M., Santos T.P., Souza C.R., Ortuño M.F., Rodrigues M.L., Lopes C.M., Maroco J.P., Pereira J.S., 2007. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150: 237-252.
- Coombe B.G., MacCarthy M.G., 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 6: 131-135.
- Deloire A., Carbonneau A., Wang Z.P., Ojeda H., 2004. Vine and water a short review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 38: 1-13.
- Dry P.R., Loveys B.R., McCarthy M.G., Stoll M., 2001. Strategic irrigation management in Australian vineyards. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 35: 129-139.
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R., 2001. Effect of irrigation on changes in anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 409-420.
- García-Escudero E., Santamaría P., López R., Zaballa O., 1994. Ensaio de riego localizado en viñedos de la D.O.C Rioja. 7as Jornadas de Estudio de los Sistemas de Conducción del Viñedo. GESCO. Valladolid, pp 261-268.
- Hepner Y., Bravdo B., Loinger C., Cohen S., Tabacman H., 1985. Effect of drip irrigation schedules on growth, yield, must composition and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 77–85.
- Hamman R.A., Dami I.E., 2000. Effects of irrigation on wine, grape growth and fruit quality. *HortTechnology* 10: 162-168.
- Intrigliolo, D.S., Castel, J.R., 2010. Response of grapevine cv.'Tempranillo' to timing and amount of irrigation: water relations, vine growth, yield and berry and wine composition. *Irrigation Science*, 28: 113-125.
- Lopes C., Barroso J., Madeira J., Vicente-Paulo J., Cabrita M.J., Pacheco C., Rodrigues M.L., Santos T., Chaves M.M., 2001. Rega da vinha no Alentejo. Dotações e época de aplicação. Actas do 5º Simpósio de Vitiviniculturta do Alentejo. ATEVA/CCRA (Eds.) Évora. 1: 99-105.
- Malheiro A.N.C., 2005. Microclimate, yield and water-use of vineyards in the Douro Region, Portugal. PhD Thesis. Cranfield University, Silsoe.
- Marsal, J., Mata M., Campo J., Arbones, A., Vallverdú X., Girona J., Olivo N., 2008. Evaluation of partial root-zone drying for potential field use as a deficit irrigation technique in commercial vineyards according to two different pipeline layouts. *Irrigation Science*, 26: 347-356.
- Matthews M.A., Anderson M., 1988. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *American Journal of Viticulture and Enology*, 39: 313-320.
- McCarthy M.G., Loveys B.R., Dry P.R., Stoll M., 2002. Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. In: 'Deficit Irrigation practices, Water Reports No 22, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 79-87.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Cifre, J., Bota, J., Flexas, J. 2003. A ten-year on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions: effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. *Functional Plant Biology*, 30: 607-619.
- Moutinho – Pereira J.M., (2000) Caracterização fisiológica e agronómica de diferentes estratégias culturais para minimizar o stress estival em *Vitis vinífera* L. na região demarcada do douro. Tese de Doutoramento, UTAD, Vila Real.

- Peterlunger E., Sivilloti P., Colussi V., 2005. Water stress increased polyphenolic quality in 'Merlot' grapes. *Acta Horticulturae*, 689, 293-300.
- Pire R., Ojeda M., 1999. Vegetative growth and quality of grapevine 'Chenin blanc' irrigated under three pan evaporation coefficients. *Fruits* 54: 135-139.
- Roby G., Matthews A., 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 74-82.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Brandtreet, E.T. and Hemmingsen, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hidrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, 148: 339-346.
- Schultz H.R., 1996. Water relations and photosynthetic responses of two grapevine cultivars of different geographical origin during water stress. *Acta Horticulturae*, 427, 251-266.
- Souza C.R., Maroco J.P., Santos T., Rodrigues M.L., Lopes C., Pereira J.S., Chaves M.M., 2003. Partial rootzone-drying: regulation of stomatal aperture and carbon assimilation in field grown grapevines (*Vitis vinifera* cv Moscatel). *Functional Plant Biology* 30: 653-662.
- Van Leeuwen C., Seguin G., 1994. Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété 'Cabernet Franc'). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28: 81-110.
- Von Caemmerer S., Farquhar G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 376-387.

## **Gestão da fertilização azotada em agro-ecossistemas**

**M.A. Rodrigues; M. Arrobas**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. angelor@ipb.pt*

### **Resumo**

A agricultura dos países desenvolvidos utiliza azoto em excesso. A comunidade científica internacional tem dado grande importância a este tópico nos últimos trinta anos procurando identificar as razões, conhecer as consequências e estudar meios de minimizar danos. A agricultura desenvolvida utiliza azoto em excesso por quatro razões principais: o custo do azoto tem sido pouco significativo comparado com o valor das produções; as plantas respondem com exuberância ao azoto aplicado quando o elemento é limitante; as produções normalmente não decrescem quando se aplica azoto em excesso; e a qualidade das recomendações de fertilização emitidas pelos laboratórios é ainda de qualidade insatisfatória.

Quando se aplica azoto em excesso a eficiência de uso do nutriente reduz-se. Na agricultura dos países desenvolvidos, de uma maneira geral, menos de 50% do azoto aplicado como fertilizante é recuperado pelas plantas. O restante perde-se para o meio ambiente. O azoto pode sair do solo na forma de nitratos, sendo lixiviado para aquíferos e cursos de água superficiais, originando a redução da qualidade da água para consumo e a eutrofização dos cursos de água e albufeiras. O azoto pode ainda sair do sistema solo/planta em formas gasosas e contaminar a atmosfera. Algumas dessas formas de azoto estão associadas ao aumento do efeito de estufa, à depleção da camada de ozono ou à redução do pH das águas da chuva (chuvas ácidas). Assim, por questões económicas e ambientais, é extremamente importante gerir de forma correcta a fertilização azotada. Neste trabalho faz-se uma breve revisão sobre este tópico.

**Palavras-chave:** fertilização azotada; produção esperada; disponibilidade de azoto no solo; diagnóstico do estado nutritivo das plantas; eficiência de uso do azoto; culturas de cobertura.

## **A agricultura dos países desenvolvidos utiliza azoto em excesso**

O azoto é considerado o elemento nutriente mais importante no âmbito da fertilização das culturas. Embora do ponto de vista fisiológico seja apenas mais um de entre os dezasseis elementos essenciais, do ponto de vista agronómico é o elemento mais determinante da produtividade vegetal. Como não se acumula nos solos em formas absorvíveis pelas plantas, é aplicado anualmente como fertilizante em todas as culturas praticamente sem excepção. Enquanto elemento nutriente, o azoto apresenta um conjunto de características ímpares que contribuem para que seja frequentemente aplicado em doses superiores ao necessário, tendo como consequências aumento de custos, ineficiência energética e danos potencialmente negativos no meio ambiente.

Quando o azoto é factor limitante, a aplicação do elemento ao solo provoca um estímulo praticamente imediato na vegetação. As plantas apresentam um desenvolvimento luxuriante adquirindo um tom verde intenso, devido ao aumento de teor de clorofila. De uma maneira geral, aumenta a biomassa produzida. A resposta visível das plantas à fertilização azotada é dos factores que mais estimula os agricultores a aplicarem azoto em excesso.

A resposta das plantas ao aumento da disponibilidade de um dado nutriente no solo traduz-se habitualmente num acréscimo de produtividade até que as necessidades fisiológicas nesse nutriente estejam satisfeitas. Se a disponibilidade do nutriente continuar a aumentar, pela aplicação de mais fertilizante, segue-se um declínio provável de produtividade, devido a desequilíbrios nutritivos ou a efeitos de toxicidade. No caso do azoto, a resposta mais frequente ao aumento da disponibilidade do nutriente no solo consiste no incremento da produtividade para doses do nutriente inferiores à dose óptima, a que se segue a estabilização da produção num extenso patamar em que a produção não decresce com o aumento do nutriente (figura 1). A região correspondente ao patamar é frequentemente designada de consumo de luxo (Santos, 1996). O facto de a produção não decrescer para doses elevadas de azoto disponível no solo permite que o nutriente seja aplicado em doses excessivas sem danos mensuráveis na produção.

A disponibilidade de azoto no solo modifica a composição de órgãos e tecidos vegetais. Em diversas culturas, a dose de azoto tem de ser definida com moderação para evitar danos na qualidade tecnológica dos produtos agrícolas. O excesso de azoto afecta negativamente a qualidade da fibra do linho, dificulta a extracção da sacarose em beterraba-sacarina, reduz o teor de açúcar das uvas e o grau alcoólico potencial dos vinhos, aumenta o teor de proteína e reduz o teor de amido em cevada de malte, etc. (Santos, 1996). Contudo, em outras culturas, como a batata, o excesso de azoto disponível não interfere significativamente nos parâmetros qualitativos que determinam o valor do produto no mercado (Rodrigues et al., 2001).

O fabrico industrial dos adubos azotados apresenta custos energéticos muito elevados (Voroney & Derry, 2008), o que torna a fertilização azotada mais dispendiosa do que, por exemplo, a fertilização fosfatada ou potássica. Contudo, o preço da fertilização azotada é

pouco significativo quando integrado na totalidade dos encargos de exploração (mobilização, rega, tratamentos fitossanitários, colheita, etc.) e também quando comparado com o valor de mercado das produções. Assim, na agricultura dos países tecnologicamente mais desenvolvidos o preço do azoto não tem sido obstáculo financeiro que motive a racionalização da aplicação do nutriente.

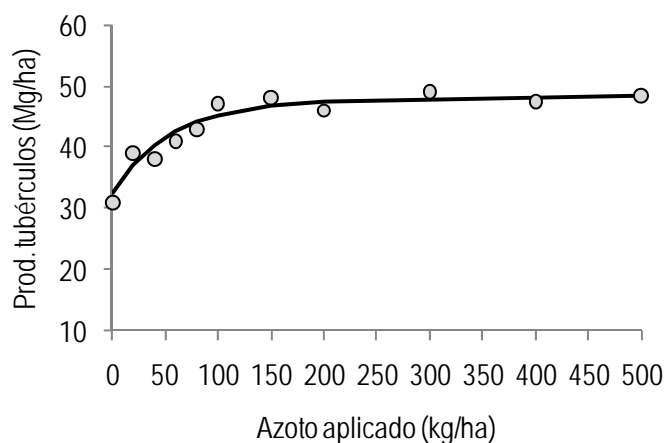


Figura 1. Resposta da produção de tubérculos (*Solanum tuberosum* L.) à fertilização azotada (adaptado de Rodrigues, 2000).

Para uma dada cultura, o azoto exportado é influenciado pelo nível de produtividade. Tome-se como exemplo o trigo: neste caso, o azoto exportado e as necessidades de fertilização são completamente diferentes se as condições agro-ecológicas permitem atingir 1000 ou 8000 kg de grão por hectare. Para os laboratórios emitirem recomendações de fertilização, solicitam aos agricultores informação sobre a produção esperada. A produção esperada deve ser entendida como a produção expectável nas condições reais de cultivo. Trabalhos realizados nos Estados Unidos mostraram que 80% dos agricultores sobrestimam a produção esperada e que 50% dos agricultores produzem 80% menos do que as suas estimativas (Meisinger et al., 2008). Sem estimativas realistas da produção esperada não há boas recomendações de fertilização.

De entre as metodologias utilizadas pelos laboratórios para fazer recomendações de fertilização para os diferentes nutrientes, destacam-se, pela sua diversidade, as que se utilizam para o azoto. Enquanto as recomendações para o fósforo e potássio não variam muito entre diferentes regiões do globo, para o azoto não há metodologias universalmente aceites. As aproximações para obter recomendações de fertilização para o azoto variam de país para país, de região para região e por vezes de laboratório para laboratório. A incerteza na qualidade da recomendação da fertilização azotada é frequentemente apontada como um factor que contribui para que se aplique azoto em excesso. Os agricultores aplicam generosamente azoto porque não querem correr riscos de comprometer a produção (Dahnke & Johnson, 1990).

## A eficiência de uso do azoto pelas plantas é baixa

Do azoto aplicado como fertilizante apenas uma fracção, normalmente inferior a 50%, é utilizada pelas plantas. A dose de azoto é um dos factores que mais contribui para a baixa eficiência de uso do nutriente, embora as técnicas de aplicação tenham também papel significativo (Boswell et al., 1985). Contudo, a reduzida eficiência de uso do azoto deve-se sobretudo à grande dinâmica do nutriente no solo, com diversas transformações de forma e possibilidades de sair do sistema solo/planta por mecanismos variados. A dinâmica do azoto no solo torna difícil a gestão da fertilização azotada, porque, por um lado, o elemento não se acumula nos solos na forma mineral e, por outro, é difícil prever quando o azoto orgânico se mineraliza e fica disponível para as plantas.

O ciclo biogeoquímico do azoto é complexo e envolve etapas que são difíceis de quantificar. Na figura 2 apresentam-se alguns dos processos quantitativamente mais relevantes do ciclo do azoto, embora muitos outros não representados na figura 2 tenham importante significado ecológico.

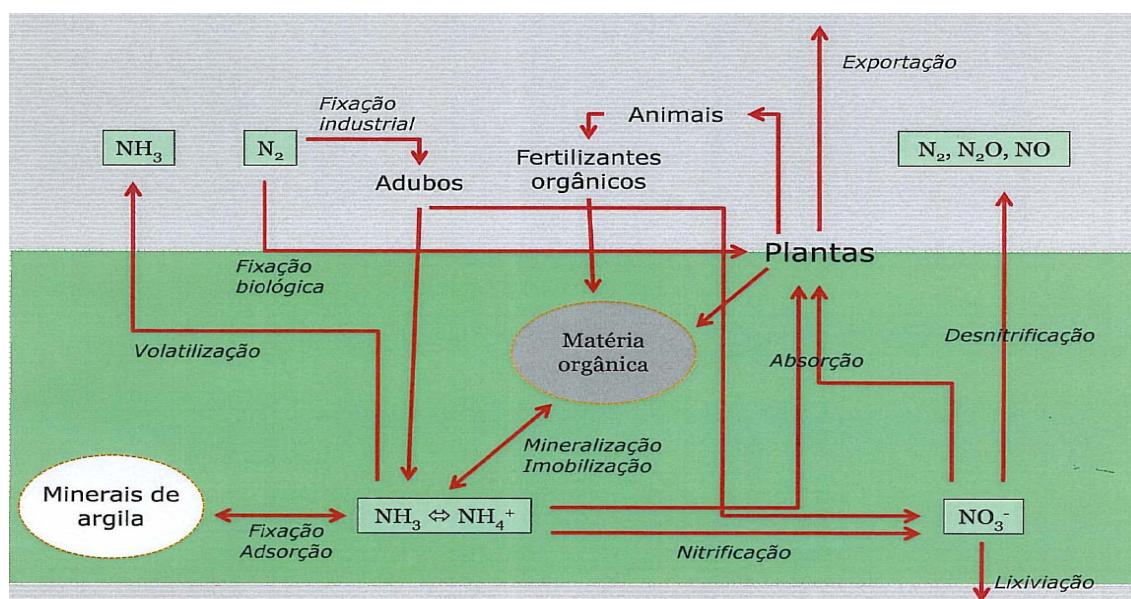


Figura 2. Ciclo biogeoquímico do azoto onde se representam alguns dos fluxos quantitativamente mais relevantes.

O azoto encontra-se no solo em formas orgânicas e minerais. Embora predomine azoto na forma orgânica (normalmente mais de 95%), as plantas absorvem maioritariamente o azoto nas formas minerais  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ .

A matéria orgânica é componente central do ciclo do azoto no solo e considerada a base da sua fertilidade. Inclui detritos animais e vegetais em várias fases de decomposição e a biomassa microbiana. É composta por polipéptidos/aminoácidos e açúcares aaminados, azoto heterocíclico (clorofila, bases azotadas, ácidos nucleicos, ...) e azoto não identificável (Olk,

2008). A matéria orgânica fica disponível para as plantas após *mineralização* (formação de  $\text{NH}_4^+$ ), processo liderado por microrganismos heterotróficos do solo.

O ião  $\text{NH}_4^+$  surge no solo a partir da mineralização da matéria orgânica, deposições atmosféricas ou a partir da aplicação de fertilizantes. Tendo carga positiva, pode ser adsorvido no complexo coloidal do solo, que apresenta maioritariamente carga negativa. Em solos ricos em minerais de argila 2:1, do tipo vermiculite, ilite e montmorilonite, uma quantidade significativa de  $\text{NH}_4^+$  pode ser fixado nas cavidades hexagonais formadas pelos átomos de oxigénio das folhas tetraédricas das superfícies externas entre duas camadas estruturais dos minerais de argila 2:1 (Kissel et al., 2008). Este processo restringe a sua disponibilidade na solução do solo. O ião  $\text{NH}_4^+$  é também usado pelos microrganismos heterotróficos do solo que decompõem a matéria orgânica quando o substrato apresenta elevada razão C/N (isto é, muita energia e pouco azoto). O processo designa-se de *imobilização biológica* e actua em sentido contrário ao processo de mineralização (Myrold & Bottomley, 2008). Em solos arejados e condições gerais favoráveis à actividade dos microrganismos, o ião  $\text{NH}_4^+$  é utilizado por bactérias quimio-autotróficas que o convertem em  $\text{NO}_3^-$  (*nitrificação*) (Norton, 2008). Em solução aquosa, o ião  $\text{NH}_4^+$  encontra-se em equilíbrio com  $\text{NH}_3$ . A pH inferior a 7,5, a quantidade de  $\text{NH}_3$  presente no solo é negligenciável. Se o pH sobe, aumenta a proporção relativa de  $\text{NH}_3$ , que, sendo um gás, pode perder-se para a atmosfera por *volatilização* (Francis et al., 2008).

O ião  $\text{NO}_3^-$  surge no solo por nitrificação de  $\text{NH}_4^+$ , deposições atmosféricas ou aplicado como fertilizante. O ião  $\text{NO}_3^-$  é muito solúvel em água. Tendo carga negativa, não existem na maior parte dos solos mecanismos químicos que o retenham, podendo perder-se por *lixiviação* na água de percolação (Mulla & Strock, 2008). Em condições de hipoxia, em solos alagados, o ião nitrato substitui o oxigénio como aceitador terminal de electrões no processo respiratório de bactérias anaeróbias facultativas, formando-se gases azotados ( $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$ ) que se escapam para a atmosfera, fenómeno designado de *desnitrificação* (Coyne, 2008).

Alguns microrganismos procarióticas que contêm nitrogenase nos seus sistemas enzimáticos são capazes de fixar azoto molecular ( $\text{N}_2$ ) directamente da atmosfera e usá-lo na síntese de aminoácidos e proteínas (Mengel & Kirkby, 1987; Russelle, 2008). Alguns destes organismos vivem livres no solo, outros formam associações com plantas na rizosfera, onde têm acesso privilegiado a exsudados radiculares, outros ainda invadem os tecidos de plantas superiores constituindo verdadeiras relações simbióticas com estas. Apreciada à escala global, a fixação biológica constitui ainda hoje a principal entrada de azoto nos solos. A agricultura tem promovido a entrada natural de azoto cultivando plantas que têm acesso ao azoto atmosférico através da fixação biológica, em particular da família *Fabaceae*. Estas plantas podem dispensar fertilização azotada e transferir azoto para as culturas que se seguem na rotação.

Muitas outras etapas do ciclo do azoto não se encontram representadas na figura 2, embora possam ter elevado significado ecológico, como deposições atmosféricas, absorção

directa e/ou perda de gases azotados pela canópia, perdas de azoto por erosão e escoamento superficial e fixação de  $\text{NH}_3$  na matéria orgânica do solo.

As principais transformações do azoto no solo são mediadas por microrganismos, estando a sua actividade dependente de variáveis ambientais (pH, temperatura, humidade, oxigénio, etc.). Apesar do esforço da comunidade científica nas últimas décadas, os fluxos de azoto no solo são ainda difíceis de prever, o que dificulta a elaboração de recomendações de fertilização com qualidade satisfatória e cria condições para que o azoto seja usado de forma pouco eficiente na agricultura.

## **O custo ambiental da utilização de azoto pode ser elevado**

A importância da gestão do azoto nos agro-ecossistemas deve-se tanto ao seu efeito na produtividade vegetal quanto ao impacte negativo que algumas formas de azoto que escapam dos solos agrícolas têm no meio ambiente. A contaminação de aquíferos e cursos de água com nitratos tem liderado a preocupação com a gestão do azoto, mas a agricultura pode ser ainda responsável por emissões de gases para a atmosfera com papel relevante no aquecimento global, na destruição da camada de ozono da estratosfera, nas chuvas ácidas e na alteração da biodiversidade.

Os cursos de água e albufeiras são naturalmente meios oligotróficos, isto é, pobres em nutrientes. Esta situação permite um determinado equilíbrio entre as espécies que habitam o ecossistema. A perda de nutrientes dos campos agrícolas, actividade pecuária e também a partir dos efluentes do saneamento básico, pode contribuir para o enriquecimento das águas em nutrientes (*eutrofização*) alterando o equilíbrio entre as espécies. Em lagos eutrofizados aumenta a produtividade de algas e plantas aquáticas, que no processo de decomposição consomem o oxigénio da água pondo em risco a vida de algumas espécies. A agricultura é a actividade humana que mais contribui para a contaminação das águas com nitratos lixiviados dos campos agrícolas. A erosão dos solos e a actividade agro-pecuária podem também contribuir para o enriquecimento das águas em fósforo, azoto e outros nutrientes.

Perdas de azoto em formas gasosas a partir da actividade agrícola e pecuária podem contribuir para a poluição atmosférica (Francis et al., 2008). A volatilização de amoníaco está particularmente ligada à actividade pecuária (manuseamento e aplicação de estrumes e chorumes), se bem que a fertilização com ureia e formas amoniacais, em particular na cultura do arroz, possam também originar perdas significativas de  $\text{NH}_3$  para a atmosfera. Apesar de ser um gás alcalino, quando depositado no solo apresenta reacção fisiológica ácida. Por outro lado, o  $\text{NH}_3$  na atmosfera não percorre grandes distâncias, sendo depositado nas proximidades das fontes emissoras, podendo originar eutrofização de lagos e, como fonte externa de azoto, provocar desequilíbrios na vegetação natural. A desnitrificação, com formação de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) tem também grande importância na contaminação atmosférica. A molécula  $\text{N}_2\text{O}$  é um poderoso gás de estufa, com um efeito 310

vezes superior à molécula de CO<sub>2</sub>. O NO está associado à destruição catalítica do ozono na estratosfera, contribuindo para a redução da protecção que a camada de ozono confere contra a radiação ultravioleta. Os óxidos de azoto estão também na origem da formação de ácido nítrico na atmosfera, contribuindo para a redução do pH da água das chuvas (chuvas ácidas).

Outra questão relacionada com a fertilização azotada e muito discutida pela ciência prende-se com o facto de algumas plantas poderem acumular quantidades particularmente elevadas de nitratos nos seus tecidos. Enquanto as plantas não podem acumular NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que, por ser fitotóxico, tem de ser assimilado na raiz, os nitratos podem ser acumulados na parte aérea das plantas, em particular nos vacúolos das células dos tecidos condutores (Mengel & Kirkby, 1987). Plantas como espinafre comum, alface, espinafre da Nova Zelândia, entre outras, podem acumular quantidades de nitratos particularmente elevadas. Nos últimos anos tem-se discutido o efeito potencialmente negativo de dietas ricas em nitratos na saúde humana (Boink & Speijers, 2001; Santamaria, 2006). Os nitratos em si não são tóxicos, mas podem ser convertidos em nitritos durante a conservação dos alimentos e também na boca durante a mastigação, podendo originar metahemoglobinemia. Aproximadamente 5% dos nitratos ingeridos são convertidos em nitritos por bactérias que contaminam a boca. Os nitritos reagem com a hemoglobina do sangue (proteína com ferro na forma Fe<sup>2+</sup>) originando metahemoglobina (hemoglobina com ferro na forma Fe<sup>3+</sup>), a qual não consegue transportar oxigénio. Os bebés com menos de 3 meses de idade são particularmente vulneráveis. Os ruminantes são também vulneráveis à metahemoglobinemia na medida em que as condições redutoras do rúmen favorecem a formação de nitritos, devendo a forragem conter baixos teores de nitratos (Westcott et al., 1998). Adicionalmente podem formar-se compostos N-nitroso no ambiente ácido do estômago com poder carcinogénico. Foi demonstrado efeito carcinogénico dos compostos N-nitroso em mais de 40 espécies, incluindo répteis, aves, peixes e mamíferos. O homem não deverá ser excepção. Os Estados Unidos e a União Europeia definiram doses máximas diárias admissíveis para a ingestão de nitratos e nitritos, bem como limites acima dos quais a água não pode ser considerada potável para consumo humano. A União Europeia introduziu ainda restrições legais à comercialização de espinafre, alface e outros vegetais cuja concentração em nitratos ultrapasse determinados limites (Regulamento EC 563/2002). Tem também sido demonstrado que a população adulta europeia ultrapassa facilmente as doses diárias de nitratos recomendadas. Contudo, a principal fonte de nitratos são os vegetais (60 a 90%) que, sendo também ricos em vitaminas, podem contrariar o efeito eventualmente negativo da ingestão de nitratos. Apesar de persistirem dúvidas sobre o real efeito negativo da ingestão de nitratos na saúde, a maior parte dos investigadores e entidades internacionais concordam que, por prudência, a exposição prolongada a dietas ricas em nitratos deve ser evitada.

## **A gestão integrada da fertilização azotada deve ser promovida**

A recomendação da fertilização azotada é complexa. Enquanto para os restantes macronutrientes fósforo e potássio os procedimentos analíticos são muito semelhantes em todo o mundo, as bases da fertilização azotada variam muito entre países e regiões agrícolas. O problema principal é a dinâmica do azoto no sistema solo/planta e a incapacidade de se encontrar um indicador minimamente credível que forneça informação sobre a disponibilidade potencial de azoto no solo. Como já se referiu, na incerteza os agricultores tendem a aplicar azoto em excesso.

A primeira etapa para se conseguir uma boa recomendação de fertilização é conhecer as necessidades das plantas. As culturas diferem na sua capacidade em exportar azoto do solo e, para uma dada cultura, a exportação de azoto depende da produtividade atingida. A *produção esperada* reflecte o que será realisticamente possível obter num dado agro-sistema. Em determinadas regiões é difícil prever a produção de uma dada cultura por estar muito dependente de variáveis ambientais como a precipitação. Por outro lado, como se referiu, os agricultores sobrestimam as produções que normalmente podem obter nas suas condições de cultivo.

Os sistemas de recomendação de fertilização variam significativamente entre várias regiões do globo. No Reino Unido e nalguns estados norte-americanos é muito popular um método de recomendação de fertilização que atribui créditos ao precedente cultural. Baseia-se no princípio de que a fertilidade residual varia entre as diferentes culturas da rotação. Culturas em que se aplique estrume e leguminosas, por exemplo, transferem bastante azoto residual para a cultura que se segue na rotação, enquanto gramíneas e culturas não fertilizadas têm um efeito mais modesto na cultura seguinte (MAFF, 1985). Apesar de ser tratar de um sistema de recomendação empírico parece funcionar relativamente bem em regiões húmidas.

O azoto inorgânico no perfil antes da instalação da cultura é usado como base da recomendação da fertilização azotada em diversos estados norte-americanos e também nalgumas regiões do Canadá (Bronson, 2008). A este azoto é atribuído valor equivalente ao que é aplicado como fertilizante. O método parece ser particularmente interessante para regiões áridas e semi-áridas onde os riscos de lixiviação de nitratos são mínimos. As amostras são colhidas a grande profundidade (0-90 cm a 0-150 cm) por empresas especializadas que são simultaneamente quem comercializa os adubos.

A determinação do azoto inorgânico no perfil durante a estação de crescimento é o principal método de recomendação de fertilização usado nalguns estados norte-americanos e menos frequentemente na Europa. Consiste em determinar o azoto inorgânico no solo imediatamente antes da cobertura, quando a cultura inicia uma fase de grande necessidade em azoto. O método foi desenvolvido por Magdoff et al. (1984) e é habitualmente designado com *pre-sidedress soil nitrate test*. Quando as plantas de milho têm 20 a 30 cm de altura, procede-se à colheita de amostras de solo na profundidade 0-30 cm e determina-se o teor de nitratos.

O teor de nitratos determinado nesta fase tem valor quantitativo e reflecte já o processo de mineralização do azoto orgânico. Outros investigadores, na tentativa de melhorar a qualidade do diagnóstico, incluíram também o  $\text{NH}_4^+$  na análise (Meisinger e tal., 1992; Rodrigues, 2004).

O teor de azoto total no solo é provavelmente o método mais generalizado no qual se baseia a recomendação de fertilização azotada. Assume-se que uma determinada percentagem de azoto orgânico (1 a 3 %) se mineraliza durante o ciclo cultural. Normalmente os laboratórios determinam o carbono orgânico no solo pelo método Walkley-Black, por ser mais simples e económico que a determinação do azoto total. Assume-se que o carbono representa aproximadamente 58% da massa da matéria orgânica e que a matéria orgânica contém aproximadamente 5% de azoto. O ponto fraco do método é que tem implícito que toda a matéria orgânica se mineraliza por igual. Talvez por esse facto, não se têm conseguido encontrar boas relações entre matéria orgânica (ou azoto total) do solo e azoto mineralizado para as plantas (Hong et al., 1990; Jalil et al., 1996).

As incubações biológicas laboratoriais são metodologias que têm vindo a ser muito ensaiadas para prever o potencial de mineralização de azoto a partir da matéria orgânica do solo. O princípio é usar os mesmos agentes biológicos que operam no solo. Os métodos biológicos laboratoriais têm consistido na incubação de solo em condições ecológicas diversificadas. As variantes ensaiadas podem ser divididas em três grandes grupos: incubações biológicas aeróbias de longa duração; incubações biológicas aeróbias de curta duração; e incubações biológicas anaeróbias. Stanford & Smith (1972) propuseram a determinação do azoto mineralizado durante pelo menos 30 semanas até ser possível descrever a relação entre o azoto acumulado e o tempo de incubação. Este método foi muito repetido nas décadas de 1970 e 1980 por ser pouco sensível aos pré-tratamentos das amostras. Como incubações biológicas aeróbias de curta duração existem muitas variantes relativamente ao tempo e condições de incubação (temperatura, arejamento, correctivos, etc.). Grande destaque foi também dado à incubação biológica anaeróbia proposta por Waring & Bremner (1964), que consiste em colocar a incubar solos em condições de excesso de água a 40 °C durante 7 dias. É uma metodologia muito simples e o resultado também não é influenciado pelos pré-tratamentos das amostras. Apesar do enorme esforço de investigação que tem sido desenvolvido em torno das incubações biológicas e da informação eventualmente relevante que tem sido obtida para conhecer os fluxos de azoto no solo, nenhuma foi ainda adoptada em sistemas de recomendação de fertilização.

Atendendo à complexidade das incubações biológicas e do tempo dispendido na sua realização, o que inviabiliza o seu uso nos procedimentos de rotina dos laboratórios, a procura de um método de extracção química tem envolvido também o esforço de numerosos investigadores. Procuram-se soluções extractantes que removam uma fracção de azoto que tenha significado biológico e que se possa relacionar com o azoto exportado pelas culturas em campo. A lista de métodos que já foram utilizados, considerando agentes extractantes e condições de extracção (concentração do reagente, temperatura, tempo de extracção, etc.)

ultrapassa várias dezenas. Como agentes extractantes tem sido ensaiada desde água quente, ácidos e bases fortes mais ou menos diluídos, soluções salinas entre outros. Apesar do volumoso trabalho de investigação dispendido, nenhum método foi ainda adoptado pelos laboratórios como base de recomendação da fertilização azotada. Na Alemanha e na Áustria está em uso o método da electroultrafiltração. Consiste na sujeição de uma suspensão de solo a um campo eléctrico em que catiões e aniões, incluindo partículas orgânicas, são arrastados para o cátodo e o ânodo e separadas com filtros apropriados (Németh, 1985; Mengel, 1991). Espera-se que as partículas orgânicas removidas estejam relacionadas com a mineralização em campo.

O estado nutritivo das plantas também pode ser usado como base da recomendação de fertilização. Analisando os tecidos vegetais pode saber-se em cada momento qual o estado nutritivo das plantas e como o nutriente está a ser absorvido (Munson & Nelson, 1990). Na análise de plantas determina-se a concentração do nutriente ou de uma sua fracção nos tecidos das plantas, após padronização do processo de colheita. A padronização rigorosa do processo de colheita é determinante pois a concentração de nutrientes nos tecidos varia com inúmeros factores, como a idade da planta, o tipo de tecido, a posição do tecido na planta, etc. Apesar do elevado potencial de diagnóstico, a análise de plantas também apresenta limitações. Em culturas anuais, de crescimento rápido, a técnica é pouco versátil porque o tempo que decorre desde a colheita do material vegetal até à elaboração de um diagnóstico por parte do laboratório impede uma intervenção oportuna, se houver necessidade de fazer a correcção de uma deficiência. Por outro lado, a análise de plantas clássica não permite quantificar a dose do nutriente a aplicar quando uma carência é detectada.

Recentemente foi também dada muita atenção a métodos expeditos de diagnóstico do estado nutritivo das plantas realizados em campo. Usam-se equipamentos portáteis que permitam de uma forma simples e rápida obter um diagnóstico do estado nutritivo das plantas. Como indicador do estado nutritivo azotado pode ser determinado o teor de nitratos nos pecíolos através de procedimentos simples e sem necessidade de enviar a amostra para laboratório (por exemplo, com o aparelho portátil RQflex, que usa tiras de teste Reflectoquant) (Rodrigues, 2004). O teor de clorofila nas folhas é também um bom indicador do estado nutritivo azotado. O teor de clorofila pode ser estimado com o aparelho portátil *SPAD-502 chlorophyll meter* de uma forma muito rápida em campo e por um processo não destrutivo (Schepers et al., 1992; Rodrigues, 2004). Estas estratégias permitem mudar o paradigma da fertilização azotada, transferindo a decisão da definição da dose de azoto a aplicar da sementeira para o momento da adubação de cobertura. Em fundo usam-se doses de azoto moderadas, sendo posteriormente monitorizado o estado nutritivo das plantas e efectuados os acertos necessários na fertilização. Alguns investigadores têm vindo a apresentar propostas de quantificação da dose de azoto a aplicar em cobertura com base em informação recolhida durante a estação de crescimento com métodos expeditos de diagnóstico (Singh, 1993; Rodrigues et al., 2005).

Num futuro próximo espera-se que a análise de plantas venha a ser substituída por técnicas de controlo remoto (Fox & Walthall, 2008). Utilizam-se tecnologias que interpretam a radiação reflectida da canópia como um indicador de um stresse biótico ou abiótico. Mais uma vez o azoto, pelas dificuldades de gestão e por exercer grande influência nas propriedades ópticas da canópia, alterando de forma evidente a intensidade da cor verde para pequenas diferenças de nutriente disponível no solo, tem sido a principal razão para o avanço rápido destas tecnologias. Para medir a radiação reflectida podem usar-se espectroradiómetros que se colocam sobre a canópia, fotografia aérea de baixa altitude e grande resolução, ou imagem de satélite. Nos estados unidos existem já algumas empresas que se estão a preparar para fornecer estes serviços aos agricultores.

Na gestão da fertilização azotada deve ter-se especial atenção à dose, na medida em que a ineficiência de uso do azoto resulta, em grande parte, da aplicação de quantidades excessivas do nutriente. Contudo, o momento e as técnicas de aplicação são também determinantes na promoção da eficiência de uso do azoto. Os fertilizantes orgânicos apresentam desafios particulares porque a sua gestão é bem mais complexa que a gestão da fertilização mineral, dada a dificuldade em se prever o seu ritmo de mineralização. A sequência de culturas deve ser tida em conta e pensada de forma a tirar o máximo proveito da fertilidade residual do precedente cultura. A introdução de culturas de cobertura (*winter-cover crops*, *catch crops*), constituindo um revestimento permanente do solo (*evergreen systems*) é também uma estratégia que deve ser implementada para reduzir as perdas de azoto para o meio ambiente.

Os fertilizantes amoniacais devem ser incorporados logo após a aplicação para reduzir as perdas de azoto por volatilização de amoníaco, sobretudo em solos alcalinos. Especial atenção deve ser dada à aplicação de ureia, onde os riscos de perda de azoto por volatilização são ainda mais elevados porque a hidrólise da ureia origina uma subida de pH do solo próximo dos grânulos do fertilizante, condição indispensável para se formar  $\text{NH}_3$  no solo (Varenes, 2003).

A fertilização azotada deve ser fraccionada, isto é, a dose total de azoto deve ser dividida em mais que uma aplicação, de forma a aumentar a oportunidade de absorção radicular. Em ambiente mediterrânico, em que se cultivam plantas em ciclo de outono/inverno, o azoto deve ser aplicado maioritariamente depois do Inverno, quando a precipitação se reduz e a temperatura sobe, condições que favorecem a retoma do crescimento activo das plantas. Desta forma, reduz-se a perda de azoto por lixiviação e promove-se a absorção do nutriente. Em culturas regadas, em que o sistema de rega permite a fertirrigação, deve promover-se o fraccionamento múltiplo da fertilização azotada, aplicando o azoto ao longo da estação de crescimento à medida das necessidades das plantas.

A pecuária intensiva, com encabeçamentos elevados, está associada a grandes problemas ambientais pelo risco potencial de perda de azoto. Os animais são pouco eficientes a utilizar o azoto dos alimentos. Por outro lado, como entra muita proteína no sistema devido ao suplemento alimentar, há normalmente excesso de azoto tendo em conta as reduzidas

áreas de solo onde os dejectos dos animais são posteriormente aplicados. A gestão dos dejectos dos animais e a sua aplicação também pode originar perdas de azoto significativas. Como forma de reduzir as perdas, chorumes e estrumes devem imediatamente incorporados no solo após a aplicação. No caso dos chorumes, até 50% do azoto contido no fertilizante pode perder-se por volatilização nas primeiras 24 horas após a aplicação (Trindade, 1997).

Os adubos de libertação gradual de nutrientes foram desenvolvidos para promover a eficiência de uso do azoto. Os fertilizantes existentes no mercado podem organizar-se em três grupos: adubos de libertação lenta (obtidos da reacção da ureia com aldeídos); adubos de libertação controlada (adubos convencionais que são posteriormente revestidos com enxofre e/ou polímeros); e adubos estabilizados (adubos aos quais é adicionado um inibidor da nitrificação). Alguns destes produtos têm-se mostrado eficazes na redução das perdas de azoto em ambientes de difícil gestão do nutriente. O preço mais elevado que o dos fertilizantes convencionais tem restringido o seu uso a viveiros, plantas envasadas, jardins públicos e privados e espaços desportivos, como campos de golfe (Trenkel, 2007). Por outro lado, os resultados destes fertilizantes quando utilizados em agricultura convencional não têm sido entusiasmantes (Rodrigues et al., 2010).

A introdução de culturas de cobertura (*catch crops*, *winter-cover crops*) permite reduzir as perdas de azoto por lixiviação e desnitrificação de nitratos (Lewan, 1994; Rodrigues et al., 2002). O excesso de azoto residual que fica no solo após uma cultura principal pode ser absorvido e retido no sistema solo/planta, sendo reutilizado pelas culturas que se seguem na rotação. Ao absorverem o azoto mineral e extraírem água limitam também a perda de azoto por desnitrificação. O tipo de planta a utilizar deve ser ajustado ao agrossistema em causa. Em ambiente mediterrânico, em que a precipitação de Inverno é importante como reserva de água para a estação seca, é necessário assegurar que a cultura de cobertura não extrai água necessária à cultura principal da rotação.

## **Nota final**

A gestão integrada da fertilização azotada implica: a implementação de metodologias que permitam quantificar adequadamente a dose a aplicar; a escolha do fertilizante, do momento e de técnicas de aplicação adequadas; e a análise global do sistema cultural (rotação, resíduos das culturas, culturas de cobertura, ...). Atenção particular deve ser dada aos sistemas agro-pecuários com excesso de nutrientes. Assim, o programa de fertilização azotada e as medidas compensatórias associadas deverão garantir produtividade, ou outro objectivo previamente definido, de forma a assegurar a sobrevivência financeira da empresa no curto prazo. Por outro lado, a fertilização azotada não pode hipotecar a sustentabilidade do sistema de produção, ou causar danos colaterais inaceitáveis no meio ambiente.

## Agradecimentos

Actividades financiadas no âmbito do projecto PTDC/AGR-AAM/098326/2008, de título "Coberturas vegetais: a estratégia decisiva na gestão sustentável dos olivais de sequeiro".

## Referências bibliográficas

- Boink, A., Speijers, G.J.A. 2001. Health effects of nitrates and nitrites, a review. *Acta Hortic.* 563: 29-36.
- Boswell, F.C., Meisinger, J.J., Case, N.L. 1985. Production, marketing, and use of nitrogen fertilizers. p. 29-292. In: Engelstad, O.P. (ed.). *Fertilizer Technology and Use*. 3<sup>a</sup> ed. SSSA, Madison, Wis.
- Bronson, K.F. 2008. Forms of inorganic nitrogen in soil. p. 31-55. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Coyne, M.S. 2008. Biological denitrification. p. 201-253. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Dahnke, W.C., Johnson, G.V. 1990. Testing soils for available nitrogen. p. 127-139. In: Westerman, R.L. (ed.). *Soil Testing and Plant Analysis*. 3<sup>a</sup> ed. SSSA, Madison, Wis.
- Fox, R.H., Walthall, C.L. 2008. Crop monitoring technologies to assess nitrogen status. p. 647-674. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Francis, D.D., Vigil, M.F., Mosier, A.R. 2008. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. p. 255-279. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Hong, S.D., Fox, R.H., Piekielek, W.P. 1990. Field evaluation of several chemical indexes of soil nitrogen availability. *Plant Soil* 123: 83-88.
- Jalil, A., Campbell, C.A., Schoenau, J., Henry, J.L., Jame, Y.W., Lafond, G.P. 1996. Assessment of two chemical indices of available nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1954-1960.
- Kissel, D.E., Cabrera, M.L., Paramasivam, S. 2008. Ammonim, ammonia, and urea reactions in soils. p. 101-155. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Lewan, L. 1994. Effects of catch crop on leaching of nitrogen from a sandy soil: simulations and measurements. *Plant Soil* 166: 137-152.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). 1985. *Fertiliser recommendations*. Reference book 209, London.
- Magdoff, F.R., Ross, D., Amadon, J. 1984. A soil test for nitrogen availability to corn. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48: 1301-1304.
- Meisinger, J.J., Bandel, V.A., Angle, J.S., O'Keefe, B.E. 1992. Presidedress soil nitrate evaluation in Maryland. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 1527-1532.
- Meisinger, J.J., Schepers, J.S., Raun, W.R. 2008. Crop nitrogen requirements and fertilization. p. 563-612. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Mengel, K. 1991. Available nitrogen in soils and its determination by the 'Nmin-method' and by electroultrafiltration (EUF). *Fert. Res.* 28: 251-262.

- Mengel, K., Kirkby, E.A. 1987. Principles of plant nutrition. 4<sup>a</sup> ed. International Potash Institute, Bern, Switzerland.
- Mulla, D.J., Strock, J.S. 2008. Nitrogen transport processes in soil. p. 361-400. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Munson, R.D., Nelson, W.L. 1990. Principles and practices in plant analysis. p. 359-387. In: Westerman, R.L. (ed.). Soil Testing and Plant Analysis. 3<sup>a</sup> ed. SSSA, Madison, Wis.
- Myrold, D.D., Bottomley, P.J. 2008. Nitrogen mineralization and immobilization. p. 157-172. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Németh, K. 1985. Recent advances in EUF research (1980-1983). *Plant Soil* 83: 1-19.
- Norton, J.M. 2008. Nitrification in agricultural soils. p. 173-199. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Olk, D.C. 2008. Organic forms of soil nitrogen. p. 57-100. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Rodrigues, M.A. 2000. Gestão do azoto na cultura da batata: estabelecimento de indicadores do estado nutritivo das plantas e da disponibilidade de azoto no solo. Diss. Doutoramento. UTAD. Vila Real.
- Rodrigues, M.A. 2004. Establishment of continuous critical levels for indices of plant and pre-sidedress soil N status in the potato crop. *Commun. Soil Sci. Plant Analysis*, 35 (13 & 14): 2067-2085.
- Rodrigues, M.A., Coutinho, J., Martins, F. 2002. Efficacy and limitations of triticale as nitrogen catch crop in a Mediterranean environment. *European Journal of Agronomy*, 17/3: 155-160.
- Rodrigues, M.A., Coutinho, J., Martins, F., Arrobas, M. 2005. Quantitative sidedress nitrogen recommendations for potatoes based upon crop nutritional indices. *European Journal of Agronomy* 23/1: 79-88.
- Rodrigues, M.A., Coutinho, J., Martins, F., Soutinho, J.C. 2001. Fertilização azotada da batateira. Produtividade e aspectos qualitativos da cv. Désirée. *Revista de Ciências Agrárias*. Vol. XXIV (3 & 4): 184-192.
- Rodrigues, M.A., Santos, H., Ruivo, S., Arrobas, M. 2010. Slow-release N fertilisers are not an alternative to urea for fertilisation of autumn-grown tall cabbage. *European Journal of Agronomy*, 32 (2): 137-143.
- Russelle, M.P. 2008. Biological dinitrogen fixation in agriculture. p. 281-359. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Santamaria, P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J. Sci. Food. Agric.* 86: 10-17.
- Santos, J.Q. 1996. Fertilização – Fundamentos da utilização dos adubos e correctivos. Publ. Europa-América, Mem Martins.
- Schepers, J.S., Francis, D.D., Vigil, M., Below, F.E. 1992. Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23 (17-20): 2173-2187.
- Singh, J.P. 1993. Tissue analysis technology for nitrogen fertilization of potato grown under subtropics short day conditions. *Fert. Res.* 36: 19-27.
- Stanford, G., Smith, S.J. 1972. Nitrogen mineralization potentials of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36: 465-472.

- Trenkel, M.E. 2007. Ullmann's Agrochemicals. Fertilizers, Vol. 3. Wiley-VCHVerlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (chapter 4 and 5).
- Trindade, H. 1997. Fluxos e perdas de azoto em explorações forrageiras intensivas de bovinicultura leiteira no Noroeste de Portugal. Diss. Doutoramento. UTAD, Vila Real.
- Varenes, A. de. 2003. Produtividade dos solos e ambiente. Escolar Editora, Lisboa.
- Voroney, P., Derry, D. 2008. Origin and distribution of nitrogen in soil. P. 1-30. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Waring, S.A., Bremner, J.M. 1964. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of soil availability. *Nature* 201: 951-952.
- Westcott, M.P., Cash, S.D., Jacobsen, J.S., Carlson, G.R., Welty, L.E. 1998. Sap analysis for diagnosis of nitrate accumulation in cereal forages. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29 (9 & 10): 1355-1363.



## **Biodiversidad y comportamiento agronómico de genciana (*Gentiana lutea*, L.) de la montaña occidental de León**

**O. González<sup>1</sup>; F. Varela<sup>2</sup>; A. Cases<sup>2</sup>; M.F. Marcos<sup>1</sup>; M.P. Campelo<sup>1</sup>; A. Lorenzana<sup>1</sup>; J.B. Valenciano<sup>1</sup>; S. Mayo<sup>1</sup>; A. Rodríguez<sup>1</sup>; O. Rada<sup>3</sup>; P.A. Casquero<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Recursos Naturales. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Universidad de León*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Plantas Aromáticas y Medicinales. Departamento de Medioambiente INIA, Madrid.*

<sup>3</sup>*Dirección General del Medio Natural. Junta de Castilla y León.*

### **Resumen**

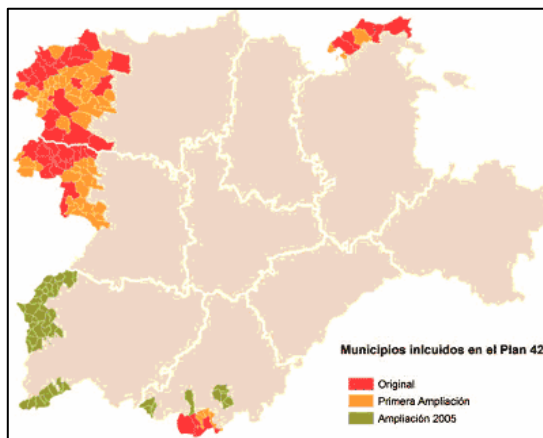
El objetivo del proyecto es el conocimiento de la variabilidad de *Gentiana lutea* (genciana) en la montaña occidental de León y el establecimiento de cultivos regulares a partir del estudio de las poblaciones silvestres presentes en las comarcas leonesas de Laciana, Omaña y Babia, posibilitando con ello su aprovechamiento sostenible. Se han localizado las poblaciones silvestres, tomando muestras de material vegetal (semillas y sistema radicular), para obtener las concentraciones en principios activos presentes en las raíces mediante técnicas de cromatografía HPLC; principalmente concentraciones de compuestos amargos como la amarogencina y genciopirina. Del mismo modo se han tomado muestras de suelo para conocer las características de aquellos en los que se desarrollan las diferentes poblaciones. Paralelamente se realizan diferentes ensayos agronómicos para determinar la capacidad germinativa y de multiplicación de la genciana a partir de semilla, utilizando para ello diferentes tratamientos pregerminativos y obteniendo plantas que son utilizadas para establecer parcelas experimentales dentro y fuera de su hábitat, con el fin optimizar las técnicas para su cultivo regular. Con todo ello se pretende identificar las poblaciones más aptas para el cultivo regular y que posean mayores concentraciones en principios activos.

**Palabras-clave:** *Gentiana lutea*, aprovechamiento sostenible, principios activos, cultivo regular, amarogencina.

## Introducción

### Antecedentes

Este estudio se enmarca dentro del Plan 42. Este Plan surge como medio de prevención de incendios forestales por iniciativa de la Consejería de Medio Ambiente a raíz de un estudio, en el cual se pone de manifiesto que el 40% de los incendios forestales sufridos en Castilla y León entre 1995 y 1999, se originaron en 42 municipios (Figura1), lo cual corresponde solamente al 1,9 % del total de municipios



Castellano-Leoneses (Memoria Plan 42., 2002). Este Plan, posteriormente ha sido ampliado en dos fases llegando a contener a 154 municipios de la geografía de la Comunidad Autónoma.

Figura 1: Municipios de Castilla y León incluidos en el Plan 42. Fuente: Consejería de Medio Ambiente JCyL

El principio fundamental del Plan 42 es el desarrollo económico de las zonas afectadas repetidamente por incendios forestales como influencia para la disminución de los mismos, siendo una de las medidas para su consecución el apoyo a la generación de proyectos e iniciativas de desarrollo rural sostenible que incidan favorablemente en la conservación y gestión de los montes, así como la valoración social de los mismos. Uno de estos proyectos es el estudio de las poblaciones silvestres de genciana y su adaptación agronómica.

### APROGEN

La "Asociación Promotora de la Genciana y otras plantas de interés de la montaña occidental leonesa", es creada en marzo de 2006 en Villablino (León). Surge a partir del "Proyecto Genciana", puesto en marcha entre los años 2005 y 2006 por cuatro ayuntamientos de la zona (Palacios del Sil, Villablino, Cabrillanes y Murias de Paredes), con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre las plantas de interés económico de la montaña de León, en particular la genciana (*Gentiana lutea* L.), y el arándano (*Vaccinium myrtillus*), y a través de ellas crear una base de iniciativas económicas viables que conlleven su aprovechamiento sostenible. Esto es posible debido, a una subvención de "Nuevos Yacimientos de Empleo", otorgada por Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, y al apoyo, tanto técnico y humano del Plan 42.

## Aprovechamiento

En España, la recogida indiscriminada de genciana ha llevado a la regresión de la especie en algunas regiones, por lo que se considera una especie amenazada.

Se encuentra legalmente protegida en toda Europa, pero no existe una legislación uniforme, de modo que esta varía entre países, e incluso, como ocurre en el caso de España, entre las diferentes comunidades.

A nivel europeo, la *Gentiana lutea* L. aparece citada en la Directiva 92/43 CEE de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. Además, el Reglamento 338/97 CEE (modificado por multitud de reglamentos), relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio, y regula los aspectos de aprovechamiento y comercialización de la genciana entre otras plantas.

En España, el aprovechamiento de la genciana está regulado, de igual manera que el de cualquier otra planta, tanto por la Ley 4/89 de Conservación de los Espacios Naturales y de la Flora y Fauna Silvestres, (derogada el 15 de diciembre de 2007), como por la Ley de Montes.

A su vez, en Castilla y León, la genciana se encuentra en la categoría "con aprovechamiento regulado", donde se incluyen las especies cuyo uso, aprovechamiento o recolección incontrolados pueden poner en riesgo la supervivencia de sus poblaciones.

## Genciana. Descripción general

### Nomenclatura

Pertenece al Orden Gentianales y a la familia Gentianaceae, la *Gentiana lutea* L, tiene diferentes sinónimos como genciana amarilla, genciana mayor, gengiba, junciana, unciana, xaranzana. León: janzana ó janciana. Gallego: xenzá. Catalán: gençana. Vasco: errosta (Renovales, 2003), o xensá en Portugal.

### Características morfológicas

La genciana es una planta herbácea, perenne la cual brota cada año en primavera, floreciendo entre junio y agosto; aquellas que lo hacen, y pudiendo secarse su parte epífita por condiciones ambientales desde julio hasta el inicio del invierno.

Los tallos son cilíndricos, huecos, erectos, lampiños, con estrías longitudinales y caducos, de 1 o 2 centímetros de grosor, o más en la base, y de 0,5 a



Figura 2: *Gentiana lutea* L. en flor.  
Fuente: Mirna ed Attilio Marzorati

1,30 metros de altura, de un verde claro (Renovales, 2003).

Las hojas son abrazadoras (Figura 2), opuestas y ovaladas apuntadas. Las inferiores más grandes, de hasta 30 centímetros de longitud por 15 centímetros de anchura, enteramente lampiñas. Cada hoja tiene cinco o siete nervios muy visibles, que arrancan de la base, se arquean y confluyen en el extremo de la lámina. Las hojas de lo alto del tallo son mucho más cortas y en sus axilas nacen las flores aglomeradas, de manera que forman un ramillete interrumpido en lo alto del tallo. Los ramilletes florales se componen de tres a cinco grupos de flores (Font Quer., 1999).



Figura 3 Detalle fruto *Gentiana lutea* L.

Posee flores hermafroditas, con un cáliz persistente, de color pajizo, en forma de cucurucho, y culminado por 3 dientes. La corola varía su color desde el amarillo al rojizo. La polinización es entomófila, siendo realizada principalmente por abejas y avispas (Renovales, 2003).



Figura 4: Raíz de *Gentiana lutea* L.

El fruto (Figura 3) es una cápsula ovoide y picuda, abierto por una hendidura longitudinal y con numerosas semillas discoideas, de color marrón claro, comprimido y aladas. El peso de 1000 semillas supone entre 0,7 y 1,7 g. Las semillas poseen una dormancia que dificulta su germinación así como también poseen una breve duración de su capacidad germinativa (Aiello et al., 1998)

Su raíz (Figura 4) es larga, de hasta un metro. Con un grosor de hasta 8 cm, posee unos internudos muy cortos. Su apariencia exterior varía con la edad teniendo un color que va pasando del amarillento al pardo. Su color interior es amarillento ocráceo. Posee un olor fuerte y un sabor especialmente amargo.

### **Subespecies y variedades**

La familia Gentianaceae tiene su origen en Asia. El Himalaya y los altiplanos sinotibetanos constituyen su centro de diversificación y de dispersión.

La especie tipo de *Gentiana lutea* definida por Linneo en 1753 es la subespecie *lutea*, y está presente en toda el área de distribución. En la Península Ibérica podemos encontrarla en los Pirineos y en la Cordillera Cantábrica, desde el País Vasco hasta la zona más oriental de la provincia de León. También en Portugal, aunque en menor cantidad se pueden encontrar en las montañas de Trás os montes y Serra da Estrela.

*Gentiana lutea ssp lutea* puede ser confundida con la *ssp. aurantiaca* (Lainz., 1982) cuando ambas carecen de flores, ya se distingue de la especie tipo por el color de las flores, intensamente naranja oscuro y no amarillo. Su área de distribución está limitada a la Cordillera Cantábrica (se encuentra en la zona más occidental de la provincia de León) y al Lago Laurenti en el Pirineo Occidental.

En Asturias y León, donde están presentes las dos subespecies: *G. lutea ssp. lutea* y *G. lutea ssp. aurantiaca*, han sido hallados individuos que presentan caracteres de colores intermedios entre las dos subespecies por lo que existe la hipótesis de un nuevo híbrido o "forma intermedia" entre *G. lutea ssp. lutea* y *G. lutea ssp. aurantiaca*. (Anchisi., 2008).

### Ecología

La genciana es una planta que se encuentra en los pastizales y laderas de las montañas, en los pisos altimontano y subalpino del centro y sur de Europa y de Asia Menor. En Italia se localiza en los Apeninos y los Alpes; en Francia en Jura y en el Macizo Central, en poblaciones como Auvergne, y en los Alpes; en Alemania en Baviera; en la región de los Balcanes y en los Cárpatos. En España se encuentra en el Pirineo, desde Cataluña hasta el País Vasco; en la Cordillera Cantábrica hasta Galicia; en las montañas del Sistema Central; y en Portugal en la Serra da Estrêla. (Aiello y Bezzi., 1998).

Crece frecuentemente entre los 800 y 1800m: Alpes (1300-1900 m), Auvernia (1800 m) Cárpatos (900-2300m), Pirineos y otras regiones montañosas de elevada pluviosidad del Norte de España (Villar, 1980; Bolós et al., 1990). En León, en estado silvestre, no es frecuente encontrarla por debajo de los 1300 m. Precisa de suelos frescos con una climatología suficientemente lluviosa. Prefiere zonas soleadas (Figura 5) y luminosas, ya que se trata de una planta heliófila.



Figura 5: Población *Gentiana lutea* L. Babia (León)

Por su fisiología y su hábitat está adaptada tanto a periodos de sequia como a estancias prolongadas bajo del manto nevoso.

Prefiere suelos profundos y francos, turbosos y ligeramente humíferos. El pH de los terrenos en los que vive varía desde 4 a 7,5-8.

En León suele estar acompañada de una importante flora asociada como escobas y piornos, arandaneras, carqueixas, pastizal y formando parte del sotobosque de robles, abedules y serbales.

### Ecología

El nombre de la genciana hace referencia al Rey Gentio de Iliria, que según la tradición, fue el primero en utilizarla (Tucakov, 1962), contra la peste. Este hecho es atribuido por los

autores clásicos Dioscórides y Plinio (Heltman, 1967). El efecto fundamental de la genciana se basa en sus contenidos amargos.

El mecanismo de actuación gástrica tiene dos fases: una en la cual se produce una acción inhibitoria de la secreción gástrica inicial a la que sigue la posterior verdaderamente estimulante (San Martín, 1977). Esto produce tanto la secreción salival como secreción gástrica, además de un aumento de la motilidad estomacal.

Su uso farmacológico se basa en la raíz "Radix Gentianae" y tiene variadas indicaciones:

- Tónico digestivo, prescrito para indigestiones, ya que aumenta la secreción gástrica, lo cual facilita la digestión y aumenta el apetito. El principal componente responsable de estas propiedades es la amarogencina. La genciopirina y la inulina tienen propiedades gastroestimulantes, mientras que la swertiamarina estimula el páncreas.

- Indicado especialmente en casos de inapetencia, atonía digestiva, debilidad y fatiga, así como en la convalecencia de enfermedades agudas, donde actúa como un buen reconstituyente que restaura la fuerza del organismo.

- Posee una sustancia activa (el carvacrol) contra los gusanos intestinales. Resulta particularmente efectiva en el caso del paludismo (malaria) donde es capaz de destruir los protozoarios causantes de la enfermedad que parasitan los glóbulos rojos de la sangre.

- Muestra actividad hemostática, antipirética, anti-inflamatoria y cicatrizante.

## **Usos**

Además de su uso farmacológico, la genciana es muy utilizada en Europa para la elaboración de licores y bebidas amargas aperitivas.

Los extractos de raíz de genciana en bebidas amargas como sustituta de la corteza de quina (cuya utilización en la alimentación está limitada a la concentración final de quinina), ha llevado al desarrollo de varias patentes industriales (Piampiano, 1980; Molitoris, 1981, Busch-Stockfisk y Domke, 1993).

En veterinaria se ha usado tradicionalmente como cicatrizante, antiparasitario y para estimular los animales a comer más, utilizándolo como aditivo en piensos (García et al., 2004).

## **Principios activos**

Como esta descrito anteriormente, la *Gentiana lutea* es muy apreciada por sus propiedades amargas, las cuales vienen determinadas por un *índice de amargor* (BI), parámetro sensorial que se determina mediante una dilución máxima a la cual todavía se detecta organolépticamente su sabor amargo (U.N.E., 1979; Farmacopea Europea, 1992).. Algunos ejemplos de estas plantas que se utilizan como drogas amargas son: el leño de

cuasia, *Quassiae Lignum* (BI=40-50x103); raíz de genciana *Gentiana Radix* (BI=10-30x103) o la corteza de quina *Chinae Cortex* (BI=1000).

Uno de los principios activos que contiene la genciana, la amarogencina, está catalogado como la sustancia más amarga de origen natural que se conoce (BI= 58x106). (H. Wagner et al., 1984)

La composición química muestra una gran variabilidad en cuanto al número de compuestos. Por orden de importancia son: Compuestos amargos, compuestos aromáticos, glúcido y otros.

### **Compuestos amargos y distribución**

Los compuestos amargos que se han identificado en las raíces y rizomas de *Gentiana lutea* son la amarogencina ( Bouquerlot y Bridel, 1910), la genciopirina (Kromeyer, 1862) y la swertiamarina ( Bricout, 1974).

En cuanto a su distribución, en las semillas aparecen: la genciopirina, swertiamarina, swerósido y ácido logánico. Tanto la genciopirina como la swertiamarina entre otros compuestos están presentes en toda la planta, no así la amarogencina, que es el componente amargo más importante, que sólo se encuentra en la raíz y rizomas (Leiton., 1996). Los compuestos amargos no se distribuyen de manera uniforme en la raíz y rizomas de la genciana. En general, existe una acumulación superior de dichos compuestos en la peridermis (Leiton., 1996) tiempo.

### **Influencia del secado y almacenamiento de la raíz**

La raíz destinada al comercio, tradicionalmente ha sido secada. Este proceso se realiza al aire libre durante un mes en el que las raíces toman un color interno rojizo. Posteriormente almacenan durante un año para su comercialización. Suelen ser estas las raíces utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas aromáticas.

El secado de las raíces va a afectar en diferente medida a los componentes de la planta. En algunos casos se realiza un triturado previo al secado. De esta manera se produce una degradación de hasta el 95% de la genciopirina presente, no así el de amarogencina, que no se ve afectado por este proceso.

## **Material y Métodos**

### **Planificación de la recolección**

La planificación de la recolección ha partido del "Inventario de poblaciones silvestres de genciana" de APROGEN donde se cuenta con una cartografía detallada de la zona de

actuación y el apoyo de cartografía 1:25.000 del Instituto Geográfico Nacional. El acceso a las poblaciones se hace mediante un todo terreno, y en ocasiones a pie los últimos tramos. Se han preestablecido las rutas así como contado con material de extracción, almacenamiento, registro escrito y gráfico, así como un Sistema de Posicionamiento Global para la localización exacta de las poblaciones.

### Recolección de muestras

En cada una de las 42 poblaciones visitadas se han recogido muestras de más de 50 g de raíces (Figura 6), procedentes de cuatro plantas elegidas al azar, para el establecimiento de la variabilidad química de la especie. También se ha extraído una muestra de suelo de aproximadamente 500 g representativa de cada población y suficiente para la realización de los análisis.



Figura 6: Raíz Recién obtenida de *Gentiana lutea* L. conocedores del entorno.

Por último se han recogido 5g de semilla para el mantenimiento de una colección de poblaciones de genciana de la montaña noroccidental leonesa, conservada en el centro de Recursos Fitogenéticos del INIA, así como para la realización de pruebas de germinación y multiplicación de la planta.

En la recolección se ha contado con habitantes de la zona y miembros de APROGEN,

### Procesado de las semillas

Las semillas de genciana se encuentran dentro de la categoría de semillas ortodoxas, luego la conservación se basa en su almacenamiento en condiciones de baja temperatura y bajo contenido de humedad interna.

En primer lugar cuando las muestras llegan al banco de germoplasma se registran (Figura 7) y se limpian. Deben estar exentas de semillas infectadas, semillas vacías, semillas extrañas a la muestra o cualquier otro tipo de impurezas. La limpieza se realiza con columnas de aire o con cribas para, acabándose normalmente de forma manual. Posteriormente, las semillas deben desecarse lo más pronto posible, siendo el método de secado más adecuado, el realizado en una atmósfera de humedad relativa entre 10-15 % conseguida con



Figura 7: Semillas secas de *Gentiana lutea* L. envasadas

deshumidificadores y temperatura entre 10-25 °C, hasta conseguir un contenido de humedad de la semilla del 5%.

Las semillas una vez desecadas son envasadas en contenedores a prueba de humedad, manteniéndose de esta forma cada muestra individualizada y evitándose contaminaciones por plagas o enfermedades. La colección base se almacenará a temperaturas en torno a -18 °C y la activa a -4 °C.

## **Análisis de los principios activos en raíz**

### **Procesado y conservación de las muestras**



Figura 8: Muestras limpias de *Gentiana lutea* L.

Una vez en el laboratorio (Figura 8) se ha procedido a la limpieza de las raíces mediante cepillado de las mismas con cepillo de cerdas duras, hasta eliminar todo vestigio de tierra y el máximo de polvo posible, y posteriormente se ha sometido a un lavado con agua fría para la optimización de la limpieza (Figuras 9 y 10) . Para el secado del material vegetal se utilizaron condiciones de temperatura en estufa a 35°C. El tiempo de secado es variable (48-96h) debido al

alto contenido en agua de las raíces.



Figura 9 Muestra de raíces jóvenes de *Gentiana lutea* L.



Figura 10 Muestra raíz central *Gentiana lutea* L.

### **Preparación de los extractos**

Las muestras secas se muelen mediante un molino de martillos utilizando un tamiz de 1mm y se guardan correctamente etiquetadas, conservándose en un desecador para evitar la reabsorción de agua, ya que se trata de un producto altamente higroscópico.

Los extractos metabólicos se obtuvieron por extracción mecánica, en un extractor Soxhlet (1g. de muestra/ 50 ml. de metanol) durante 160 minutos.

Posteriormente la suspensión es filtrada, se elimina el marco, y el extracto se evapora en rotavapor a 38 °C, hasta eliminar todo el metanol. El extracto obtenido por desecación se diluye en 5 ml de metanol para HPLC, se filtra a través de filtro de 0.5µm y se conserva en viales topacio y en nevera, hasta su análisis.



Figura 11: Realización del extracto mediante Soxhlet.

### **Análisis Químico de genciana**

Los extractos metabólicos han sido analizados mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), para la determinación de los componentes característicos de la genciana (Aberham et al, 2007; Ando et al, 2007).

Mencionados anteriormente, los componentes de mayor interés en la genciana están presentes en la raíz, y son los compuestos amargos. La amarogencina (AG) y gentiopicrósido (GP) son los más importantes.

Otros componentes analizados son ácidos fenólicos y flavonoides, con actividad antioxidante.

### **Análisis de Suelo**

El análisis de suelos ha sido realizado por el Laboratorio de técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para el análisis de las muestras de suelo se utilizaron los métodos oficiales de análisis propuestos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994).

## **Resultados y Discusión**

### **Análisis de Suelo**

Como se puede observar (Tabla 1) los suelos en la zona de estudio presentan una estructura franca o franco arenosa, con un pH ácidos o muy ácidos, mientras que los suelos analizados por Bezzi (1987), en

Tabla 1. Características de los suelos analizados.

<b>Componente</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Intervalo</b>
Arena (%)	55,1	8,29	38,00 - 74,00
Limo(%)	41,05	8,28	20,00 - 56,00
Arcilla (%)	3,81	2,11	2,00 - 12,00
pH	4,18	0,32	3,57 - 4,99
MO (%)	17,9	6,62	9,14 - 36,24

poblaciones alpinas recolectadas cercanas a Trento poseen un pH entre 7 y 7,50.

### **Análisis Químico de *Gentiana lutea* L.**

Los datos (Tabla 2) muestran los contenidos en amarogencina y genciopirina presentes en las muestras analizadas. Comparando estos datos con los presentados por Leiton (1996), que, estudiando poblaciones de las montañas centro y este de la Península Ibérica, obtiene concentraciones de amarogencina entre 0,25 y 1,14 mg/g, mientras que para genciopirina las concentraciones obtenidas varían desde 37,3 a 67,5 mg/g. Bezzi Bezzi (1987) analizando poblaciones alpinas cerca de Trento describe concentraciones de amarogencina entre 0,2 y 1,25 mg/g, y para genciopirina entre 30 y 65,6 mg/g.

Tabla 2. Concentraciones de los principales compuestos amargos y altitud.

<b>Componentes</b>	<b>Media (mg/g)</b>	<b>Rango (mg/g)</b>	<b>Desviación estandar</b>
Genciopirina	23,16	8,18 - 32,11	4,9562
Amarogencina	1,32	0,09 - 2,57	0,6726
	<b>Media (m)</b>	<b>Rango (m)</b>	<b>Desviación estandar</b>
Altitud	1739	1508-1945	108

Como se puede comprobar (Tabla 2) la localización de las poblaciones está por encima de los 1500m de media y, aunque por debajo de esta altitud hay plantas de genciana, no constituyen hasta ahora poblaciones dignas de reseñar.

### **Conclusiones**

La genciana en la montaña noroccidental leonesa se desarrolla en suelos de pH ácido, con elevados contenidos en materia orgánica y una estructura franco-arenosa caracteres que deben ser tenidos en cuenta a la hora de elegir las parcelas para su cultivo regular.

Los análisis de las muestras de las diferentes poblaciones de *Gentiana lutea* muestran concentraciones en amarogencina elevados, superiores a los análisis presentados para otras zonas de Europa.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León la financiación del proyecto y a la asociación APROGEN la colaboración en su desarrollo.

## Referencias

- Aberham, A., Schwaiger, S., Stuppner, H., Ganzera, M. 2007. *Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthonoids and xanthonoid glycosides in Gentiana lutea L. roots by RP-HPLC and LC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 45: 437-442.
- Aiello, N. y Bezzi, A. 1998: *Genziana maggiore (Gentiana lutea L.): aspetti biologici, qualitativi e produttivi*. Agricoltura Ricerca XX (176) : 8-17.
- Anchisi, E. 2008: *Gentiana lutea L. La variabilità morfologica e le sue ibridazioni interspecifiche*. Notiziario dell'Associazione Internazionale Giardini Botanici Alpini. Congresso A.I.G.B.A. Parco Naturale Adamello Brenta, 31-39.
- Ando, H., Hirai, Y., Fujii, M., Hori, Y., Fukumura, M. 2007. *The chemical constituents of fresh gentian root*. Journal of natural medicines, 61 (3): 269-279.
- Bolós, O., Vigo J., Masalles, R.M. y Ninot, J.M. 1990. *Flora manula dels Paisos Catalans*.
- Bourquelot, E. y Bridel, M. 1910. *Sur la présence de la gentiopicroína dans les racines et dans les tiges foliées de la Gentiana pneumonante L.* Journal de Pharmacie et de Chimie, 2:149-153
- Bricout, J. 1974. *Identification et dosage des constituants amers des racines de Gentiana lutea L.* Phytochemistry 13:2819-1823.
- Busch-Stockfish, M. y Dome, Dome. 1993. *Sensorische beurteilung des Bittergeschmacks von Amarogentin und Austauschmöglichkeiten gegen Chinin in Erfrischungshetränken*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 196:225-258.
- Consejo de Europa. Ministerio de Sanidad y Consumo, 1992 *Farmacopea Europea*, 5:392.
- Font Quer, P., 1999: *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. Ed. Península.
- Foto Mirna ed Attilio Marzorati. [http://luirig.altervista.org/schedeit/fo/gentiana\\_lutea.htm](http://luirig.altervista.org/schedeit/fo/gentiana_lutea.htm).
- García M.J., Hernández A., Liñán O., Méndez G., 2004. *Estudio sobre el aprovechamiento de la genciana (Gentiana lutea lutea.) y otras plantas de interés económico en la montaña occidental leonesa*. 19-135.
- Heltmann, H. 1967. *La gentiane (Gentiana Lutea): une importante plante médicinaleet alimentaire*. Nature Série Biologie nº1.
- Junta de Castilla y León, Medio Ambiente: *Memoria del Plan 42*.<http://www.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1132926921318/> (Consulta 21/08/2010)
- Kromeyer, A. 1862. *Archiv der Pharmazie*. 110:27
- Laínz, M. 1982. *Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias*. Diputación Provincial de Asturias, Instituto de Estudios Asturianos (C.S.I.C). Oviedo.
- Leiton, M.J. 1996. *Compuestos amargos y aromáticos de Gentiana lutea L.* Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 1994. *Métodos oficiales de análisis*. Tomo II. Madrid.
- Molitoris, K. 1981. *Alternative für Chinin in Bittergetränken*. Branwelt, 121:323-335
- Piampiano, C. 1980. *Means and method improving taste of saccharine sweetened food products*. United States Patent 4219579.
- Renobales, G. 2003. *Notas acerca del tratamiento de las Gentianaceae para Flora Ibérica*. Anales Jardín Botánico Madrid 60(2): 461-469.
- San Martín, R. 1977. *Tratado de Farmacognosia*, 373-384. Editorial Científico-Médica, Barcelona
- Tucakov, J. 1962. *La Gentiana lutea L. in Jugoslavia*. Rivista Eppos, 60-62.

Una Norma Española. 1979. *Análisis sensorial. Prueba de agudeza gustativa para los cuatro sabores elementales. UNE 87-003-79*. Instituto Nacional de Racionalización y Normalización. CDU 612.87.001.1. Madrid

Villar, L. 1980. *Catálogo florístico del Pirineo occidental español*, 217-219.

Wagner, H., Blatt, S. y Zgainski, E.M. 1984. *Plant Drug Analysis*. Berlin:Springer-Verlag.



## **Bases ecológicas para el aprovechamiento de especies silvestres. El caso de tres especies mexicanas**

**J.A.C. Rodríguez<sup>1</sup>; A.H. Tapia<sup>1</sup>; D.A. López-Carmona<sup>1</sup>; A.X. Padilla<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Agroecología, Universidad Autónoma Chapingo, México

<sup>2</sup>Comisión Nacional de áreas naturales protegidas, México

### **Resumen**

La riqueza biológica de México, producto de su posición latitudinal, su variada orografía y una compleja historia geológica, se corresponde con gran diversidad cultural que generó, entre otros aspectos, la aparición de distintas formas de aprovechamiento de la flora y la fauna. Aunque la domesticación de especies, sobre todo de plantas, fue un proceso que alcanzó un gran desarrollo en México, el aprovechamiento de especies silvestres tiene aún una gran importancia. No obstante, que este manejo tiene profundas raíces en el tiempo, la deforestación y la explotación excesiva, colocan a distintas especies en niveles de riesgo preocupantes. En este trabajo se presentan los resultados de estudios de ecología de poblaciones que estiman el impacto del aprovechamiento, en condiciones silvestres, de las siguientes especies: *Manilkara zapota*, que es árbol del que se extrae el chicle o goma de mascar y que desarrolla en las selvas húmedas y subhúmedas del sureste de México. *Echinocactus platyacanthus*, que es una cactácea de cuyo tallo se obtiene el dulce llamado acitrón, que se utiliza en la confección de repostería y que distribuye en las zonas desérticas del centro del país. El pitayo, *Stenocereus stellatus*, que es una cactácea columnar de las selvas secas de la vertiente del pacífico y de la que se aprovechan sus frutos llamados pitayas. En los tres casos se presentan recomendaciones para lograr un manejo sustentable que garantice la persistencia de sus poblaciones y que permita a las comunidades campesinas seguir recolectando sus productos.

**Palabras-clave:** productos forestales no maderables, modelos matriciales, conservación de especies vegetales

## Introducción

La recolección de productos vegetales en ecosistemas naturales (frutos, hojas, raíces, tallos, gomas, pigmentos, resinas, entre otros productos) es una forma de aprovechamiento ampliamente difundida en distintas regiones de México; representa una fuente considerable de recursos económicos (Peters, 1998) y si se realiza de forma sustentable contribuye a la conservación de los recursos naturales y al desarrollo de las comunidades rurales (Peters, 1998; Belky y Siebert, 1995). A este tipo de productos se le conoce genéricamente como productos forestales no maderables (PFNM) y por lo general su recolección se realiza en periodos de descanso de la agricultura, lo que permite al recolector dedicarse a otras actividades. A pesar de que los montos de efectivo que se obtienen por familia son generalmente reducidos un manejo apropiado y sistemático haría que fueran relevantes para economía familiar (Marín, 2004; De la Peña e Illsley, 2001).

Los PFNM generalmente forman parte de la vegetación natural, además, su presencia coincide a menudo con las áreas llamadas de "monte" o terrenos de uso común en ejidos y comunidades, por lo que su presencia está casi siempre asociada con ecosistemas que tienen un cierto grado de conservación (De la Peña e Illsley, 2001). Para la FAO (1995), el aprovechamiento de PFNM, además de beneficios económicos, genera una serie de beneficios ambientales entre los que destacan la preservación de recursos genéticos *in situ* y la conservación de procesos ecológicos esenciales para la persistencia de las especies. Lo anterior se logra gracias a que con frecuencia, su extracción se realiza sin eliminar las plantas y sin transformar significativamente los ecosistemas.

El aprovechamiento de PFNM genera también beneficios culturales, ya que el interés por muchos de estos productos tienen hondas raíces sociales y culturales (tal es el caso de los que se utilizan para hacer artesanías o que se usan como alimento). Cabe destacar, además, que en las actividades de recolección y procesamiento primario de los PFNM participan principalmente las mujeres, situación que permite mejorar substancialmente su condición dentro de la familia rural.

La recolección de PFNM pueden tener mayores efectos sociales que actividades como la ganadería, ya que es altamente demandante de mano de obra y la inversión por unidad de producción es reducida; la mano de obra representa la mayor parte de los costos por producción y llega a ser de alrededor del 96%. (Marín-Cruz, 2004). Aunque la ganadería también requiere de una inversión pequeña genera muy poco empleo. Por lo tanto, la actividad de la recolección genera más empleos con menos inversión. Esto se refleja en mayores beneficios para un mayor número de jornaleros y campesinos (Marín-Cruz 2004).

Sin embargo, para que un sistema de recolección sea sustentable, es decir para que se pueda realizar de forma indefinida en un área específica, se requiere que el impacto sobre la abundancia, distribución y estructura de tamaños de las poblaciones sujetas a aprovechamiento sea el reducido. El efecto final de estos procesos no deben implicar la

generación de tendencias negativas en la tasa de crecimiento poblacional (Peters, 1998; MacNeil, 1989).

La recolección de PFNM por si misma no garantiza un impacto bajo sobre los recursos y el sistema de donde se extraen. Según Peters (1998) esta condición depende de la intensidad y frecuencia de la recolección, la formas de realizarla y del producto que se extrae de la planta. Para ello se debe de tener un plan de aprovechamiento que genere un daño mínimo sobre las especies colectadas y el sistema.

Los análisis demográficos, que evalúan el cambios en la abundancia de una población y los factores que lo determinan, son esenciales para la elaboración de estrategias de manejo y conservación de una especie (Caswell, 1989). Existen diferentes herramientas de análisis demográfico para cumplir con este fin entre las que destacan los llamados modelos matriciales. Estos modelos permiten analizar el impacto de las diferentes etapas del ciclo de vida de una especie en su tasa de crecimiento poblacional (Caswell, 1989); se construyen para especies con ciclos de vida clasificados por edades, tamaños o estadios y su suposición básica es que la dinámica poblacional es satisfactoriamente descrita por los valores promedio de crecimiento, reproducción y supervivencia de los individuos de cada clase (Zagt & Boot, 1997). Permiten examinar el efecto, que sobre la tasa de crecimiento proyectada por el modelo (representada por la letra griega lambda  $\lambda$ ), tienen los cambios en las tasas vitales. Este procedimiento, que se denomina análisis de perturbación, identifica cambios futuros en las tasa de crecimiento poblacional, a partir de datos obtenidos del pasado y se realiza por medio del cálculo de los parámetros denominados sensibilidad y elasticidad (Caswell, 2000). Matemáticamente la elasticidad cuantifica el cambio poblacional en  $\lambda$  que resulta el cambio proporcional infinitesimal en cada valor de la matriz, mientras que todos los otros elementos permanecen constantes. La sensibilidad por su parte, cuantifica el cambio absoluto de  $\lambda$  producto de un cambio absoluto infinitesimal de cada valor de la matriz (Caswell, 1997).

Los modelos matriciales son adecuados para describir la dinámica poblacional cuando los datos son escasos (Heppell *et al*, 2000), y tienen la ventaja de que sus atributos matemáticos pueden ser interpretados en términos biológicos (Caswell, 1989; Cochran & Ellner, 1992). Además, son fáciles de construir, ya que pueden hacerse a partir de descripciones gráficas del ciclo de vida o de datos de individuos que hayan sido seguidos en el tiempo. Su simulación es sencilla dado que la ecuación que los representa,  $\mathbf{n}(t+1) = \mathbf{A}\mathbf{n}(t)$ <sup>1</sup>, puede ser iterada por una simple multiplicación de matrices. Otra ventaja de estos modelos es que permiten incorporar procesos estocásticos tanto ambientales como demográficos (Caswell *et al*, 1997)

Este tipo de análisis es útil para diseñar estrategias de manejo y conservación ya que mediante el se identifica la etapa de ciclo de vida y los parámetros demográficos (tasa de supervivencia, crecimiento y reproducción) de mayor influencia en la dinámica de la población y por lo tanto sobre los que se deben enfocar los esfuerzos de manejo y conservación (Caswell, 1997)

En este trabajo presentaremos algunos resultados del análisis demográfico de tres especies de plantas mexicanas. Los trabajos se han realizado, a lo largo de varios años, por un grupo de investigación del Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Dada la diversidad de ambientes que presenta nuestro país, se ha trabajado en un matorral áridos del estado de Hidalgo, una selva baja caducifolia en el estado de Morelos y una selva mediana subperennifolia de Veracruz.

## La biznaga del acitrón

*Echinocactus platyacanthus* (Link et Otto) es una cactácea silvestre, con forma de tonel, que ha estado sometida a un alto nivel de aprovechamiento, ya que de ella se elabora un dulce típico de las regiones áridas y semiáridas de México llamado acitrón. Esta presión ha obligado a declarar a *E. platyacanthus* como una especie sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2001), como especie vulnerable (UICN, 1991) e incluso como especie amenazada (Hernández y Godínez, 1994). Existen poblaciones de *E. platyacanthus* en varias provincias de la parte central de México y en todos los casos las poblaciones tienen densidades de hasta 1580 individuos por hectárea (Jiménez *et al.*, 2000).

En el Valle del Mezquital, (estado de Hidalgo), se ha encontrado en la comunidad Texcatepec, municipio de Chilcuautla, una población en muy buen estado de conservación, con individuos que presentan un diámetro de hasta 120 cm. En el pasado esta poblaciones fue explotada para elaborar dulce de acitrón, no obstante, la población mantiene una densidad elevada. La comunidad de este ejido tiene la intención de participar en labores de manejo y conservación de esta especie, no obstante, para ello se requiere disponer de información básica que oriente dichas acciones.

Para contribuir a lo anterior se realizó una evaluación que permitió resolver las siguientes cuestiones: ¿Qué cantidad de individuos de esta especie existen en las áreas silvestres del ejido? ¿Qué tipo de distribución espacial presentan? ¿De que tamaño son? ¿Hay condiciones para un repoblamiento natural que garantice la permanencia de la especie? ¿Qué cantidad de individuos pueden ser aprovechados sin afectar la permanencia de la población? Para resolver estas cuestiones se llevo a cabo una evaluación de la población por un periodo de un año a partir de agosto de 2004. Con la información recabada se construyó un modelo poblacional matricial (*sensu* Caswell, 1989) que permitió evaluar el estado demográfico de la población; con dicho modelo se realizaron simulaciones para proyectar el impacto que tendría el aprovechamiento de individuos adultos para obtener acitrón.

En primer lugar se encontró que la especie en esta zona tiene una densidad mayor que las de otras regiones del país (Jiménez *et al.*, 2000; Eguiarte y Jiménez, 1999); sin embargo, sus diámetros y alturas son menores a los consignados para otras poblaciones (Jiménez *et al.*, 2000). El número de individuos con ramificaciones es muy pequeño (menos del 2%); lo anterior es importante ya que las plantas tienden a ramificarse cuando sufren daños físicos (Eguiarte y

Jiménez, 1999 y Jiménez *et al.*, 2000), y es común que los ganaderos las dañen para dejar al descubierto el tejido interno que sirve de forraje a los animales.

La escala espacial a la que se realizó este trabajo no permitió detectar diferencias en la distribución de los individuos ya que las plantas se desarrollan de igual manera en las partes bajas como en las partes altas de la comunidad y en zonas de pendiente ligera o pendiente fuerte. Es importante resaltar que el 70% de los individuos con un diámetro menor a 10 cm se encuentran bajo arbustos y presentan un vigor mayor que aquellos que se localizan en áreas abiertas. La preferencia por establecerse bajo el dosel de otra planta obedece a la modificación microambiental, que las protege de la insolación y de altas temperaturas, y a que en estos sitios se generan islas de fertilidad debido a la mayor acumulación de materia orgánica y nutrimentos. Es necesario resaltar que la cantidad de frutos y semillas por planta está relacionada positivamente con el diámetro y altura de cada individuo.

De acuerdo con el modelo matricial generado la tasa de crecimiento poblacional ( $\lambda = 1.02$ ), es de 2 % anual y las probabilidad anual que tiene un individuo juvenil de transitar a la clase adulta es muy baja, en virtud de que su tasa relativa de crecimiento es pequeña. De acuerdo con los valores de elasticidad la supervivencia de los individuos adultos es el parámetro demográfico de mayor importancia y por lo tanto cambios a demográfica son las que tienen un mayor impacto demográfico. En términos demográficos los individuos grandes son muy importantes, no sólo por su contribución reproductiva, sino porque ellos representan, estadísticamente, a los individuos más "caros" en la población, dado el número de semillas requeridas para producir un individuo de ese estado.

Las simulaciones llevadas a cabo con el modelo matricial (mediante el uso de programa RAMAS STAGE), señalan que el aprovechamiento de los individuos de esta población con el fin de obtener el dulce de acitrón, tendría un impacto demográfico significativo. Sí las condiciones en la que se encuentra la población no cambian, anualmente no se debe aprovechar más del 30% de los individuos de la clase adultos medianos y no más del 7% de individuos adultos más grandes, sino se quiere que la tasa de crecimiento de la población sea menor a uno (lo que implica un decremento de la población).

## El árbol del chicle

El chicozapote, *Manilkara zapota* (L.) Royen (**Sapotaceae**), es una de las especies arbóreas que forman parte del dosel superior de las selvas altas perennifolias y de las medianas subperennifolias de la región sureste de México, Guatemala y Belice (Pennington y Sarukhán, 1998). Esta especie destaca por su gran abundancia; que en algunas zonas es posible encontrar hasta 30 individuos adultos por hectárea, situación que no es común para la mayoría de las especies arbóreas de estos tipos de vegetación (Pennington, 1992). Del chicozapote se aprovechan los frutos, la madera y el látex que se obtiene de hendiduras en el tronco. Este último producto es el de mayor importancia económica, ya que a partir de él se

elabora la goma de mascar, también conocida como chicle. La aparición de las gomas sintéticas, a partir de la década de los 50, provocó un desplome en la demanda de látex de *M. zapota* y por esta razón, en muchas regiones las selvas de chicozapote están siendo desplazadas por áreas de cultivo y pastizales para la cría de ganado (Flores, 1983).

En virtud de que *Manilkara zapota* suele ser dominante en el dosel de la selva (con individuos de 40 metros de altura o más) y además, es fuente de alimento de diferentes especies de animales (Martínez-Gallardo y Sánchez-Cordero, 1997), es fundamental desarrollar estrategias que permitan su manejo y conservación; para lograrlo se necesita comprender sus procesos de establecimiento, crecimiento, supervivencia y reproducción; además, es importante fundamental identificar las etapas más vulnerables de su ciclo de vida, así como los factores físicos y biológicos que determinan la dinámica y estructura de sus poblaciones (Martínez-Ramos y Alvarez-Buylla, 1995). El conocimiento de cómo las tasas de mortalidad, crecimiento y fecundidad varían con la edad, el tamaño de los individuos y con las condiciones ambientales, permite evaluar si las poblaciones persistirán en el tiempo (Hartshorn, 1972; Álvarez-Buylla *et al.*, 1996).

A continuación describiremos brevemente una investigación para evaluar la dinámica poblacional de *Manilkara zapota* en una selva mediana subperennifolia, México, que se localiza en reserva natural denominada Zona de Protección de Flora y Fauna Santa Gertrudis, en el estado de Veracruz, México. Esta selva ha estado protegida de la explotación forestal desde fines del siglo XIX, lo que ha permitido que mantenga áreas con estados de sucesión avanzados. En algunas áreas de la reserva *M. zapota* presenta densidades altas; estas áreas son conocidas como zapotales y por razones etnohistóricas dichos individuos no han estado sometidos a la extracción de. Esto permite tener un referente para estudios que se realicen en aquellas regiones en donde el chicle sigue siendo extraído.

En este trabajo se buscó determinar cuáles son los requerimientos físicos y biológicos que favorecen el proceso de repoblamiento natural de esta especie lo que. Por tal motivo se realizaron evaluaciones de la supervivencia, el crecimiento y la fecundidad en las diferentes etapas del ciclo de vida de la especie, poniendo especial énfasis en las etapas tempranas de su desarrollo. Se aplicaron técnicas del análisis de supervivencia (Lee, 1980), y se obtuvo un modelo matricial con base en tamaños.

Las principales preguntas a resolver a lo largo de este trabajo fueron las siguientes: ¿Cuáles son las condiciones físicas que influyen en el establecimiento, crecimiento y muerte de las plántulas de esta especie? ¿Qué factores biológicos (depredadores, parásitos, patógenos) representan los mayores riesgos de muerte para las plántulas de *M. zapota*? ¿Qué probabilidades tienen los individuos de edades tempranas de sobrevivir y llegar a las etapas posteriores del ciclo de vida? ¿Cómo varían los parámetros demográficos de las diferentes clases de tamaño en la población estudiada y cómo influyen éstos en la tasa de crecimiento de la población? ¿Qué características demográficas de esta especie explican su elevada densidad?

En primer lugar se encontró que las plántulas de *M. zapota*, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las especies de árboles tropicales, tienen tasas anuales de supervivencia muy altas (de más del 70%). Además, no se presentaron efectos significativos del ataque de hongos y herbívoros; dado que estas plantas presentan látex desde edades muy tempranas no son apetecibles para insectos y otros organismos. Las altas tasas de supervivencia generan un banco de plántulas persistente, que aporta constantemente individuos para las clases juveniles. Al abrirse un claro en el dosel estos últimos aceleran su tasa de crecimiento vertical e incrementan sus probabilidades de convertirse en adultos (Cruz-Rodríguez y López-Mata, 2004). Los adultos presentan tasas de incremento diamétrico muy reducidos y su edad se pueden estimar en términos de siglos.

El análisis de elasticidad mostró, sin embargo, que el parámetro supervivencia de adultos presenta los mayores valores de elasticidad y por lo tanto se debe considerar como el de mayor importancia demográfica. No obstante, en años no reproductivos, la importancia demográfica de los adultos tiende a disminuir y se incrementa la importancia de los prereproductivos.

En convencional, la mayor atención en las estrategias de manejo y conservación se deben poner en las clases con los valores de elasticidad más altos, sin embargo, un problema surge de esta situación: ¿cómo elevar el valor de la tasa de crecimiento  $\lambda$  si la supervivencia de adultos y de los prereproductivos es prácticamente del 100 %? Cuando eso ocurre elasticidades tan altas no son particularmente informativas para aspectos de manejo, dado que no podemos incrementar la supervivencia de esas clases. Además, si se requiere incrementar  $\lambda$  no es suficiente con prolongar la vida de estos individuos ya que se requiere aumentar la incorporación de nuevos individuos y evitar así que la población disminuya.

Un patrón más o menos general muestra que los parámetros demográficos con varianzas altas poseen una elasticidad baja (Mills *et al.*, 1999). Debido a lo anterior el análisis del impacto de los elementos de la matriz en  $\lambda$  no se debe basar únicamente en los valores medios de la elasticidad, ya que es necesario considerar la contribución de cada parámetro a la varianza de la tasa de crecimiento  $\lambda$  (Zuidema y Franco, 2001). Esto hace más compleja la identificación de las fases del ciclo de vida que más influyen en la tasa de crecimiento poblacional y sobre las que deben dirigir los esfuerzos de manejo y conservación. Para mejorar lo anterior es necesario identificar si la variación en los parámetros es provocada por la variabilidad ambiental o por la calidad del hábitat, ya que esta última condición es susceptible de ser modificada.

Como método alternativo se tiene el Análisis de perturbación estandarizado en la varianza (Zuidema y Franco, 2001), que considera la variabilidad en los parámetros demográficos que puede ser generada por diferencias genéticas o fenotípicas de los individuos de la población y por variaciones en las condiciones microambientes. En virtud de que procesos demográficos con baja elasticidad, pero con alto grado de variación producen, potencialmente, más variación en la tasa de crecimiento poblacional, que aquellos procesos

con elevada elasticidad y baja variabilidad, la identificación de la tasa vital con la mayor influencia en la tasa de crecimiento poblacional difiere de la sugerida por el análisis de elasticidad. En el caso de *M. zapota* el análisis de elasticidad indica que la permanencia y la supervivencia de adultos tendría la mayor importancia relativa en cuanto los efectos en  $\lambda$ , sin embargo, en el análisis estandarizado en la varianza la supervivencia de plántulas, que son las que conforman en grueso de la población, la supervivencia de las primeras etapas de juveniles y la fecundidad individual de los adultos, provocan mayor grado de variación en  $\lambda$ , situación que obliga a considerarlas en los programas de manejo y conservación de la especie (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2009).

## Las pitayas, frutos de gran valor

Los frutos del pitayo (*Stenocereus stellatus* Pfeiffer (Britton & Rose) Cactaceae), son un valioso recurso para los habitantes de las comunidades de la Sierra de Huautla, en el estado de Morelos. Aunque existen huertos en los que se cultivan dicha especie, el grueso de la producción se obtiene de la recolección de frutos en poblaciones silvestres. Al igual que en otras regiones del país las pitayas (nombre con el que se conoce a estos frutos) se comercializan en los mercados locales y representan una importante fuente de recursos económicos que complementan los ingresos de los campesinos. Existen indicios de domesticación de algunas poblaciones naturales de *Stenocereus pruinosus* y *S. stellatus*, lo que ha favorecido el desarrollo de plantas con características especiales. En general, las especies antes mencionadas muestran amplia variación morfológica y tienen múltiples usos: fruto consumible, cercos vivos, control de erosión y combustible (Casas *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2001).

En áreas con alta densidad de pitayos, como es el caso de la comunidad de Pizotlán, con un promedio de 350 individuos por hectárea (que incluyen tanto plantas adultas como juveniles), se estima una producción potencial de 20 toneladas de frutos por hectárea (Cruz y Hernández, 2003). No obstante, su aprovechamiento, como el de otros productos forestales no maderables (PFNM), debe tener como base la información del estado de las poblaciones y su impacto en la persistencia de la población. Aunque existen distintos agroecosistemas para producción de pitayas las plantas no manifiestan respuesta a las prácticas agronómicas de fertilización y riego. En este sentido la comprensión de factores fisiológicos, genéticos y ambientales que influyen en la producción permitirá un aprovechamiento con una menor inversión de energía (Pimienta *et al.*, 1997).

La Sierra de Huautla es una de las regiones con mayor riqueza biológica de la región central de México; el tipo de vegetación predominante es la selva baja caducifolia, que es un tipo de vegetación ampliamente extendido en el estado de Morelos ya que cubría cerca del 60% de su superficie. Sin embargo, la expansión de los terrenos agrícolas y ganaderos han transformado la vegetación original a tal grado que actualmente solo quedan pequeños

fragmentos de selva en buen estado de conservación y algunos remanentes con signos notables de disturbio (Trejo, 1998)

En el año 2007 se evaluó la condición en de tres pitayeras silvestres que son sometidas a aprovechamiento mediante recolección (López-Carmona, 2009); se determinó: densidad de plantas, distribución espacial y estructura de tamaños; adicionalmente se estimó la riqueza de especies arbóreas presente en esos sistemas. Actualmente se están realizando los estudios demográficos que permitan construir un modelo matricial y realizar simulaciones.

La densidad promedio de los pitayos vario entre sistemas de  $56 \pm 7$  a  $84 \pm 10$  plantas/hectárea, con un patrón de distribución espacial aleatorio (razón varianza/media de 1.05 a 1.83).

En de los tres sitios evaluaos la cantidad de individuos menores a 75 cm represento menos 7 % del total de la población y en uno de ellos la mayor parte esta compuesta por individuos de más cuatro metros de altura. Esto representa serios riesgos para la población ya que nos indica un proceso de repoblamiento natural muy limitado (Figura 1).

Observaciones en campo permiten inferir que los pitayos están adaptados a condiciones de alta pedregosidad; es claro que su condición silvestre y su tipo de metabolismo fotosintético le permite establecerse en condiciones edáficas precarias en las que la agricultura no sería posible.

Asociadas con las poblaciones de pitayos se registraron 56 que pertenecen a 36 géneros y 22 familias botánicas (Figura 2); se estimó que este número pueda subir hasta 63. Las familias mejor representadas fueron: Fabaceae con 18, Burseraceae con 9 y Cactacea con 5. En estas familias se concentró 57.1 % del total de especies; el resto se ubicó en 19 familias, 14 de las cuales contaron con sólo una especie.

Se identificaron 35 tipos de uso para las diferentes especies arbóreas y arbustivas; 27 especies registraron al menos un tipo de aprovechamiento. Los usos más frecuentes fueron los siguientes: ceremonial, medicinal, leña, forraje, comestibles y construcción (Figura 3).

El seguir aprovechando lo pitayos a través de la recolección permitiría utilizar tierras no aptas para la agricultura a la vez que se promovería la conservación de más de sesenta especies arbóreas y arbustivas de la Sierra de Huautla (eso sin contar a todas las especies animales y otras vegetales que las acompañan).

Es importante no exagerar el valor potencial de los PFM ya que con frecuencia su disponibilidad es discontinua, no hay una demanda alta en el mercado, existen dificultades para su transportación y existen muchos productos que pueden substituirlos. Por tal motivo, es importante hacer evaluaciones adecuadas y cumplir con la idea de un "aprovechamiento bajo un sistema de recolección sustentable".

## Referencias

- Alvarez-Buylla, E., García-Barrios, R., Lara-Moreno, C. y Martínez-Ramos, M. 1996. Demographic and Genetic Models in Conservation Biology: Applications and Perspectives for Tropical Rain Forest Tree Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:387-421.
- Balick, M.J., y R.O. Mendelsohn. 1944. Assessing the economic value of traditional medicines from tropical rain forest, *Conservation Biology* 6: 128-130.
- Belsky, J.M. y S.F. Siebert. 1998. Nontimber forest products in community development and conservation: the palm *Desmoncus schippii* in Galess Point, Belize. In Primack, B.R., D.B. Burton y H.A. Galletti (ed). *Timber, tourists, and temples conservation and development en the Maya forest of Belize, Guatemala and México*. Island Press. Washington D.C. 141-154.
- López-Carmona, D. A. 2009. Ecología del pitayo (*Stenocereus stellatus*) en la Selva Baja Caducifolia de Morelos. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Casas, A. 2002. Uso y manejo de Cactáceas columnares mesoamericanas. *Biodiversitas* (40):18-22.
- Casas, A. 2005. El manejo tradicional de una especie puede incrementar la diversidad biológica: el caso del Xoconochtlí. *Biodiversitas* 2005(60):2-6
- Casas, A., Caballero, J., Valiente-Banuet, A., Soriano, J. A. and Dávila, P. 1999. Morphological variation and the process of domestication of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in Central Méxicoico. *American Journal of Botany* 86 (4):522-533.
- Caswell, 1989. Matrix population models construction análisis and interpretation. Sinauer, Sunderland, Massa Chusetts. U.S.A.
- Cochran, M. E. y S. Ellner. 1992. Simple methods for calculating age-based life history parameters for stage-structure population. *Ecological monographs* 62: 345-364
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2005. Programa de conservación de la Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Protegidas. México, Distrito Federal. 205 p.
- Cruz, L. C. y Hernández C. E. 2003. El uso de los recursos naturales en de los ejidos de Pitzotlan y El Limón en la reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Morelos. Memoria de Estancia Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco Edo. de Mex. 35 p.
- Cruz-Rodríguez, J. A. y L. López-Mata. 2004. Demography of the seedlings bank of *Manilkara zapota* (L.) Royen, in subtropical rain forest of Mexico. *Plant Ecology* 172:227-235.
- Cruz-Rodríguez, J. A., L. López-Mata y T. Valverde. 2009. A comparison of traditional elasticity and variance-standardized perturbation analyses: a case study with the tropical tree species *Manilkara zapota* (Sapotacea). *Journal of Tropical Ecology* 25:135-146.
- De la Peña V., G. y Illsley, C. 2001. Inmersos en bosques y selvas los recursos no maderables. Su potencial económico, social y de conservación. La Jornada ecológica, suplemento del periódico La Jornada 27 de agosto del 2001. 27-30.
- Eguarte F. L. E. y Jiménez S. C. 1999, Inédito. Análisis de la distribución y estructura de las poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto, en el Valle de Zapotitlán, Puebla, Informe final del Proyecto L009 CONABIO, México.
- FAO. 1995. Memoria consulta de expertos sobre productos forestales no maderables para América Latina y el Caribe. FAO. Santiago, Chile, del 4 al 8 de julio de 1994.
- Flores S., J.L. 1983. Chicozapote. INIREB Informa, no. 59: 3 pp. Jalapa, Ver.
- Hartshorn, G. 1972. The ecological life history and population dynamics of *Pentaclethra macroleoba*, a wet forest dominant and *Stryphnodendron excelsum*, an occasional associate.

- UICN. 1991. Listado de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales
- Jiménez S. C., Sotero R. M. y Eguiarte F. L. E. 2000. Características edafológicas donde se desarrolla *Echinocactus platyacanthus* en Zapotitlán de las Salinas, Puebla y en Meztitlán Hidalgo. Quintero R. et al editores. La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Vol. II. México. pp 494-499.
- Luna-Morales, C., Aguirre, R. J. y Peña-Valdivia, C. 2001. Cultivares tradicionales mixtecos de *Stenocereus pruinosus* y *S. stellatus* (Cactaceae). Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica 72(2): 131-155.
- MacNeil, J. 1989. Strategies for sustainable economic development. Scientific American 261: 154-165.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Publicada en el diario Oficial de la Federación 06 de marzo de 2001.
- Marín-Cruz., Víctor Hugo. 2004. Evaluación económica de productos forestales no maderables en una selva mediana subperennifolia, del centro del estado de Veracruz. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Martínez-Gallardo, R. y Sánchez-Cordero, V. 1997. Historia natural de algunas especies de mamíferos terrestres. En: González-Soriano, E., Dirzo, R. y Vorgh, R.C. (eds.), Historia Natural de los Tuxtlas.
- Martínez-Ramos, M. y Alvarez-Buylla, E. 1995. Ecología de poblaciones de plantas en una selva húmeda de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 56: 121-153.
- Pennington, T.D. 1992. *Sapotacea*. Flora Neotropica. 52: 1-771.
- Pennington, T. D. y Sarukhán, J. 1998. Árboles tropicales de México. Fondo de Cultura Económica, UNAM.
- Peters, C.M. 1998. The ecology and management of non-timber forest resources. World Bank Technical. Paper number 322. Washington, D.C.
- Pimienta, B. E., Robles, M. C. y Pimienta, B. E. 2002. Crecimiento primario en plantas silvestres de pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) y su relación con temperatura, lluvia y micorrizas. Revista de Fitotecnia 25 (002)119-122.
- Pimienta-Barrios E., Nobel, P., Robles-Murguía, C., Méndez-Moran, I., Pimienta-Barrios, E. and Yépez-González, E. 1997. Ethnobotany, Productivity, and Ecophysiology of Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*). Disponible en: <http://www.jpacd.org/Pimienta1.pdf>
- Siebert, S.F. 1995. Prospects for sustained-yield harvesting of rattan (*Calamus sp.*) in two Indonesian national parks. Society and Natural Resources 8: 209-218.

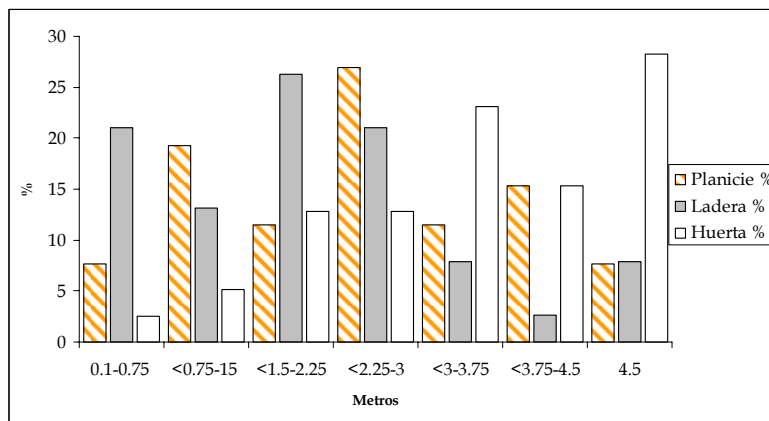


Figura 1. Estructura vertical considerando las alturas de tres poblaciones de pitaya en Tepalcingo Morelos, 2007

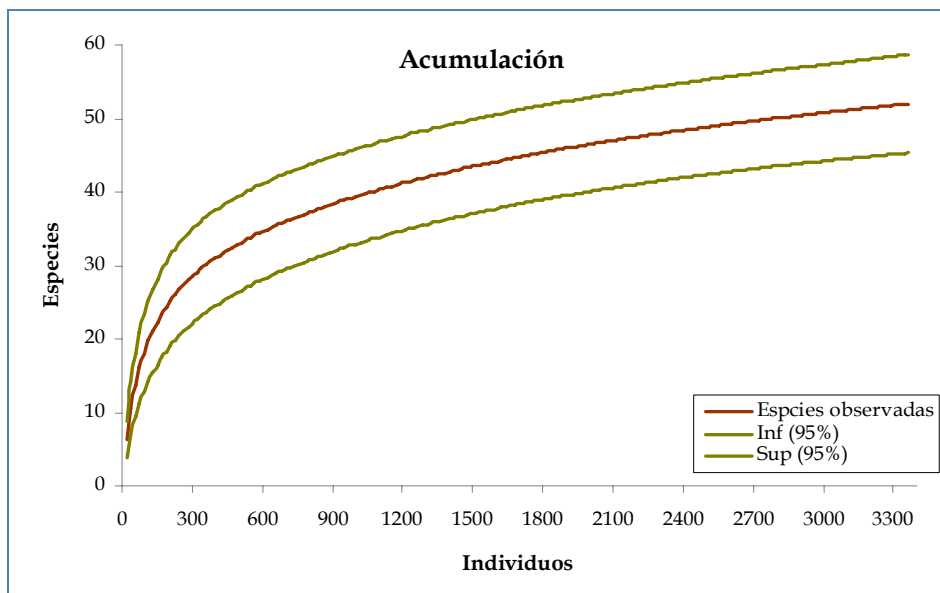


Figura 2. Curva de acumulación de especies en sistemas de recolección de pitaya en la Sierra de Huautla, Morelos.

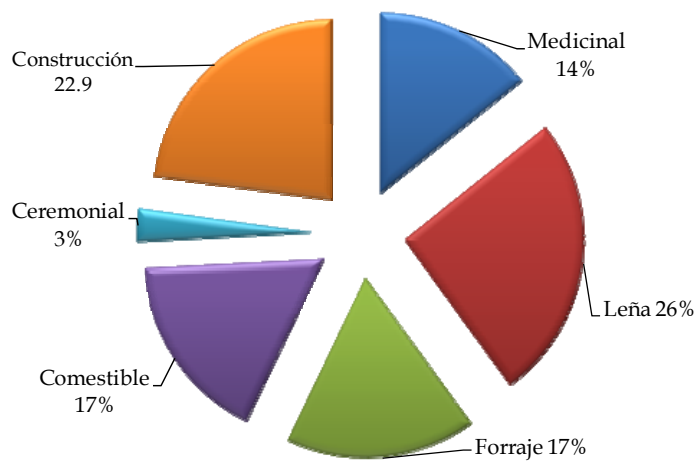


Figura 3. Categorías de aprovechamiento de las especies arbóreas y arbustivas asociadas a las pitayeras en Sierra de Huautla, Morelos.



## Qualidade seminal de reprodutores caprinos alimentados com níveis de óleo de licuri [*Syagrus coronata* (Martius) Beccari] na dieta

L.E.P. Martins<sup>1</sup>; L.P. Barbosa<sup>2</sup>; R.L. Oliveira<sup>1</sup>; B.M.C. Neto<sup>2</sup>; P.A. Dutra<sup>2</sup>; K.C. KIYA<sup>1</sup>; A.R. Bagaldo<sup>2</sup>; M.C.P. Leite<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. E-mail: lpires73@yahoo.com.br

### Resumo

Objetivou-se avaliar a inclusão de níveis de óleo de licuri em dietas de reprodutores caprinos na qualidade do sêmen fresco. Utilizou-se 16 machos caprinos  $\frac{3}{4}$  Boer, sexualmente maduros, mantidos em baias individuais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e alimentados com feno de Tifton-85 e mistura concentrada com 0,0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de licuri, sendo estes níveis os tratamentos. O experimento apresentou duração total de 120 dias, iniciando as coletas seminais 30 dias após o início do fornecimento das dietas, foram realizadas pela técnica de vagina artificial, duas vezes por semana, totalizando 51, 55, 56 e 49 ejaculados, para os tratamentos com 0,0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de licuri, respectivamente. As variáveis analisadas foram: aspecto seminal (1-3), volume seminal (mL), turbilhonamento espermático (0-5), vigor espermático (0-5), motilidade espermática progressiva (0-100%), concentração e morfologia espermáticas. O aspecto seminal apresentou comportamento linear crescente e o volume seminal linear decrescente, com a adição do óleo de licuri na dieta ( $P < 0,05$ ). Todos os outros parâmetros físicos e morfológicos não foram influenciados pela adição de óleo ( $P > 0,05$ ). Pode-se adicionar óleo de licuri na dieta de reprodutores caprinos em até 4,5%, sem causar efeito deletério às características físicas e morfológicas do sêmen.

**Palavras-chave:** bode, lipídio, sêmen

## Introdução

Com o objetivo de melhorar a tecnificação e otimizar os resultados produtivos da caprinocultura, a busca por melhor desempenho reprodutivo é imprescindível, juntamente com adequado manejo nutricional e principalmente com vistas a atender à demanda energética.

O incremento energético na dieta pode ser atingido por intermédio da inclusão de fontes lipídicas, muitas vezes provenientes de sub ou co-produtos agroindustriais. Outras fontes disponíveis regionalmente também têm potencial de utilização, no entanto o perfil lipídico dessas fontes alternativas é bastante variável, o que demanda a necessidade de avaliações mais apuradas de seus efeitos sobre o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais.

Dentre as fontes regionais disponíveis no Nordeste brasileiro encontra-se o óleo extraído do licuri [*Syagrus coronata* (Martius) Beccari], palmeira oleaginosa que tem predileção por regiões secas e áridas da caatinga e que possui, em sua amêndoa, em torno de 49% de lipídios (Queiroga et al., 2010).

Por meio desta suplementação lipídica, pode-se alcançar efeitos positivos tanto relacionados à nutrição, como a inibição da produção de metano e o aumento da eficiência da síntese microbiana; quanto reprodutivos, como a elevação da concentração sérica de colesterol, precursor dos hormônios esteróides e o aumento da fluidez das membranas biológicas (Lin et al., 1995; Williams & Stanko, 1999; Maggione et al., 2008).

Do ponto de vista reprodutivo, o incremento energético, por meio da suplementação lipídica, eleva a produção de propionato no rúmen o que aumenta a gliconeogênese e propicia elevação dos níveis de insulina, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e hormônio luteinizante (LH) (Chalupa et al., 1986).

A elevação das concentrações de IGF-I ocasiona a regulação da secreção pulsátil de GnRH e LH, o que influencia diretamente, tanto a foliculogênese quanto a espermatogênese (Lammoglia et al., 2000).

Desta forma, objetivou-se determinar o efeito do óleo de licuri em dietas de reprodutores caprinos na qualidade do sêmen fresco.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, em Salvador, Bahia, situada a 13<sup>0</sup>00'14.01"S e 38<sup>0</sup>30'34.06"O, apresenta clima quente e úmido, com precipitação média superior a 1.500mm, temperatura média anual de 25,5<sup>0</sup>C e umidade relativa do ar média anual de 88%. O período experimental transcorreu entre junho e outubro de 2008.

Foram utilizados 16 machos caprinos  $\frac{3}{4}$  Boer, sexualmente maduros e clinicamente saudáveis, com idade média de 12 meses. Os mesmos foram manejados em baias individuais, de 1,0 x 2,0m, com piso suspenso de madeira ripada, providas de bebedouros e comedouros, tendo sido distribuídos aleatoriamente nos quatro tratamentos, com níveis de inclusão de óleo de licuri na dieta.

As dietas apresentavam proporção volumoso:concentrado de 50:50, sob a forma de mistura completa. O concentrado foi elaborado com farelo de milho, farelo de soja, sal mineral e óleo de licuri nos níveis 0,0; 1,5; 3,0 e 4,5% com base na matéria seca (Tabela 1). Como volumoso utilizou-se feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) moído em partícula de aproximadamente 5cm. A oferta de alimento foi feita de forma a garantir entre 10 e 20% de sobras. O fornecimento de água foi *ad libitum*.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes das dietas utilizadas na alimentação de caprinos

Ingrediente (% MS)	Óleo de licuri (%MS)			
	0,00	1,50	3,00	4,50
Farelo de milho	34,12	32,30	30,40	28,70
Farelo de soja	13,29	13,60	14,00	14,20
Óleo de licuri	0,00	1,50	3,00	4,50
Premix vitamínico mineral <sup>1</sup>	2,60	2,60	2,60	2,60
Feno de Tifton-85	50,00	50,00	50,00	50,00

<sup>1</sup>Níveis de garantia (por kg em elementos ativos): cálcio 120,00 g; fósforo 87,00 g; sódio 147,00 g; enxofre 18,00 g; cobre 590,00 mg; cobalto 40,00 mg; cromo 20,00 mg; ferro 1.800,00 mg; iodo 80,00 mg; manganês 1.300,00 mg; selênio, 15,00 mg; zinco 3.800,00 mg; molibdênio 300,00 mg; flúor máximo 870,00 mg; Solubilidade do fósforo (P) em ácido cítrico a 2% mínimo - 95%.

A composição bromatológica das dietas experimentais (Tabela 2) foi determinada conforme AOAC (1990), para determinação dos teores de MS, matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE). As análises para a determinação da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram feitas segundo Van Soest et al. (1991). Os carboidratos não-fibrosos foram calculados de acordo com Sniffen et al. (1992).

Entre o 40º e o 44º dias do experimento foram quantificadas e coletadas amostras de sobras para determinação do consumo dos nutrientes. Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foram obtidos por meio da soma das frações digestíveis (o EE digestível foi multiplicado por 2,25).

A extração da gordura foi realizada com base na técnica descrita por Rodrigues-Ruiz et al. (1999) e a transesterificação dos ácidos graxos foi realizada conforme descrito por Eifert et al. (2006).

Tabela 2. Composição bromatológica e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais utilizadas na alimentação de caprinos

Item	Óleo de licuri (%MS)			
	0,00	1,50	3,00	4,50
Matéria seca (%)	84,33	84,48	84,65	84,81
Matéria mineral (% MS)	6,76	6,76	6,77	6,76
Proteína bruta (% MS)	12,50	12,50	12,36	12,34
Extrato etéreo (% MS)	5,48	6,86	8,75	9,63
Fibra em detergente neutro (% MS)	44,72	44,54	44,35	44,17
Fibra em detergente ácido (% MS)	26,96	26,87	26,77	26,67
Lignina (% MS)	6,45	6,40	6,36	6,32
Celulose (% MS)	20,51	20,47	20,41	20,35
Hemicelulose (% MS)	17,76	17,67	17,58	17,50
Carboidratos não fibrosos (% MS)	30,55	29,35	27,78	27,11
Perfil de ácidos graxos (g/100g de óleo)				
C12:0	0,31	1,73	3,14	4,56
C16:0	15,73	15,55	15,38	15,19
C18:0	2,64	2,71	2,79	2,87
C18:1 n9	27,21	26,01	24,77	23,57
C18:2 n6	48,23	46,72	45,21	43,69
C18:3 n3	2,16	2,15	2,14	2,13
Outros	3,71	4,79	5,89	6,96
AGCM <sup>1</sup>	17,21	19,53	21,85	24,16
AGCL <sup>2</sup>	82,79	80,47	78,15	75,84
Saturados	19,76	22,14	24,54	26,92
Insaturados	80,24	77,86	75,45	73,08

<sup>1</sup>Ácidos graxos de cadeia média (11 a 16 carbonos), <sup>2</sup> ácidos graxos de cadeia longa (acima de 16 carbonos).

Segundo Jesus (2009), utilizando as mesmas dietas e tendo realizado ensaios de digestibilidade, encontrou valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) de 67,40; 69,30; 75,30; 80,60% da MS para os tratamentos 0,0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de licuri na dieta, respectivamente.

O experimento teve duração de 120 dias, os animais receberam as dietas duas vezes ao dia durante todo o período experimental, as coletas seminais foram iniciadas 30 dias após o fornecimento das dietas.

As coletas seminais foram realizadas duas vezes por semana, no início da manhã, utilizando-se a técnica de vagina artificial e uma fêmea como manequim. Foram realizadas entre 10 e 13 coletas de sêmen por animal, totalizando 51, 55, 56 e 49 amostras para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de licuri, respectivamente, durante o período experimental.

Após a coleta, o sêmen foi encaminhado imediatamente ao Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Animal da UFBA e incubado em banho maria, a 37<sup>o</sup> C, para realização dos exames físico e morfológico (volume seminal, aspecto seminal, turbilhonamento espermático, vigor espermático, motilidade espermática progressiva, concentração espermática e morfologia espermática, incluindo, defeitos maiores, secundários e totais).

O volume do ejaculado foi verificado por visualização direta no tubo graduado e registrado em mililitros (mL) e o turbilhonamento espermático (escala de 0-5) foi avaliado por meio de observação ao microscópio, em objetiva de 10X, de uma gota de sêmen sobre lâmina pré-aquecida em mesa aquecedora a 37<sup>o</sup> C.

O vigor espermático (escala 0-5) e a motilidade espermática progressiva (escala 0-100%) foram avaliados pela observação ao microscópio óptico de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas, em objetiva de 40X, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (Henry & Neves, 1998). Para o cálculo da concentração espermática utilizou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 20µL para 10mL (1:500) em solução formal-salina. O número total de espermatozóides no ejaculado foi calculado multiplicando-se o volume ejaculado (mL) pela concentração espermática/mL.

Uma alíquota de sêmen foi fixada em solução formol salina pré-aquecida a 37<sup>o</sup> C, para posterior avaliação da morfologia espermática utilizando-se a técnica de lâmina úmida em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000X. Foram contadas 200 células para determinação do percentual de espermatozóides normais e anormais, sendo classificados individualmente em defeitos maiores, menores e totais, conforme o método descrito por Blom (1973).

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado. Todos os parâmetros foram inicialmente testados para normalidade. Aqueles que apresentaram distribuição normal (aspecto e volume seminal) foram analisados por análise de regressão, a um nível de significância de 5%, e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal (turbilhonamento, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática, defeitos maiores, secundários e totais) foram analisadas por modelos lineares generalizados, usando o Programa GENMOD, a um nível de significância de 5% de probabilidade (SAS, 2004).

## **Resultados e Discussão**

Os consumos de matéria seca (MS), de proteína bruta (PB), de fibra em detergente neutro (FDN) e de carboidratos não fibrosos apresentaram comportamento linear decrescente ( $P < 0,05$ ), com exceção do consumo de extrato etéreo (EE), que não apresentou diferença entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo de médio diário de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CHONF) em de caprinos ¾ Boer alimentados com níveis de óleo de licuri

Itens (g/dia)	Nível de óleo de licuri (%MS)				Equação de regressão
	0,0	1,5	3,0	4,5	
CMS	1044,14	874,91	579,00	431,54	$\hat{Y}=1052,45350-142,24767x$
CPB	176,00	157,09	113,85	97,02	$\hat{Y}=178,01925-18,67883x$
CEE	79,33	90,19	85,07	84,79	$\hat{Y}=84,85$
CFDN	489,11	327,49	184,40	69,90	$\hat{Y}=477,83675-93,38217x$
CCHO NF	424,07	355,78	234,66	189,51	$\hat{Y}=424,72925-54,98883x$

CMS=Consumo de matéria seca; CPB=Consumo de proteína bruta; CEE=consumo de extrato etéreo; CFDN=Consumo de fibra em detergente neutro; CCHONF=Consumo de carboidratos não fibrosos.  
Os dados foram analisados por regressão a 5% de probabilidade.

A diminuição nos consumos de MS, PB, FDN e carboidratos não fibrosos pode ser explicada pelos elevados teores de EE encontrados nas dietas dos quarto tratamentos, possivelmente em decorrência do alto teor deste nutriente no milho utilizado para formulação das rações. Sabe-se que elevados níveis de lipídeos podem reduzir o consumo e a digestibilidade, motivo pelo qual as concentrações de EE na matéria seca da dieta de ruminantes não devem ser superior a 7% (Palmquist & Jenkins, 1980). Entretanto, não se verificou diferença no consumo de EE entre os tratamentos, sendo este o nutriente mais importante e limitante para reprodução (Dias et al., 2009).

Verificou-se comportamento linear crescente ( $P<0,05$ ) para o aspecto seminal (Figura 1) (Tabela 4), que denota elevação da consistência do ejaculado com a adição do óleo de licuri na dieta.

Sabe-se que o aspecto do sêmen é influenciado diretamente pelo volume seminal e pela concentração espermática. Desta forma, o aumento da consistência do ejaculado se explica pelo comportamento linear decrescente apresentado pelo parâmetro volume do ejaculado (Figura 2), associado à não variação da concentração espermática entre os tratamentos (Tabela 3), aumentando assim, o número de células por mL.

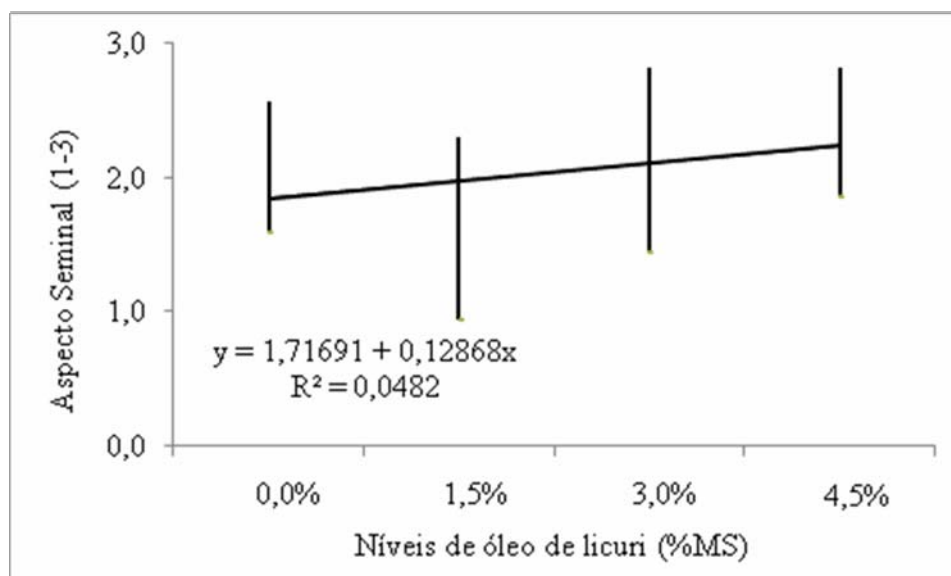


Figura 1. Aspecto seminal de ejaculados de caprinos ¾ Boer alimentados com níveis de óleo de licuri na dieta

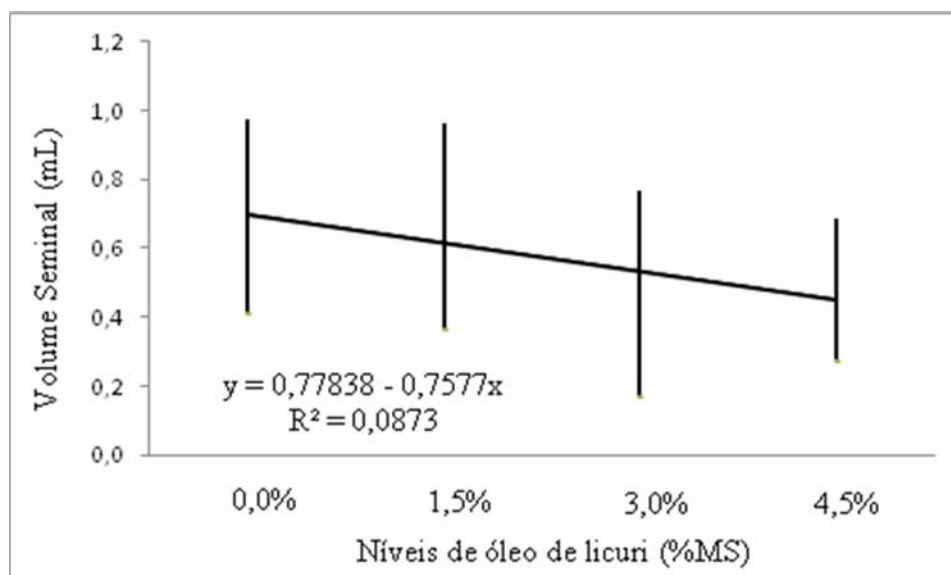


Figura 2. Volume seminal de ejaculados de caprinos ¾ Boer alimentados com níveis de óleo de licuri na dieta

Os valores para volume seminal em todos os tratamentos apresentam-se abaixo do valor médio (Tabela 3), preconizado pelo CBRA (Henry & Neves, 1998), para espécie caprina, de 0,8mL. Contudo, apesar da diminuição do volume seminal, como não houve alteração na concentração espermática, este fato não caracteriza um efeito deletério ao sêmen.

Tabela 4. Características físicas do sêmen *in natura* de caprinos 3/4 Boer submetidos na dietas com níveis de óleo de licuri<sup>1</sup>

Variáveis	Nível de óleo de licuri (%MS)			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Aspecto (1-3)	2,08±0,48	1,62±0,69	2,13±0,69	2,34±0,48
Volume (mL)	0,69±0,28	0,66±0,30	0,47±0,30	0,48±0,21
Turbilhonamento (0-5)	4,15±1,15	3,63±1,39	3,93±1,17	3,91±1,36
Motilidade (0-100)	80,50±19,26	71,20±26,20	78,39±20,91	75,71±26,58
Vigor (0-5)	4,37±0,96	3,84±1,18	4,14±1,05	4,10±1,27
Concentração (x10 <sup>9</sup> )	4,12±1,72	3,08±1,52	4,16±1,50	4,00±1,62

<sup>1</sup> Os dados referem-se às médias ± desvio padrão

Médias em uma mesma linha não apresentaram diferença significativa pelos modelos lineares generalizados (P>0,05).

Para os demais parâmetros de características físicas do sêmen; turbilhonamento espermático, vigor espermático, motilidade progressiva e concentração espermática, não houve efeito da adição de óleo de licuri na dieta (P>0,05) (Tabela 4). Os valores encontrados para os parâmetros acima citados estão acima dos preconizados pelo CBRA (Henry & Neves, 1998) para a espécie caprina.

Essa não diferença encontrada para os parâmetros de qualidade seminal pode ter ocorrido, provavelmente, pelo perfil de ácidos graxos presente no óleo de licuri, o qual se caracteriza pelo alto teor de ácido graxo do tipo  $\omega$  -6, pelo baixo teor de ácido graxo do tipo  $\omega$  -3 e, principalmente, pela proporção entre os ácidos graxos  $\omega$  -6 e  $\omega$  -3, de 20:1. Conforme Maldjian et al. (2003), fontes de lipídios com alto teor de ácidos graxos do tipo  $\omega$  -6 e baixa relação de ácidos do tipo  $\omega$  -3 e  $\omega$  -6, características encontradas no óleo de licuri, apresentam efeito deletério às características seminais. Demonstrando, que o perfil de ácidos graxos da fonte de lipídios é o fator mais importante quando se quer melhorar produção e qualidade seminal.

No presente estudo não foi observado efeito deletério da adição de óleo de licuri na dieta nos parâmetros de qualidade seminal, provavelmente por que a concentração máxima utilizada de 4,5% não foi suficiente para chegar a induzir efeitos maléficos ao sêmen, podendo talvez explicar a diminuição do volume seminal.

Estudos mostram uma variação nos achados em relação ao volume seminal, com a utilização de variadas fontes de óleo na dieta de reprodutores. Oliveira et al. (2006) avaliaram a influência do fornecimento de óleo comercial PUFA<sup>®</sup> sobre a qualidade do sêmen *in natura* de varrões e observaram elevação do volume do ejaculado. Enquanto que, Murgas et al. (2001), quando trabalharam com fornecimento de óleo de soja para varrões e Medeiros (2005), utilizando farelo de castanha de caju como fonte energética na suplementação de ovinos confinados, buscando a sua influência nos parâmetros seminais, não a encontraram sobre o volume seminal, também se contrapondo aos resultados encontrados neste experimento.

Estudos mostram que óleos com perfis contendo grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e com elevado teor de ácidos do tipo  $\omega$  -3, além de uma relação entre  $\omega$  -3 e  $\omega$  -6, de 4:1, apresentariam efeitos benéficos para reprodução de fêmeas e de machos.

Medeiros (2005) trabalhou com ovinos confinados suplementados com farelo de castanha de caju, também não encontrou diferença significativa para os parâmetros seminais de turbilhonamento e motilidade espermática progressiva. Da mesma forma, Fuck (2006) não encontrou diferença significativa nos parâmetros seminais de caprinos com a adição de semente de linhaça a dieta, justificada pela não modificação sobre o número ou sensibilidade dos receptores das células de Sertoli e de Leydig ao FSH e ao LH, respectivamente.

Murgas et al. (2001), em experimento com varrões suplementados com óleo de soja (Fonte de  $\omega$  -6) como fonte de ácidos graxos, também não encontraram influência do mesmo sobre os parâmetros físicos do sêmen. Enquanto que, Oliveira et al. (2006) encontraram influência significativa no vigor espermático, quando adicionaram óleo de peixe (Fonte de  $\omega$  -3) como fonte de ácidos graxos essenciais na dieta de varrões.

Diante desses resultados e de acordo afirmações de Rooke et al. (2001) e Strzezek et al. (2004), a relação entre os ácidos graxos da série  $\omega$  -3 e  $\omega$  -6 nesses alimentos pode ser o principal responsável em melhorar a qualidade do sêmen *in natura*, uma vez que a fluidez da membrana dos espermatozóides é grandemente relacionada à sua composição lipídica.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Cerolini et al. (2001) verificaram que a diminuição da proporção de ácidos graxos da série  $\omega$  -3, em relação aos demais lipídios, reduziu significativamente a qualidade espermática. Da mesma forma, Strzezek et al. (2004), verificaram que a proporção entre os níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) e de ácido eicosapentaenóico (EPA), ambos  $\omega$  -3, e destes com ácidos graxos da série  $\omega$  -6 é importante na manutenção de suas características, por seguirem rotas metabólicas diferenciadas na síntese de outros compostos, em especial prostaglandinas e tromboxanos.

Ainda relacionando a proporção entre  $\omega$  -3 e  $\omega$  -6, Maldjian et al. (2003) afirmaram que estudos com machos suínos demonstraram que, proporções elevadas de  $\omega$  -3 em relação à  $\omega$  -6 resulta em melhorias na fertilidade dos mesmos, enquanto que altos níveis de  $\omega$  -6 relativos a  $\omega$  -3 resultam em baixa qualidade seminal. Sendo este último perfil o característico do óleo de licuri.

Da mesma forma, os parâmetros de morfologia espermática não foram influenciados pela adição de óleo de licuri na dieta ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5). Os valores de defeitos maiores, menores e totais nos tratamentos, encontram-se dentro dos limites preconizados pelo CBRA (Henry & Neves, 1998).

Tabela 5. Características morfológicas do sêmen *in natura* de caprinos 3/4 Boer submetidos a dietas com níveis de óleo de licuri<sup>1</sup>

Variáveis	Nível de óleo de licuri (%MS)			
	0,0	1,5	3,0	4,5
Defeitos maiores (%)	1,57±1,62	1,36±1,31	1,59±1,90	1,23±1,11
Defeitos menores (%)	12,51±7,77	12,60±12,14	16,42±9,55	13,64±8,63
Defeitos totais (%)	14,08±7,75	13,96±12,26	18,01±9,32	14,87±8,62

<sup>1</sup> Os dados referem-se às médias  $\pm$  o desvio padrão.

Médias seguidas por letras iguais em uma mesma linha não diferem entre si, pelos modelos lineares generalizados ( $P > 0,05$ ).

Murgas et al. (2001), quando realizaram experimento com varrões suplementados com óleo de soja, como fonte de ácidos graxos, não verificaram diferença significativa nos valores obtidos para morfologia espermática. Entretanto, Oliveira et al. (2006) avaliaram a influência do fornecimento de óleo comercial PUFA<sup>®</sup> e óleo de peixe em varrões e detectaram modificações morfológicas significativas quando levou-se em consideração alterações de cauda. Mostrando novamente que o perfil de ácidos graxos da fonte de lipídio utilizada influencia de formas diferentes os parâmetros reprodutivos.

Desta forma, a inclusão em até 4,5% de óleo de licuri na dieta de reprodutores caprinos não promoveu efeitos deletérios na qualidade seminal, podendo desta forma, ser utilizado.

## Referências bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 15.ed. Washington, 1990.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk veterinærmedicin*. v.25, n.7, 383-391, 1973.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, v.121, p.395-401, 2001.
- CHALUPA, W.; VECHIARELLI, B.; ELSER, A. et al. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.1293-1301, 1986.
- DIAS, J.C.; MARTINS, J.A.M.; EMERICK, L.L.; SOUZA, F.A.; ANDRADE, V.J. Efeitos da suplementação lipídica no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.2, p.95-104, 2009
- EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.1, p.219-228, 2006.
- FUCK, E.J. Desempenho produtivo e reprodutivo de caprinos machos alimentados com dieta contendo grãos de linhaça. 2006. 76f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR

- HENRY, M.; NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 1998. 53p.
- JESUS, I.B. Óleo de licuri *syagrus coronata* (martius) beccari na alimentação de cabritos jovens. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal da Bahia. Salvador-Ba
- LAMMOGLIA, M.A.; BELLOWS, R.A.; GRINGS, E.E; BERGMAN, J. W; BELLOWS,S. E.; SHORT, R. E.; HALLFORD, D. M.; RANDEL, R. D. Effects of dietary fat and sire breed on puberty, weight, and reproductive traits of F1 beef heifers. *Journal of Animal Science*, v.78, p.2244-2252, 2000.
- LIN, H.; BOYSLON, T.D.; CHANG, M.J.; LUEDECKE, L.O.; SHULTZ, T.D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.11, p.2358-2365, 1995.
- MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; ITO, R.H.; MARQUES, J.DE A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R.M.DO; PRADO, I.N.DO. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. *PUBVET*, v.2, n.11, 2008.
- MALDJIAN, A.; PENNY, P.C.; NOBLE, R.C. Docosohexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. In: De VRIESE, S.R.; CHRISTOPHE, A.B. (Eds.) *Male fertility and lipid metabolism*. Champaign: AOCS Press; 2003. p.60-72.
- MEDEIROS, M.N. Efeitos de dietas com o sem inclusão de farelo de castanha de caju sobre o consumo de matéria seca e parâmetros seminais de ovinos adultos. 2005. 56f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
- MURGAS, L.D.S.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.; LIMA, J.A.F Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleo de soja como fonte de ácidos graxos. *Ciência Agrotécnica*, v.25, n.6, p.1423-1434, 2001.
- OLIVEIRA, S.L.; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, J.A.; FREITAS, R.T.F.; ZANGERONIMO, M.G. efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo na dieta de varrões sobre a qualidade do sêmen "in natura". *Ciência agrotécnica*, v.30, n.6, p.1205-1210, 2006.
- PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: review. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1-14, 1980.
- QUEIROGA, R.C.R.E.; MAIA, M.O.; MEDEIROS, A.N.DE; COSTA, R.G.; PEREIRA, R.Â.G.; BOMFIM, M.A.D. Produção e composição química do leite de cabras mestiças Moxotó sob suplementação com óleo de licuri ou de mamona. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.1, p.204-209, 2010.
- RODRIGUES-RUIZ.; J.R. BELARBI, E-H.; SÁNCHEZ, J.L.G. et al. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology Techniques*, v.12, p.689-691, 1999.
- ROOKE, J. A.; SINCLAIR, A. G.; EDWARDS, S. A. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*, v.121, n.2, p.315-322, 2001.
- SAS Institute Inc., SAS® 9.1.2. Statistical Analysis System, Systems for Windows. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.
- SNIFFEN, C.J.; CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluation of cattle diets. II Carbohydrate and protein availability. *Journal Animal Science*, v.70, n.3, p.3562-3577, 1992.
- STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology*, v.4, n.3, p.271-287, 2004.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.3583-3597, 1991.

WILLIAMS, G.L.; STANKO, R.L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. Proceedings of the American Society of Animal Science, 1999.

## **Sistemas agro-pecuários de montanha de Trás-os-Montes. Um caso de estudo**

**J.M. Pires<sup>1</sup>; N. Moreira<sup>2</sup>; J. Cabanas<sup>1</sup>; J.C. Pires<sup>1</sup>; E. Fernandez-Nuñez<sup>1</sup>; C. Aguiar<sup>1</sup>; A. Bernardo<sup>3</sup>; M.A.Rodrigues<sup>1</sup>**

*(1) Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA - Instituto Politécnico de Bragança, Apartado 1172, 5301-855 Bragança. jaime@ipb.pt*

*(2) Escola de Agricultura e Ciências Veterinárias, UTAD, 5001-801 Vila Real*

*(3) Direcção Regional de Agricultura e das Pescas do Norte, Montalegre, 5470 Montalegre*

### **Resumo**

Com o objectivo de avaliar as potencialidades de conversão ao modo de produção em agricultura biológica de explorações agro-pecuárias de montanha, procedeu-se durante o período 2002-2003, à recolha sistematizada de informação de modo a poder construir um modelo de funcionamento de uma exploração representativa da região de Salto - Montalegre.

Para o efeito foi efectuada uma caracterização da exploração, com georeferenciação das parcelas que a constituem, bem como das culturas praticadas, complementada com uma descrição dos solos e nível de fertilidade, recolha de dados sobre as produções de origem vegetal e animal, técnicas culturais aplicadas, entradas e saídas de factores de produção e produtos.

É apresentado um modelo de funcionamento dessa exploração no primeiro ano de conversão à agricultura biológica, quantificados os fluxos internos e externos do sistema, e calculada a sua eficiência energética, 0,12.

Trata-se de uma exploração agro-pecuária de bovinos da raça autóctone "Barrosã", com uma área total de 35,8 ha, em que os lameiros representam 63,1% e os lameiros de pasto/pousios arbustivos, 21,8%. As culturas anuais (milho, ferrejo de centeio, batata e outras hortícolas) representam apenas 11,5 % e o castanheiro 3,6%. O efectivo apresenta um peso vivo de 8942 kg a que corresponde um encabeçamento de 0,52 CN.ha-1. As entradas de factores de produção resumem-se a fertilizantes, equivalente a 10 kg de N, concentrados (0,512 t) e combustíveis, lubrificantes e manutenção de equipamentos. As saídas do sistema dizem respeito apenas aos vitelos para abate.

**Palavras-chave:** agroecossistema, pecuária biológica, eficiência, sustentabilidade.

## **Introdução**

A necessidade de obter um conhecimento integrador da agricultura numa dada região que abarque o seu funcionamento interno e as relações com o exterior, só é possível aplicando o conceito de sistema à agricultura.

A importância deste conhecimento em zonas ecológicas de montanha é inquestionável, pela sua sensibilidade a alterações de uso dos recursos naturais, pela necessidade da sua conservação e pela premência no combate à desertificação humana, através da valorização da sua actividade.

A valorização dos produtos e serviços que a agricultura de montanha fornece é um dos pilares para o combate à desertificação humana. O estudo da viabilidade de introdução de sistemas de produção certificados, como a Denominação de Origem Protegida (DOP), a Agricultura Biológica (AB) e outros, podem contribuir para essa mais valia. A avaliação dos impactos da agricultura em termos ambientais de uma forma directa ou indirectamente através da sua eficiência, pode ser outra medida que de alguma forma ajude a encontrar mecanismos de valorização da actividade de agricultura em zonas de montanha.

È neste contexto que este trabalho se justifica, começando numa primeira fase por compreender o funcionamento dos sistemas agro-pecuários de montanha que existem em Trás-os-Montes, de modo a poder avaliar as possibilidades de valorização dos produtos e serviços daí obtidos.

O trabalho desenvolvido e a seguir apresentado foi levado a cabo na zona DOP de produção de carne de bovino da raça Barrosã, na localidade de Salto, concelho de Montalegre. Foi escolhida uma exploração agrícola representativa e estudada no ano cultural de 2002-03, como um sistema de agricultura representativo da região de Salto-Montalegre.

## **Condições ecológicas e caracterização da exploração agrícola**

A exploração agrícola localiza-se a 41° 36'41" Norte, 7° 55'23" Oeste e a 950 m de altitude. Para os parâmetros climáticos mais relevantes, Mendes e Bettencourt (1980) referem os seguintes valores para Montalegre:

- precipitação anual de 1455 mm, com máximos de 200 mm nos meses de Novembro e Dezembro e mínimos de 22 mm em Julho e Agosto;

- evapotranspiração potencial anual de 795 mm, com máximos de 150 mm em Julho e mínimos de 10 mm em Dezembro e Janeiro;

- temperatura média anual de 9,9 °C, em que as médias mensais mais elevadas ocorrem em Agosto (17,4 °C) e as médias mensais mais baixas ocorrem em Janeiro (3,4 °C);

- a precipitação é inferior a metade da evapotranspiração potencial nos meses de Julho e Agosto;

Considerando o método de cálculo da estação de crescimento seguido pela FAO (1996), temperatura média mensal  $\geq 5$  °C e precipitação  $\geq 0,5$ ·evapotranspiração potencial, a duração da estação de crescimento nesta região é de 213 dias, repartidos de Março a Junho e Setembro a Novembro. Contudo, considerando que o crescimento activo das gramíneas de climas temperados ocorre apenas para valores  $\geq 8$  °C (Lazenby, 1988), a estação de crescimento de pastagens decresce para valores na ordem dos 152 dias.

Os solos são de origem granítica pouco profundos, cujo nível de fertilidade apresenta os seguintes valores: teores de MO de 65,5 – 86,0 g·kg<sup>-1</sup> de t.f.; pH<sub>(H<sub>2</sub>O)</sub> 3,5 – 4,5; pH<sub>(KCl)</sub> 3,1 – 4,0; teores de fósforo e potássio, respectivamente de, 39 – 212 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·kg<sup>-1</sup> de t. f. e 101 – 205 mg de K<sub>2</sub>O·kg<sup>-1</sup> de t. f. Saliencia-se que as parcelas cultivadas com culturas anuais, apresentam os maiores teores de fósforo e potássio, respectivamente 158 a 212 e 203 a 205, enquanto as pastagens apresentam os menores valores 39 a 65 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·kg<sup>-1</sup> de t. f., e 101 a 164 mg de K<sub>2</sub>O·kg<sup>-1</sup> de t. f. Por outro lado os teores de MO não apresentam grandes diferenças entre as parcelas com lameiros e as parcelas cultivadas.

A exploração é constituída por 33 parcelas estruturadas em 14 blocos (Figura 1). A área total é de 35,8 ha, com a seguinte ocupação cultural:

- pastagens de montanha de aproveitamento misto (lameiros de feno) distribuem-se por 15 parcelas totalizando 22,6 ha;
- pastagens de montanha destinadas a pastoreio exclusivo (lameiros de pasto ou pastigueiros e pousios arbustivos) ocupam 9 parcelas somando 7,8 ha;
- forragens de milho e centeio, batata, centeio para grão e horta são cultivadas em 7 parcelas numa área total de 4,15 ha;
- souto em duas parcelas com uma área de 1,25 ha;

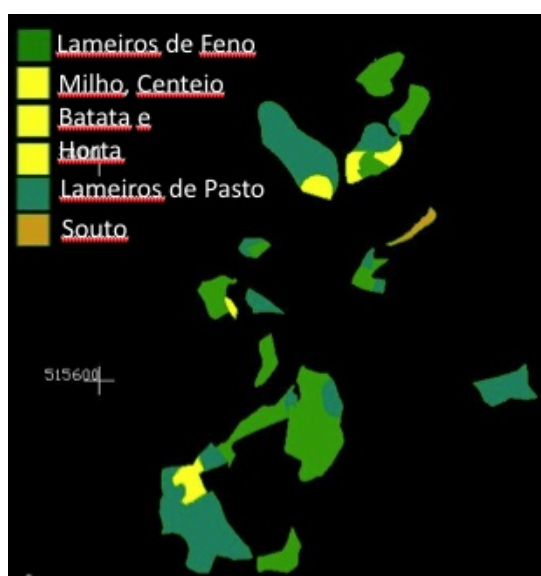


Figura 1. Representação da exploração, distribuição das parcelas e ocupação cultural.

A superfície em regadio atinge 23,3 ha, e corresponde quase na sua totalidade aos lameiros de feno.

As culturas anuais são efectuadas da seguinte forma: o centeio é semeado todos os anos na totalidade da área excepto em 0,2 ha destinados a horta para consumo familiar. Dependendo da necessidade de pasto no Inverno e início de Primavera, assim como da necessidade de palha e grão, o agricultor decide no fim do Inverno qual a área que se destina à produção de grão e qual a área que será semeada na Primavera com milho e batata. Estas duas culturas vão rodando de parcela ao longo dos anos, de forma a respeitar para batata o intervalo cultural mínimo de quatro anos. Para este esquema poder funcionar a área de batata corresponde normalmente a menos de 1/4 da área de milho, 0,2 a 0,4 ha. No ano de 2003 não houve lugar à produção de centeio para grão.

Estas são as únicas culturas que exigem mobilização do solo ao longo do ano, a prática de fertilizações e a entrada de semente, principalmente de batata. A semente de centeio e milho raramente provêm do exterior, uma vez que é normal proceder à colheita de semente nestas duas culturas, quer se destine à alimentação humana, quer dos efectivos pecuários, constituindo-se anualmente uma reserva do melhor grão para semear no ano seguinte. A cultura de milho destina-se a ser consumido em verde, dado tratar-se de populações regionais.

As operações culturais consistem em mobilizações com escarificador e grade de discos no fim do Verão após a saída do milho e da batata para a sementeira do centeio. O centeio é distribuído a lanço e incorporado no solo com escarificador. Ainda no Outono procede-se à distribuição de estrumes sólidos nos lameiros ( $\approx 28$  t), numa determinada área, de forma sequencial, permitindo que no decurso dos vários anos todos os lameiros venham a ser fertilizados. Na Primavera efectua-se a distribuição de estrumes para as culturas de milho e batata e para a parcela dedicada à horta familiar ( $\approx 152$  t), seguida de uma lavoura. Próximo da data de sementeira a preparação do solo é finalizada com escarificações e gradagens, incorporando ainda uma pequena quantidade de fertilizantes com origem externa à exploração, seguida de sementeira ou plantação em linhas.

As infra-estruturas e equipamento de suporte de que a exploração dispõe constam de: armazém com 144 m<sup>2</sup>, estábulo com 325 m<sup>2</sup>, tractor de 65 Cv, três gadanheiras, charrua, grade de discos, escarificador, reboque, reboque distribuidor de estrumes, pá-frontal, virador-juntador de feno e enfardadeira.

O efectivo pecuário, de raça Barrosã, é constituído por 18 fêmeas e um macho adultos, quatro novilhas com idade inferior a um ano, e 16 vitelos com idade inferior a seis meses, perfazendo um efectivo equivalente a 26,8 CN. O peso vivo dos animais adultos e em recria é de 8942 kg, e dos vitelos é de 999,5 kg, com referência ao Outono de 2002. A alimentação do efectivo pecuário é efectuada em pastoreio ao longo de todo o ano nos lameiros e no centeio durante o Inverno, o qual decorreu em 231 dias considerando 8 h de pastoreio por dia. O feno obtido nos lameiros é distribuído ao efectivo adulto durante o período de Outubro a Abril e aos vitelos durante todo o ano. O milho é distribuído nos meses de Setembro e Outubro, durante

um período de 30 a 50 dias, tendo correspondido neste ano a 38 dias. Os vitelos permanecem no estábulo até serem vendidos para abate (com 6 a 8 meses de idade) ou serem seleccionados para recria.

## **Metodologia na recolha de informação**

Os dados sobre o funcionamento da exploração foram recolhidos através de um inquérito que permitia refazer as actividades desenvolvidas semanalmente/mensalmente, bem como todas as entradas e saídas da exploração em termos de factores de produção e produtos.

A recolha de dados sobre produções foi efectuada, identificando numa primeira fase áreas homogéneas de parcelas atendendo aos solos e culturas praticadas. Nos lameiros foram identificadas quatro áreas homogéneas, dois tipos de lameiros de feno e dois tipos de lameiros de pasto, pertencentes a comunidades de *Anthemido-Cynosuretum*, e *Nardus stricta* no caso de um lameiro de pasto. Nas culturas anuais foram identificadas três áreas homogéneas. Em cada área homogénea sujeita a pastoreio foram colocadas caixas de exclusão, num número nunca inferior a três, para avaliar a produção de pasto disponível em matéria seca, efectuada sazonalmente. No caso do milho foram efectuadas amostragens na altura de corte, e no caso de centeio para grão, batata e restantes produções, o agricultor forneceu os valores.

No Outono de 2002 foi obtido o peso vivo do efectivo pecuário existente, e ao longo do ano obtiveram-se os pesos vivos e em carcaça dos vitelos para abate.

## **Resultados obtidos e discussão**

Os sistemas agro-pecuários como definidos por Grigg (1996), caracterizam-se por uma interligação entre as componentes de produção animal e vegetal, com saída do sistema de produtos de origem vegetal e animal. O diagrama de fluxos do sistema desta exploração agrícola (Figura 1) evidencia uma predominância da componente de produção animal relativamente à produção vegetal, não havendo saídas sistemática para o exterior de produtos de origem vegetal. O sistema típico de agricultura destas regiões de montanha, antes da diminuição dos preços da batata e do centeio, caracterizava-se por uma maior representatividade destas duas culturas, cujos produtos eram uma importante saída do sistema (Moreira, 1984).

Como características mais importantes deste sistema é a reduzida entrada de factores de produção, uma elevada interligação entre as componentes e uma reduzida saída de produtos, exclusivamente os vitelos destinados a abate, quantificada com base no peso em carcaça (Figura 1 e Quadro 1). Destaca-se a importância que os estrumes têm no funcionamento do sistema sendo a principal fonte de nutrientes, mas não menos importante é a introdução de matos nas camas dos animais, 70 a 90 t ha.ano<sup>-1</sup>.

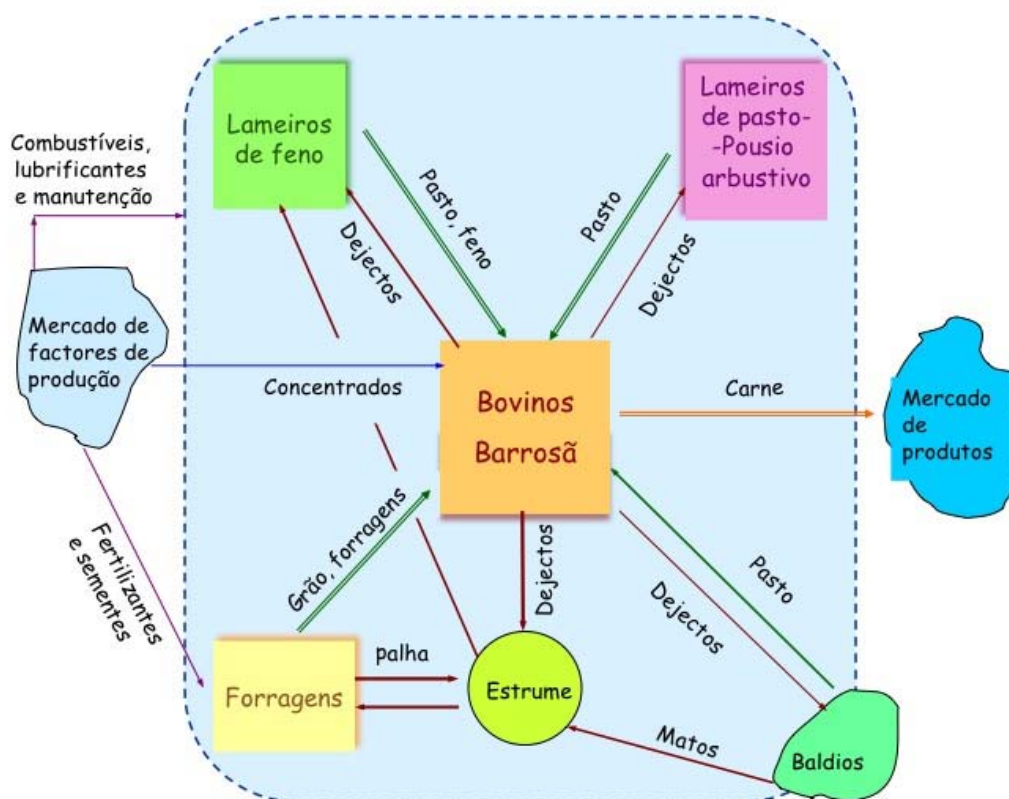


Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema

Para o cálculo da energia (MJ) associada aos factores de produção e produtos do sistema foram utilizados os valores de conversão referidos por Gliessman (2007) para os fertilizantes, estrumes e concentrados, por Demarquilly *et al* (1980) para os lameiros, forragens e grãos, por Leme *et al* (2000) para a carne (carcaça) e por Bayliss-Smith (1982) para os combustíveis, já com lubrificantes e manutenção incluídos.

A eficiência do sistema (total de energia das saídas/total de energia das entradas) apresenta um valor baixo (0.12) indicando uma reduzida saída de produtos (Quadro 1). Valores de 0.18 foram referidos por Spedding (1979) para sistemas de produção de carne quando a energia de suporte do sistema era contabilizada, como é este o caso. Estes valores são justificados também pelo baixo encabeçamento existente,  $0.52 \text{ CN}\cdot\text{ha}^{-1}$ , o qual poderia atingir  $2 \text{ CN}\cdot\text{ha}^{-1}$ , máximo permitido em agricultura biológica. Contudo, estimando a energia produzida em carne por todo o efectivo, com base numa eficiência de conversão da energia bruta do alimento em energia da carne de bovino de 0.03 (Spedding, 1979), a eficiência energética do sistema passa para 1.83. Este valor é já próximo do referido por Intxaurrendieta e Arandía (2008) para sistemas de produção de bovinos em agricultura biológica 2.19.

Os sistemas de produção animal ou sistemas agro-pecuários com reduzida importância da componente vegetal, quando comparados com os sistemas de produção vegetal, apresentam sempre valores de eficiência muito inferiores. Por outro lado nos sistemas em que a produção

Tabela 1. Entradas, factores de produção e produtos intermédios e saídas do sistema quantificados em energia (exploração agrícola).

	Entradas		Factores de produção e produtos intermédios		Saídas		Eficiência
	(t) (l)	MJ	t	MJ	t	MJ	
Batata	0.10	1506.96	4.00	60278.40			
Milho (grão)	0.05	847.67	0.53	9983.61			
Combustíveis	822.00	66828.60					
Fertilizantes equivalente a:							
Azoto	0.01	614.17					
Fósforo	0.06	701.90					
Potássio	0.06	435.18					
Concentrados	0.51	12109.26					
Lameiros de feno (MS)							
Pasto			120.10	2252268.93			
Feno			69.00	1256427.90			
Lameiros de pasto (MS)			54.00	990072.72			
Milho (forragem) (MS)			21.10	353298.40			
Centeio (forragem) (MS)			11.20	210036.74			
Energia total contida na alimentação dos bovinos				5074213.94			
Estrumes			196.00	1319228.57			
Efectivo pecuário							
Vitelos (peso vivo)					2.22		
Vitelos (peso em carcaça)					1.14	9986.12	
<b>Total</b>		83043.74		11513699.95		9986.12	
<b>Eficiência Efectiva</b>							<b>0.120</b>
<b>Energia estimada</b> na produção de carne de todo o efectivo (Factor de conversão 0.03)				5074213.94		152226.42	
<b>Eficiência estimada</b>							<b>1.83</b>

animal esteja presente há sempre uma maior interligação entre componentes do sistema, e como tal uma maior reciclagem de nutrientes e uma menor dependência do exterior relativamente aos factores de produção. Kainz (2005) num redesenho de um sistema agropecuário com uma forte componente de culturas arvenses em rotação destinadas à produção de grão e de forragem, refere uma eficiência de 16.7, como um valor elevado e indicador de um sistema sustentável.

Contudo, convém salientar que a baixa eficiência energética obtida neste sistema, indicando riscos de insustentabilidade, não é o resultado de uma elevada entrada de factores de produção, como acontece em sistemas intensivos e tecnológicos, mas sim a um baixo aproveitamento dos recursos forrageiros disponíveis no sistema.

## Conclusões

A baixa eficiência do sistema é o resultado de um baixo encabeçamento, e de uma componente vegetal pouco representativa e nula em termos de contribuição para as saídas de produtos.

O risco de insustentabilidade que esta baixa eficiência indica, pode ser diminuído exclusivamente pelo aumento do efectivo, de forma a otimizar o uso dos recursos forrageiros disponíveis.

## Referências bibliográficas

- Bayliss-Smith, T. P. (1982). *The ecology of agricultural systems*. Cambridge University Press, Cambridge, 112 pp.
- Demarquilly, C.; Andrieu, J. e Sauvant, D. (1980). Tableaux de la valeur nutritive des aliments. In *Actualités Scientifiques et Agronomiques. Alimentation des Ruminants*, Ed. INRA Publications, pp. 519-584.
- FAO (1996). *Agro-Ecological Zoning Guidelines*. FAO Soils Bulletin 76, Rome, Italy.
- Gliessman, S. R. (2007). *Agroecology. The ecology of sustainable food systems*. CRC Press, Boca Raton, London/New York, 384 pp.
- Grigg, D. B. (1996). *The agricultural systems of the world. An evolutionary approach*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Intxaurrendieta, J.M., Arandia, A. (2008). Sistemas ganaderos, energía y emisiones. Análisis comparativo de explotaciones de ganadería rumiante en Navarra. Actas del III Congreso de la Asociación Hispano Portuguesa de Economía de los Recursos Naturales y Ambientales AERNA. Palma de Mallorca.
- Kainz, M. (2005). Enhancing sustainability by landscape-design and conversion to organic farming. In *Researching sustainable systems, Proceedings of the First Scientific Conference of ISOFAR*, ed. U. Kope; U. Niggli; D. Neuhoff; P. Cornish; W. Locheretz; H. Willer, Adelaide Austrália, pp 438-441.
- Lazenby, A. (1988). The grass crop in perspective: selection, plant performance and animal production. In *The grass crop. The physiological basis of production*, ed. Michael B. Jones and Alec Lazenby, published by Chapman and Hall, London, New York, pp. 311-360.
- Leme, P.R.; Lanna, D.; Henrique, W.; Alleoni, G.F. e Boin, C. (2000). Substituição do Grão de Milho por Polpa de Citros em Dietas com Diferentes Níveis de Concentrado. □2. Taxas de Deposição e Composição Química Corporal1. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29 nº 3
- Mendes, J.C. e Bettencourt, M. L. (1980). O clima de Portugal. Fasc. XXIV : Contribuição para o estudo do balanço climatológico de água no solo e classificação climática de Portugal Continental Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, Lisboa, 172 pp.
- Moreira, N. (1984). *Os sistemas de agricultura do Nordeste*. IUTAD, Vila Real.
- Spedding, C. R. (1979). *An introduction to agricultural systems*. Applied Science Publishers LDT, Barking, Essex.

## Contribuição da solarização do solo para uma agricultura sustentável

A. César<sup>1</sup>; A. Pinto<sup>2</sup>; F. Mélo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária

<sup>2</sup>Instituto Politécnico de Viseu - Escola Superior Agrária

<sup>3</sup>Instituto Politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária

### Resumo

A solarização do solo é um meio de luta não químico e muito promissor em protecção e produção integrada das culturas. Recorrendo ao uso de plástico e não à utilização de pesticidas, esta técnica é eficaz relativamente a inúmeros inimigos das culturas presentes no solo, de difícil combate por outras vias. A solarização do solo é segura para o utilizador, para o consumidor e para o ambiente, podendo por isso, em determinadas situações, dar um contributo apreciável na prática da agricultura sustentável. Neste sentido, é com muito agrado que vemos espelhada a relevância destes aspectos nas orientações do Ministério da Agricultura que consideram como elegíveis, entre outras acções ambientais a financiar, o emprego da solarização. Neste documento são apresentados alguns resultados de trabalhos efectuados em Bragança e em Coimbra que mostram a eficácia da solarização relativamente a alguns fungos fitopatogénicos do solo (*Plasmodiophora brassicae* Wor e *Phytophthora cinnamomi* Rand) e que revelam também alguns efeitos positivos, designadamente em relação a algumas características biológicas do solo, ao contrário do que sucede com muitos outros meios de luta, nomeadamente com a aplicação de pesticidas ao solo que apresenta diversos efeitos secundários negativos.

**Palavras-chave:** Agricultura sustentável; solarização do solo; *Plasmodiophora brassicae* Wor; *Phytophthora cinnamomi* Rand; plástico.

## **Introdução**

A agricultura é uma das actividades humanas mais antigas, não deixando no entanto de ter uma grande importância para a humanidade nos dias de hoje.

Ao longo de muitos anos a agricultura e diversas actividades a ela associadas foram muito lesivas, a vários níveis, comprometendo aquilo que designamos por desenvolvimento sustentável.

Um uso incorrecto dos fertilizantes e uma má utilização dos produtos fitofarmacêuticos (na vertente da protecção fitossanitária) são das práticas que mais contribuíram para essa situação.

Com o objectivo de reduzir esses inconvenientes tem-se assistido à implementação de práticas menos agressivas para o homem e para o ambiente, nomeadamente no que diz respeito à protecção das culturas com a adopção de técnicas alternativas ao uso de pesticidas.

A protecção integrada e a produção integrada das culturas tiveram nas últimas décadas e terão um papel importante na agricultura e na implementação de um desenvolvimento sustentável.

A solarização do solo, meio de protecção não químico e não poluente que permite combater de forma eficaz variados inimigos das culturas presentes no solo, surge como alternativa ao uso de pesticidas para combater uma vasta gama de infestantes, pragas e doenças.

Neste trabalho abordámos alguns estudos sobre a eficácia da solarização do solo no combate a alguns inimigos das culturas, nomeadamente fungos fitopatogénicos do solo, bem como os efeitos secundários sobre algumas características biológicas do solo (efeitos sobre algumas bactérias responsáveis pela fixação biológica do azoto no solo).

## **Solarização do solo**

A solarização do solo é uma técnica que permite combater inimigos das culturas presentes no solo. A utilização deste meio de luta teve o seu início em Israel, no fim do século passado, tendo-se vindo, desde então, a assistir à expansão da sua utilização.

A solarização do solo baseia-se no aproveitamento da radiação solar para conseguir eliminar variados inimigos das culturas presentes no solo (doenças, pragas e infestantes).

De uma forma sucinta, podemos dizer que a solarização consiste em cobrir o solo com um filme de plástico transparente (PE ou PVC) de espessura reduzida (geralmente de 0,025 a 0,050mm) durante um período de 6 a 8 semanas, no verão, altura em que existe maior intensidade de radiação solar, que se irá traduzir num maior aumento da temperatura do solo (Katan, 1992).

Antes da colocação do plástico, o solo é devidamente mobilizado e regado até à situação de capacidade de campo, nomeadamente para aumentar a condutividade térmica do solo.

### **Eficácia da solarização no combate a alguns inimigos presentes no solo**

A solarização do solo como qualquer outro meio de luta não deve ser encarada como uma panaceia que permite resolver todos os problemas em todas as situações.

Estudámos a influência da solarização sobre diversos inimigos das culturas existentes no solo, nomeadamente os fungos *Plasmodiophora brassicae* Wor , responsável pela doença radicular da hénria da couve, e *Phytophthora cinnamomi* Rand , principal agente causador da doença da tinta do castanheiro.

O trabalho sobre à primeira doença foi realizado em Coimbra e o relativo à segunda em Bragança.

O solo onde se realizou cada um dos trabalhos estava infestado pelo respectivo agente fitopatogénico.

Para avaliar o efeito deste meio de protecção recorreremos a duas modalidades : solo submetido à solarização (solo solarizado) e solo não submetido à solarização (solo não solarizado).

Posteriormente à solarização procedeu-se à instalação de plantas susceptíveis (couve da China relativamente a *P. brassicae* e castanheiro relativamente a *P. cinnamomi*).

O efeito da solarização foi avaliado através da determinação da :

- percentagem (%) de couves com raízes infectadas dois meses após a solarização
- % percentagem (%) de castanheiros que não morreram um ano após a solarização

As couves com raízes não infectadas apresentaram um valor de 99% no solo solarizado e 1% no solo não solarizado.

Quanto aos castanheiros a taxa de sobrevivência foi de 95% nas plantas instaladas em solo solarizado e de apenas 10% nas plantas instaladas em solo não solarizado.

Estes resultados revelaram que a solarização é um meio de luta que apresenta um grande eficácia relativamente a estes dois problemas fitossanitários, permitindo uma redução drástica das taxas de plantas infectadas e de plantas mortas.

É de salientar que, no caso dos castanheiros, no ano seguinte (isto é dois anos após a solarização), no solo solarizado a taxa de sobrevivência se manteve no valor de 95%, verificando-se o efeito a longo ( ou médio ) prazo já observado em relação a diversos inimigos das culturas (Satour *et al.*, 1989), enquanto que em solo não solarizado a taxa de mortalidade dos castanheiros atingiu o valor de 100%.

## **Efeitos positivos da solarização sobre algumas características biológicas do solo**

A fixação do azoto é muito importante para toda a bioprodução do planeta. A esse respeito, o papel dos microrganismos é fundamental, sendo a fixação biológica do azoto atmosférico assegurada por dois processos : a fixação simbiótica a cargo de espécies do género *Rhizobium* (nos nódulos das raízes das leguminosas), e a fixação livre realizada por outras bactérias onde se destacam *Azotobacter* spp. (que actuam em condições de aerobiose) e *Clostridium pasteurianum* (actuando em condições de anaerobiose), entre outras.

A solarização do solo à semelhança do que ocorre com outros meios de luta pode apresentar efeitos secundários a vários níveis.

Neste trabalho estudámos a influência da solarização do solo sobre as bactérias responsáveis pela fixação livre do azoto em condições aeróbias e em condições anaeróbias anteriormente referidas, comparando os níveis populacionais das bactérias existentes no solo submetido à solarização (solo solarizado) e no solo não submetido à solarização (solo não solarizado). Esta comparação foi feita em dois momentos, imediatamente após o período de solarização e dois meses depois.

Verificou-se que as populações das bactérias do solo responsáveis pela fixação livre de azoto estudadas (*Azotobacter* spp, e *C. pasteurianum*) não foram afectadas negativamente pela solarização do solo.

Relativamente às populações de *Azotobacter* spp. houve um decréscimo imediatamente após a solarização , mas passados dois meses os níveis populacionais eram muito superiores (30% mais elevados) aos verificados no solo não solarizado.

No que diz respeito a *C. Pasteurianum* , apesar de um elevado aumento das populações no solo solarizado ( 45% mais elevado do que no solo não solarizado) constatou-se que, decorrido o período de dois meses, os níveis populacionais eram semelhantes em ambos os solos.

Estes efeitos secundários da solarização são pois muito positivos e benéficos, comportando-se esta técnica com selectividade, relativamente à flora microbiana estudada.

Efeitos semelhantes foram verificados relativamente a outro grupo de bactérias, as reaponsáveis pela fixação simbiótica do azoto atmosférico, *Rhizobium* spp., ao contrario do que ocorre com a aplicação de vários pesticidas ao solo que pode afectar negativamente as suas populações, reduzindo o grau de nodulação (cenis *et al.* , 1984 ; Nair *et al.* ,1990).

Esses efeitos secundários da solarização relativamente a algumas características biológicas do solo, bem como a própria eficácia relativamente a inúmeros inimigos das culturas presentes no solo poderão estar relacionados com outros efeitos secundários da solarização verificados ao nível de algumas características físicas do sol (Al-Kayssi *et al.*, 1989 ; Chen *et*

al., 1991 ; César, 1992) bem como ao nível de algumas características químicas do solo (Chen *et al.*, 1991 ; Pinto & César, 1999 ; Pinto *et al.* , 2007).

## Considerações finais

A solarização apresenta uma boa eficácia, permitindo a protecção das culturas simultaneamente em relação a muitos dos seus inimigos presentes no solo.

O efeito protector da solarização face a numerosos inimigos das culturas mantém-se frequentemente não apenas no período imediatamente posterior à solarização, verificando-se o chamado efeito a longo prazo, como referido anteriormente no trabalho realizado com os castanheiros.

A solarização pode ser implementada nas mais variadas culturas, nomeadamente nas culturas perenes, mas também nas culturas protegidas onde os problemas com inimigos das culturas no solo se colocam com maior frequência e com maior gravidade.

Nesse sentido é com grande satisfação e entusiasmo que encaramos a facto do Ministério da Agricultura (MADRP-GPP) considerar o emprego da solarização do solo como uma das acções (acção 7.5) propostas como elegíveis para apoio no quadro ambiental no âmbito da Estratégia Nacional no documento intitulado "Estratégia Nacional para programas operacionais sustentáveis".

Temos esperança de que a solarização do solo venha a desempenhar um papel crescente e possa dessa forma proporcionar um maior contributo para resolver variadíssimos problemas fitossanitários com diversas vantagens. Este meio de luta não envolve a utilização de pesticidas, não cria o vazio biológico como sucede com outras formas de desinfestação do solo, é seguro para o aplicador, para o consumidor e para o ambiente.

## Referências bibliográficas

- Al-Kayssi, A.W.; Ahmed, S. & Hussain, R. (1989). Influence de la solarisation du sol sur les mouvements et la répartition des sels. *Plasticulture*, 84 : 47–53.
- Cenis, J. L.; Martinez, P.F.; Gonzalez-Benavente, A. & Aragon, R. (1984). Ensayo de control de *Verticillium dahliae* y *Rhizoctonia solani* mediante desinfeccion solar en el campo de Cartagena. *III Congreso Nacional de Fitopatologia*, Tenerife.
- César, A. (1992). Alterações na Estrutura do Solo Provocadas pela Solarização. *Simpósio Solarização do Solo*, Oeiras.
- Chen, Y.; Gamliel, A.; Stapleton, J.J. & Aviad, T. (1991). Chemical, physical, and microbial changes related to plant growth in desinfested soils. In Katan, J. & De Vay, J.E. (Ed.). *Soil Solarization*. CRC Press, Boston : 103–129.
- Satur, M.M.; Abdel-Rahim, M.F.; El-Yamani, T.; Radwan, A.; Grinstein, A.; Rabinowitch, H.D. & Katan, J. (1989). Soil solarization in onion fields in Egypt and Israel : short-and long-term effects. *Acta Horticulturae*, 255 : 151–159.

- Katan, J. (1992). Soil Solarization: Status and Future Developments. *Simpósio Solarização do Solo*, Oeiras.
- Nair, S.K.; Peethambaran, C. K.; Geetha, D.; Nayar, K. & Wilson, K.I. (1990). Effect of soil solarization on nodulation, infection by mycorrhizal fungi and yield of cowpea, (Abstr.) *Plant and Soil*, 125 (1) : 153–154.
- Pinto, A. & César, A. (1999). Efeitos da solarização do solo em alguns constituintes químicos do solo. *V Encontro Nacional de Protecção Integrada*. Bragança, 27-29 de Outubro de 1999
- Pinto, A. ; Da Silva, L. ; Velázquez, E. & César, A. (2007). Effects of solarization on phosphorus and other chemical constituents of soil. In VELÁZQUEZ; E. & RODRÍGUEZ-BARRUECO, C (Ed). *Developments in plant and soil sciences* . Springer, Holanda, Dordrecht : 253-256

## A importância das interações entre fungos do solo em agroecologia

P. Baptista<sup>1</sup>; E. Pereira<sup>1</sup>; R. Tavares<sup>2</sup>; T. Lino-Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IPB - Instituto Politécnico de Bragança, CIMO - Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1038, 5301-854 Bragança, Portugal.

<sup>2</sup>Centro para a Biodiversidade e Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG)/Centro de Biologia Funcional de Plantas, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

### Resumo

Os microrganismos vivem no solo sob a forma de comunidades complexas, sendo constantes as interações que estabelecem entre si e com as raízes das plantas. Esta enorme diversidade de interações contribui, de forma preponderante, para a fertilidade do solo, desenvolvimento, nutrição e sanidade das plantas. Ao nível da comunidade fúngica do solo é possível observar vários tipos de interação entre diferentes espécies fúngicas, sendo o antagonismo um dos mais comuns. Os fungos do solo são igualmente capazes de interagir com as plantas, sendo as associações patogénicas e as micorrízicas, as interações mais significativas em agroecologia. No presente trabalho pretende-se fazer uma revisão sobre a complexidade das interações estabelecidas entre diferentes fungos do solo e entre estes e a planta. Ao nível das interações interespecíficas será dado especial ênfase aos diversos tipos de interação que podem ocorrer entre fungos de diversos grupos ecológicos (saprófitas, micorrízicos e fitopatogénicos), os factores que a afectam, o seu efeito na comunidade fúngica do solo e a sua aplicação na luta biológica de doenças. O efeito destas interações na composição, dimensão e funcionamento da comunidade fúngica existente no solo, bem como no crescimento das plantas, tem consequências para a prática de uma agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada. Neste trabalho será particularmente focada a influência de fungos saprófitas na colonização de plantas por fungos arbusculares ou ectomicorrízicos, com consequências no crescimento e desenvolvimento das plantas.

**Palavras-chave:** interação fungo-fungo, mecanismos de interação, luta biológica, desenvolvimento de plantas.

## Introdução

A microflora diversificada existente nos solos, na qual intervêm fungos, bactérias, protozoários, algas, nemátodes e vírus, constitui um ecossistema complexo e diversificado. A sua acção, benéfica ou prejudicial para a planta, depende da resposta das interacções que se estabelecem na rizosfera entre microrganismos, raízes e componentes do solo (Kennedy 1998; Bowen & Rovira 1999; Barea et al. 2005; Fageria & Stone 2006). De facto, os microrganismos desempenham actividades relevantes ao nível do desenvolvimento, nutrição e sanidade das plantas. No caso dos fungos, as principais acções podem ser ao nível (i) da decomposição de resíduos complexos de plantas e animais, (ii) da associação parasita ou patogénica, causando doenças nas plantas, (iii) da associação, mutuamente favorável, com as raízes das plantas superiores formando as micorrizas e (iv) da interacção intra- ou interespecífica com diversos organismos. Os fungos podem ainda constituir alimento para animais do solo ou insectos e estimular a germinação de sementes (Klein & Paschke 2004).

De entre a multiplicidade de interacções que os fungos podem estabelecer com microrganismos do solo interessa destacar a acção exercida sobre outros fungos, devido aos seus efeitos na composição e funcionamento da comunidade fúngica. De facto, a competição entre fungos do solo constitui um dos mais importantes reguladores da densidade populacional e/ou da estrutura final da comunidade (i.e. abundância relativa de cada espécie na comunidade). Estas modificações na composição da comunidade fúngica do solo poderão ter adicionalmente repercussões no crescimento e sanidade das plantas, especialmente quando a comunidade fúngica micorrízica e patogénica é alterada. Os efeitos das interacções fúngicas podem ainda ser observados ao nível da mobilização e da translocação de biomassa e de nutrientes nos ecossistemas naturais (Boddy 2000; Wells & Boddy 2002), com consequências importantes no seio da comunidade vegetal (El-Shatnawi & Makhadmeh 2001).

Ao nível da comunidade fúngica do solo é possível observar vários tipos de interacções classificadas em (i) positivas, quando ocorre o benefício mútuo para ambos os seres vivos, ou para apenas um deles, sem que o outro seja prejudicado, (ii) negativas, quando surge prejuízo para ambos os organismos interactuantes, ou para um deles em benefício do outro, e por fim (iii) interacções onde nenhuma das duas espécies é afectada (neutralismo). Todas estas formas de interacção podem ocorrer entre indivíduos da mesma espécie, interacções intraespecíficas, ou então entre indivíduos de espécies diferentes, interacções interespecíficas. A terminologia utilizada para a descrição das interacções entre fungos é controversa e diversificada, estando descritas diferentes definições baseadas nas respostas dos fungos ou do mecanismo de interacção. A classificação geralmente aceite, proposta por Tuininga (2005), refere que as interacções interespecíficas podem ser **nutritivas** e **não-nutritivas**, consoante o fungo receba ou não nutrientes da espécie opositora, respectivamente. No primeiro caso, a interacção pode ser classificada em (i) **biotrófica**, quando o fungo obtém nutrientes pela colonização de hospedeiros vivos (e.g. parasitismo); (ii) **necrotrófica**, quando o fungo obtém nutrientes de um hospedeiro acabando por lhe provocar a morte (e.g. predação); (iii) e

**saprófita**, quando o fungo obtém nutrientes a partir de matéria orgânica morta (e.g. decomposição). As interacções interespecíficas não-nutritivas são classificadas em **comensalismo**, **mutualismo**, **antagonismo**, **co-antagonismo**, **agonismo** e **co-habitação** (Tabela 1). Em seguida, proceder-se-á a uma descrição mais detalhada das interacções não-nutritivas negativas, por serem as mais abundantes nos ecossistemas naturais e por exercerem um papel importante na estrutura final da população fúngica do solo, com consequências na produção agrícola. Neste âmbito, será ainda dado especial ênfase ao efeito das interacções fúngicas na micorrização de plantas e na luta biológica de doenças, consideradas duas das principais estratégias num sistema de produção agrícola agroecológico.

Tabela 1. Tipos de interacção não-nutritivas entre duas espécies fúngicas, respectivas respostas e exemplos de mecanismos (adaptado de Tuininga 2005).

Tipos de interacção	Resposta	Exemplos de mecanismos
<u>Interacções neutras</u>		
Co-habitação	0 / 0 Nenhuma das espécies afecta a outra	Entrelaçamento de hifas
<u>Interacções negativas</u>		
Antagonismo	- / 0 Morte, redução de crescimento de uma das espécies sem prejuízo para a outra	Lise e vacuolização das hifas, alterações no valor de pH, interferência de hifas (antibiose e alelopatia), inibição física
Co-antagonismo	- / - Morte, redução de crescimento das duas espécies	Lise e vacuolização das hifas, alterações no valor de pH, interferência de hifas (co-antibiose e co-alelopatia), inibição física, defesa de território, competição nutricional (competição por exploração, captação primária e secundária de recursos), defesa
Agonismo	- / + Redução de crescimento de uma das espécies e aumento de crescimento da outra	Interferência de hifas (antibiose e alelopatia)
<u>Interacções positivas</u>		
Comensalismo	0 / + Aumento de crescimento de uma das espécies sem prejuízo para a outra	Produção de exsudados e entrelaçamento de hifas
Mutualismo	+ / + Aumento de crescimento de ambas as espécies	Produção de exsudados e entrelaçamento de hifas

0 espécie não afectada pela presença da outra

+ espécie beneficiada pela presença da outra

- espécie prejudicada pela presença da outra

## Tipos de interacção não-nutritivas negativas entre fungos do solo

### Antagonismo

No antagonismo verifica-se a morte ou a redução do crescimento de uma das espécies fúngicas sem prejuízo para a outra (- / 0, Tabela 1), tendo como resultado a predominância do micélio antagonista, ou mesmo a substituição total ou parcial do fungo opositor. Os mecanismos responsáveis por esta resposta de interacção podem operar à distância (antagonismo à distância) ou após estabelecimento de contacto físico entre as colónias

fúngicas, resultando em reacções tais como "interferência de hifas" ou "inibição física" (Boddy 2000).

No **antagonismo à distância**, a inibição de crescimento do fungo opositor é usualmente atribuída à produção de compostos voláteis e/ou difusíveis, tais como antibióticos (Boddy 2000). Por vezes estão ainda envolvidos metabolitos ou enzimas extracelulares (Heilmann-Clausen & Boddy 2005). Neste tipo de antagonismo, as reacções são muito variáveis de acordo com a combinação de espécies fúngicas. No entanto, as reacções mais vulgares correspondem à lise e vacuolização das hifas ou à sua substituição pelo micélio da espécie invasora (Boddy 2000).

O mecanismo de "**interferência de hifas**" ocorre quando uma hifa estabelece contacto com uma outra hifa ou esporo da espécie interactuante, resultando na morte desta como consequência de uma série programada de eventos de destruição citoplasmática (Boddy 2000; Woods et al. 2005). Este tipo de antagonismo é um dos mais vulgares ao nível dos basidiomicetos saprófitas-lenhícolas, sendo a espécie *Phlebiopsis gigantea* a mais estudada devido à sua larga aplicação como agente de luta biológica contra *Heterobasidion annosum* (Pratt et al. 1999; Vainio et al. 2001; Annesi et al. 2005). O mecanismo de "interferência de hifas" não está perfeitamente esclarecido, mas é referido como sendo mediado pela produção de metabolitos difusíveis, não-enzimáticos, excretados apenas quando as hifas interactuantes estabelecem contacto (Boddy 2000).

O mecanismo de antagonismo designado por "**inibição física**" é o que apresenta maior relevância ao nível dos fungos. Este tipo de antagonismo ocorre após o estabelecimento de contacto de micélios de duas espécies fúngicas, resultando em alterações morfológicas nos fungos interactuantes. De uma maneira geral, estas alterações morfológicas, têm como função aumentar a resistência à penetração do micélio do fungo invasor ou possibilitar o crescimento micelial sobre ou através da colónia fúngica opositora (Dowson et al. 1988). Estas alterações morfológicas podem incluir especificamente (i) a formação de micélio denso que constitua uma "barreira" que impeça a invasão do fungo interactuante, (ii) a formação de um micélio "invasivo" pela criação de várias frentes de crescimento, (iii) a formação de um micélio com crescimento aéreo, e (iv) a formação de cordões miceliais ou de estruturas rizomórficas (Dowson et al. 1988; Boddy 2000; Donnelly & Boddy 2001; Wald et al. 2004; Woods et al. 2005). Estas alterações são normalmente acompanhadas por uma redistribuição do micélio, que passa a apresentar-se menos denso nas zonas distais à zona de interacção, tornando a colónia susceptível ao fungo invasor no caso de ocorrência de fragmentação da zona de interacção (Boddy 2000). É igualmente frequente ocorrer a produção intra- e intercelular de pigmentos (Donnelly & Boddy 2001). Nalgumas interacções estabelecidas entre fungos que formam cordões miceliais, pode ocorrer a descoloração e a indução de uma resposta lítica, num ou em ambos os segmentos dos cordões miceliais (Dowson et al. 1988). Esta resposta micelial foi designada pelos autores como "interferência de micélios" devido à sua semelhança com a resposta do mecanismo de antagonismo de "interferência de hifas".

### **Co-antagonismo**

O co-antagonismo verifica-se em interacções que exerçam um efeito negativo sobre ambas as espécies fúngicas (- / -, Tabela 1), traduzido numa redução de crescimento ou mesmo morte (Tuininga 2005). O co-antagonismo é facilmente identificável em co-culturas pela inibição do crescimento de ambas as espécies fúngicas, a qual pode ocorrer de forma assimétrica (e.g. somente na zona de interacção) ou de forma generalizada pelas colónias fúngicas. Os mecanismos responsáveis por esta resposta de interacção são idênticos aos referidos para o antagonismo. Poderão ocorrer mecanismos adicionais que englobam a exclusão de uma espécie por outra de um determinado recurso, através de agressão física ou química; e a competição por exploração onde uma das espécies utiliza um recurso tornando-o indisponível ou diminuindo a sua disponibilidade à outra espécie (Tuininga 2005).

### **Agonismo**

Neste tipo de interacção ocorre a redução de crescimento de uma das espécies e aumento de crescimento da outra espécie (- / +, Tabela 1). Este tipo de interacção distingue-se do parasitismo e da predação pela regulação da distribuição espacial de uma espécie em relação à outra, sem envolver directamente a aquisição de nutrientes por parte dos fungos interactuantes. Contudo, o acesso a determinados recursos acaba por ser regulado por uma das espécies. Por exemplo, no agonismo, a espécie A inibe o crescimento da espécie B, crescendo de seguida em direcção a B. A espécie A acaba assim por excluir a espécie B do território que inicialmente ocupava, beneficiando das alterações causadas no substrato pelo fungo B, tal como aquelas promovidas pela secreção de compostos, e não da transferência directa de nutrientes provenientes do fungo B (Tuininga 2005). Os mecanismos responsáveis pela inibição do crescimento da espécie B são essencialmente por "interferência de hifas".

### **Factores que afectam a interacção entre fungos**

O efeito da interacção entre fungos depende de múltiplas variáveis, tais como (i) factores abióticos, nomeadamente temperatura do substrato, pH, potencial hídrico, pressão atmosférica de CO<sub>2</sub>; (ii) estado fisiológico/nutricional das espécies fúngicas interactuantes; (iii) presença de uma terceira espécie fúngica; e mais importante ainda (iv) natureza intrínseca das espécies, ou seja a sua combatividade/agressividade (Boddy 2000; Wald et al. 2004; Cano & Bago 2005).

Inúmeros estudos têm vindo a ser realizados de modo a avaliar o efeito de factores abióticos no estabelecimento da interacção entre fungos, verificando-se que podem condicionar o crescimento de um dos fungos interactuantes em favorecimento do outro. Tem sido demonstrado que o crescimento da maioria das espécies fúngicas é afectado pelo potencial hídrico, cessando o seu crescimento quando este apresenta valores abaixo dos -4,4 MPa (Boddy 2000; Wald et al. 2004). A actividade antagonista de diversas espécies de

basidiomicetos tem sido descrita como ficando seriamente comprometida quando os níveis de CO<sub>2</sub> são elevados e os de O<sub>2</sub> baixos (Chapela et al. 1988). A temperatura e o pH do substrato parecem igualmente influenciar a forma e a taxa de crescimento dos fungos, com consequências ao nível do efeito da interacção (Schoeman et al. 1996; Wald et al. 2004). Enquanto alguns fungos crescem bem a 30°C, outros conseguem crescer quando a temperatura é de -18°C (Yakovlev et al. 2000; Wald et al. 2004). A maioria dos fungos promove alterações drásticas do pH do meio de cultura, baixando os seus valores iniciais (Wald et al. 2004).

A disponibilidade de nutrientes para ambas as espécies fúngicas influencia a interacção estabelecida, por determinar directamente o estado nutricional dos fungos interactuantes (Holmer & Stenlid 1997; Boddy 2000; Wells & Boddy 2002; Wald et al. 2004). De uma maneira geral, os fungos que ocupam um maior volume de substrato possuem uma maior capacidade combativa em relação aos fungos que ocupam menores volumes de substrato (Zakaria & Boddy 2002; Wald et al. 2004). O substrato onde é efectuado o crescimento de ambos os fungos também interfere na interacção estabelecida, tendo sido verificado que, para a mesma combinação fúngica, a interacção observada em solo nem sempre é idêntica à verificada noutro substrato, como por exemplo em madeira (Wells & Boddy 2002). De facto, a maioria dos estudos da interacção entre espécies fúngicas é realizada em condições axénicas, recorrendo a crescimentos efectuados em meios de cultura. Apesar dos resultados fornecerem informações importantes, a sua extrapolação directa para as condições naturais de campo deve ser feita com cuidado e com alguma reserva, uma vez que os resultados obtidos nem sempre são coincidentes com o obtido em substrato natural (Dowson et al. 1988).

A presença de uma terceira espécie fúngica pode ainda alterar a resposta da interacção, por um efeito indirecto da interacção ou pela modificação da interacção (Boddy 2000). Por exemplo, o fungo *Poria placenta* quando cultivado em agar substitui *Coniophora marmorata*, *C. marmorata* substitui o fungo imperfeito *Paecilomyces variotii* e *P. placenta* substitui *P. variotii* (White et al. 1998). Se as três espécies estivessem simultaneamente presentes, a extrapolação destes resultados sugeria que *P. variotii* era substituído por *C. marmorata*, que por sua vez era também substituído por *P. placenta*. Contudo, na prática, este resultado não se verifica, sugerindo que a resposta da interacção entre duas espécies não pode ser extrapolada para interacções com três espécies (White et al. 1998).

De entre os factores que influenciam a interacção entre duas espécies fúngicas, a combatividade/agressividade de ambas as espécies interactuantes é o principal determinante do tipo de interacção estabelecido. Existem alguns fungos que são inaptos no ataque e na defesa de um recurso, enquanto outros o fazem de um modo bastante eficaz. Existem ainda outros que são eficazes no ataque mas inabilitados na defesa, enquanto outros apesar de apresentarem más características para o ataque podem ser excelentes na defesa do recurso que ocupam. Esta multiplicidade de respostas da interacção entre diferentes espécies de fungos permitiu efectuar a hierarquização das espécies relativamente à sua combatividade

(Boddy 2000). Nesta hierarquização foi tido em conta o efeito da combatividade contra outros fungos (por exemplo, pela indisponibilidade de recursos) e também o nível da resposta de combatividade (por exemplo, na defesa do recurso ocupado face a fungos invasores).

### **Efeito das interações fúngicas negativas na comunidade fúngica do solo**

Os fungos saprófitas, em especial os basidiomicetos, exibem diferentes estratégias para a captura de nutrientes, que variam de acordo com a espécie, a quantidade e tipo de recurso disponível (solo ou madeira), o estado nutricional do fungo e a presença de outros organismos (Dowson et al. 1989; Holmer & Stenlid 1997; Boddy 1999). Em estudos de interacção com fungos tem sido evidenciada uma redução do crescimento ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) e da produção de biomassa ( $\text{mg dia}^{-1}$ ) de um dos micélios devido à presença de outro fungo no mesmo recurso (Donnelly & Boddy 2001). A superfície ocupada pelos micélios das colónias fúngicas interactuantes revelou ainda alterações na distribuição de um dos micélios que se apresentava menos denso e ramificado.

Durante a interacção entre fungos, é provável que ocorram modificações na actividade metabólica dos micélios interactuantes, decorrentes sobretudo da acção defensiva ou combativa contra o fungo opositor (Freitag & Morrell 1992). Algumas evidências sugerem que a competição entre dois fungos esteja associada a custos de energia, ocorrendo frequentemente alterações dos níveis de  $\text{CO}_2$  (aumento ou diminuição) durante as interacções antagonistas (Boddy 2000). Apesar de poucos trabalhos reportarem o efeito da interacção antagonista na translocação de nutrientes, alguns resultados sugerem a translocação de macronutrientes (carbono e de fósforo) entre fungos interactuantes, tendo sido igualmente verificada a perda de nutrientes na zona de interacção (Boddy 2000; Wells & Boddy 2002).

Das interacções interespecíficas nos fungos podem ser assim distinguidas repercussões negativas, não só ao nível da composição da comunidade fúngica, mas também ao nível do seu funcionamento. Neste último caso, os efeitos observados podem ocorrer no padrão de crescimento e distribuição dos respectivos micélios, na translocação de nutrientes num mesmo micélio e para outros organismos (inclusivamente para o fungo opositor) e nas taxas de libertação de  $\text{CO}_2$  (respiração) (Boddy 2000). A competição entre fungos constitui, assim, um dos mais importantes reguladores da densidade populacional e/ou da estrutura final da comunidade.

### **Efeito de fungos saprófitas no desenvolvimento micorrízico**

A associação simbiótica de fungos com raízes de muitas espécies de plantas superiores -as micorrizas - constitui uma das interacções mais importantes que ocorrem ao nível da rizosfera. Este tipo de associação caracteriza-se pela existência de fluxos de compostos inorgânicos do fungo para a planta e de compostos orgânicos da planta para o fungo (Smith &

Read 2008). A micorrização origina modificações fisiológicas na planta hospedeira, resultando numa melhoria para o seu crescimento, desenvolvimento e resistência/tolerância a stresses bióticos e abióticos (Jeffries et al. 2003; Barea et al. 2005), podendo ainda desempenhar uma multiplicidade de acções no sistema solo-planta (Jeffries et al. 2003; Lum & Hirsch 2003; van der Heijden 2004; Barea et al. 2005; Fageria & Stone 2006; Rillig & Mummey 2006). De acordo com as suas características morfofuncionais, as micorrizas são classificadas em três grupos distintos: endomicorrizas (incluindo as micorrizas arbusculares, orquidóides e ericóides), ectomicorrizas e ectendomicorrizas (incluindo as micorrizas arbutóides e monotropóides) (Smith & Read 2008).

Apesar da micorrização promover um aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, importante no crescimento e produtividade vegetal, o estudo da interacção de fungos micorrízicos com fungos de outros grupos ecológicos tem sido descurada. A maior parte dos trabalhos tem incidido sobre o efeito da inoculação de fungos saprófitas na micorrização de plantas por fungos arbusculares e em menor número por fungos ectomicorrízicos. Os resultados obtidos indicam que, de uma maneira geral, os fungos saprófitas reduzem o crescimento da planta e inibem a colonização das raízes pelos fungos arbusculares, comprometendo a micorrização (Fracchia et al. 1998; Godeas et al. 1999; Murphy & Mitchell 2001; Martinez et al. 2004). No entanto, este efeito nem sempre é observável podendo ocorrer uma resposta antagónica à descrita, a qual depende sobretudo da espécie e estirpe, quer do fungo saprófita quer do fungo arbuscular (García-Romera et al. 1998; Fracchia et al. 2000; Werner et al. 2002; Fracchia et al. 2004). A supressão da micorrização pelos fungos saprófitas ocorre principalmente durante a fase da pré-colonização do desenvolvimento simbiótico, através da inibição da germinação dos esporos e do crescimento das hifas dos fungos arbusculares (Martinez et al. 2004). Esta inibição resulta da produção de substâncias voláteis e de exsudados solúveis pelo fungo saprófita (Martinez et al. 2004). De entre as espécies saprófitas, cujo efeito na micorrização de plantas por fungos arbusculares foi estudado, destacam-se as espécies pertencentes aos géneros *Trichoderma* sp. (McAllister et al. 1994; Fracchia et al. 1998; Godeas et al. 1999; Wells & Boddy 2002; Werner et al. 2002; Fracchia et al. 2004; Martinez et al. 2004) e *Fusarium* sp. (McAllister et al. 1994; García-Romera et al. 1998; Fracchia et al. 2000).

O efeito de fungos saprófitas na micorrização de plantas por fungos ectomicorrízicos é, comparativamente aos fungos arbusculares, menos conhecido. A maioria dos estudos reporta apenas o efeito da interacção no crescimento das espécies fúngicas saprófitas e ectomicorrízicas, seja em condições axénicas (Shaw et al. 1995; Baar & Stanton 2000; Werner et al. 2002; Mucha et al. 2006; Sharma et al. 2010) ou em solo não estéril (Lindahl et al. 1999; Leake et al. 2001; Lindahl et al. 2001). Os resultados obtidos mostram que a resposta da interacção entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos é muito variável, dependendo das espécies e da combinação de espécies fúngicas, da disponibilidade de nutrientes, e da quantidade e tipo de carbono presente no substrato de crescimento dos fungos (Lindahl et al. 1999; Koide & Kabir 2000; Lindahl et al. 2001; Werner & Zadworny 2003). Por exemplo,

recorrendo ao método de cultura dupla, verificou-se que o fungo saprófita *T. harzianum* inibia o crescimento do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* (Zadworny et al. 2004), situação que se alterou quando a co-cultura, realizada nas mesmas condições, era estabelecida com o fungo saprófita *Trichoderma virens* (Werner et al. 2002). De igual modo, foram observadas respostas contraditórias em estudos de interacção entre espécies fúngicas ectomicorrízicas e saprófitas realizados sob condições não estéreis. Em estudos efectuados em solo não estéril foi observada uma acção antagonista dos fungos ectomicorrízicos *Suillus variegatus* e *Paxillus involutus* sobre o fungo lenhícola *H. fasciculare*, traduzida pela redução no crescimento do fungo lenhícola e pela captação de nutrientes (fósforo) deste para o fungo ectomicorrízico (Lindahl et al. 1999; 2001). Contudo, esta acção antagonista não foi idêntica para as duas espécies ectomicorrízicas, apresentando a espécie *S. variegatus* uma acção antagonista superior ao *P. involutus*. Utilizando uma técnica de cultura e um substrato de interacção semelhantes, foram descritos resultados diferentes para o fungo ectomicorrízico *Suillus bovinus* quando em co-cultura com o fungo lenhícola *Phanerochaete velutina*, verificando-se apenas redução no crescimento do fungo micorrízico (Leake et al. 2001). Neste caso, a diminuição do crescimento do fungo ectomicorrízico era ainda acompanhada pela redução da transferência de carbono da planta hospedeira para o fungo ectomicorrízico, e pelo aumento da acumulação de carbono no fungo lenhícola.

O efeito antagonista dos fungos saprófitas sobre os fungos micorrízicos poderá comprometer a micorrização das plantas e as vantagens que daí advém. Num estudo efectuado em condições de estufa verificou-se que a inoculação de plantas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) com o fungo lenhícola *Hypholoma fasciculare* inibia a micorrização das raízes pelo fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pereira et al. 2011). A supressão da formação de ectomicorrizas resultou num decréscimo de crescimento das plantas em altura (em 49%), dos níveis foliares em azoto (em 30%), e das clorofilas e carotenóides (em 30-40%), comparativamente às plantas inoculadas exclusivamente com *P. tinctorius*. Este efeito foi apenas observado em plantas inoculadas simultaneamente com as duas espécies fúngicas, deixando de se verificar quando *H. fasciculare* era aplicado isoladamente ou 30 dias depois da inoculação com *P. tinctorius*. Assim sendo, o efeito benéfico do *P. tinctorius* só se revelou quando o estabelecimento da associação simbiótica ocorria previamente à inoculação com *H. fasciculare*. Os resultados obtidos confirmam a existência de uma acção antagonista do fungo saprófita sobre o fungo ectomicorrízico, com consequências deletérias no crescimento da planta. Apesar de *P. tinctorius* se encontrar descrito como sendo um colonizador primário e eficiente na micorrização de muitas espécies de plantas, parece apresentar baixa acção competitiva contra *H. fasciculare*, que pelo contrário é apontado como sendo um fungo muito combativo. A esta espécie saprófita foi anteriormente reconhecida a capacidade de interferir no desenvolvimento de micorrizas pelo fungo ectomicorrízico *Suillus variegatus* em raízes de *Pinus sylvestris* (Lindahl et al. 2001). O efeito de fungos saprófitas comprometerem o estabelecimento de ectomicorrizas foi igualmente sugerido pela observação de uma redução

do número de raízes de *Pinus contorta* micorrizadas pelo fungo ectomicorrízico *Paxillus involutus* em solos contendo o fungo saprófita *Collybia maculate* (Shaw et al. 1995).

O efeito da interacção entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos pode também ter repercussões na nutrição mineral das plantas hospedeiras, nomeadamente em azoto e fósforo (Koide & Kabir 2001; Wu et al. 2003; Wu et al. 2005). Quando os teores destes nutrientes minerais no solo não são limitativos, os fungos saprófitas aumentam a sua disponibilidade para os fungos ectomicorrízicos, resultando numa melhoria do estado nutricional da planta hospedeira. Esta maior disponibilidade é particularmente relevante para os nutrientes minerais que derivam de polímeros complexos, os quais a maioria dos fungos ectomicorrízicos, ao contrário dos saprófitas, não consegue hidrolisar (Koide & Kabir 2001; Wu et al. 2005). Quando os solos apresentam teores limitativos em nutrientes, como azoto e fósforo, poderá ocorrer competição directa entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos, com prejuízos na nutrição mineral das plantas hospedeiras (Koide & Kabir 2001).

### **Aplicação da interacção: luta biológica de doenças**

Uma estratégia que tem vindo a ser utilizada para o controlo de determinadas doenças ou pragas consiste na luta biológica, onde é utilizado um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca um outro prejudicial a culturas de interesse. O aumento dos custos da luta química, a perda de eficiência de alguns dos produtos utilizados, os problemas ao nível da intoxicação do homem e dos animais e os problemas ambientais advindos destas práticas, têm vindo a promover a procura de alternativas para o controlo de fungos patogénicos. A utilização de microrganismos antagonistas como agentes biológicos apresenta potencialidades para (i) a limitação da actividade de patógenos, pela utilização de diversos mecanismos (dos quais se destacam o micoparasitismo, a produção de antibióticos ou de enzimas, e a competição por nutrientes), ou (ii) o aumento da resistência do hospedeiro, estimulando os seus mecanismos de defesa e/ou produção de metabolitos tóxicos (Brimner & Boland 2003).

De entre os fungos filamentosos, as espécies pertencentes ao género *Trichoderma* são reconhecidamente os microrganismos antagonistas mais utilizados na luta biológica, sendo por essa razão uns dos mais estudados. Estes fungos saprófitas têm sido frequentemente utilizados na luta biológica de patógenos radiculares, tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* spp., *Fusarium* spp. e *Armillaria* spp., e de patógenos da parte aérea, como por exemplo *Venturia* spp., *Botrytis* spp. e *Pyrenophora tritici-repentis* (Calistru et al. 1997; Inglis & Kawchuk 2002; Perelló et al. 2003). O seu modo de acção é variado podendo o seu mecanismo de antagonismo ser por parasitismo (Lu et al. 2004), pela produção de metabolitos voláteis e não voláteis (antibióticos, enzimas) (Inglis & Kawchuk 2002; Wiest et al. 2002; Reithner et al. 2005) ou pela competição por nutrientes, espaço e oxigénio (Brimner & Boland 2003).

A elevada agressividade exibida pela maioria dos fungos saprófitas sugere a sua utilização, como agentes biológicos, na luta de patógenos. Um exemplo de sucesso é a

utilização do fungo *Phlebiopsis gigantea* na prevenção da colonização pelo fungo patogénico *Heterobasidion annosum* das superfícies de corte (feridas) em troncos de pinheiro (*Pinus* spp.) ou de abeto (*Picea abies*) (Pratt et al. 1999; Vainio et al. 2001; Annesi et al. 2005). A acção do fungo *P. gigantea* deriva sobretudo da sua elevada taxa de crescimento nesses tecidos competindo, desta forma, com o agente patogénico pelo mesmo recurso por intermédio do mecanismo de antagonismo "interferência de hifas" (Boddy 2000; Woods et al. 2006). Os fungos saprófitas-lenhícolas formadores de cordões miceliais, por exibirem elevada agressividade, têm sido igualmente utilizados na luta biológica de determinados agentes patogénicos. De entre estes, destacam-se as espécies *Hypholoma fasciculare*, *Hypholoma australe*, *Phanerochaete filamentosa*, *Phanerochaete velutina*, *Coriolus versicolor*, *Stereum hirsutum*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* e *Xylaria hypoxylon* na luta biológica de *Armillaria* spp., um patogéneo radicular que ataca diversas espécies florestais e fruteiras, e algumas plantas herbáceas, nas regiões temperadas e tropicais (Pearce & Malajczuk 1990; Pearce et al. 1995; Chapman et al. 2004; Cox & Scherm 2006). Apesar da maioria destes trabalhos de antagonismo ter sido efectuada em condições laboratoriais, alguns casos de sucesso de luta biológica de *Armillaria* spp. em condições de campo têm sido referidos. De entre estes, destaca-se a redução significativa da taxa de mortalidade de plantas atribuída a *Armillaria ostoyae*, três a cinco anos após inoculação com o fungo *H. fasciculare* (Chapman et al. 2004). Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies fúngicas, nomeadamente *Hypholoma australe* e *Phanerochaete filamentosa*, cuja inoculação juntamente com um tratamento químico com sulfamato de amónio, reduziu significativamente a colonização de plantas pelo fungo patogénico *Armillaria luteobubalina* (Pearce et al. 1995). O mecanismo de antagonismo adoptado por estes agentes biológicos é normalmente ao nível da "interferência de hifas", sendo caracterizado pela cessação de crescimento do fungo patogénico como resultado da vacuolização, granulação e lise das hifas (Cox & Scherm 2006). Para além do controlo da *Armillaria*, alguns fungos saprófitas formadores de cordões miceliais têm demonstrado exercer um efeito antagonista, em condições laboratoriais ou de campo, contra o fungo patogénico *Heterobasidion annosum* que ataca sobretudo as raízes e o colo da maioria das coníferas (Nicolotti & Varese 1996; Woods et al. 2006). De entre estes, destacam-se as espécies *H. fasciculare*, *P. velutina*, *Verticillium bulbillosum* (Nicolotti & Varese 1996) e *Resinicium bicolor* (Woods et al. 2006).

## Conclusão

Os microrganismos que vivem no solo constituem uma comunidade complexa e variável, da qual depende a estrutura do solo e o saudável desenvolvimento das plantas. De entre a comunidade microbiana do solo, os fungos distinguem-se pelo seu papel na decomposição e mobilização de nutrientes, assim como na associação prejudicial (doenças) ou benéfica (micorrizas) que estabelecem com as plantas. As interacções intra- e interespecíficas entre fungos reflectem-se na composição e funcionamento da comunidade microbiana do solo,

podendo assim comprometer o desenvolvimento, nutrição e sanidade das plantas. As diferentes estratégias combativas e de defesa que os fungos apresentam para dominar ou defender o seu território ou nutrientes são principalmente definidas pelo papel que desempenham na comunidade fúngica. Fungos saprófitas apresentam elevada capacidade na captura de novos recursos e na defesa daqueles existentes, apresentando múltiplas estratégias de interacção não-nutritiva negativa. Nesse contexto, a maior parte dos agentes biológicos que têm vindo a ser estudados para a concepção de programas de luta biológica de patógenos radiculares pertencem ao grupo dos fungos saprófitas. A utilização de agentes biológicos no controlo de doenças permitirá ultrapassar muitos problemas que advêm da utilização de pesticidas, quer sejam de natureza económica, de eficácia ou, mais importante ainda, de natureza ambiental. No entanto, importa salientar que o efeito antagonista dos fungos saprófitas sobre os fungos micorrízicos poderá comprometer a micorrização das plantas e as vantagens que daí advêm. O conhecimento das interacções que são estabelecidas entre os diferentes microrganismos poderá assim permitir a prática de uma agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada, que permita a satisfação das necessidades alimentares das populações humanas actuais e futuras.

## Agradecimentos

Trabalho financiado pelo Projecto PTDC/AGR-AAM/099556/2008.

## Referências bibliográficas

- Annesi T, Curcio G, D'amico L, Motta E (2005) Biological control of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinea* by *Phlebiopsis gigantea*. *Forest Pathology*, 35: 127
- Baar J, Stanton NL (2000) Ectomycorrhizal fungi challenged by saprotrophic basidiomycetes and soil microfungi under different ammonium regimes *in vitro*. *Mycological Research*, 104:691–697
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778
- Boddy L (1999) Saprotrophic cord-forming fungi: Meeting the challenge of heterogeneous environments. *Mycologia*, 91: 13-32
- Boddy L (2000) Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 185-194
- Bowen GD, Rovira AD (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66: 1-102
- Brimner TA, Boland GJ (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 100: 3-16
- Calistru C, McLean M, Berjak P (1997) *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 139: 115-121.

- Cano C, Bago A (2005) Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 97: 1201-1214.
- Chapela IH, Boddy L, Rayner ADM (1988) Structure and development of fungal communities in beech logs four and half years after felling. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 59-70.
- Chapman B, Xiao G, Myers S (2004) Early results from field trials using *Hypholoma fasciculare* to reduce *Armillaria ostoyae* root disease. *Canadian Journal of Botany*, 82: 962-969.
- Cox KD, Scherm H (2006) Interaction dynamics between saprobic lignicolous fungi and *Armillaria* in controlled environments: Exploring the potential for competitive exclusion of *Armillaria* on peach. *Biological Control*, 37: 291-300.
- Donnelly DP, Boddy L (2001) Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming, saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist*, 151: 691-704.
- Dowson CG, Rayner ADM, Boddy L (1988) The form and outcome of mycelial interactions involving cord-forming decomposer basidiomycetes in homogeneous and heterogeneous environments. *New Phytologist*, 109: 423-432.
- Dowson CG, Springham P, Rayner ADM, Boddy L (1989) Resource relationships of foraging mycelial systems of *Phanerochaete velutina* and *Hypholoma fasciculare* in soil. *New Phytologist*, 111: 501-509.
- El-Shatnawi MKJ, Makhadmeh IM (2001) Ecophysiology of plant-rhizosphere system. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 187: 1-9.
- Fageria NK, Stone LF (2006) Physical, Chemical, and Biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1327-1356.
- Fracchia S, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA (2000) Effect of the saprophytic fungus *Fusarium osysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil*, 223: 175-184.
- Fracchia S, Mujica MT, García-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martín J, Ocampo J, Godeas A (1998) Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant and Soil*, 200: 131-137.
- Fracchia S, Sampedro I, Scervino JM, García-Romera I, Ocampo JA, Godeas A (2004) Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. *Symbiosis*, 36: 169-182.
- Freitag M, Morrell JJ (1992) Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 317-323.
- García-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martin JP, Jr., Fracchia S, Mujica MT, Godeas A, Ocampo J (1998) Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular mycorrhizas of soybean plants. *Symbiosis*, 24: 235-246.
- Godeas A, Fracchia S, Mujica MT, Ocampo JA (1999) Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi. *Mycorrhiza*, 9: 185-189.
- Heilmann-Clausen J, Boddy L (2005) Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial Ecology*, 49: 399-406.
- Holmer L, Stenlid J (1997) Competitive hierarchies of wood decomposing basidiomycetes in artificial systems based on variable inoculum size. *Oikos*, 79: 77-84.
- Inglis GD, Kawchuk LM (2002) Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 60-70.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 1-16.

- Kennedy AC (1998) The rhizosphere and spermosphere. In Principles and Applications of Soil Microbiology. (DM Sylvia, JJ Fuhrmann, PG Hartel, DA Zuberer, eds.) Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 389-407.
- Klein DA, Paschke MW (2004) Filamentous Fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. *Microbial Ecology*, 47: 224-235.
- Koide RT, Kabir Z (2001) Nutrient economy of red pine is affected by interactions between *Pisolithus tinctorius* and other forest-floor microbes. *New Phytologist*, 150: 179-188.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ (2001) Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following <sup>14</sup>C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology*, 21: 71-82.
- Lindahl B, Stenlid J, Finlay R (2001) Effects of resource availability on mycelial interactions and <sup>32</sup>P transfer between a saprotrophic and an ectomycorrhizal fungus in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 38: 43-52.
- Lindahl B, Stenlid J, Olsson S, Finlay R (1999) Translocation of <sup>32</sup>P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. *New Phytologist*, 144: 183-193.
- Lu Z, Tombolini R, Woo S, Zeilinger S, Lorito M, Jansson JK (2004) In vivo study of *Trichoderma*-pathogen interactions using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3073-3081.
- Lum MR, Hirsch AM (2003) Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 368-382.
- Martinez A, Obertello M, Pardo A, Ocampo JA, Godeas A (2004) Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, 14: 79-84.
- McAllister CB, Garcia-Romera I, Godeas A, Ocampo JA (1994) Interaction between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effect on plant growth, arbuscular mycorrhizas and saprophytic population. *Soil Biology and Biochemistry*. 26: 1363-1367.
- Mucha J, Dahm H, Strzelczyk E, Werner A (2006) Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. *Archives of Microbiology*, 185: 69-77
- Murphy EA, Mitchell DT (2001) Interactions between *Tricholomopsis rutilans* and ectomycorrhizal fungi in paired culture and in association with seedlings of lodgepole pine and Sitkaspruce. *Forest Pathology*, 31: 331-344.
- Nicolotti G, Varese GC (1996) Screening of antagonistic fungi against air-borne infection by *Heterobasidion annosum* on Norway spruce. *Forest Ecology and Management*, 88: 249-257.
- Pearce ME, Nelson EE, Malajczuk N (1995) Effects of the cordforming saprotrophs *Hypholoma australe* and *Phanerochaete filamentosa* and of ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycological Research*, 99: 951-956.
- Pearce MH, Malajczuk N (1990) Inoculation of *Eucalyptus diversicolor* thinning stumps with wood decay fungi for control of *Armillaria luteobubalina*. *Mycological Research*, 94: 32-37.
- Pereira E, Coelho V, Tavares RM, Lino-Neto T; Baptista P (2011) Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. *Mycorrhiza in press*
- Perelló A, Mónaco C, Simón MR, Sisterna M, Dal Bello G (2003) Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*, 22: 1099-1106.
- Pratt JE, Gibbs JN, Webber JF (1999) Registration of *Phlebiopsis gigantea* as a forest biocontrol agent in the UK: recent experience. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 113-118.

- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krska R, Zeilinger S (2005) The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 749-760.
- Rillig MC, Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171: 41–53.
- Schoeman MW, Webber JF, Dickinson DJ (1996) The effect of diffusible metabolites of *Trichoderma harzianum* on *in vitro* interactions between basidiomycete isolates at two different temperature regimes. *Mycological Research*, 100: 1454-1458.
- Sharma R, Rajak RC, Pandey AK (2010) Evidence of antagonistic interactions between rhizosphere and mycorrhizal fungi associated with *Dendrocalamus strictus* (Bamboo). *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1:112–117
- Shaw TM, Dighton J, Sanders FET (1995) Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Mycological Research*, 99: 159-165.
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, USA.
- Tuininga, A.R. (2005). Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. In *The fungal community its organization and role in the ecosystem*. Dighton J.; White J. F.; Oudeman P. edit. Taylor & Francis, London.
- Vainio EJ, Lipponen K, Hantula J (2001) Persistence of a biocontrol strain of *Phlebiopsis gigantea* in conifer stumps and its effects on within-species genetic diversity. *Forest Pathology*, 31: 285-295.
- Vainio EJ, Lipponen K, Hantula J (2001) Persistence of a biocontrol strain of *Phlebiopsis gigantea* in conifer stumps and its effects on within-species genetic diversity. *Forest Pathology*, 31: 285-295.
- van der Heijden MGA (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters*, 7: 293-303.
- Wald P, Crockatt M, Gray V, Boddy L (2004) Growth and interspecific interactions of the rare oak polypore *Piptoporus quercinus*. *Mycological Research*, 108: 189-197.
- Wells JM, Boddy L (2002) Interspecific carbon exchange and cost of interactions between basidiomycete mycelia in soil and wood. *Functional Ecology*, 16: 153-161.
- Werner A, Zadworny M (2003) In vitro evidence of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*. *Mycorrhiza*, 13: 41-47.
- Werner A, Zadworny M, Idzikowska K (2002) Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown in vitro. *Mycorrhiza*, 12: 139-145.
- White NA, Sturrock C, Ritz K, Samson WB, Bown J, Staines HJ, Palfreyman JW, Crawford J (1998) Interspecific fungal interactions in spatially heterogeneous systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 21-32.
- Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerley C (2002) Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 20862-20868.
- Woods CM, Woodward S, Pinard MA, Redfern DB (2006) Colonization of sitka spruce stumps by decay-causing hymenomycetes in paired inoculations. *Mycological Research*, 110: 854-868.
- Woods CM, Woodward S, Redfern DB (2005) In vitro interactions in artificial and wood-based media between fungi colonizing stumps of *Sitka spruce*. *Forest Pathology*, 35: 213-229.
- Wu T, Kabir Z, Koide RT (2005) A possible role for saprotrophic microfungi in the N nutrition of ectomycorrhizal *Pinus resinosa*. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 965-975.

- Wu T, Sharda JN, Koide RT (2003) Exploring interactions between saprotrophic microbes and ectomycorrhizal fungi using a protein-tannin complex as an N source by red pine (*Pinus resinosa*). *New Phytologist*, 159: 131-139.
- Yakovlev AY, Borovskii GB, Penzina TA, Petrov AN, Voinikov VK (2000) The influence of subzero temperatures on mycelial growth and fruit bodies vitality of some higher xylophilic basidiomycetes. *Mikologiya i Fitopatologiya*, 34: 56-62.
- Zadworny M, Werner A, Idzikowska K (2004) Behaviour of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* in vitro. *Mycorrhiza*, 14: 401-405.
- Zakaria AJ, Boddy L (2002) Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 135.

## **Cancro do Castanheiro - Luta biológica por hipovirulência**

**M.E. Gouveia; J.J. Rocha**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. egouveia@ipb.pt*

### **Resumo**

Para combater os inimigos das plantas diferentes estratégias devem ser consideradas. Os meios de luta biológicos são estratégias de protecção que consideram todo o agroecossistema com o objectivo de proteger as plantas e garantir a ausência de efeitos adversos. A hipovirulência é um método de luta biológica com elevada selectividade contra o Cancro do Castanheiro que permite controlar a doença e garantir a ausência de impactos negativos no ecossistema. A hipovirulência é uma atenuação da agressividade do fungo patogénico mediada por vírus citoplasmáticos, dsRNA, que não possuem fase extracelular e se transmitem na população do fungo patogénico por anastomose das hifas. O aparecimento de estirpes hipovirulentas não tem sido relatado até agora em Portugal, mas, recentemente, alguns casos de cancros com características de hipovirulência foram identificados pelos produtores de castanha. Depois de avaliados detectaram-se isolados de *Cryphonectria parasitica* com fenótipo branco e do mesmo grupo de compatibilidade da população virulenta, vc (UE-11). Nos isolados brancos *C. parasitica* foi observada redução da pigmentação e conidiação reduzida tendo ainda sido detectada a banda L-dsRNA (12 kbp), fragmento de diagnóstico de infecção por vírus de *C. parasitica*. Dada a especificidade do modo de acção, aplicou-se no mesmo local a estirpe hipovirulenta VP811 em 19 árvores de castanheiro afectadas. Nos cancros mais extensos procedeu-se à remoção dos tecidos necrosados e inoculação por pincelagem da estirpe hipovirulenta. Nos cancros de menor dimensão a aplicação da estirpe hipovirulenta foi realizada por inoculação na extremidade do cancro. Avaliações preliminares, seis meses depois da aplicação, evidenciaram que os cancros tratados não apresentavam crescimento de cancro e foram isoladas estirpes hipovirulentas e outros isolados apresentavam características intermédias quanto ao fenótipo e capacidade de produzir esporos. Avaliações futuras e em curso permitirão determinar a eficácia do tratamento tanto ao nível dos cancros tratados como também ao nível dos souts envolvente onde a doente se encontra presente.

**Palavras-chave:** *Cryphonectria parasitica*, cancro do castanheiro, dsRNA, estirpes hipovirulentas.



## **Seleção e caracterização de plantas com potencial para atrair a sirfídeo fauna do olival**

**L. Pinheiro<sup>1</sup>; L. Torres<sup>2</sup>; S.A.P. Santos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança.

<sup>2</sup>Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas, Departamento de Agronomia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real.

### **Resumo**

As larvas de sirfídeos têm potencial como agentes de luta biológica e, no olival, podem ser particularmente importantes como predadores naturais de *Euphyllura olivina* (algodão-da-oliveira). Os adultos necessitam do néctar e do pólen fornecido pelas plantas nativas e que funcionam, respectivamente, como fonte de energia e para estimular a maturação dos ovos nas fêmeas. Neste sentido, a implementação de recursos floristicamente diversos no olival pode oferecer uma possibilidade para reforçar o controlo biológico de conservação. O objectivo deste trabalho foi seleccionar e caracterizar 20 espécies de plantas com potencial para valorizar a sirfídeo fauna do olival. Doze espécies de plantas foram seleccionadas a partir de um estudo realizado em 36 olivais localizados na Beira Interior onde foram identificadas 100 espécies de plantas nativas. As restantes espécies (8) foram seleccionadas a partir de pesquisa bibliográfica. As 20 espécies de plantas foram caracterizadas atendendo aos seguintes critérios: época de floração e sincronia com o ciclo de vida dos sirfídeos, quantidade e acessibilidade de néctar e pólen, arquitectura e estrutura floral e fonte de presas alternativas. Este conjunto de plantas vai ser testado em laboratório para determinar a sua eficácia para promover, ou até incrementar, a sobrevivência, longevidade e fecundidade de uma espécie de sirfídeo, *Episyrphus balteatus* (De Geer).

**Palavras-chave:** Sirfídeo fauna, olival, flora natural, nectar, pólen.

## Introdução

O uso contínuo de produtos químicos perigosos e de determinadas técnicas agrícolas está a conduzir à degradação dos recursos naturais, à perda de biodiversidade e da paisagem (Altieri, 1999), nomeadamente nos olivais. Uma das maneiras possíveis para alcançar a sustentabilidade nos olivais é a conservação biológica (Samways, 1994, Torres, 2007) que consiste em manipular o habitat para melhorar a eficácia dos inimigos naturais. Deste modo, o incremento da biodiversidade de espécies vegetais no agroecossistema pode representar uma fonte suplementar de néctar floral e extrafloral (fonte de aminoácidos e açúcares), pólen (fonte de aminoácidos e proteínas), sementes, meladas (fonte de açúcares) presas/hospedeiros alternativos e refúgios. Neste sentido, a escolha de plantas-alvo são determinantes para a redução dos efeitos do impacto das pragas, incluindo a supressão ou a regulação das pragas (Colley e Luna, 2000; Amaro, 2003; Tooker et al., 2006; Thomson e Hoffmann, 2009).

As larvas de sirfídeos são conhecidas por atacarem uma ampla gama de pragas, em especial hemípteros e no olival têm sido referidas como potenciais predadores de algodão-da-oliveira, *Euphyllura olivina* (Costa) (López-Villalta, 1999).

Deste modo, a criação de um ambiente olivícola em equilíbrio com um ecossistema diversificado em plantas (Malavolta et al., 2002) pode representar uma melhoria das condições de crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e reprodução de inimigos naturais tais como os sirfídeos (Thompson, 1999; Franco, 2006; Wäckers et al., 2007). O objectivo desta pesquisa consistiu em seleccionar 20 plantas com potencial para incrementar a abundância da sirfideofauna do olival.

## Material e Métodos

Com base no estudo realizado por Nave *et al.* (2009), onde foram identificadas 100 espécies de plantas nativas recolhidas em 36 olivais localizados na Beira Interior, foi realizada uma recolha bibliográfica para seleccionar 20 espécies de plantas com potencial para atrair os sirfídeos. Adicionalmente, foram consideradas algumas espécies que, embora não estivessem descritas para o olival, pudessem ter interesse para o incremento desta entomofauna funcional.

Como critérios de selecção foram considerados os seguintes:

- a. interesse na valorização das espécies de sirfídeos;
- b. época de floração e sincronia com o ciclo de vida dos sirfídeos;
- c. arquitectura e morfologia floral;
- d. fonte e acessibilidade de néctar e pólen;
- e. fonte de presas alternativas.

## Resultados e Discussão

A selecção das espécies de plantas foi determinada por uma complexa série de factores que incluem além da época de floração, fonte e acessibilidade de néctar e pólen e arquitectura e estrutura florais. Assim, e tendo como ponto de partida a lista de plantas identificadas por Nave *et al.* (2009) em olivais da Beira Interior, foram eliminadas as plantas nativas com carácter invasor, como por exemplo *Chondrilla juncea* L., *Conyza canadensis* (L.) Cronq., *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter e *D. graveolens* (L.) W. Greuter.

De seguida, seleccionaram-se plantas potencialmente atractivas para os sirfídeos e que tivessem em conta as características anatómicas do insecto e a arquitectura da flor. Da lista de Nave *et al.* (2009) foram escolhidas doze plantas, as restantes oito foram seleccionadas a partir de pesquisa bibliográfica de acordo com o seu potencial para atraírem sirfídeos. Da análise do Quadro I verifica-se que 45% das plantas pertencem à família Asteracea por apresentarem um tipo de inflorescência que pode ter interesse como plataforma de aterragem e funcionar como zona de descanso e alimentação para os sirfídeos. As plantas da família Apiacea representam 30% do total de plantas seleccionadas e podem ser atractivas para os sirfídeos devido aos vários compostos voláteis que libertam, pelo tipo de corola aberta que permite um fácil acesso aos recursos florais (Gilbert, 1981; Tooker *et al.*, 2006) e pela abundância de flores por haste.

Uma vez que o pico de abundância dos sirfídeos adultos ocorre normalmente em Abril-Maio e depois em Setembro-Outubro, de acordo com observações efectuadas em Trás-os-Montes, as plantas seleccionadas têm também picos de floração que ocorrem naqueles períodos (Quadro 1). É o caso de *Bellis perennis*, *Chamaemelum fuscatum*, *Coleostephus myconis*, *Hypochoeris radicata*, *Matricaria chamomilla*, *Tolpis barbata*, *Senecio vulgaris*, *Daucus carota*, *Borago officinalis*, *Echium plantagineum*, *Hypericum perforatum*, *Calamintha baetica* e de *Malva neglecta*.

Relativamente à morfologia da flor, a cor da flor/inflorescência também foi um parâmetro que se teve em conta, uma vez que há estudos que comprovam que as flores brancas e amarelas atraem os sirfídeos (Lunau e Wacht, 1994; Sajjad e Saeed, 2010), critério comum a quase todas as plantas seleccionadas excepto a flor de *Calamintha baetica*, de *Echium plantagineum*, de *Malva neglecta* e de *Rosmarinus officinalis*, que são de cor rosa a roxa e de *Borago officinalis*, azul (Quadro 2).

Quanto à variação da produção de néctar, pólen e teores de açúcar entre as espécies de plantas seleccionadas pouco se sabe, para além disso, não há informação sobre como a variação do néctar, do pólen e da composição em açúcares afecta a selecção das flores por parte dos sirfídeos.

Quadro 1. Características das espécies seleccionadas

Espécies	Família	Época de floração	Duração
<i>Andryala integrifolia</i> L. *	Asteraceae	Junho – Agosto	Anual
<i>Bellis perennis</i> L.	Asteraceae	Janeiro - Setembro	Vivaz
<i>Chamaemelum fuscatum</i> (Brot.) Vasc. *	Asteraceae	Dezembro - Agosto	Anual
<i>Coleostephus myconis</i> (L.) Rchb.f. *	Asteraceae	Fevereiro - Agosto	Anual
<i>Hypochoeris radicata</i> L. *	Asteraceae	Abril - Novembro	Bianual
<i>Matricaria chamomilla</i> L. [= <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert] ou <i>Matricaria recutita</i> L.	Asteraceae	Abril – Junho	Anual
<i>Taraxacum officinale</i> Weber (Variedade: melhorado, de compra)	Asteraceae	Junho - Setembro	Vivaz
<i>Tolpis barbata</i> (L.) Gaertner *	Asteraceae	Abril - Julho	Anual
<i>Senecio vulgaris</i> L. *	Asteraceae	Quase todo o ano	Anual
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. (compra)	Apiaceae	Maio – Julho	Anual
<i>Anethum graveolens</i> L. (compra)	Apiaceae	Julho – Agosto	Anual
<i>Daucus carota</i> L. *	Apiaceae	Abril - Agosto	Anual
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill (silvestre e de compra) *	Apiaceae	Julho - Setembro	Vivaz
<i>Pimpinella anisum</i> L. (compra)	Apiaceae	-	Anual
<i>Borago officinalis</i> L.	Boraginaceae	Janeiro - Outubro	Anual
<i>Echium plantagineum</i> L. *	Boraginaceae	Março - Julho	Anual/ Bianual
<i>Hypericum perforatum</i> L. *	Hypericaceae	Maio - Outubro	Vivaz
<i>Calamintha baetica</i> Boiss. & Heldr. [= <i>Satureja baetica</i> (Boiss. & Heldr.) Pau] *	Lamiaceae	Abril - Dezembro	Vivaz
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Janeiro - Fevereiro	Vivaz
<i>Malva neglecta</i> Wallr. *	Malvaceae	Maio - Setembro	Vivaz

Nota: \* plantas que foram seleccionadas a partir de um estudo realizado em 36 olivais localizados na Beira Interior onde foram identificadas 100 espécies de plantas nativas.

Quadro 2. Características da flor das espécies seleccionadas.

Espécies	Corola				Referência
	Forma	Profundidade (mm)	Largura (mm)	Cor	
<i>Andryala integrifolia</i> L. *	Tubular	2,31	0,6	Amarela	
<i>Bellis perennis</i> L.	-	-	-	Branca	
<i>Chamaemelum fuscatum</i> (Brot.) Vasc. *	Tubular	-	-	Amarela	
<i>Coleostephus myconis</i> (L.) Rchb.f. *	-	-	25 - 45	Amarela	
<i>Hypochoeris radicata</i> L. *	-	-	11.45 +/- 1.08	Amarela	Torres e Galetto, 2002
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	-	-	-	Branca	
<i>Taraxacum officinale</i> Weber (Variedade: Melhorado, de compra)	-	-	10.94 +/-0.95	Branca	Torres e Galetto, 2002
<i>Tolpis barbata</i> (L.) Gaertner *	-	-	-	Amarela	
<i>Senecio vulgaris</i> L. *	Tubular	-	4-5	Amarela	
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. (compra)	-	-	-	Branca	
<i>Anethum graveolens</i> L. (compra)	-	0	2.63 ± 0.06	Amarela	Winkler <i>et al.</i> , 2009
<i>Daucus carota</i> L. *	Disco	0	3.05 ± 0.13	Branca	Winkler <i>et al.</i> , 2009
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (silvestre e de compra) *	Disco	0	-	Amarela	Winkler <i>et al.</i> , 2009
<i>Pimpinella anisum</i> L. (compra)	-	-	-	Branca	
<i>Borago officinalis</i> L.	-	-	-	Azul	
<i>Echium plantagineum</i> L. *	Funil	-	4,5	Roxo	
<i>Hypericum perforatum</i> L. *	Dialipétala	0	-	Amarela	
<i>Calamintha baetica</i> Boiss. & Heldr. *	Cilíndrico	5,0	1,2	Roxa	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Cilíndrico	5,09	2,04	Roxa	
<i>Malva neglecta</i> Wallr. *	Taça	-	-	Roxa	

Nota: \* plantas que foram seleccionadas a partir de um estudo realizado em 36 olivais localizados na Beira Interior onde foram identificadas 100 espécies de plantas nativas.

Outros factores relacionados com a anatomia, comportamento e ecologia dos sirfídeos podem também influenciar a escolha do recurso alimentar. Considerando a anatomia do aparelho bucal, que actua na alimentação dos sirfídeos, Gilbert (1985a) aponta o tipo e comprimento do aparelho bucal destes insectos, nomeadamente no que se refere à extensão da probóscide em relação ao tamanho do corpo, como um dos factores mais relevantes. Estas diferenças morfológicas entre as espécies de sirfídeos condicionam o tipo de recurso alimentar explorado. Para além disso, é comum os machos apresentarem comprimentos da probóscide maiores do que as fêmeas, o que lhes permite explorar néctar de forma mais eficaz do que as fêmeas, que ficam mais limitadas ao consumo de pólen ou a arquitecturas florais com nectários mais acessíveis (Gilbert, 1985b).

De uma maneira geral, estas espécies de plantas são colonizadas por várias espécies de afídeos, que representam presas alternativas para as larvas de sirfídeos (Sadeghi e Gilbert, 2000).

Em conclusão e no contexto mencionado, este trabalho representa um primeiro passo na selecção de um conjunto de espécies de plantas com potencial interesse na valorização da acção dos inimigos naturais do algodão-da-oliveira (*E. olivina*). As espécies seleccionadas estão a ser testadas quanto à sua capacidade para incrementar a sobrevivência, longevidade e fecundidade da espécie *Epysirphus balteatus* e todas as características que não se conseguiram obter por recolha bibliografia vão ser quantificadas de modo a completar os quadros.

Quadro 3. Características das fontes de alimento das plantas seleccionadas para Sirfídeos.

Espécies	Néctar	Produção 24h Néctar/flor (µl)	Pólen	Produção 24h Pólen/flor (mg)	Localização dos Nectários	Teor de Açúcar (mg/flor/24h)	Referência
<i>Andryala integrifolia</i> L. *	-	-	x	0,023	Restritivo	-	Bosch et al., 1997
<i>Bellis perennis</i> L.	-	-	-	-	-	-	
<i>Chamaemelum fuscatum</i> (Brot.) Vasc. *	-	-	-	-	-	-	
<i>Coleostephus myconis</i> (L.) Rchb.f. *	-	-	-	-	-	-	
<i>Hypochoeris radicata</i> L. *	-	-	-	-	-	-	
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	x	-	-	-	-	-	
<i>Taraxacum officinale</i> Weber	-	-	-	-	-	-	
<i>Tolpis barbata</i> (L.) Gaertner *	-	-	-	-	-	-	
<i>Senecio vulgaris</i> L. *	-	-	-	-	-	-	
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. (compra)	-	-	-	-	-	-	
<i>Anethum graveolens</i> (compra)	x	-	-	-	Exposto	-	
<i>Daucus carota</i> L. *	x	0,02	-	0,026	Totalmente exposto	-	Bosch et al., 1997
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (silvestre e de compra)*	x	0,18	x	0,039	-	-	Bosch, et al., 1997
<i>Pimpinella anisum</i> L. (compra)	-	-	-	-	-	-	
<i>Borago officinalis</i> L.	x	-	-	-	No tubo da corola	-	Ghorbel e Nabli, 1998
<i>Echium plantagineum</i> L. *	x	1000	x	-	Na base do tubo da corola ou em baixo dos ovários	-	
<i>Hypericum perforatum</i> L. *	-	-	x	0,39	-	-	
<i>Calamintha baetica</i> Boiss. & Heldr. *	x	-	x	-	-	-	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	x	0,5+/-0,1	x	-	-	0,23	Herrera, 1985
<i>Malva neglecta</i> Wallr. *	x	-	x	-	-	-	

Nota: \* plantas que foram seleccionadas a partir de um estudo realizado em 36 olivais localizados na Beira Interior onde foram identificadas 100 espécies de plantas nativas.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, com financiamento parcial do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, através do projecto PTDC/AGR-AAM/100979/2008, Incremento da biodiversidade funcional do olival, no fomento da protecção biológica contra pragas da cultura.

## Referências bibliográficas

- Amaro, P. (2003). *A Protecção Integrada*. ISA Press. Lisboa.
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 19–31.
- Bosch, J., Retana J., Cerdá, X. (1997). Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous mediterranean plant community. *Oecologia*, 109: 583-591.
- Colley, M. R., Luna, J. M (2000). Relative attractiveness of potential beneficial insectary plants to aphidophagous hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Environmental Entomology*, 29: 1054-1059.
- Franco, J.C., Ramos, P.A, Moreira, I. (2006) Gestão do habitat e protecção biológica. Franco, J. C, Ramos, A. P., Moreira, I. (Eds.). *Infra-estruturas ecológicas e protecção biológica - caso dos citrinos*. ISA Press. Lisboa, pp - 13-32.
- Gilbert, F.S. (1981). Foraging ecology of hoverflies morphology of the mouthpart in relation to feeding on nectar and pollen in some common urban species. *Ecological Entomology*, 6: 245-262.
- Gilbert, F.S. (1985a). Morphological approaches to community structure in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Proceedings of the Royal Society*, 224: 115-130.
- Gilbert, F.S. (1985b). Morphometric patterns in hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 224: 79-90.
- Ghorbel, S., Nabli, M.A. (1998). Pollen, pistil and their interrelations in *Borago officinalis* and *Heliotropium europaeum* (Boraginaceae). *Grana*, 37: 203-214.
- Herrera, J. (1985). Nectar secretion patterns in southern Spanish Mediterranean scrublands. *Israel Journal of Botany*, 34: 47–58.
- Lunau, K., Wacht, S. (1994). Optical releasers of the innate proboscis extension in the hoverfly *Eristalis tenax* L. (Syrphidae, Diptera). *Journal of Comparative Physiology A*, 174: 575-579.
- López-Villalta, M. C. (1999). Olive pest and disease management. Collection: Practical Handbooks. International Olive Oil Council. Madrid.
- Malavolta, C., Delrio, G., Boller, E.F. (2002). Guidelines for Integrated Production of Olives. Tech. Guidel. III. 1<sup>st</sup> Edition, 2002. *Bulletin. OILB/SROP*, 25:(4), 75 pp.
- Nave, A., Crespi, A., Campos, M., Torres, L.(2009). Infestantes do Olival com Interesse Potencial na Limitação Natural da Traça-da-Oliveira, Prays oleae. *XIX Congresso da SEMh/XIX Congresso da ALAM/ II Congresso da IBCM*.
- Sacchetti, P. (1990). Osservazioni sull'attività e sulla bio-etologia degli entomofagi di *Prays oleae* (Bern.) in Toscana, I – Predatori. Firenze; Redia, *Giornale di Zoologia*, Vol. LXXIII, n°1.
- Sadeghi, H., Gilbert, F. (2000). The effect of egg load and host deprivation on oviposition behaviour in aphidophagous hoverflies. *Ecological Entomology*, 25: 101-108.
- Sajjad, A., Saeed, S. (2010). Floral host plant range of Syrphid flies (Syrphidae: Diptera) under natural conditions in southern Punjab Pakistan. *Pakistan Journal Botany*, 42: 1187-1200.

- Samways, M.J. (1994). *Insect Conservation Biology*. Chapman & Hall.
- Thompson, S.N. (1999). Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 44: 561–92.
- Thomson, L. J., Hoffmann, A.A. (2009). Vegetation increases the abundance of natural enemies in vineyards. *Biological Control*, 49: 259–269.
- Torres, C., Galetto, L. (2002). Are nectar sugar composition and corolla tube length related to the diversity of insects that visit Asteraceae flowers? *Plant biology*, 4: 360- 366.
- Torres, L. (2007). *Manual de Protecção Integrada do Olival*. João Azevedo Editor. Viseu.
- Tooker, J.F., Hauser, M., Hanks, L.M. (2006). Floral host plants of Syrphidae and Tachinidae (Diptera) of central Illinois. *Annals Entomological Society of America*, 99: 96-112.
- Wäckers, F.L., Romeis, J., Van Rijn, P.C.J. (2007). Nectar and pollen feeding by insect herbivores and implications for multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology*, 52: 301–323.
- Winkler, K., Wäckers, F.L, Kaufman, L.V., Larraz V., Van Lenteren J.C. (2009). Nectar exploitation by herbivores and their parasitoids is a function of flower species and relative humidity. *Biological Control*, 50: 299–306.



## As plantas de bordadura do olival: o papel agroecológico de *Ditrichia viscosa* (L.) W. Greuter

L. Mota<sup>1</sup>; M. Porcel<sup>2</sup>; M. Campos<sup>2</sup>; A. Bento<sup>1</sup>; J.A. Pereira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CIMO / Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1171, 5301-854 Bragança, Portugal. jpereira@ipb.pt

<sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Professor Albareda 1, 18008 Granada, Espanha.

### Resumo

A vegetação existente na bordadura dos campos de utilização agrícola pode desempenhar um papel importante, do ponto de vista agroecológico, com repercussões ao nível da protecção fitossanitária das culturas. Esta vegetação serve de repositório de inimigos naturais (predadores e parasitóides) e contribui para a sua manutenção na parcela uma vez que pode fornecer alimentos alternativos quando os níveis populacionais das pragas são baixos ou inexistentes. É fonte de suplementos alimentares, como sejam meladas e néctares, com grande importância ao nível da performance de um grande número de auxiliares. Serve de local de abrigo, refúgio e hibernação quando são efectuadas algumas intervenções ao nível da parcela como sejam a aplicação de fitofármacos, mobilizações e podas. Adicionalmente, contribui para um aumento da biodiversidade e sustentabilidade ambiental.

*Ditrichia viscosa* (L.) W. Greuter é uma planta presente em abundância no Sul da Europa, que aparece frequentemente na berma das estradas e em locais alterados pelo homem. Em algumas regiões é frequente encontra-la na bordadura de olivais. Trabalhos recentes têm mostrado que *D. viscosa* pode desempenhar um papel agroecológico importante nos ecossistemas agrários onde está presente funcionando como reservatório de alguns predadores generalistas importantes, e de parasitóides de pragas agrícolas.

No olival, o seu papel prende-se essencialmente com o facto das suas flores serem atacadas pelo díptero formador de galhas, *Myopites stylatus* (Fabricius). As larvas deste díptero são atacadas por diversos parasitóides, entre os quais o himenóptero *Eupelmus urozonus* Dalm, considerado um parasitoide importante da mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* Rossi. Acresce ainda que as galhas servem de alimentação a indivíduos da ordem Lepidoptera que podem ser hospedeiros de parasitóides de outras pragas da oliveira. No presente trabalho discute-se o papel agroecológico de *D. viscosa* no olival e a sua relevância para a manutenção de predadores e parasitóides, agentes de limitação natural de pragas da oliveira.

**Palavras-chave:** *Ditrichia viscosa*, biodiversidade, predadores, parasitóides, mosca-da-azeitona.



## Fungos entomopatogénicos na luta contra pragas: o caso das pragas da oliveira

I. Oliveira<sup>1</sup>; P. Baptista<sup>1</sup>; T. Lino-Neto<sup>2</sup>; A. Bento<sup>1</sup>; J.A. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. jpereira@ipb.pt

<sup>2</sup>BioFIG, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga. Portugal

### Resumo

Em modos de produção sustentável, os fungos entomopatogénicos podem apresentar-se como uma boa alternativa ao uso de produtos químicos de síntese, uma vez que estes apresentam diversos problemas como sejam uma fonte importante de poluição ambiental, de resíduos nos produtos alimentares, com problemas de toxicidade para o Homem, e de desenvolvimento de resistência por parte das pragas onde são aplicados.

A oliveira é atacada por mais de 40 espécies fitófagas, contudo apenas um reduzido número causa importantes estragos à cultura. De entre as pragas, a mosca-da-azeitona (*Bactrocera oleae* Rossi) e a traça-da-oliveira (*Prays oleae* Bernard), são consideradas as mais importantes na maioria das regiões olivícolas.

No caso da mosca-da-azeitona, tem sido referida a virulência de alguns isolados fúngicos e a taxa de mortalidade induzida por fungos entomopatogénicos em pupas localizadas no solo dos olivais, enquanto que para a traça-da-oliveira, a presença deste fungos não tem praticamente sido referida. Neste trabalho apresentam-se os resultados do projecto levado a cabo nos últimos três anos na região de Trás-os-Montes e que incidiu na prospecção, isolamento, identificação e caracterização de fungos entomopatogénicos associados a pragas da oliveira. Foram identificadas diversas espécies com características entomopatogénicas das quais se destacam a *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides*, *Isaria farinosa*, *Lecanicillium psalliotae* e *Paecilomyces formosus*, maioritariamente associadas à traça-da-oliveira. *B. bassiana* foi a espécie mais abundante, representando 60% do total dos isolados entomopatogénicos identificados. As espécies pertencentes ao género *Cladosporium*, com 36% do total dos isolados, foram outro grupo importante. O isolamento destas espécies, e em especial de *B. bassiana*, pode constituir um estímulo para a sua utilização na luta contra pragas da oliveira, uma vez que a utilização de isolados autóctones, adaptados quer às condições climáticas quer às pragas em questão, aumenta a eficiência da luta biológica mas também a sustentabilidade ecológica do sistema de produção.

**Palavras-chave:** pragas da oliveira, fungos entomopatogénicos, *Beauveria bassiana*.



## **Estudo da influência do diâmetro dos orifícios de armadilhas Olipe na luta contra a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi)**

**V. Coelho<sup>1,2</sup>; J.A. Pereira<sup>1</sup>; S.A.P. Santos<sup>1</sup>; A. Mexia<sup>2</sup>; A. Bento<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. bento@ipb.pt

<sup>2</sup>Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

### **Resumo**

A mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi) é praga chave da oliveira na maioria dos países mediterrânicos, sendo também um dos inimigos mais importantes da cultura em Trás-os-Montes. Esta praga pode provocar prejuízos elevados chegando, em alguns anos, a atingir mais de 80% das azeitonas. Em modo de produção biológico, a utilização de armadilhas do tipo Olipe, para captura em massa de adultos de *B. oleae*, tem sido um método frequentemente utilizado em diferentes regiões da Península Ibérica. Esta armadilha consiste numa garrafa de plástico com capacidade de 1,5 litros, onde são feitos 6 orifícios, a cerca de 10 cm do topo, e em cujo interior é colocado um atractivo alimentar, em geral uma solução de fosfato biamónico a 3%. Apesar da facilidade de obtenção e do custo reduzido, a sua eficácia necessita de ser melhorada, considerando-se que o diâmetro dos orifícios, um dos aspectos a estudar. Assim, o objectivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes diâmetros dos orifícios (4, 6, 8 e 10 mm) das armadilhas Olipe na captura de mosca-da-azeitona e nos níveis de ataque nos frutos. O trabalho de campo decorreu em 2009 e 2010, num olival em modo de produção biológico localizado próximo de Mirandela. O olival foi dividido em cinco blocos com cerca de um hectare. Em quatro dos cinco blocos foram colocadas as armadilhas, a razão de uma armadilha por árvore e por diâmetro de orifício, enquanto no quinto, funcionou como testemunha. O acompanhamento dos níveis populacionais da mosca-da-azeitona foi feito semanalmente através da contagem dos adultos em armadilhas cromotrópicas amarelas com feromona, enquanto para a avaliação dos níveis de ataque, quinzenalmente foram observados 25 frutos por árvore num total de 20 árvores, tendo-se registado o número de frutos e o estado de desenvolvimento do insecto quando este se encontrava presente. Os resultados obtidos mostram que de maneira geral as armadilhas Olipe diminuem os níveis populacionais de *B. oleae* e consequentemente o nível de ataque nos frutos. Verificou-se também que as armadilhas com diâmetros superiores (8 e 10 mm) registaram maior número de capturas. Convém contudo registar que diâmetros superiores apresentam um maior impacto na fauna auxiliar dos olivais.

**Palavras-chave:** *Bactrocera oleae* (Rossi), Armadilhas Olipe; diâmetro dos orifícios, captura em massa.

## Introdução

A oliveira encontra-se distribuída por toda a região do Mediterrâneo, sendo um elemento característico da paisagem, onde tem grande importância económica, ecológica e social. Esta cultura é atacada por inúmeras pragas e doenças que diminuem o seu rendimento. De entre as pragas, a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), é praga-chave da cultura na maioria dos países mediterrânicos (Bento *et al.*, 1997).

A mosca-da-azeitona pode causar estragos quer quantitativos quer qualitativos. Os primeiros, resultam da queda prematura dos frutos e da destruição da polpa pelas larvas (Neuenschwander e Michelakis, 1978; Economopoulos *et al.*, 1986), enquanto os qualitativos decorrem da perda de qualidade do azeite proveniente dos frutos atacados, caso se trate de azeitona para azeite, e na total desvalorização comercial, no caso da azeitona de mesa (Civantos, 1999; Pereira *et al.*, 2004). Em anos de forte ataque, e quando não são dispensados meios de protecção adequados à cultura, este insecto é responsável por grandes prejuízos, podendo atingir totalidade dos frutos atacados (Bento *et al.*, 1999, 2003, 2009; Broumas *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, o combate a esta praga era feito com recurso a insecticidas (Zervas, 1982; Haniotakis *et al.*, 1991; Broumas e Haniotakis, 1994; Montiel-Bueno e Jones, 2002), o que pode por em causa a qualidade e segurança alimentar dos produtos do olival e ter implicações negativas para o ambiente. Vários estudos têm demonstrado a existência de resíduos de pesticidas em azeites provenientes de azeitonas tratadas (Botitsi *et al.*, 2004; Dugo *et al.*, 2005; Tsoutsi, 2006; Cunha *et al.*, 2007; García-Reyes *et al.*, 2007; Amvrazi e Albanis, 2009), com as possíveis implicações ao nível da saúde humana, por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que a aplicação de pesticidas contra a mosca tem um forte impacto negativo na fauna auxiliar do olival (Cirio, 1997; Civantos, 1999; Ruano *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003), na perda de biodiversidade e no desenvolvimento de resistência na praga em questão (Marc *et al.*, 1999; Hawkes *et al.*, 2005). As implicações referidas e as limitações de uso de pesticidas em modos de produção sustentável, como o modo de produção biológico, justificam a procura e o desenvolvimento de meios alternativos como sejam a captura em massa (Reg. CEE 2092/91; Andrea *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de testar dispositivos e/ou atraentes para captura em massa de *B. oleae* (armadilhas cromotrópicas garrafas mosqueiras com atractivo alimentar e armadilhas com sais amoniacais e feromonas sexuais mais piretróides) (Broumas *et al.*, 1983; Delrio, 1985; Bento *et al.*, 1998; Montiel-Bueno e Jones, 2002; Ragoussis, 2005). No sul de Espanha, em 1997, a Cooperativa Olivarera de los Pedroches, começou a utilizar dispositivo de captura contra a mosca-da-azeitona, posteriormente apelidado de armadilhas tipo Olipe (Caballero, 2001), que não é mais que uma garrafa de plástico translúcido (PET), com capacidade de 1,5 litros (30 cm de altura, 9 cm de diâmetro), perfurada, usualmente com 6 orifícios a cerca de 10 cm do topo, e em cujo interior

se coloca um atractivo alimentar, em geral uma solução aquosa amoniacal e em algumas situações uma feromona.

Em olivais conduzidos sob o modo de produção biológico, a captura em massa com armadilhas tipo Oliwe é uma opção promissora, devido ao seu baixo custo e eficácia, podendo reduzir as populações de mosca-da-azeitona para níveis considerados aceitáveis (Caballero, 2002; Altolaquirre-Obrero *et al.*, 2003; Bento *et al.*, 2004; Pavão *et al.*, 2007). No entanto, a grande variabilidade de resultados registada, a nocividade para a fauna auxiliar associada à cultura e a perda de eficácia durante o período em que estão no campo são factores que limitam a sua utilização. Neste sentido, com o presente trabalho pretende-se estudar o efeito do diâmetro dos orifícios (10, 8, 6 e 4 mm) como forma de melhorar a sua acção contra a praga, pela diminuição dos seus níveis populacionais, aumentando a sua eficácia.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado num olival conduzido em modo de produção biológico, localizado na região de Mirandela - nordeste de Portugal (41°29'20.76"N, 7°07'36.02"W), nos anos de 2009 e 2010. As oliveiras encontram-se com um marco de plantação de 7 x 7 metros, são de tamanho médio e pertencem à cultivar Cobrançosa.

O olival foi dividido em cinco blocos com cerca de um hectare cada, onde em quatro dos cinco blocos foram colocadas armadilhas Oliwe, à razão de uma armadilha por árvore, e correspondendo a cada um dos diâmetros de orifício estudados (10, 8, 6 e 4 mm). O quinto bloco actuou como testemunha, não se colocando qualquer armadilha. As armadilhas foram posteriormente cheias até 2/3 da sua capacidade com uma solução de fosfato biamónio 3% (Ammonium di-Hydrogen Phosphate, Panreac) e colocadas no interior da copa, à altura de cerca de 1,5 metros, permanecendo no campo desde o final de Agosto até ao final de Outubro, em 2009, e entre meados de Agosto e início de Novembro, em 2010. Quinzenalmente procedia-se à contagem de adultos de mosca-da-azeitona capturados em cada modalidade com armadilha Oliwe. Periodicamente, foi acrescentada a solução de fosfato biamónio 3% para evitar que as armadilhas ficassem vazias devido à evaporação.

A curva de voo obteve-se a partir do cálculo da média das capturas registadas em 5 armadilhas cromotrópicas com feromona e 5 armadilhas cromotrópicas sem feromona, que foram colocadas no início de Julho e se mantiveram até meados de Novembro. As contagens das capturas nestas armadilhas eram feitas semanalmente.

Quinzenalmente, eram recolhidas 20 azeitonas por árvore para num total de 25 árvores escolhidas aleatoriamente em cada modalidade (testemunha, armadilhas Oliwe com orifício de 10, 8, 6 e 4 mm de diâmetro). O ataque nas azeitonas foi observado em laboratório à lupa binocular através da observação de fases imaturas (ovo, larva, pupa e orifícios de saída), tendo-se calculado a percentagem de frutos atacados por modalidade e data. Em 2009 o período de observação decorreu desde o início de Setembro e até final de Outubro. Em 2010, o

período de observação das azeitonas iniciou-se em meados de Agosto e prologou-se até ao início de Novembro. O efeito do tamanho dos orifícios na luta conta a mosca-da-zeitona foi avaliado pelo número de frutos atacados em cada modalidade e o estado fenológico de *B. oleae* em cada fruto.

## Resultados e Discussão

Pela análise das curvas de voo de *B. oleae* (Figura 1), verifica-se que esta praga se encontra presente durante todo o período de observação, atingindo um pico de capturas em Outubro, facto também já observado por Bento *et al.* (1999), Neves (1999), Vilarinho (1999) e Gonçalves *et al.* (2007) em outros olivais da região de Trás-os-Montes. O número de capturas em 2009 foi bastante superior, comparativamente a 2010.

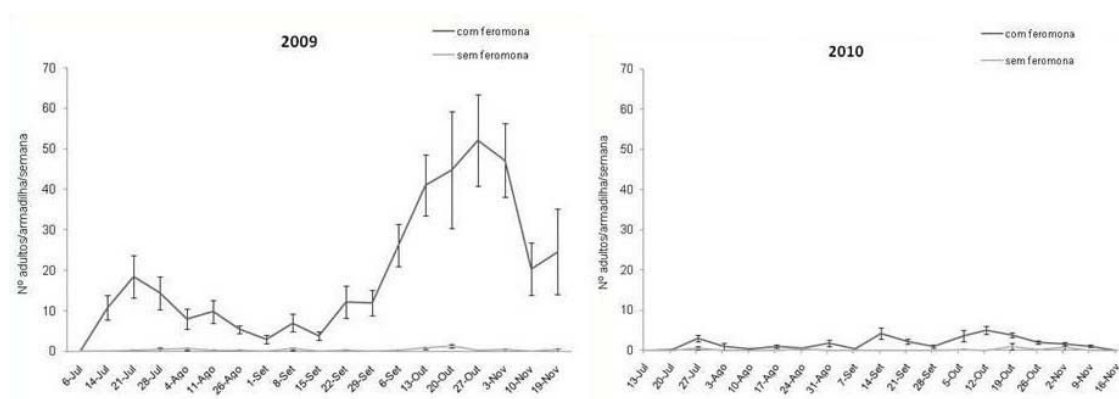


Figura 1. Curvas de voo de *Bactrocera oleae* (Rossi) no olival em estudo. Mirandela, 2009 e 2010.

Os dados da fenologia dos estados imaturos de *B. oleae* correspondentes aos anos 2009 e 2010 encontram-se nos Quadros 1 e 2. As diferenças observadas entre os dois anos podem em parte ser justificadas pelas temperaturas mais elevadas registadas em 2010, onde se registaram no mês de Agosto vários dias consecutivos com temperaturas superiores a 35°C. Está referido para esta praga que temperaturas superiores a 35°C provocam elevada mortalidade de ovos e larvas (Gomes e Cavaco, 2003). Em 2009, todos os estados fenológicos observados ao longo do tempo foram sempre superiores na modalidade que serviu como testemunha em comparação com as modalidades onde foram colocadas as armadilhas Olipe com os diferentes tamanhos de orifícios. Na altura da colheita, que ocorreu na última semana de Outubro, registou-se um maior número de ovos, larvas, pupas e orifícios de saída na modalidade que serviu de testemunha.

De um modo geral, atendendo à data em que aparecem os primeiros ovos, verifica-se que as posturas ocorrem mais tarde nas modalidades onde havia armadilhas Olipe, em especial para os tamanhos de orifícios de 8, 6 e 4 mm, atrasando assim o ciclo biológico da praga, como se pode verificar pelo menor número de frutos com orifícios de saída de pupas nessas modalidades em comparação com a modalidade que serviu de testemunha.

Quadro 1. Dados do ciclo de vida de *Bactrocera oleae* (Rossi) nos diferentes blocos ensaiados (testemunha, armadilhas Oliwe com orifício de entrada de 10, 8, 6 e 4 mm de diâmetro). Mirandela, 2009.

Data	Testemunha			
	O	L	P	OS
01-09	0	10	3	2
15-09	2	20	0	0
29-09	4	31	0	3
13-10	25	49	4	5
20-10	39	57	3	5
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>167</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
Armadilhas Oliwe com 10 mm de diâmetro				
01-09	0	0	0	0
15-09	2	1	0	0
29-09	4	8	0	0
13-10	10	5	0	0
20-10	13	4	0	0
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Armadilhas Oliwe com 8 mm de diâmetro				
01-09	0	8	0	1
15-09	0	18	0	2
29-09	4	7	1	0
13-10	19	21	2	1
20-10	24	38	0	1
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>92</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Armadilhas Oliwe com 6 mm de diâmetro				
01-09	0	0	0	0
15-09	0	1	0	0
29-09	1	1	0	0
13-10	7	17	0	0
20-10	20	13	0	0
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Armadilhas Oliwe com 4 mm de diâmetro				
01-09	0	0	0	0
15-09	0	0	0	0
29-09	3	4	0	0
13-10	10	9	1	0
20-10	25	27	1	0
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>40</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

O – Ovo, L – Larva, P – Pupa, OS – Fruto com orifício de saída

Em 2010, o número total de ovos e larvas no final do ensaio foi superior na modalidade com armadilhas Oliwe com 8 mm de diâmetro. Não foi registada a presença de pupas nos frutos em nenhuma das modalidades, no entanto surgiu um número anormalmente elevado de picadas.

No que respeita ao ataque dos frutos, verificou-se que em todos os blocos ensaiados, a percentagem de frutos atacados foi mais alta em 2009 relativamente a 2010. Em 2009, a percentagem de frutos atacados, no final do ensaio, foi superior na modalidade que serviu como testemunha (sem colocação de armadilhas Oliwe), tendo-se registado no final do ensaio 19% dos frutos atacados (Figura 2), quase o dobro do registado nas modalidades onde foram colocadas armadilhas Oliwe. A modalidade com armadilhas Oliwe com orifício de 10 mm de diâmetro foi aquela que apresentou no final do ensaio a percentagem mais baixa de frutos

atacados (3,4%), parecendo haver aqui um efeito positivo da utilização das garrafas de maior diâmetro na redução de níveis populacionais de mosca-da-azeitona.

Quadro 2. Dados do ciclo de vida de *Bactrocera oleae* (Rossi) nos diferentes blocos ensaiados (testemunha, armadilhas Olipe com orifício de entrada de 10, 8, 6 e 4 mm de diâmetro). Mirandela, 2010.

Data	Testemunha				
	O	L	P	OS	PSN
17-08	1	0	0	0	0
31-08	3	1	0	0	0
14-09	3	1	0	0	5
28-09	1	0	0	0	3
12-10	4	1	0	0	11
26-10	10	0	0	5	22
02-11	7	5	0	7	15
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>56</b>
Armadilhas Olipe com 10 mm de diâmetro					
17-08	1	0	0	0	0
31-08	2	0	0	0	0
14-09	0	0	0	0	4
28-09	0	0	0	0	11
12-10	3	2	0	0	8
26-10	2	2	0	0	21
02-11	1	6	0	0	12
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>56</b>
Armadilhas Olipe com 8 mm de diâmetro					
17-08	1	1	0	0	0
31-08	2	0	0	0	0
14-09	2	0	0	0	2
28-09	2	0	0	1	6
12-10	10	1	0	0	6
26-10	12	15	0	0	4
02-11	7	12	0	0	44
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>29</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>62</b>
Armadilhas Olipe com 6 mm de diâmetro					
17-08	2	2	0	0	0
31-08	3	0	0	0	0
14-09	3	2	0	1	5
28-09	0	1	0	0	19
12-10	8	2	0	0	14
26-10	15	4	0	1	10
02-11	3	1	0	1	6
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>54</b>
Armadilhas Olipe com 4 mm de diâmetro					
17-08	0	0	0	0	0
31-08	1	0	0	0	0
14-09	1	1	0	0	2
28-09	0	0	0	0	2
12-10	2	1	0	0	20
26-10	7	2	0	0	7
02-11	0	1	0	0	4
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>35</b>

O – Ovo, L – Larva, P – Pupa, OS – Fruto com orifício de saída, PSN – Picada sem nada

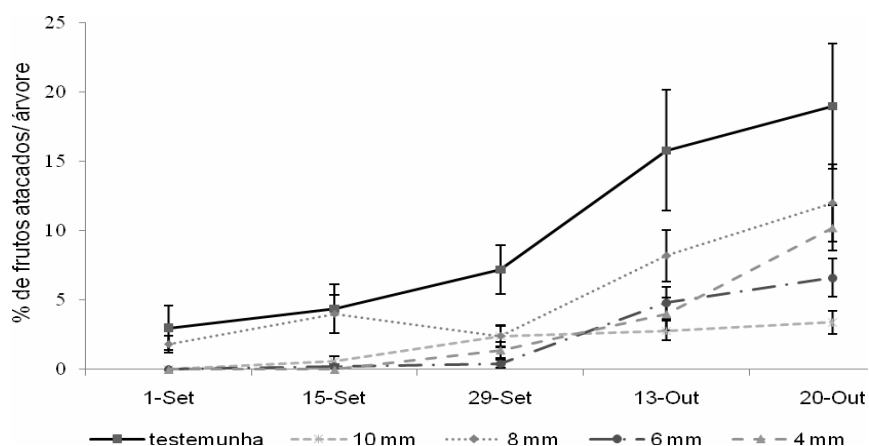


Figura 2. Evolução da percentagem de frutos atacados por *Bactrocera oleae* (Rossi) nos diferentes blocos ensaiados (testemunha, armadilhas Olipe com orifício de entrada de 10, 8, 6 e 4 mm de diâmetro). Mirandela, 2009.

Relativamente ao ano de 2010, a modalidade que serviu como testemunha registou no final do ensaio, 6,8% de frutos atacados, tendo a modalidade com armadilhas Olipe com orifícios de entrada de 8 mm de diâmetro registado uma percentagem superior de frutos atacados (12,6%), como se pode verificar na Figura 3. A percentagem mais baixa de frutos atacados (1,0%) foi registada na modalidade com armadilhas Olipe com orifícios de entrada de 4 mm de diâmetro. Neste ano, verifica-se também uma baixa percentagem (3,8%) na modalidade com o maior tamanho de orifício.

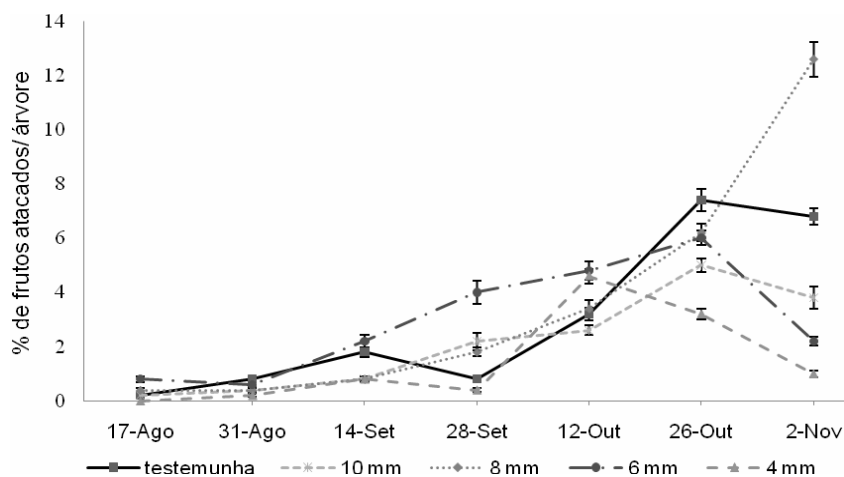


Figura 3. Evolução da percentagem de frutos atacados por *Bactrocera oleae* (Rossi) nos diferentes blocos ensaiados (testemunha, armadilhas Olipe com orifício de entrada de 10, 8, 6 e 4 mm de diâmetro). Mirandela, 2010.

## Conclusão

*B. oleae* é uma praga importante nos olivais da região de Trás-os-Montes, encontrando-se presente durante todo o tempo de estudo deste trabalho. Em 2009 registaram-se níveis populacionais mais elevados relativamente a 2010. As diferenças observadas entre os dois anos podem em parte ser justificadas pelas temperaturas mais elevadas registadas em 2010, onde se registaram no mês de Agosto vários dias consecutivos com temperaturas superiores a 35°C.

A percentagem de frutos atacados foi superior no ano de 2009. Constatou-se que a percentagem de ataque sendo relativamente baixa no início do ensaio, atinge os níveis máximos no final de Outubro o que está de acordo com observações anteriores em outros olivais da região de Trás-os-Montes (Bento *et al.* 1999; Neves, 1999; Vilarinho, 1999).

Quanto ao efeito dos diferentes tamanhos de orifícios de entrada nas armadilhas Oliwe na redução de níveis populacionais de mosca-da-azeitona, verifica-se que em ambos os anos a percentagem de frutos atacados é baixa na modalidade com armadilhas Oliwe de 10 mm de diâmetro, registando-se também um número reduzido de ovos e larvas no final do ensaio, altura em que a população de *B. oleae* atinge o pico de voo. Pela análise dos dados dos dois anos, parece haver aqui um efeito positivo da utilização das garrafas de maior diâmetro na redução de níveis populacionais de mosca-da-azeitona.

Em ambos os anos verificou-se uma redução de frutos com orifício de saída de pupas nas modalidades onde foram ensaiadas as armadilhas Oliwe com os diferentes tamanhos de orifício, em relação à modalidade que serviu como testemunha. Esta redução, aparentemente provocada pela presença das armadilhas Oliwe, pode contribuir para a obtenção de azeites de melhor qualidade pois, segundo Pereira (2000), a qualidade do azeite pode ser negativamente afectada com o aumento de acidez, do índice de peróxido e da redução da resistência à oxidação, principalmente devido à diminuição de antioxidantes naturais, provocado pela instalação de fungos e bactérias nas feridas causadas pela mosca-da-azeitona.

## Agradecimentos

Trabalho realizado no âmbito da Bolsa nº SFRH/BD/65316/2009, atribuída ao primeiro autor, pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

## Referências Bibliográficas

Altolaquirre-Obrero, M.; López-Pérez, A.; Caballero-Jiménez, J.A., 2003. Estrategia alternativa al control de mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin) mediante "trampa OLIPE". Ensayos en distintas zonas de la provincia de Córdoba. Actas del XI Simposium Científico-Técnico Expoliva 2003. Jaén, Spain, May 14-16.

- Amvrazi, E.G.; Albanis, T.A., 2009. Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry*, **113**, 253–261.
- Andrea, L.; Delrio, G.; Cipriano, F., 2005. Experiments for the control of olive fly in organic agriculture. *IOBC/wprs Bulletin*, **28**, 73-76.
- Bento, A.; Cabanas, J.E.; Pereira, J.A., 2004. Control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.), in organic agriculture. 5th International Symposium on olive growing, 27 September - 2 October. Izmir/Turkiye, Livro de resumos, 62p.
- Bento, A.; Pereira J.A.; Cabanas, J.E.; Pinto, A.; Torres, L., 2003. Economic injury levels for the olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.), in Trás-os-Montes region (Northeast of Portugal). 1st European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group "Integrated Control in Olives", MAICH—CHANIA, CRETE, HELLAS, May 29–31, 2003, p 27
- Bento, A.; Pereira, J.; Cabanas, J.; Pinto, A.; Torres, L., 2009. Sensibility of different olive cultivars to infestations by the olive fly, *Bactrocera oleae*, and the olive moth, *Prays oleae*. *Actas Portuguesas de Horticultura*, **13**, 134–140
- Bento, A.; Torres, L.; Lopes, J., 1999. Studies on the controlo of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.) by mass trapping. *XIV International Plant Protection congress (IPPC)*, Jerusalem, Israel, July 25-30, 1999, 104.
- Bento, A.; Torres, L.; Lopes, J.; Pereira, J.A.; Rocha, M., 1998. Ensaio de captura em massa contra a mosca da azeitona *Bactrocera oleae* (Gmel.). *Revista de Ciências Agrárias*. Vol. XXI, Nº **1,2,3 e 4**, 231-235.
- Bento, A.; Torres, L.; Sismeiro, R.; Lopes, J., 1997. A contribution to the knowledge of *Bactrocera oleae* (Gmel) in Trás-os-Montes region (Northeastern Portugal): phenology, losses and control. *Acta Horticulturae*, **474** (2), 541-544.
- Botitsi, E.; Kormali, P.; Kontou, S.; Mourkojanni, A.; Stavrakaki, E.; Tsipi, D., 2004. Monitoring of pesticide residues in olive oil samples: Results and remarks between 1999 and 2002. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **84**, 231–239.
- Broumas, T.; Haniotakis, G., 1994. Comparative field studies of various traps and attractants of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Entomology Experimentalis Applied*, **73**, 145-150.
- Broumas, T.; Haniotakis, G.; Liaropoulos, C.; Tomazou, T.; Ragoussis, N., 2002. The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): pilot-scale feasibility studies. *Journal of Applied Entomology*, **126**, 217-223.
- Caballero, J. A., 2001. Control de plagas y enfermedades de Olivares ecológicos en la Comarca de Los Pedroches. En la practica de la agricultura y ganadera ecológica. Comité Andaluz de Agricultura Ecológica (C.A.A.E.) Sevilla, España, pp 258-265.
- Caballero, J. A., 2002. Sistema de control de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) en olivar ecológico. Experiencias en "Los Pedroches". Actas de la I Conferencia Mundial de IFOAM sobre olivar ecológico: Producciones y culturas. Puente de Génave (Jaén), Spain, May 22-25. pp. 421-424.
- Cirio, U., 1997. Productos agroquímicos e impacto ambiental en olivicultura. *Olivae* **65**, 32-39.
- Civantos, M., 1999. Control de plagas y enfermedades del olivar. Consejo Oleícola Internacional, Madrid, Spain. 207 pp.
- Cunha, S.C.; Fernandes, J.O.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P., 2007. Comparison of matrix solid-phase dispersion and liquid-liquid extraction for the chromatographic determination of fenthion and its metabolites in olives and olive oils. *Food Additives and Contaminants*, **24**(2), 156–164.
- Delrio, G., 1985. Biotechnical methods for olive pest control. In Cavalloro, R & Croveti, A. (Eds). Integrated pest control in olive-groves. *Proceed. of the CEC/FAO/IOBC International joint Meeting*, Pisa, Italy, 3-6 April 1984, 394-410.

- Dugo, G.; Di Bella, G.; La Torre, L.; Saitta, M., 2005. Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. *Food Control*, **16**, 435–438.
- Economopoulos, A.P.; Raptis, A.; Stavropoulou-Delivoria, A.; Papadopoulos, A., 1986. Control of *Dacus oleae* by yellowsticky traps combined with ammonium acetate slow-release dispensers. *Entomology Experimentalis Applied*, **41**, 11–16.
- García-Reyes, J.; Ferrer, C.; Gómez-Ramos, M.J.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A., 2007. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol **26**(3), 239-251.
- Gomes, H.B.; Cavaco, M., 2003. Protecção integrada oliveira. Lista dos produtos fitofarmacêuticos. Níveis económicos de ataque. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Direcção Geral de Protecção das Culturas, 55p.
- Gonçalves, F.; Oliveira, A.; Torres, L., 2007. Contribuição para o conhecimento da bioecologia da mosca-da-azeitona *Bactrocera (Daculus) oleae* (Gmelin) na Terra Quente Transmontana. *II Colóquio Nacional de Horticultura Biológica*, Lisboa, 19 e 20 de Abril de 2007, 312-319.
- Haniotakis, G.; Kozypakis, M.; Fitsakis, T.; Antonidaki, A., 1991. An effective mass trapping method for the control of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, **84**, 564-569.
- Hawkes, N.J.; Janes, R.W.; Hemingway, J.; Vontas, J., 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pest Biochemistry Physiology*, **81**, 154–163.
- Montiel Bueno, A.; Jones, O., 2002. Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC / Wprs Bulletin*. **25**, 147-156.
- Neuenschwander, P.; Michelakis, S., 1978. Infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, **86**, 420–433.
- Neves, P.J.P., 1999. A mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmelin) na Terra Quente Transmontana: ciclo biológico, eficácia de diferentes tipos de armadilha e estimativa de risco. Relatório final de curso de Bacharelato em Produção Agrícola. Escola Superior Agrária de Bragança. 55p.
- Pavão, F.; Pereira, J.A.; Bento, A., 2007. Mass-trapping of the olive fruit fly with olipe traps in Trás-os-Montes region (Northeast of Portugal). *3rd European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Protection of Olive Crops"*. Polytechnic Institute of Bragança. October, 10-12.
- Pereira, J.A., 2000. Efeito da infestação pela mosca, *Bactrocera oleae* (Gmel.), e do tempo de armazenamento da azeitona na qualidade de azeites elementares das Cv. *Cobrançosa*, *Madural* e *Verdeal*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade, FF/UP, Porto, 112p.
- Pereira, J.A.; Alves, R.; Casal, S.; Oliveira, M.B.P.P., 2004. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana. *Italian Journal of Food. Science*, **16**, 355-365.
- Pereira, J.A.; Pavão, F.; Bento, A., 2007. Effects of different attractants used in Olipe traps for olive fly mass-trapping on beneficial arthropods. *3rd European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated Protection of Olive Crops"*. Polytechnic Institute of Bragança. October, 10-12.
- Ragoussis, 2005. Contribution to the biological olive agriculture. Efficient control to the olive fly by the ECO-TRAP®. *IOBC/wprs Bulletin*, (**28**)9, 29-35.
- Regulamento (CEE) 2092/91 do Conselho de 24 de Junho de 1991. Jornal Oficial, nº L 198 de 22.7.1991. consultado em 21.03.2011: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/consleg/1991/R/01991R2092-20070101-pt.pdf>

- Rodríguez, E.; Peña, A.; Sánchez Raya, A.J.; Campos, M., 2003. Evaluation on the effect on arthropod populations by using deltamethrin to control *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Coleoptera: Scolytidae) in olive orchards. *Chemosphere*, **52**, 127-134.
- Ruano, F.; Lozano, C.; Tinauta, A.; Peña, A.; Pascual, F.; García, P.; Campos, M., 2001. Impact of pesticides on beneficial arthropod fauna in olive orchards. *OILB/Wprs Bulletin* **24**, 113-120.
- Tsoutsis, C.; Konstantinou, I.; Hela, D.; Albanis, T., 2006. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **573–574**, 216–222.
- Vilarinho, M.A.F.G., 1999. Estudo sobre a mosca da azeitona (*Bactrocera oleae* Gmelin) na Terra Quente: Bioecologia, importância económica e estimativa de risco. Relatório final de curso de Bacharelato em Produção Agrícola. Escola Superior Agrária de Bragança. 61p.
- Zervas G. A., 1982. A new long live trap for olive fruit fly *Dacus oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae) and other Diptera. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, **94**, 522-552.



## **Influência da época de colheita e tipos de secagem no teor e composição dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. (Menta) e *Lippia alba* (Mill) n.e.br. (Erva-cidreira)**

**S. Teles<sup>1</sup>; C.H.B. Santos<sup>1</sup>; R.V. Menezes<sup>1</sup>; F. Silva<sup>1</sup>; A.M. Lucchese<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

### **Resumo**

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da época de colheita no teor e nos constituintes químicos do óleo essencial de *Mentha piperita* L. e *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. submetidos a processo de secagem natural, à sombra, e processo de secagem artificial, em desumidificador, em Cruz das Almas, Bahia. As plantas foram colhidas aos 150 dias entre 8 e 9 horas da manhã. Logo após a colheita, as folhas foram submetidas à secagem natural à sombra e secagem artificial com desumidificador. Para a extração do óleo essencial, o método utilizado foi da hidrodestilação em aparelho Clevenger durante 3 horas. O óleo essencial extraído foi analisado por cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização de chama (CG / DIC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC / MS). O teor de óleo essencial das folhas secas de *Mentha piperita* L. e *Lippia alba* (Mill) N.E.Br folhas não diferem em ambos os métodos de secagem. Durante Janeiro, a *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. apresentaram teores mais elevados para os dois métodos de secagem. *Mentha piperita* L., o maior teor de óleo foi encontrado em novembro. A carvona, o limoleno, o germacreno- D e  $\beta$ -mirceno foram os principais componentes da *Lippia alba* (Mill) NEBr. E o óxido piperitona, germacreno -D, limoneno, e E-cariofileno foram os principais componentes da *Mentha piperita* L..

**Palavras-chave:** plantas medicinais, colheita, manejo.



## **Alimentos do passado, nutrientes de futuro! Inventariação e caracterização de espécies com interesse alimentar presentes nos agroecossistemas da Terra-Fria Transmontana**

**A.M. Carvalho; L. Barros; I.C.F.R. Ferreira**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. anacarv@ipb.pt.*

### **Resumo**

Inventários etnobotânicos realizados durante a última década no território integrado na zona agroecológica da Terra-Fria Transmontana mostram a importância dos saberes e das práticas tradicionais na gestão e manutenção dos agroecossistemas e da biodiversidade que os caracteriza. Por outro lado, revelam também a multifuncionalidade de espaços silvestres, parcelas cultivadas e hortas e o papel preponderante que certas espécies desempenharam na alimentação, na saúde, no bem-estar, em suma, no quotidiano das populações rurais.

Dada a especificidade local/regional do conhecimento e uso e do seu aproveitamento sazonal e extensivo, estas espécies não foram objecto de estudos que comprovassem o seu contributo em termos nutricionais e medicinais ou de medidas que garantissem a continuidade do seu uso sustentável. As alterações ocorridas nas zonas rurais no contexto produtivo e socioeconómico e a globalização levaram ao abandono de muitas das actividades tradicionais (incluindo as de carácter agro-pecuário), introduziram novas necessidades e hábitos alimentares e tiveram como consequência o esquecimento e o cair em desuso de muitas espécies vegetais.

Um novo olhar sobre as potencialidades e aplicações das verduras silvestres e dos recursos das hortas tradicionalmente cultivadas está na base da caracterização química e nutricional de várias espécies outrora frequentemente usadas na alimentação, muitas delas emblemáticas da gastronomia regional, mas cujo consumo foi esquecido ou abandonado.

Os ensaios e análises realizados confirmam o interesse nutricional (macronutrientes, micronutrientes) de verduras silvestres e cultivadas nas hortas e vão mais longe, proporcionando também informação sobre os compostos bioactivos e a capacidade antioxidante destes alimentos.

Os resultados obtidos mostram o renovado interesse na recuperação destes hábitos alimentares e na reintrodução destas espécies nas dietas contemporâneas ou dos seus extractos em novas formulações de alimentos funcionais. A valorização destes produtos permite ainda contribuir para a revitalização das zonas rurais, promovendo a colheita e o cultivo sustentável de várias espécies com interesse alimentar.



## **Conhecimento tradicional, biodiversidade e agroecologia: Potencialidades de uso sustentável da flora regional**

**A.M. Carvalho; L. Barros; I.C.F.R. Ferreira**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. anacarv@ipb.pt.*

### **Resumo**

A diversidade de ecossistemas agrários e as particularidades da sua gestão e manutenção levadas a cabo pelas populações rurais ao longo de gerações propiciam um conjunto de saberes e práticas empíricas com relevância no domínio da agroecologia.

Tanto os habitats silvestres, habitualmente submetidos a práticas de gestão multifuncional, e as hortas e parcelas cultivadas são locais fundamentais para a conservação de recursos genéticos vegetais e constituem um repositório de plantas, práticas e saberes de grande importância para o desenvolvimento de sistemas alternativos de agricultura, facilitando a partilha e transferência de conhecimentos e promovendo um equilíbrio entre tradição e inovação.

As potencialidades e aplicações das verduras silvestres, das plantas aromáticas e medicinais (PAM) e dos cultivos tradicionais das hortas familiares surgem assim com um interesse renovado na revitalização das zonas rurais. O conhecimento empírico relativo a estes recursos revela-se uma ferramenta basilar porque permite compreender as razões do uso e selecção de determinadas espécies pelas populações e inferir novas tendências e aplicações como alternativa/complemento a novas formas de fazer agricultura e gerir a conservação da biodiversidade. Contribui ainda para o seu aproveitamento, nomeadamente nas áreas da nutrição, fitoterapia, etnofarmacologia, no âmbito da produção sustentável e da conservação dos recursos genéticos vegetais e também no campo das actividades complementares como o agro turismo, gastronomia regional e animação em meio rural

A partir de estudos de caso realizados em Bragança, Miranda do Douro e Vinhais utilizando metodologias etnobotânicas foi possível identificar um conjunto de espécies aromáticas, medicinais, condimentares e alimentares de uso frequente nestas zonas. Muitas das práticas e usos associados a algumas dessas espécies vegetais já não estão vigentes permanecendo apenas na memória dos mais velhos. Contudo, outras plantas continuam a ser usadas e adaptadas a novas aplicações. Usufruindo de uma equipa interdisciplinar, além dos inventários botânicos e estudos antropológicos realizados, desenvolveu-se investigação fitoquímica aplicada tendo como matriz materiais provenientes de plantas aromáticas, medicinais e alimentares da flora local, com elevado índice de citação (frequência de citação >50%) e que têm ainda um significado cultural especial nas áreas de estudo seleccionadas.

Os resultados da composição fitoquímica e propriedades antioxidantes obtidos através de ensaios químicos e bioquímicos mostram correlações significativas entre os compostos bioactivos e a actividade antioxidante (expressa em valores de  $EC_{50}$ ).

A pesquisa experimental aponta para efeitos nutracêuticos e farmacológicos que confirmam a importância do uso empírico dessas espécies e a sua contribuição para uma vida saudável, constituindo esta informação uma base importante para o reaproveitamento e valorização agronómica e social destas espécies.

## **Conservação do solo: experiência e reflexões sobre duas décadas de ensino na Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal**

**T. Figueiredo; F. Fonseca; A. Almeida**

*Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5301-855 Bragança, Portugal, tomasfig@ipb.pt.*

### **Resumo**

Em resposta a estímulos e necessidades determinadas por razões de mercado ou de segurança alimentar, em muitas áreas do globo o recurso solo foi e vem sendo sujeito a condições de uso depressoras das suas qualidades e funções nos ecossistemas. A degradação dos solos está, em inúmeros casos, directamente associada à conversão das terras a usos agrários, e a investigação neste tema sempre teve como enfoque especial os agrossistemas. Na mesma linha se foi consolidando o corpo de conhecimentos sobre métodos, técnicas e estratégias de conservação do solo, que são parte essencial da formação agronómica, seguindo os mais elementares princípios do vasto domínio da Agroecologia. Mais consequentes serão as competências específicas adquiridas no tema da conservação do solo quando integradas na formação superior ou pós-graduada, tendo em conta a importância que os técnicos deste nível têm na aplicação prática daqueles princípios na acção, na gestão e no planeamento para sistemas mais sustentáveis de agricultura.

Na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, embora sempre presente, o tema evoluiu, seja na atitude pedagógica, seja nos programas ou nos currículos das formações aqui ministradas. É esse percurso, para o qual os autores contribuíram, objecto de análise neste trabalho, elaborado com o objectivo de apresentar essa experiência de mais de duas décadas, e as reflexões que suscita, entendidas como pertinentes para os desafios emergentes nas sociedades actuais no que ao uso sustentável dos recursos diz respeito.

**Palavras-chave:** solo, degradação do solo, conservação do solo, ensino, agroecologia, Portugal.

## Introdução

O solo é elemento central dos ecossistemas e recurso natural não renovável à escala da vida humana. Às suas funções de suporte das plantas, em ecossistemas naturais, silvestres ou cultivados, associam-se também funções de regulação ao nível do ciclo hidrológico e do ciclo do Carbono. Em ambos, o papel do solo ganha uma importância que decorre não já da problemática, apesar de tudo sempre presente, da sustentação alimentar de uma população em crescimento. De facto, no primeiro caso, são hoje maiores as preocupações com a regulação da disponibilidade do recurso água, respondendo à procura de uma população urbana crescente, até por que a desregulação, traduzida numa maior severidade dos eventos hidrológicos extremos, tem consequências quase sempre catastróficas, já demasiadas vezes demonstradas. No segundo caso, de modo emergente releva o papel dos solos no sequestro do Carbono, assim podendo contribuir, enquanto sumidouro, para a regulação da concentração de gases com efeito de estufa na atmosfera (Blum, 2009; Lal et al., 1997).

São várias as ameaças que impendem sobre o solo enquanto recurso, como por exemplo a erosão, a compactação, a perda de matéria orgânica, a salinização, a poluição. Em algumas, a sua importância é geograficamente determinada mas em outras é essencialmente dependente do uso do solo, seja do ponto de vista da vegetação que o cobre seja das práticas de gestão que esse uso implica. É o caso da erosão – a hídrica comum nos terrenos de encosta, a eólica frequente nas áreas mais aplanadas e secas e/ou litorais – em contraponto com o da perda de matéria orgânica. Na Europa, avalia-se que mais de metade da superfície total esteja afectada por estes que são os dois principais processos de degradação dos solos neste continente (erosão, 12%; perda de matéria orgânica, 45%). À escala global, a erosão é um dos mais relevantes processos de degradação dos solos. Acresce que, as regiões áridas e semi-áridas, em processo de desertificação acelerado quase sempre por via da degradação da qualidade dos solos, estendem-se por todos os continentes, abrangendo 1/3 da superfície da Terra, afectando cerca de 1/6 da população mundial (CEC, 2006; Morgan, 2005; Junior, 2001).

Em resposta a estímulos e necessidades determinadas por razões de mercado ou de segurança alimentar, em muitas áreas do globo o recurso solo foi e vem sendo sujeito a condições de uso depressoras das suas qualidades e funções nos ecossistemas. A degradação dos solos está, em inúmeros casos, directamente associada à conversão das terras a usos agrários, e a investigação neste tema sempre teve como enfoque especial os agrossistemas (Blum, 2009; Lal et al., 1997; Morgan, 2005). Na mesma linha se foi consolidando o corpo de conhecimentos sobre métodos, técnicas e estratégias de conservação do solo, que são parte essencial da formação agronómica, seguindo os mais elementares princípios do vasto domínio da Agroecologia. Mais consequentes serão as competências específicas adquiridas no tema da conservação do solo quando integradas na formação superior ou pós-graduada, tendo em conta a importância que os técnicos deste nível têm na aplicação prática daqueles princípios na acção, na gestão e no planeamento para sistemas mais sustentáveis de agricultura.

Na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA/IPB), embora sempre presente, o tema evoluiu, seja na atitude pedagógica, seja nos programas ou nos currículos das formações aqui ministradas. É esse percurso objecto de análise neste trabalho e para ele os autores contribuíram ao longo da sua carreira na instituição.

## **Objectivos e fontes de informação**

É objectivo do trabalho apresentar essa experiência de mais de duas décadas, e as reflexões que suscita, entendidas como pertinentes para os desafios que emergem nas sociedades actuais no que ao uso sustentável dos recursos diz respeito.

O trabalho recorre aos registos próprios dos autores e a informação interna da ESA e do IPB, como conteúdo de relatórios ou documentos de trabalho dos seus Órgãos de Gestão, devidamente referenciados como fonte.

## **Conservação do Solo na ESA: Unidades curriculares, Cursos e Programas**

O Quadro 1 mostra o elenco de unidades curriculares, e respectivos cursos, nas quais, ao longo do tempo, na ESA, o tema da Conservação do Solo foi objecto parcial ou integral de estudo.

A título de clarificação, sublinha-se que, como Escola integrada no sub-sistema politécnico do Ensino Superior, a ESA ministrou apenas Bacharelatos até ao ano lectivo de 1999/2000, ano lectivo em que entraram em funcionamento as Licenciaturas em dois ciclos (bi-etápicas), apesar de, desde 1993/94, as Escolas deste sub-sistema poderem implementar Cursos de Estudos Superiores Especializados (CESEs), outorgando um diploma equivalente ao da Licenciatura quando coerente com o Bacharelato de base. Foi o caso do CESE em Agricultura Sustentada, incluído no Quadro 1.

Por outro lado, como instituição na linha da frente na implementação das regras ditas pela Declaração de Bolonha, a ESA viu todos os seus cursos convertidos a este modelo no ano lectivo de 2006/07, iniciando também a implementação de Mestrados autónomos. É que, de novo com avanço em relação às suas congéneres, e mercê da qualidade científica do seu corpo docente, a ESA já ministrara Mestrados em anos anteriores, em parceria com Universidades, às quais cabia outorgar o grau. Exemplo disso foi o Mestrado em Gestão e Conservação da Natureza (Universidade dos Açores), indicado no Quadro 1.

Como se pode constatar, desde o arranque dos cursos na ESA em 1986/87, que o tema da Conservação do Solo se encontra presente nos cursos aqui ministrados. Na verdade, o seu peso nos programas era residual, quase sempre localizando a temática no capítulo dedicado à água no solo, no qual a gestão e conservação da água servia de mote para tanto, em unidades curriculares sempre apenas parcialmente dedicadas ao estudo dos Solos. Esta situação, em

que os programas ainda não acolhem o tema explicitamente, perdura até à entrada em funcionamento das Licenciaturas bi-etápicas, em 1999/2000, e corresponde à fase em que a Conservação do Solo é tópico instilado mais do que tratado, como parte de uma atitude pedagógica tomando o solo como recurso a exigir uso racional, protecção e recuperação nos casos de degradação acelerada.

Há todavia que destacar duas excepções nesse período: o Bacharelato em Engenharia Rural e o CESE em Agricultura Sustentada. Aquele foi o que primeiramente acolheu no título de uma unidade curricular a expressão Conservação do Solo, atribuindo a correspondente relevância substancial da temática nos seus conteúdos. De resto, sendo este curso herdeiro de um outro com que se iniciou a ESA (Melhoramentos Rurais), tratava-se apenas de explicitar algo que já se encontrava expresso no quadro dos objectivos e competências a conferir por ambos os cursos. Com o CESE em Agricultura Sustentada, pela primeira vez na ESA se implementa uma unidade curricular dedicada ao tema. Embora efémera, já que a unidade curricular apenas funcionou um ano, a experiência foi muito valiosa, servindo de elemento motivador e de teste para ensaios no domínio pedagógico, então iniciados e mais tarde consolidados em outras unidades curriculares.

Com o arranque das Licenciaturas bi-etápicas inicia-se a fase em que o ensino do tema da Conservação do Solo se vê mais generalizado nas formações de graduação. Com efeito, nos Cursos de Engenharia Agronómica (ao tempo dividido em 4 Ramos), Florestal e do Ambiente, uma unidade curricular no 1º ciclo de estudos (Pedologia I) abordava já o tema com o carácter residual antes conhecido, mas, no 2º ciclo da Licenciatura bi-etápica, uma outra unidade curricular dedicava boa parte do programa ao tema (Pedologia II). A experiência do CESE foi consolidada, apesar do suporte informático que constituía a base das aulas práticas neste caso, não tivesse idênticas condições de aplicação face ao número de alunos e às infra-estruturas da época, sendo os exercícios adaptados ao suporte em papel.

A conversão das formações da ESA ao modelo de Bolonha teve por consequência a criação de novos cursos de Mestrado. O tema, nas Licenciaturas, manteve o carácter residual, possível numa unidade curricular dedicada ao estudo dos Solos, nas Licenciaturas de Engenharia Agronómica, Florestal e do Ambiente. Todavia, os Mestrados criados acautelaram o tema sob variados formatos, com tratamento parcial em dois casos mais tardios (Mestrados em Gestão de Recursos Florestais e em Tecnologia Ambiental) e integral no caso primeiramente implementado (Mestrado em Agroecologia). É neste Mestrado que o nome da unidade curricular expressa integralmente o tema – Conservação do Solo (como o havia sido no CESE em Agricultura Sustentada) – constituindo o caso, único, em que tema é mais dedicadamente tratado na ESA.

As experiências mais recentes nesta matéria têm sentidos diversos, ambos merecedores de destaque. De facto, no plano de estudos do CET em Defesa da Floresta contra Incêndios foi acautelado um módulo sobre Técnicas de Controle da Erosão, o que introduz o tema ao nível da pré-graduação, situação nova na ESA. Por outro lado, no quadro do esforço estratégico do

IPB para a internacionalização, foi realizado ao longo de 3 anos lectivos um Programa Intensivo Erasmus com enfoque específico no tema. Tratou-se do SPinSMEDE, curso internacional de pós-graduação, coordenado pelo IPB e levado a cabo, nas suas 3 edições, em Bragança, Atenas e Lugo, congregando alunos e professores de 5 Instituições de Ensino Superior europeias: o IPB e as Universidades de Wageningen (Holanda), Atenas (Grécia), Lérida e Santiago de Compostela (Espanha). Desta experiência resultou um livro de texto para apoio às aulas, reunindo os contributos dos professores das diferentes instituições, editado pelo IPB em 2009 (Evelpidou & Figueiredo, 2009; Figueiredo et al., 2010).

Como se referiu, nos programas das unidades curriculares em que o tema da Conservação do Solo surge com carácter residual, tal é afluído no capítulo da água no solo. Nos casos de programas em que o tema tem maior importância, os tópicos tratados passam sempre por uma abordagem prévia mas detalhada dos processos de degradação dos solos, com enfoque especial na erosão hídrica, a que se segue a descrição e avaliação das técnicas de conservação do solo, com exercícios de dimensionamento no caso das medidas de carácter estrutural (terraços e valas). Merece ainda destaque o facto de, em Geologia Ambiental, serem também abordados os movimentos de massa dos terrenos de vertente, para além dos processos erosivos de superfície, o que não é regra no ensino nestas matérias. Vale a pena sublinhar ainda que, no Programa Intensivo Erasmus SPinSMEDE, a despeito do enfoque técnico do curso, o contexto socioeconómico e as medidas de política que enquadram as iniciativas de Conservação do Solo, ser tratado de forma explícita e específica, face ao seu reconhecido papel no sucesso dos programas e planos neste âmbito (Morgan, 2005).

### **Elementos de reflexão como tópicos conclusivos**

A descrição da experiência de mais de duas décadas de ensino de Conservação do Solo na ESA permite identificar elementos de reflexão, neste trabalho assumidos como tópicos conclusivos.

A Figura 1 mostra a evolução do número de alunos (expresso percentualmente) de cursos em que o tema foi tratado, no quadro das formações aqui ministradas até à conversão havida com o processo de Bolonha. Apesar de apenas parcialmente incluídos na Figura, já que a ESA arrancou com os cursos de Melhoramentos Rurais e Gestão da Empresa Agrícola no ano lectivo de 1986/87, nos primeiros anos de funcionamento da ESA a totalidade dos alunos tomou contacto com estas matérias. Mercê do declínio muito claro do peso relativo de ingressos em cursos envolvendo o conhecimento dos Recursos da Terra (casos das Engenharias Agronómica, Florestal e do Ambiente), a proporção do número de alunos com esse contacto era já inferior a 50% no ano lectivo de 2005/2006. Essa tendência atenuou-se nestes últimos anos em que o modelo de Bolonha já vigora, mas aquela proporção não ultrapassará hoje os 30%, incluindo formações de todos os níveis (Figura 2, com dados do ano lectivo de 2007/08, tomado como representativo da situação actual).

Esta evidência, cruzada com a informação constante da última coluna do Quadro 1 é reveladora da tendência para a especialização que entretanto se consolidou na Escola, conferindo a um menor número de alunos competências na matéria mais aprofundadas. Este corolário conclusivo da abordagem aqui apresentada acentua as condições prevaletentes para a realização de um ensino de elevada qualidade, pedagógica e científica, nesta matéria, desafio sempre renovado nas práticas e nas atitudes, tanto quanto nos meios colocados à disposição dos alunos para a sua aprendizagem.

## Referências bibliográficas

- Blum, W. 2009. Environmental Policies and Social Impacts with regard to Land and Soil Management. Invited Communication at EcoHCC'09 – International Conference on Ecohydrology and Climate Change, Tomar, September 2009. Instituto Politécnico de Tomar, Portugal.
- CEC. 2006. Thematic Strategy for Soil Protection (SEC(2006)620, SEC(2006)1165). Commission of the European Communities, Brussels. 12 pp.
- Evelpidou, N. & Figueiredo, T. de (eds.). 2009. Soil Protection in Sloping Mediterranean Agri-Environments: Lectures and exercises. Instituto Politécnico de Bragança. Xvi+300 pp.
- Figueiredo, T. de, de Graaff, J., Evelpidou, N. Martínez-Casasnovas, J. A. & Merino, A. 2010. SPINSMEDE: first presentation of a transnational training experience on soil protection. Actas do IV Congresso Ibérico da Ciência do SECS, Granada, Espanha. pp. 517-523.
- IPB. 2006. IPB institutional Self-Evaluation Report (under the European University Association (EUA) Institutional Evaluation Programme). Instituto Politécnico de Bragança.
- Junior, H.M., 2001. Indicadores de desertificação: histórico e perspectivas. Cadernos UNESCO Brasil, Série Meio Ambiente, Volume 2.
- Lal, R., Kimble, . M., Follett, R. F. & Stewart, B. A. (eds.). 1997. Soil Processes and the Carbon Cycle. Advances in Soil Science Series. CRC Press, Boca Raton, USA. 609 pp.
- Morgan, R. P. C. 2005. Soil Erosion and Conservation, 3<sup>rd</sup> Ed.. Blackwell Publ., Oxford, UK. 303 pp.

Quadro 1. Unidades curriculares ministradas na ESA integrando no seu programa o tema da Conservação do Solo.

Unidade Curricular	Curso	Grau	Período <sup>a</sup>	Capítulo da matéria e proporção do tema
Fundamentos da Agricultura I	Gestão da Empresa Agrícola	Bacharelato	1986/87 – 2001/02	Gestão e conservação da água, Avaliação terras (10%)
Fundamentos da Agricultura	Melhoramentos Rurais	Bacharelato	1986/87 – 2000/2001	Gestão e conservação da água do solo (10%)
Solos e Fertilidade	Produção Agrícola	Bacharelato	1989/90 – 2001/02	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Solos e Fertilidade	Produção Animal	Bacharelato	1989/90 – 2001/02	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Solos e Fertilidade	Gestão de Recursos Florestais	Bacharelato	1989/90 – 2001/02	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Solos e Conservação do Solo	Engenharia Rural	Bacharelato	1993/94 – 2001/02	Conservação do Solo e da água (60%)
Solos	Engenharia do Ambiente e do Território	Bacharelato	1996/97 – 1999/00	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Conservação do Solo	Agricultura Sustentada	CESE <sup>c</sup>	1997/98 – 2000/01	Conservação do Solo e da água (100%)
Pedologia I	Engenharia Agronómica	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Pedologia I	Engenharia Florestal	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Pedologia I	Engenharia do Ambiente e do Território	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Gestão e conservação da água do solo (5%)
Pedologia II	Engenharia Agronómica	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Conservação do Solo e da água (70%)
Pedologia II	Engenharia Florestal	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Conservação do Solo e da água (70%)
Pedologia II	Engenharia do Ambiente e do Território	Licenciatura bi-etápica	1998/99 – 2005/2006	Conservação do Solo e da água (70%)
Módulo sobre Geodiversidade	Gestão e Conservação da Natureza	Mestrado	2003/04 e 2005/2006	Conservação do Solo e da água (60%)
Pedologia	Engenharia Agronómica	Licenciatura Bolonha	2006/07 – 2010/11	Gestão e conservação da água do solo (10%)
Mecanização e Equipamento	Engenharia Agronómica	Licenciatura Bolonha	2006/07 – 2010/11	Mecanização e estrutura do solo (10%)
Pedologia	Engenharia Florestal	Licenciatura Bolonha	2006/07 – 2010/11	Gestão e conservação da água do solo (10%)
Pedologia	Engenharia do Ambiente	Licenciatura Bolonha	2006/07 – 2010/11	Gestão e conservação da água do solo (10%)
Solos Florestais	Gestão de Recursos Florestais	Mestrado Bolonha	2007/08 – 2010/11	Conservação do Solo e da água (60%)
Geologia Ambiental	Tecnologia Ambiental	Mestrado Bolonha	2009/10 – 2010/11	Conservação do Solo e da água (60%)
Técnicas de Controle da Erosão	Defesa da Floresta contra Incêndios	CET <sup>d</sup>	2009/10 – 2010/11	Conservação do Solo e da água (100%)
Conservação do Solo	Agroecologia	Mestrado Bolonha	2006/07 – 2010/11	Conservação do Solo e da água (100%)
SPinSMEDE <sup>b</sup>	Programa Intensivo Erasmus	Pós-graduação	2007/08 – 2009/2010	Conservação do Solo e da água (100%)

<sup>a</sup> – Refere-se ao período de vigência do curso e não da leccionação da unidade curricular; <sup>b</sup> – Soil Protection in Sloping Mediterranean Agri-Environments; <sup>c</sup> – Curso de Estudos Superiores Especializados (equivalente a Licenciatura); <sup>d</sup> – Curso de Especialização Tecnológica (pré-graduação).

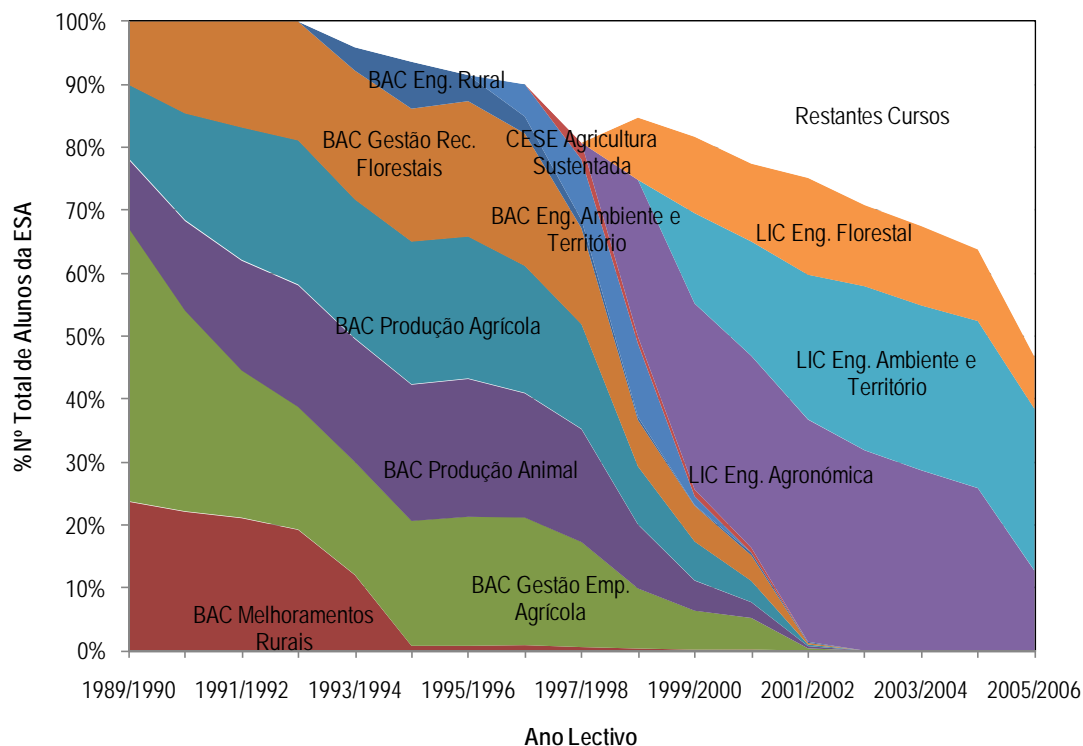


Figura 1. Evolução da % do número de alunos de cursos da ESA com unidades curriculares contemplando o tema da Conservação do Solo: situação pré-Bolonha (Fonte: IPB, 2006).

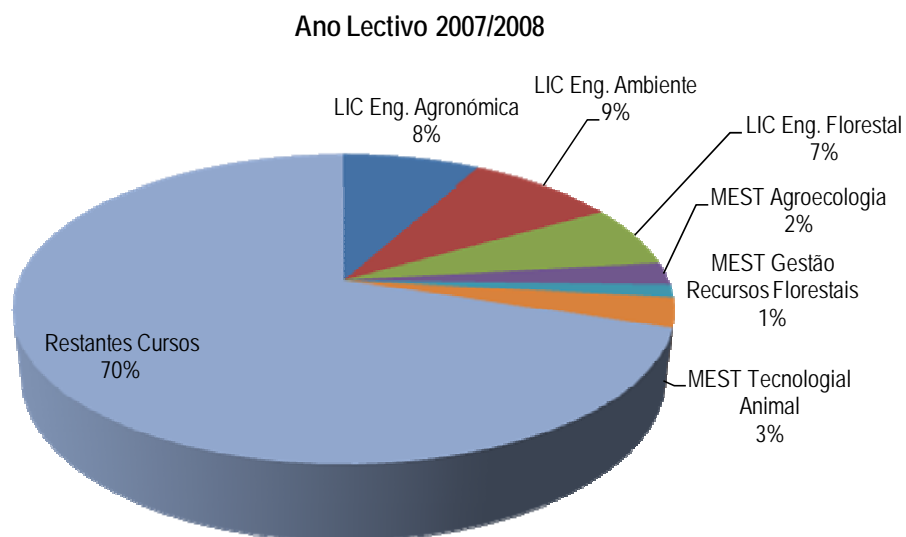


Figura 2. Alunos de cursos da ESA com unidades curriculares contemplando o tema da Conservação do Solo: ano lectivo 2007/2008. (Fonte: Documentos Internos ESA/IPB, 2008).

## **Gestão de cobertos vegetais em olival na região mediterrânica**

**M. Arrobas; A.M. Claro; I.Q. Ferreira; M.A. Rodrigues**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. marrobas@ipb.pt*

### **Resumo**

Em ambiente mediterrânico, a produtividade do olival cultivado em sequeiro está, sobretudo, limitada pelo stresse hídrico estival imposto pela longa estação quente e seca. Assim, a gestão do coberto vegetal herbáceo deve minimizar a competição pela água e, simultaneamente, proteger o solo, em particular da erosão hídrica. A vegetação herbácea pode ser gerida com recurso a mobilizações de solo, herbicidas de acção residual, herbicidas não selectivos pós-emergência, corte da vegetação (natural ou semeada) com destroçadores ou recorrendo a pastoreio. Qualquer das soluções tem aspectos positivos e negativos quando apreciada pela produtividade das árvores e por possíveis efeitos colaterais no meio ambiente e na sustentabilidade do sistema de produção. Neste trabalho discutem-se as possibilidades de gestão da vegetação herbácea em olival na região mediterrânica.

**Palavras-chave:** olival de sequeiro, cobertos vegetais, mobilização de solo, herbicidas, corte da vegetação, pastoreio, leguminosas anuais de ressementeira natural.

## Mobilização do solo

A mobilização do solo é uma prática ancestral através da qual a humanidade conseguiu progressos notáveis no cultivo da terra. Em olival de sequeiro, o solo é mobilizado para controlar a vegetação herbácea que compete com as árvores pela água e pelos nutrientes. Actualmente, a mobilização dos olivais consiste em passagens de escarificador (normalmente duas) durante a Primavera com o objectivo de destruir a vegetação herbácea e simultaneamente incorporar fertilizantes (Figura 1).



Figura 1. Solo recentemente mobilizado com escarificador. Esta prática danifica o sistema radicular, torna o solo vulnerável à erosão e reduz o teor de matéria orgânica do solo.

A mobilização do solo pode considerar-se um método eficaz de controlar a vegetação herbácea. Contudo, a passagem do escarificador causa danos apreciáveis no sistema radicular das árvores, em particular nos solos de reduzida espessura efectiva, como aqueles em que se encontra instalada a maior parte do olival de sequeiro da bacia mediterrânica. Não há estudos que quantifiquem a perda de fotoassimilados com a destruição do sistema radicular, mas supõe-se que seja a principal razão que justifica as perdas de produção que têm sido registadas em ensaios de campo em que se incluiu este sistema de manutenção do solo (Tisdall, 1989; Rodrigues et al., 2001; Rodrigues et al., 2011).

Por outro lado, as mobilizações de solo são efectuadas na Primavera, próximo da floração e vingamento dos frutos. Neste período, a restrição imposta à absorção de água e nutrientes pela destruição física do sistema radicular causa danos irrecuperáveis na produção e atrasos no desenvolvimento das árvores.

As mobilizações tornam o solo vulnerável à erosão (Gómez et al., 1999; Pastor et al., 2001; Fleskens & Graaff, 2001). As árvores oferecem uma reduzida cobertura do solo e as mobilizações expõem-no ao impacto directo das gotas de chuva. Em eventos de precipitação intensa, em que a água que cai ultrapassa momentaneamente a capacidade de infiltração do

solo, ocorre escoamento superficial com arrastamento de grandes massas de solo (Figura 2). A perda de solo é um dos aspectos mais preocupantes na gestão do coberto vegetal herbáceo em olival, pela perda de fertilidade do solo, base da sustentabilidade desta actividade económica, e por impactes ambientais a jusante, designadamente eutrofização e assoreamento de cursos de água e albufeiras.



Figura 2. Erosão hídrica em dois olivais jovens em que a manutenção do solo é feita com mobilizações.

Os solos mobilizados repetidamente apresentam teores de matéria orgânica muito baixos (Arrobas & Rodrigues, 2002). O arejamento estimula a actividade dos microrganismos heterotróficos que mineralizam a matéria orgânica. O teor de matéria orgânica do solo é um dos indicadores de fertilidade mais directamente relacionados com a sustentabilidade dos agrossistemas.

A informação técnica e científica disponível no momento recomenda que as mobilizações do solo em olivais de sequeiro na bacia mediterrânica sejam evitadas (Pastor et al., 2001; Rodrigues & Cabanas, 2007, 2009). No entanto, a realidade é bem diferente, sendo ainda o método de manutenção do solo mais generalizado entre olivicultores.

### **Herbicidas com componente de acção residual**

Os herbicidas de acção residual são aplicados em pré-emergência, conseguindo-se manter a superfície do solo permanentemente nua durante todo o ano. Na bacia mediterrânica, durante muitos anos foi utilizada simazina como principal herbicida residual. Esta substância foi abandonada por dificuldades no controlo de algumas infestantes e por alguns problemas ambientais associados.

No presente, o uso de herbicidas que contenham apenas componentes de acção residual não é habitual. Usam-se mais frequentemente aqueles que associam componente(s)

de acção residual com um componente de aplicação pós-emergência. Desta forma, consegue-se eliminar a vegetação presente e prevenir emergências futuras (Figura 3).



Figura 3. Solo gerido com herbicida com componentes de acção residual e de pós-emergência. O solo fica livre de vegetação durante todo o ano.

De uma maneira geral, os herbicidas de acção residual controlam a vegetação de forma eficaz, sobretudo quando associados a um componente pós-emergência. No entanto, como mantêm o solo permanentemente nu não controlam adequadamente a erosão (Pastor et al., 2001). Sendo pouco tolerantes com o desenvolvimento da vegetação herbácea, também não promovem o aumento da matéria orgânica no solo. Por outro lado, ao não danificarem o sistema radicular, permitem a obtenção de maior produção quando comparados com olivais mobilizados (Rodrigues et al., 2011).

### **Herbicidas pós-emergência**

Como herbicidas pós-emergência são utilizadas sobretudo substâncias activas não selectivas, como glifosato, com capacidade para destruir espécies anuais e também espécies perenes com mecanismos de multiplicação vegetativa.

Com o uso de herbicidas pós-emergência consegue-se a eliminação eficaz da vegetação. Como não têm efeito residual, é possível manter a superfície do solo com vegetação viva durante o período Outono/inverno (Figura 4a) e um *mulching* de vegetação morta após a aplicação do herbicida no período Primavera/verão (Figura 4b). A cobertura permanente que confere ao solo transforma-o num método eficaz no controlo da erosão (Pastor et al., 2001). Como é um método de manutenção do solo tolerante com o desenvolvimento da vegetação herbácea, são depositadas anualmente quantidades elevadas de resíduos orgânicos, sobretudo através dos sistemas radiculares, permitindo o aumento do teor de matéria orgânica

do solo. O controlo eficaz da vegetação, associado ao facto de não se destruir o sistema radicular das árvores, origina produções mais elevadas e um bom estado nutritivo das árvores comparativamente com outros métodos de manutenção do solo (Rodrigues et al., 2011).



Figura 4. a) Aspecto de um olival no início da Primavera e b) um mês após a aplicação de um herbicida pós-emergência. Durante o Inverno o solo fica protegido com vegetação viva e durante o Verão por um *mulching* de vegetação morta.

### **Vegetação natural gerida com corte**

A vegetação pode ser controlada com equipamentos que fazem a sua destruição física, designadamente com destroçadores de correntes ou de facas. Nestes sistemas não se mobiliza o solo nem se utilizam herbicidas (Figura 5).

O controlo da vegetação herbácea pelo corte é um método muito eficaz para prevenir a erosão, uma vez que o solo nunca se encontra nu durante todo o ano (Pastor et al., 2001). A maior tolerância com o desenvolvimento da vegetação herbácea e o facto de não se mobilizar permite que o teor de matéria orgânica do solo aumente (Osborne et al., 2004; Pisante et al., 2004). Contudo, o corte não elimina completamente a vegetação. Após o corte pode haver recrescimento, continuando o coberto a transpirar água. Este aspecto faz com que estes sistemas de manutenção do solo originem menores produções quando comparados com o uso de herbicidas pós-emergência (Montemurro et al., 2002).



Figura 5. Olival em que o controlo da vegetação é feita com destróador. O solo fica protegido durante todo o ano com vegetação.

A gestão do coberto vegetal herbáceo pelo corte é um método muito utilizado em olival biológico, onde as mobilizações não são recomendadas e o uso de herbicidas não é permitido. É também o método de gestão da vegetação mais utilizado em olival regado e, de uma maneira geral, em fruticultura em regiões húmidas, onde a disponibilidade de água no solo não é factor limitante (Anderson et al., 1992; Lipecki & Berbec, 1997).

### **Gestão de cobertos vegetais semeados**

Em olival podem semear-se leguminosas pratenses de ressementeira natural e ciclo curto em alternativa à manutenção da vegetação herbácea natural (Figura 6). As espécies de ciclo curto apresentam vantagens relativamente à vegetação natural, na medida em que transpiram menos água no fim da Primavera. Por outro lado, a presença de leguminosas pode aumentar a fertilidade do solo através da simbiose que estas espécies estabelecem com microrganismos com capacidade de fixar azoto atmosférico e de o transferir para as plantas (Russelle, 2008).



Figura 6. Coberto vegetal semeado à base de trevo subterrâneo de ciclo curto. Esperam-se benefícios na protecção do solo e na nutrição azotada das árvores.

A persistência dos cobertos de leguminosas pratenses de ciclo curto não foi ainda estudada. Há uma longa tradição na gestão destes cobertos em sobreiro e azinheira com pastoreio na região mediterrânica (Carneiro et al., 2008). Em Trás-os-Montes (NE Portugal) estão em curso estudos em que se simula o pastoreio com equipamentos de corte para aumentar a persistência das espécies leguminosas semeadas (Rodrigues et al., 2010 a,b).

### **Pastoreio como método de gestão da vegetação**

É possível controlar a vegetação herbácea natural ou semeada no olival com rebanhos de ovelhas (Figura 7). O método é bastante aceitável do ponto de vista ecológico e os produtos do rebanho (leite, carne, lã) poderiam compensar a perda de produção que se observa nestes sistemas de manutenção do solo (Rodrigues et al., 2011). A menor produção deve-se ao deficiente controlo da vegetação herbácea pelos animais no fim da Primavera, num período em que a competição pela água entre vegetação herbácea e árvores se torna evidente.

Contudo, só é possível introduzir rebanhos em olival tradicional gerido com copas altas, na medida em que as ovelhas podem comer as folhas das árvores. Por outro lado, a estrutura fundiária de algumas regiões olivícolas da região mediterrânica, em particular de Trás-os-Montes (NE Portugal), é caracterizada por múltiplas parcelas de pequena dimensão que não permitem a existência de rebanhos. Por outro lado, o sector olivícola está hoje muito especializado, não tendo as explorações agrícolas terra livre para produzir forragem para alimentar as ovelhas nos períodos do ano em que a vegetação herbácea não cresce no olival, o que também limita esta possibilidade de gestão do solo.



Figura 7. Coberto vegetal natural gerido com um rebanho de ovelhas. Espera-se que os produtos do rebanho compensem a perda de produção de azeitona pelo deficiente controlo da vegetação e conseqüente aumento de competição pela água.

### **Nota Final**

A forma com é mantida a superfície do solo tem influência na produtividade das árvores e pode causar impactes ambientais significativos. Em cada contexto agro-ecológico determinadas soluções são mais apropriadas que outras e vice-versa. Em olival de sequeiro da região mediterrânica, o uso de herbicidas pós-emergência é uma solução muito interessante. Em regadio o método de eleição deverá ser o corte da vegetação com destroçadores. Em modo de produção biológico deve tentar-se a sementeira de cobertos vegetais com leguminosas anuais de ciclo curto e ressementeira natural. Em olival biológico é extraordinariamente difícil manter as árvores num estado nutritivo azotado adequado. Com cobertos de leguminosas consegue-se uma boa protecção do solo e contribui-se para a resolução do problema da nutrição azotada, devido à fixação biológica de azoto.

### **Agradecimentos**

Actividades financiadas no âmbito do projecto PTDC/AGR-AAM/098326/2008, de título "Coberturas vegetais: a estratégia decisiva na gestão sustentável dos olivais de sequeiro".

### **Referências bibliograficas**

Anderson, J.L., Bingham, G.E. & Hill, R.W. 1992. Effect of permanent cover crop competition on sour cherry tree evapotranspiration, growth and productivity. *Acta Horticulturae* 313: 135-142.

- Arrobas, M. & Rodrigues, M.A. 2002. Agricultura de conservação em culturas perenes. I Congresso Nacional de Mobilização de Conservação do Solo. APOSOLO, Évora, pp. 149-154.
- Carneiro, J.P., Simões, N., Duarte-Maçãs, I., Tavares-de-Sousa, M. 2008. Pasture improvement in montado extensive farming systems. *Options Méditerranéennes, Serie A*, 79, 193-197.
- Fleskens, L. & Graaff, J. 2001. Soil conservation options for olive orchards in sloping land. *Proceed. I World Congress on Conservation Agriculture*. Madrid, 231-235.
- Gómez, J.A., Giráldez, J.V., Pastor, M. & Fereres, E. 1999. Effects of tillage method on soil physical properties, infiltration and yield in an olive orchard. *Soil and Tillage Research* 52: 167-175.
- Lipecki, J. & Berbeć, S. (1997) - Soil management in perennial crops: orchards and hop gardens. *Soil and Tillage Research* 43: 169-184.
- Montemurro, P., Francchiollo, M., Guarini, D., Losorella, C. 2002. Results of a chemical weed control trial in an olive orchard. *Acta Horticulturae* 586: 397-400.
- Osborne, B., Davis, P., Black, K., Clifton-Brown, J. Kumar, S., Williams, M. & Jones, M. 2004. Crops and cropping systems for enhanced carbon sequestration in temperate arable agricultura. *Proc. of 8th ESA-Congress*. Copenhagen. Denmark: 149-150.
- Pastor, M., Castro, J., Veja, V. & Humanes, M.D. 2001. Sistemas de manejo del suelo. In: Barranco, D., Fernández-Escobar, R. & Rallo, L. (Eds.) *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa and Junta de Andalucía, Madrid, pp. 215-254.
- Pisante, M. & Benites, J. 2004. The importance of cover crops in conservation agriculture. *Proc. of 8th ESA-Congress*. Copenhagen. Denmark: 647-648
- Rodrigues, M.A. & Cabanas, J.E. 2007. As Infestantes. In: *Manual da protecção integrada do olival*. Torres L (ed.), João Azevedo Editor, Viseu, 357-376.
- Rodrigues, M.A. & Cabanas, J.E. 2009. Manutenção do solo. In: Rodrigues, M.A. & Correia, C.M. (Eds.) *Manual da Safra e contra safra do olival*. IPB, Bragança. pp. 41-57.
- Rodrigues, M.A., Bento, A., Lopes, J.I., Torres, L., Pereira, J.A. 2001. Manutenção da superfície do solo em olival. *Revista de Ciências Agrárias*. Vol. XXIV (1&2): 20-25.
- Rodrigues, M.A., Cordeiro, A., Arrobas, M. 2010a. Gestão da vegetação herbácea em vinha e olival. *Oleavitis* 4: 12-15 (Out./Nov. 2010).
- Rodrigues, M.A., Pavão, F., Oliveira, J., Arrobas, M. 2010b. Gestão da vegetação herbácea em olival biológico. *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*, No 102 (Julho-Agosto-Setembro): 17-20.
- Rodrigues, M.A., Lopes, J.I., Pavão, F.M., Cabanas, J.E., Arrobas, M. 2011. The effect of soil management on olive yield and nutritional status of trees in rainfed orchards. *Communications in Soil Science and Plant Analysis (in press)*.
- Russelle, M.P. 2008. Biological dinitrogen fixation in agriculture. p. 281-359. In: Schepers, J.S., Raun, W.R. (eds.). *Nitrogen in Agricultural Systems*. Agronomy Monograph 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis.
- Tisdall, J.M. 1989. Soil Management. *Acta Horticulturae* 240: 161-168.



## **Relevância do sistema agro-florestal pastagem-freixo no Nordeste Transmontano**

**E. Pereira**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. epereira@ipb.pt.*

### **Resumo**

Os sistemas agro-florestais são sistemas de uso do solo nos quais as árvores crescem em associação com culturas agrícolas, pastagens ou gado, com marcadas interações ecológicas entre os componentes. O sistema agro-florestal montado é aquele que em Portugal tem maior expressão, sobretudo na região sul do País. Porém, na região norte do País ocorrem localizadamente outros sistemas agro-florestais, destacando-se os soutos e o sistema agro-florestal pastagem-freixo. Este sistema constituído por pastagens permanentes (*lameiros*) associado a espécie arbórea caducifólia, *Fraxinus angustifolia* Vahl, apresenta a maior representatividade na área do planalto Mirandês e nos concelhos de Bragança e de Macedo de Cavaleiros. O valor agrícola deste sistema resulta do facto de constituir suporte da pecuária de montanha, nomeadamente dos efectivos pecuários autóctones explorados em sistema de produção extensivo, de ser a principal ocupação dos solos agrícolas e de ser a principal cultura das explorações das zonas montanhosas do Nordeste de Portugal. Pretende-se com este trabalho contribuir para o conhecimento deste sistema e sua relevância na agroecologia da região do Nordeste Transmontano.

**Palavras-chave:** Freixo, lameiros, sistema agro-florestal.



## Utilização dos pombais tradicionais: uma perspectiva agroecológica

A.M. Villa-Serrano<sup>1</sup>; M.D. Perez-Murcia<sup>2</sup>; A. Perez-Espinosa<sup>2</sup>; J. Moreno-Caselles<sup>2</sup>; Gálvez-Sola<sup>2</sup>; M.A. Bustamante<sup>2</sup>; N.A. Raposo Martins<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. mariavilla@ipb.pt

<sup>2</sup>Departamento de Agroquímica e Ambiente. Universidade de Miguel Hernández, EPS-Orihuela, Ctra Beniel Km 3.2, 03312-Orihuela (Alicante), Spain. perez.murcia@umh.es

<sup>3</sup>Associação PALOMBAR. Escola Primária de Uva, 5230 – 232 Uva, Vimioso. Portugal. palombar@gmail.com

### Resumo

No norte de Portugal, e sobretudo nos distritos de Bragança e Guarda, existem catalogados mais de 3250 pombais tradicionais que são parte integrante da paisagem da região devido à sua abundância e arquitectura próprias. Tradicionalmente estes pombais fizeram parte da economia familiar sendo o pombinho, as pombas e as penas os seus produtos. O pombinho, material residual de carácter sólido procedente das dejeções das pombas misturado com a palha espalhada no interior do pombal, foi produzido e utilizado de forma generalizada como fertilizante. Neste sentido, com o presente trabalho, promovido pela associação PALOMBAR, pretendeu-se estudar os pombais tradicionais numa perspectiva agroecológica. A importância do incentivo no uso dos pombais tradicionais radica em três pontos fundamentais: (1) o crescente interesse na procura de fertilizantes naturais que evitem o uso de fertilizantes químicos; (2) a busca da sustentabilidade dos sistemas agrícolas como ferramenta para o desenvolvimento rural; (3) o facto de que as pombas constituem em grande parte a base alimentar das aves de rapinas ameaçadas, nomeadamente a águia de Bonelli (*Aquila fasciata* Vieillot) e a águia-real (*Aquila chrysaetos* Linneus).

No presente estudo procedeu-se à caracterização físico-química e química do pombinho procedente de 29 pombais representativos das diferentes condições ambientais de norte a sul da região; analisou-se o pombinho como material susceptível de ser utilizado como fertilizante orgânico; determinaram-se os seus potenciais riscos de uso agrónomico como a salinidade e elementos potencialmente tóxicos; e estudou-se a variabilidade da sua composição em função da localização no território estudado.

As conclusões desde trabalho foram: (1) a catalogação e georreferenciação de 29 pombais localizados na região Natural do Nordeste Transmontano e o estabelecimento de agrupamentos de pombais representativos em função de âmbitos geográficos comuns; (2) grande variabilidade entre amostras o que justifica a necessidade da sua prévia caracterização antes do uso agrónomico; (3) os teores em matéria orgânica, carbono orgânico total e azoto total do pombinho foram elevados sendo que o uso do pombinho como corretor ou fertilizante proporcionaria quantidades importantes de azoto, fósforo, potássio e micronutrientes (fundamentalmente ferro); (4) comparando os estrumes obtidos com os de coelho, porco, vaca

e ovelha, observando-se uma capacidade fertilizante superior; (4) o pH do pombinho foi ligeiramente ácido pelo que a sua aplicação em solos básicos melhoraria a disponibilidade de nutrientes e em solos ácidos poderia eventualmente melhorar aspectos negativos derivados da toxicidade de metais e da deficiência de alguns nutrientes essenciais; (5) o pombinho apresentou uma baixa condutividade eléctrica pelo que o risco de salinização dos solos será menor que o risco de outros resíduos de origem animal apresentando também teores de sódio inferiores aos de outros resíduos de origem animal; (6) o pombinho apresentou baixa relação C/N e altos conteúdos em N, pelo que a sua aplicação deve controlar-se respeito à quantidade e momento da aplicação ou bem deve-se compostar com outros resíduos com maior relação C/N; (7) os pombais do sul apresentaram no geral maior salinidade e maior teor em matéria orgânica, carbono orgânico total e azoto total em quanto os pombais do norte apresentaram um maior conteúdo de cinzas e micronutrientes (Fe, Cu, Mn e Zn) e uma maior relação C/N.

**Palavras-chave:** pombais tradicionais, pombinho, fertilização, sustentabilidade, agroecologia.

## **Controlo de populações de microalgas por plantas: Que relevância em Agroecologia?**

**S. Barros; A.M. Geraldes; C. Fernandes**

*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. sandracgbarros@gmail.com; geraldes@ipb.pt; conceicao.fernandes@ipb.pt*

### **Resumo**

Muitos sistemas aquáticos apresentam desenvolvimento excessivo de fitoplâncton e algas filamentosas devido à eutrofização. Para mitigar os problemas ambientais e económicos resultantes, têm sido aplicados algicidas convencionais. Contudo, estes têm eficácia discutível, são tóxicos e persistentes no ambiente. Uma alternativa poderá ser a utilização de plantas e dos seus extractos como algicidas naturais. No presente trabalho foi investigado o potencial algicida/algistático de óleos essenciais e de decocções extraídos das seguintes plantas: alfazema (*Lavandula sp*), alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), loureiro (*Laurus nobilis L.*), mendrasto (*Mentha suaveolens Ehrh.*), freixo (*Fraxinus angustifolia Vahl.*), choupo (*Populus sp.*) e sabugueiro (*Sambucus nigra L.*). Para tal, culturas de *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyta) e *Anabaena cylindrica* Lemm (Cyanophyta) foram expostas a diferentes concentrações dos extractos mencionados. Os resultados obtidos sugerem que os óleos essenciais testados possuem propriedades algicidas e que apenas as decocções de alecrim e loureiro na concentração máxima testada terão efeito algistático nas culturas de *Chlorella vulgaris* e capacidade de diminuição da proliferação celular nas culturas de *Anabaena cylindrica*. A decocção de freixo também parece ter efeito algistático mas apenas na cultura de *Anabaena cylindrica*. No futuro, e num contexto de uma agricultura cada vez mais sustentável plantas, ou extractos, com propriedades algicidas/algistáticas poderão ser utilizados para controlar o excesso de algas em charcos e tanques das explorações agrícolas e em sistemas aquáticos adjacentes com menores impactos ambientais e económicos e com menos riscos para a saúde pública.

**Palavras-chave:** microalgas, extractos vegetais, actividade algicida/algistática.

## Introdução

Desde a década de 30 do século XX, é do conhecimento geral que plantas aquáticas e terrestres podem libertar para o meio envolvente compostos activos (alelopáticos) que condicionam o desenvolvimento de outros organismos. Estes compostos são geralmente fenóis, terpenóides, alcalóides, ácidos gordos e esteróides (Bourgaud *et al.*, 2001), podendo ser encontrados em diversas partes da planta, como, folhas, caules, frutos, sementes, não existindo no entanto um padrão para a quantidade exacta em cada parte da planta (Inderjit, 1996). Também foi observado que muitos destes compostos inibiam o crescimento do fitoplâncton e de outras espécies de algas filamentosas (Gross *et al.*, 2007). São de salientar os estudos pioneiros nos quais se verificou que a palha de cevada apresentava um efeito de redução significativo na densidade de microalgas e um aumento acentuado na transparência da água, em sistemas aquáticos com crescimento de algas excessivo (Geiger *et al.*, 2005). São também de salientar os trabalhos desenvolvidos por Gross 2000; Berger & Schagerl, 2004; Hilt 2006; Mulderij *et al.*, 2006; Hilt & Gross 2008; Zhang *et al.*, 2009 que mais uma vez evidenciam a produção de substâncias alelopáticas com efeito algicida em plantas aquáticas. Outros trabalhos revelaram que óleos essenciais extraídos de várias plantas terrestres têm também efeitos inibidores do crescimento de várias microalgas (Cantrell *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Extractos aquosos (infusões) provenientes de várias plantas também parecem ter efeitos negativos no crescimento do fitoplâncton (Jančula *et al.*, 2007). Este tipo de investigação tem-se tornado muito relevante dado que é cada vez mais frequente em sistemas aquáticos, tanto naturais como artificiais, de pequena e grande dimensão, a ocorrência de um crescimento excessivo (*blooms*) do fitoplâncton e de algas filamentosas induzido pela crescente eutrofização. A mitigação dos problemas ecológicos, estéticos e económicos causados pelos *blooms* de algas passa na maior parte dos casos pela simples aplicação de algicidas convencionais (e.g.  $\text{CuSO}_4$ ). No entanto, estes compostos têm vários inconvenientes que incluem um grau de eficiência discutível, persistência nos ecossistemas causando impactos ambientais muito negativos, e toxicidade para outros organismos não – alvo. Outras alternativas aos processos químicos, são os processos físicos como por exemplo, a remoção mecânica e ultra-sons, no entanto, estes métodos são geralmente muito dispendiosos e apenas viáveis em áreas confinadas. Urge assim desenvolver novas tecnologias de controlo directo de populações de algas. Estas, deverão ser eficientes, de baixo custo e “amigas” do ambiente. Em Portugal apesar de existirem numerosos sistemas aquáticos (albufeiras, rios, lagos ornamentais e piscinas) com problemas devido ao desenvolvimento excessivo de algas até ao momento não era conhecido nenhum tipo de investigação que visasse avaliar o potencial algicida/algistático de plantas autóctones (Barros, 2010; Barros, *et al.* 2010). Assim, o objectivo do presente estudo é avaliar o potencial algicida/algistático de várias plantas que ocorrem espontaneamente (autóctones) ou que são cultivadas (alfazema, choupo e loureiro) na região de Trás-os-Montes.

## **Material e Métodos**

### **Plantas**

Para este estudo foram seleccionadas sete plantas: alfazema (*Lavandula sp*), alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), loureiro (*Laurus nobilis L.*), mendrasto (*Mentha suaveolens Ehrh.*), freixo (*Fraxinus angustifolia Vahl.*), choupo (*Populus sp.*) e sabugueiro (*Sambucus nigra L.*), tendo sido colhidas no *Campus* de Santa Apolónia, Instituto Politécnico de Bragança (41°47'45.01"N, 6°45'59.21"W), no mês de Setembro de 2009. Sempre que possível, foram consideradas três partes de cada planta: flores, folhas e caules para a extracção de óleos essenciais e para a obtenção das decocções. O material vegetal colhido foi armazenado a -18 °C em envelopes de papel até ser processado.

### **Obtenção de óleos essenciais e decocções**

A extracção de óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação durante 3h a temperatura inferior a 100 °C através do aparelho do tipo Clevenger. Cada amostra foi triturada e colocada num balão de 500 mL com água ultra-pura. Após o processo de destilação a porção de óleo essencial obtido foi removido para um frasquinho de vidro. A decocção resultante deste processo foi filtrada e também recolhida. Ambos os tipos de extractos foram armazenados a -20°C.

### **Culturas de microalgas e sua manutenção laboratorial**

Para testar o efeito dos extractos das plantas foram utilizadas culturas monoalgais de *Chlorella vulgaris* Beijerinck (CBS15-2075) e de *Anabaena cylindrica* Lemm (UTAD\_A212). As culturas de *C. vulgaris* foram mantidas em meio de Walne-modificado, a pH 6.0 agitadas continuamente por fluxo de ar, utilizando filtros autoclaváveis de 0.2 µm e diâmetro de 50 mm (Millex™), a uma temperatura controlada de 25 °C, com iluminação de 4500 lx provenientes de lâmpadas fluorescentes de 30W (Gro-Lux) e com fotoperíodo de 16h/8h luz/escuro. As culturas de *A. cylindrica* foram mantidas em meio BG<sub>11</sub>, a pH 7 em condições semelhantes, sendo agitadas manualmente uma vez por dia. Os meios de cultura e o material de vidro utilizado foram previamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### **Ensaio Laboratoriais**

#### **Avaliação do potencial algistático/algicida das decocções**

As culturas de *C. vulgaris* quando atingiram a fase exponencial foram expostas a diferentes concentrações das decocções: 1:4, 1:7 e 1:10 (25, 14 e 10 mL de extracto num total de 100 mL de cultura). Os ensaios foram incubados em câmara de cultura à temperatura de 22 °C, intensidade luminosa de 2390 lx com fotoperíodo de 16h/8h luz/escuro, sendo agitados

manualmente uma vez por dia. O crescimento das culturas foi avaliado por contagem diária do número de células em câmara de Neubauer. O potencial algicida/algistático deste tipo de extractos foi avaliado pelos seguintes parâmetros: taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{Max}$ ) e tempo de duplicação (td). Para cada cultura, os dados que relacionam o logaritmo do número de células por mL, em função do tempo de incubação, na fase exponencial do crescimento, foram ajustados por análise de regressão linear e usada a seguinte expressão:

$$\text{Taxa específica de crescimento } (\mu) = \frac{\text{Log}N - \text{Log}N_0}{t - t_0}$$

Onde:

N = concentração de células no tempo t de incubação

N<sub>0</sub> = concentração de células no tempo t<sub>0</sub>

O tempo de duplicação foi calculado tendo em conta a seguinte equação,

$$\text{Tempo de duplicação (td)} = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Os ensaios com *A. cylindrica* foram realizados nas mesmas condições, tendo sido testadas as seguintes concentrações de extractos: 1:4, 1:10 e 1:50 (25, 10 e 2 mL de extracto num total de 100 mL de cultura). A avaliação do crescimento foi feita pela quantificação de pigmentos fotossintéticos de acordo com Lorenzen & Jeffrey (1980). O potencial algicida/algistático foi avaliado comparativamente ao controlo, pelo incremento em clorofila a e pelo seu valor máximo.

#### **Avaliação do potencial algistático/algicida das decocções**

Os óleos essenciais foram testados em meio sólido, utilizando-se o método de difusão em disco. As placas de Petri com meio sólido (1% agar) Walne modificado e BG<sub>11</sub>, foram inoculadas com *C. vulgaris* e *A. cylindrica* respectivamente. A inoculação foi feita com 150  $\mu$ L de cultura na fase exponencial e semeada em forma de estrias na superfície do agar. Foram usados discos estéreis de 6 mm de diâmetro (Whatman No. 2017-006 AA) que após colocação nas placas de Petri foram impregnados com 30  $\mu$ L de mistura teste. Esta consistiu em óleos essenciais dissolvidos em solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) (Merck K40270552 936), a diferentes concentrações: 1:1; 1:3; 1:4; 1:10; 1:50 num volume total de 30  $\mu$ L. Os ensaios foram incubados em câmara de cultura em condições idênticas aos ensaios com as decocções. A avaliação do crescimento foi feita pela observação de halos de inibição para ambas as microalgas.

## Resultados

### Avaliação do potencial algistático/algicida das decocções

#### *Chlorella vulgaris*

As taxas específicas de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e tempo de duplicação (td) determinadas para a cultura de *C. vulgaris* incubada com 25 mL (1:4), 14 mL (1:7) e 10 mL (1:10) das diferentes decocções de plantas, comparativamente ao controlo são apresentadas na Tabela I.

Tabela 1. Expressões matemáticas do crescimento (fase exponencial) para *C. vulgaris* exposta a diferentes concentrações de decocções obtidas das plantas em estudo.

	25 mL (1:4)		14 mL (1:7)		10 mL (1:10)	
	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	Td (dias)	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	Td (dias)	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	Td (dias)
<b>Controlo</b>	<b>0.60</b>	<b>1.16</b>	<b>0.48</b>	<b>1.44</b>	<b>0.46</b>	<b>1.50</b>
<b>Choupo</b>	0.60	1.16	0.66	1.05	0.93	0.75
<b>Sabugueiro</b>	0.62	1.12	0.43	1.62	ND	ND
<b>Mendrasto</b>	0.47	1.47	0.77	0.90	0.54	1.28
<b>Alecrim</b>	0	0	0.48	1.44	0.54	1.28
<b>Loureiro</b>	0	0	0.75	0.92	0.55	1.26
<b>Freixo</b>	ND	ND	0.66	1.05	0.45	1.54

ND – não determinado

De um modo geral verificou-se um efeito algistático ou diminuição da taxa específica de crescimento apenas nas concentrações mais elevadas: os extractos de alecrim e de loureiro mostraram efeito algistático já que, as densidades celulares se mantiveram constantes ao longo do tempo originando taxas específicas de crescimento nulas; por outro lado, a incubação na presença de mendrasto e até certo ponto na presença de freixo, já que não ocorreu uma fase exponencial marcada, diminuiu a taxa específica de crescimento de *C. vulgaris*. Em nenhuma das concentrações testadas se verificou efeito algicida.

#### *Anabaena cylindrica*

No Gráfico 1 são apresentados os valores da clorofila a das culturas expostas às decocções na concentração de 1:4 em que os resultados parecem ser mais promissores. Assim, apenas as decocções de loureiro, mostraram capacidade para diminuir a proliferação celular, ocorrendo uma diminuição dos valores de clorofila a. Por outro lado, o extracto de freixo mostrou potencial algistático já que o valor de clorofila a, não obstante a algumas oscilações, manteve-se próximo do inicial.

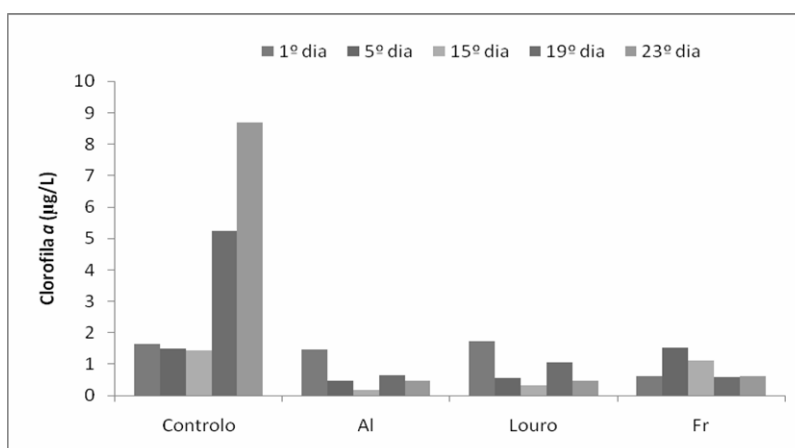


Gráfico 1. Variação da concentração de clorofila *a* em culturas de *A. cylindrica*, em meio Bg<sub>11</sub> expostas a decoções na concentração de 1:4 relativamente ao controlo; Al = alecrim; louro = loureiro e Fr = freixo.

No Gráfico 2 são apresentados os efeitos das decoções de todas as plantas estudadas nas concentrações de 1:10 e 1:50. Os extractos de freixo e de alecrim na concentração de 1:10 parecem continuar a apresentar potencial algistático. Relativamente às culturas incubadas com o extracto de loureiro continuou-se a observar a diminuição da proliferação celular. Na concentração de 1:50 verificou-se o estímulo do crescimento em todas as decoções.

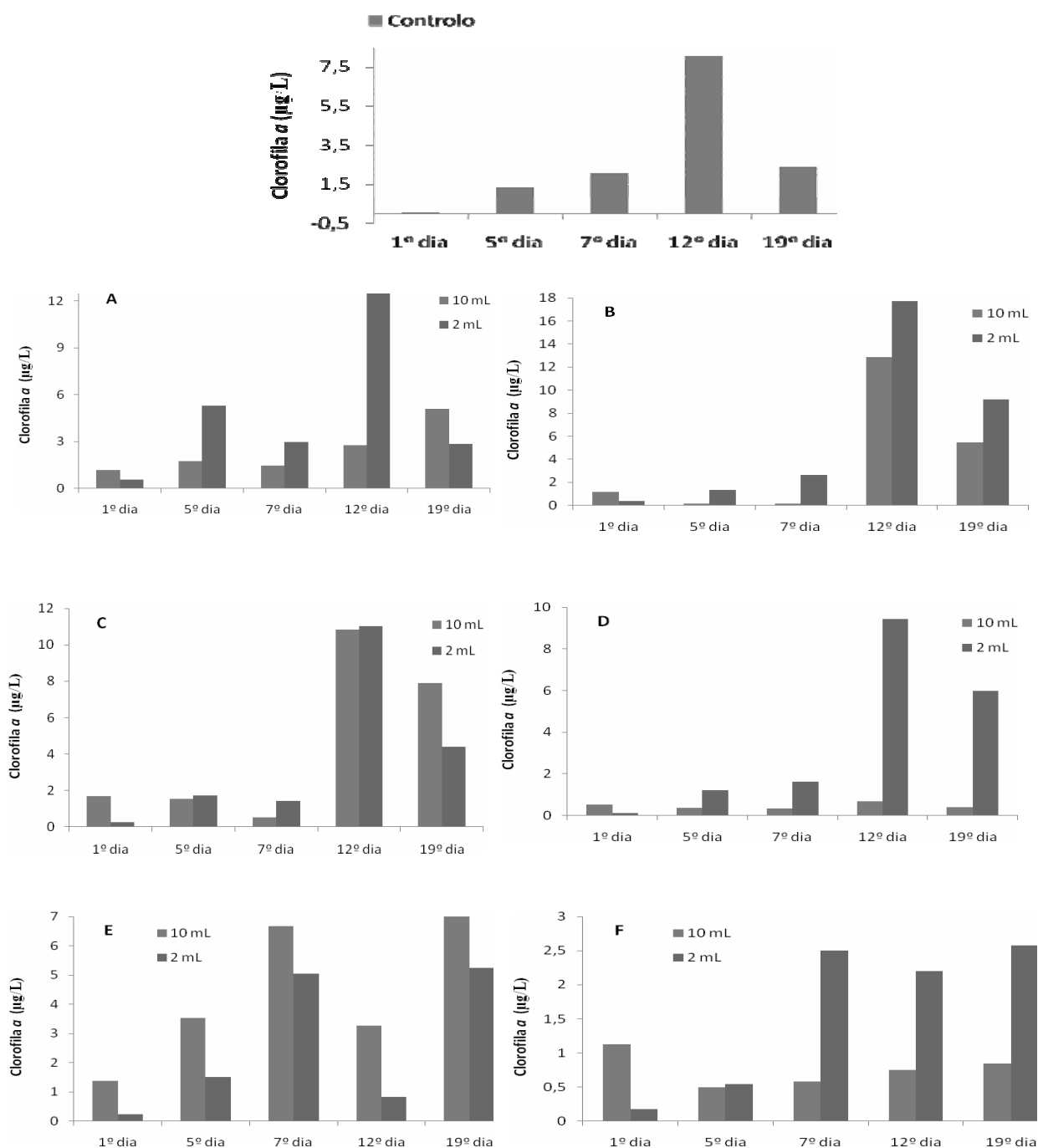


Gráfico 2. Variação da concentração de clorofila a em culturas de *A. cylindrica*, em meio BG<sub>11</sub> expostas às decocções: 10 mL (1:10) e 2 mL (1:50), relativamente ao controlo; A – choupou; B – sabugueiro; C – mendrasto; D – alecrim; E – loureiro e F – freixo

### Avaliação do potencial algicida/algistático dos óleos essenciais

Só foi possível extrair óleos essenciais em quantidades suficientes para os ensaios do alecrim, alfazema, mendrasto e loureiro. Os ensaios mostram que todos os óleos essenciais testados inibem completamente o crescimento de ambas as microalgas (Tabela II a IV), sugerindo um efeito algicida forte. Um aspecto a salientar é a inexistência de halos de inibição

em todos os ensaios realizados. Este facto provavelmente dever-se-á á elevada volatilidade destes extractos.

Tabela 2. Avaliação dos controlos dos ensaios em meio sólido para *C. vulgaris* e *A. cylindrica*

	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Anabaena cylindrica</i>
<b>Esterilização</b>	-	-
<b>Crescimento</b>	++	++
<b>Disco</b>	++	++
<b>Disco + DMSO</b>	++	++

(-) Ausência de crescimento; (+) Presença de crescimento

Tabela 3. Avaliação do crescimento de *C. vulgaris* em meio sólido na presença das várias concentrações de óleos essenciais

	1:1	1:3	1:4	1:10	1:50
<b>Alfazema</b>	-	-	-	-	-
<b>Alecrim</b>	-	-	-	-	-
<b>Mendrasto</b>	-	-	-	-	-
<b>Loureiro</b>	-	-	-	-	-

(-) Ausência de crescimento; (+) Presença de crescimento;

Tabela 4. Avaliação do crescimento de *A. cylindrica* em meio sólido na presença das várias concentrações de óleos essenciais

	1:1	1:3	1:4	1:10	1:50
<b>Alfazema</b>	-	-	-	-	-
<b>Alecrim</b>	-	-	-	-	-
<b>Mendrasto</b>	-	-	-	-	-
<b>Loureiro</b>	-	-	-	-	-

(-) Ausência de crescimento; (+) Presença de crescimento;

## Discussão

Os resultados obtidos parecem indicar que as decocções de alecrim e loureiro nas concentrações de 1:4 têm efeito algistático nas culturas de *C. vulgaris* e potencial para diminuir a proliferação celular em culturas de *A. cylindrica*. A decocção de loureiro na concentração de 1:10 também revelou potencial algistático. Por seu turno, *A. cylindrica* é também sensível à decocção do freixo nas concentrações de 1:4 e nas concentrações de 1:10. Em nenhuma concentração estudada se verificou efeito algicida. Durante a fase exponencial de crescimento são diversos os factores, quer intrínsecos, quer extrínsecos, que interferem com as taxas de crescimento das culturas. Estes incluem o estado fisiológico do inóculo, a concentração de

nutrientes no meio de cultura, pH e temperatura de incubação, entre outros. Nestes ensaios, dado que as condições de incubação, e o estado fisiológico do inóculo foram idênticas, as diferenças nas taxas de crescimento em *C. vulgaris* e nas concentrações de clorofila *a* em *A. cylindrica* poderão ser devidas á variação da composição do meio de cultura em função das diferentes decocções e das concentrações testadas (Barros, 2010). Actualmente estão a decorrer ensaios para avaliar o efeito destes extractos em culturas em diferentes estádios.

Nesta fase da investigação ainda não foi feito qualquer estudo que vise determinar a composição quer das decocções que revelaram efeito mais promissor, quer dos óleos essenciais, mas considerando dados da literatura sobre algumas espécies de plantas espontâneas em Portugal (Proença da Cunha, *et al.*, 2007) é possível afirmar, por exemplo, que as folhas e as partes aéreas do alecrim apresentam na sua composição taninos, flavenoides, lactonas, ácidos e álcoois triterapénicos, ácidos polifenólicos e derivados do ácido cafeico. O loureiro possui também flavenóides, taninos, lactonas e ainda vestígios de alcalóides isoquinoleicos. Ainda segundo os mesmos autores, o óleo essencial do alecrim é constituído por  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno e limoneno entre outros compostos. Por sua vez, o óleo essencial do loureiro é constituído principalmente por cineol. Alguns destes compostos, quando presentes em determinadas concentrações, serão certamente responsáveis pelos efeitos algistático e algicida observados. A suposição de que os compostos mencionados são responsáveis pelos efeitos algicidas e algistáticos observados, é suportada por vários autores (e.g. Harrison *et al.* 1980; Hassan *et al.*, 2004; Jančula *et al.*, 2007) que analisaram a composição dos extractos de plantas com efeito inibitório no crescimento de microalgas, verificando que esta acção era consequência de substâncias como compostos fenólicos, alcalóides, taninos, terpenos e flavenóides. De acordo com Mahamed *et al.* (2010) estes extractos têm efeitos algicidas/ algistáticos, porque alguns constituintes podem interferir com funções fisiológicas a nível celular. De facto, Feng-Min & Hong-Ying (2005) verificaram que os extractos de *Phragmites communis* provocam uma redução na actividade de enzimas anti-oxidantes, como a superóxido dismutase e a peroxidase, sendo a integridade da membrana celular afectada. Interessante foi também verificar que em concentrações baixas, os compostos presentes nas decocções poderão ter um efeito contrário ao pretendido, ou seja, estimulam o crescimento das microalgas em cultura.

No futuro esta linha de investigação visa: alargar este estudo a outras plantas; nomeadamente plantas aquáticas e outras da mata ripícola; avaliar os efeitos dos extractos e das plantas na fisiologia das microalgas; investigar a toxicidade dos extractos e de partes de plantas em espécies não alvo, como é o caso dos peixes e do zooplâncton; identificar e isolar as substâncias presentes nas plantas e nos extractos que revelem efeitos mais promissores.

De acordo com a Directiva Quadro da Água, as águas superficiais de todos os Estados Membros deverão atingir um bom estado ecológico até 2015. A supressão dos *blooms* de algas passa pela redução das entradas de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, o que não será possível sem um correcto ordenamento territorial e sem implementação de boas práticas

agrícolas e florestais. Mesmo que este estado de qualidade ecológica venha um dia a ser atingido será sempre necessária uma gestão contínua destes sistemas. Este tipo de investigação é, assim relevante sob duas perspectivas: (1) Ao conhecer-se as propriedades algicidas/algistáticas das plantas é possível gerir mais eficientemente a mata ripícola e, assim, controlar mais eficientemente, sem recurso a algicidas/algistáticos convencionais, a intensidade dos *blooms* de algas (2) Num contexto de uma agricultura cada vez mais sustentável, plantas ou extractos destas, com propriedades algicidas/algistáticas poderão ser utilizados para controlar o excesso de algas em charcos e tanques das explorações agrícolas e em sistemas aquáticos adjacentes, com menores impactos ambientais e económicos e com menos riscos para a saúde pública. Caso no futuro esta metodologia de controlo de algas venha a ser aplicada de forma generalizada poderá estimular o cultivo e a criação de viveiros de plantas destinadas a serem utilizadas como algicidas/algistáticos. De salientar que muitas destas plantas são também aromáticas e medicinais, podendo ser cultivadas para múltiplos fins e assim, constituírem fonte de rendimento suplementar para alguns agricultores. Por outro lado, um grande número de plantas com potencial algicida/algistático ocorre nas zonas de bordadura dos campos agrícolas. Como é do conhecimento geral estas zonas são muito importantes no contexto da Agroecologia. Assim, a exploração sustentável de algumas plantas com potencial algicida/algistático que ocorrem nestas zonas poderá ser um estímulo à sua conservação.

## Agradecimentos

Às Instituições que cederam as algas: Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica do Porto (*Chlorella vulgaris* (CBS15-2075)); Universidade de Trás – os – Montes e Alto Douro, Vila Real (*Anabaena cylindrica* (UTAD\_A212)). À Professora Doutora João Sousa, da ESAB, pelo apoio na metodologia da extracção; à Professora Doutora Anabela Martins, da ESAB, pelas facilidades no uso da câmara de cultura.

## Referências bibliográficas

- Barros S (2010) Avaliação do potencial algicida/algistático de extractos vegetais em microalgas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 57 pp.
- Barros S, Geraldés AM, Ramos A, Galhano V, Fernandes C (2010). Avaliação do potencial algicida/algistático de extractos vegetais em microalgas (Chlorophyta e Cyanophyta) AIL. XV Congresso Ibérico de Limnologia. 5-9 Julho, Ponta Delgada, Açores.
- Berger J, Schagerl M (2004). Allelopathic activity of Characeae. *Biologia* (Bratislava), 59: 9 – 15.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839–851.

- Cantrell LK, Mamonov RN, Kustova TS, Fischer NH, Schrader KK (2007). Bioassay-guided isolation of anti-algal constituents from *Inula helenium* and *Limonium myrianthum*. *ARKIVOC*, 7: 65-75.
- Feng-Min L, Hong-Ying H, (2005). Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6545–6553.
- Geiger S, Henry E, Hayes P, Haggard K (2005). Barley straw – Algae control literature analysis. <http://barleyworld.org/barleystraw/Barley%20Straw%20%20Algae%20Control%20Lit%20Anal%20Final.pdf> (acedido em 19/11/2010).
- Gross EM (2000). Seasonal and spatial Dynamics of allelochemicals in the submersed macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *Limnologie*, 27: 2116 – 2119.
- Gross EM, Hilt S, Lombardo P, Mulderij G (2007). Searching for allelopathic effects of submersed macrophytes on phytoplankton – state of the art and open questions. *Hydrobiologia*, 584: 77 – 88.
- Harrison PG, Chan AT (1980). Inhibition of the Growth of Micro-Algae and Bacteria by Extracts of Eelgrass (*Zostera marina*) Leaves. *Marine Biology*, 61: 21 – 26.
- Hassan FM, Yaseen AA, Abed RK (2004). Effect of some medicinal plants extracts on the growth of the alga *Microcystis aeruginosa* Kuetz. Elenkin.Iraqi. *Iraqi Journal of Science*, 45: 92-98.
- Hilt S (2006). Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. *Aquatic Botany*, 85: 252 – 256.
- Hilt S, Gross EM (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilize clear – water states in shallow lakes? *Basic and Applied Ecology*, 9: 422 – 432.
- Inderjit (1996). *Plant Phenolics in Allelopathy*. *The Botanic Review* 62: 186 – 202.
- Jančula D, Suchomelová J, Gregor J, Smutná M, Maršálek B, Táborská E (2007). Effects of Aqueous Extracts from Five Species of the Family Papaveraceae on Selected Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology*, 480 – 486.
- Lorenzen C J, Jeffrey S W (1980). Determination of chlorophyll in seawater. *Unesco tech. pap. mar. sci.*, 35. 20p.
- Mohamed ZA, Shehri AM (2010). Differential Responses of Epiphytic and Planktonic Toxic Cyanobacteria to Allelopathic Substances of the Submersed Macrophyte *Stratiotes aloides*. *Internat. Rev. Hydrobiology*, 95: 224–234.
- Mulderij G, Smolders AJP, Donk EV (2006). Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biology*, 51: 554 – 561.
- Proença da Cunha A, Ribeiro JA, Roque OR (2007). Plantas aromáticas em Portugal caracterização e utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 328
- Yang W, Liu J, Li H, Zhang X, Qi Y. (2009). Inhibition of the Growth of *Alexandrium tamarense* by Algicidal Substances in Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Bull Environ Contam Toxicol*, 83: 537 – 541.
- Zhang WH, Hu GJ, He W, Zhou LF, Wu XG, Ding HJ (2009). Allelopathic effects of emergent macrophyte, *Acorus calamus* L. on *Microcystis aeruginosa* Kietzing and *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Allelopathy Journal* 24: 157 – 168.



## **Qualidade seminal e morfometria testicular de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) suplementados com geleia real *in natura***

**L.P. Barbosa<sup>1</sup>; P.K.A. Campos<sup>2</sup>; M.M. Neves<sup>3</sup>; B.E.S. Melo<sup>2</sup>; A.C.T. Morais<sup>2</sup>; D.B. Morais<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia, Brasil. E-mail: lpires73@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de geleia real *in natura* na qualidade seminal e morfometria testicular de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Quatorze coelhos adultos da raça Nova Zelândia foram distribuídos em três grupos (G), sendo: G1 (grupo controle) (n=4), com administração diária de 1mL de água, via oral; G2 (n=5), administração diária de 0,5mg e G3 (n=5), administração diária de 1,0mg (n=5) de geleia real *in natura* diluída em 1mL de água, via oral. O fornecimento de geleia real foi iniciado 30 dias antes das coletas de sêmen, permanecendo durante todo o período de coleta, totalizando um período de 90 dias. Para coleta de sêmen foi utilizado o método da vagina artificial. Foram avaliados os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen e parâmetros de morfometria testicular. Houve diferença no volume seminal do G2 (0,54±0,22) em relação ao G1 (0,39±0,13) e ao G3 (0,30±0,09). Para os grupos G1, G2 e G3, não houve diferença para turbilhonamento espermático, concentração espermática, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. Os defeitos maiores no grupo G2 (8,52±3,26) foram menores do que nos grupos G1 (14,09±4,26) e G3 (16,1±3,95). Não houve diferença significativa entre os defeitos menores e valores de defeitos totais. Os pesos corporal, testicular, epididimário e índice gonadossomático não diferiram entre os grupos. A ingestão diária de 0,5mg de geleia real *in natura*, durante um período de 90 dias, apresentou efeitos positivos na morfologia espermática de coelhos adultos.

**Palavras-chave:** índice gonadossomático, patologia espermática, sêmen

## Introdução

Nos últimos anos, é perceptível um interesse maior em todo mundo pelos produtos apícolas, incluindo a geleia real, este interesse é justificado pelo fato destes produtos apresentarem propriedades medicinais e nutritivas singulares. Várias análises químicas e testes para as atividades biológicas da geleia real e sua composição têm sido relatados na literatura (Rocha et al., 2003).

A geleia real possui em sua composição 63% de umidade, 3,5% de lipídios (esteroides), 13% de proteínas e 19,5% de carboidratos, minerais, e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina) (Amoedo e Muradian, 2002) e outros componentes ainda não identificados (Kohno et al., 2004). O ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) é o principal componente da sua fração lipídica e é considerado o mais importante princípio ativo da geleia real (Koshio e Muradian, 2003).

Segundo Koshio e Muradian (2003), a fertilidade e o longo período de vida da abelha rainha, que é alimentada exclusivamente com geleia real, têm gerado interesse no seu consumo. Tem sido vasta sua utilização popular por causa de seus prováveis efeitos medicinais para problemas hepáticos, cardíacos, imunológicos, dermatológicos e em questões relacionadas à reprodução, como aumento da fertilidade e libido.

Alguns estudos retratam o uso da geleia real atuando no processo reprodutivo de animais (Khattab et al., 1989; Husein e haddad, 2006; Morais et al., 2009; Barbosa et al., 2009). Em coelhos, o tratamento com geleia demonstrou uma melhora da fertilidade e do desenvolvimento embriogênico (Khattab et al., 1988). Husein e Haddad (2006), em seus experimentos, concluíram que a geleia real aumenta o desempenho reprodutivo em ovelhas. Embora os mecanismos de ação desta substância ainda não estejam determinados, possui efeitos positivos no desenvolvimento e crescimento folicular e na gestação, sustentando a hipótese de que a geleia real produza efeitos similares aos produzidos pela gonadotrofina coriônica equina.

De maneira similar, Kridli e Al-Khetib (2006) concluíram que a geleia real pode ter efeitos positivos na gestação e na taxa de nascidos, agindo de maneira a aumentar a resposta ao estro e a taxa de concepção, com o aumento do desenvolvimento folicular, resultando no aumento da produção de estrógeno.

Entretanto, estudos para testar a hipótese de que a geleia real age de maneira positiva nos aspectos reprodutivos de machos são escassos. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da geleia real *in natura* nos parâmetros físicos e morfológicos do sêmen e na morfometria testicular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*).

## Material e Métodos

O projeto foi realizado no Biotério do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – UnilesteMG, em Coronel Fabriciano-MG. Foram

utilizados 14 coelhos machos adultos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura a 24°C e luminosidade controlada, sendo o fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Receberam ração específica para animais de laboratório e água *ad libitum*. Foram alojados em gaiolas de metal, própria para coelhos, com lotação de dois animais por gaiola.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (G), sendo: G1 (grupo controle) (n=4), administração de 1mL de água por via oral, diariamente; G2 (n=5), administração de 0,5mg de geleia real diluída em 1mL de água via oral, diariamente e G3 (n=5), administração de 1mg de geleia real diluída em 1mL de água via oral, diariamente.

A suplementação dos animais com geleia real foi iniciada 30 dias antes das coletas de sêmen permanecendo até o final do período experimental, totalizando três meses de suplementação.

O sêmen foi coletado duas vezes por semana durante dois meses, utilizando-se o método de vagina artificial, utilizando uma fêmea como manequim. Utilizou-se uma caixa de coleta, apresentando 80cm de comprimento, 40cm de largura e 30cm de altura. Após a coleta do sêmen, este foi imediatamente levado ao banho-maria, estabilizado à temperatura de 37°C, seguindo-se à realização do seu exame físico.

Foram analisados os parâmetros físicos do sêmen, como aspecto; volume seminal; concentração espermática, avaliada em câmara de Neubauer; turbilhonamento espermático (0-5); motilidade espermática progressiva (0-100%), vigor espermático (0-5) e aspectos morfológicos do sêmen, por meio de avaliações das patologias espermáticas, classificadas como defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (1998).

Após o período de suplementação e avaliação seminal, os coelhos foram sacrificados, utilizando aplicação intravenosa de tiopental, diluído em soro fisiológico e éter. Posteriormente os animais foram pesados e retirados os testículos. Estes órgãos, direito e esquerdo, bem como o epidídimo, foram dessecados e pesados em balança de precisão. Por meio do peso de ambos os testículos foi possível calcular o índice gonadossomático, o qual refere-se ao percentual de massa corporal alocado em gônadas.

Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliação do volume seminal, turbilhonamento espermático, vigor espermático, motilidade espermática progressiva e peso testicular e Análise de Variância para concentração espermática, patologias espermáticas (defeitos maiores, defeitos menores e totais), peso corporal dos animais, peso epididimário e índice gonadossomático, utilizando 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

O aspecto dos ejaculados analisados, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados com geleia real, apresentaram coloração leitosa, o que é característico da espécie. Das amostras analisadas apenas uma do grupo controle apresentou coloração amarelo citrino, característico de ejaculado pouco concentrado.

Houve diferença para o volume seminal entre os grupos ( $P < 0,05$ ). (Tabela 1), sendo que os animais do G2 apresentaram valores superiores ( $0,54 \pm 0,22$ ), em relação aos animais do G3 ( $0,30 \pm 0,09$ ) e aos animais do G1 ( $0,39 \pm 0,13$ ).

Tabela 1. Aspectos físicos do sêmen de coelhos suplementados com geleia real *in natura* via oral.

Parâmetros	G1 (Sem geléia)	G2 (0,5mg geleia)	G (1,0mg geléia)
Volume seminal (mL)	$0,39 \pm 0,13b$	$0,54 \pm 0,22a$	$0,30 \pm 0,09b$
Turbilhonamento espermático (0 a 5)	$3,00 \pm 1,58$	$3,33 \pm 1,12$	$3,11 \pm 1,17$
Motilidade espermática (%)	$62,22 \pm 38,98$	$78,33 \pm 23,18$	$73,89 \pm 24,59$
Vigor espermático (0 a 5)	$3,00 \pm 1,73$	$3,67 \pm 1,12$	$3,56 \pm 1,24$
Concentração espermática ( $\times 10^6$ /mL)	$147,44 \pm 01,27$	$132,94 \pm 20,88$	$100,99 \pm 09,24$

Valores na linha seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis para volume seminal, turbilhonamento espermático, vigor espermático e motilidade progressiva e ANOVA para concentração espermática, a 5% de probabilidade.

O ejaculado do coelho tem volume amplamente variado, desde 0,3 a 6mL (Badú, 2003; Oliveira, 2004). Neste estudo, a média do volume seminal encontra-se dentro da faixa considerada normal para a espécie, indicando o perfeito funcionamento das glândulas sexuais acessórias. Em seu estudo com coelhos, Foote (1999) ressalta que o volume do ejaculado é evidência do normal funcionamento das glândulas acessórias, associado à produção de andrógenos e a boa libido do animal. Desta forma, a produção de andrógenos pode ter sido favorecida no grupo suplementado com 0,5mg de geleia real, sendo refletida no aumento de volume seminal.

As médias dos volumes encontradas neste estudo são similares aos encontrados por Oliveira et al. (2004), em seu estudo com a suplementação de zinco em coelhos. Andreazzi et al. (2004) obtiveram média de volume de 0,59mL em seu experimento com coelhos Nova Zelândia, avaliando a qualidade do sêmen dos animais alimentados com rações contendo diferentes fontes de óleos vegetais.

O turbilhonamento espermático é caracterizado como sendo a associação de quatro características físicas do sêmen: volume, concentração espermática, motilidade espermática e vigor espermático (Fonseca et al., 1992). Os valores de turbilhonamento espermático não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre o grupo controle ( $3 \pm 1,58$ ) e os grupos tratados com geleia real, G2 ( $3,33 \pm 1,12$ ) e G3 ( $3,11 \pm 1,17$ ) (Tabela 1).

Holtz e Foote (1978), em seus estudos analisando a constituição e diversos parâmetros do sêmen de coelhos Nova Zelândia, obtiveram  $3,3 \pm 1,2$  de turbilhonamento espermático. Shimamoto e Sofikitis (1998), para este mesmo parâmetro, encontraram  $2,3 \pm 0,4$  no grupo tratado com dieta rica em colesterol e valor de  $3,3 \pm 0,3$  para o grupo controle, sendo este valor similar aos obtidos neste experimento.

As médias de concentração espermática não diferiram significativamente ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 1). Observa-se que houve uma variação muito grande nos valores de desvio padrão. Holtz e Foote (1978) obtiveram uma média de concentração espermática de  $90,2 \times 10^6/\text{mL}$ , o que não difere muito dos valores encontrados neste estudo. Entretanto, Andreazzi et al. (2004) obtiveram valores maiores, de  $207 \times 10^6/\text{mL}$ .

Não houve diferença na motilidade espermática progressiva e no vigor espermático do sêmen dos animais nos três grupos ( $P>0,05$ ) (Tab. 2), mostrando que a geleia real não influenciou nos referidos parâmetros.

Badú (2003) encontrou um valor médio de 85,6 de motilidade espermática, obtendo valor maior do que o encontrado neste estudo. Para vigor espermático, obteve um valor de 3,4 em seu experimento, sendo que as coletas foram realizadas no mesmo período do ano do presente experimento, de maio a setembro.

Os resultados obtidos por Oliveira (2004) em seu trabalho utilizando suplementação com zinco em coelhos, não diferiram dos achados neste estudo. Obteve valores de motilidade espermática progressiva de 73,60 a 79,17% e vigor espermático com média de 3,4 a 4,0. Shimamoto e Sofikitis (1998) obtiveram 79% de motilidade espermática.

A média de motilidade espermática obtida por Holtz e Foote (1978) foi relativamente baixa, comparando-a com este experimento, com um valor de 58%, semelhante aos resultados apresentados por Andreazzi et al. (2004), em que a média da motilidade espermática progressiva foi de 49%, mostrando-se também baixa.

Não houve diferença entre os defeitos menores e defeitos totais nos três grupos avaliados ( $P>0,05$ ) (Tabela 2). Entretanto, o total de defeitos maiores no grupo recebendo 0,5mg de geleia ( $8,52 \pm 3,26$ ) foi significativamente menor do que nos grupos controle ( $14,09 \pm 4,26$ ) e com suplementação com 1,0mg de geleia ( $16,10 \pm 3,95$ ). Essa diferença pode ser um reflexo também do efeito da geleia real na produção de andrógenos, influenciando diretamente na eficiência do processo de espermatogênese.

Tabela 2. Aspectos morfológicos do sêmen de coelhos suplementados com geleia real *in natura* via oral

Parâmetros	G1 (Sem geléia)	G2 (0,5mg geleia)	G (1,0mg geléia)
Defeitos menores	14,09 ± 4,26b	8,52 ± 3,26a	16,10 ± 3,95b
Defeitos maiores	22,88 ± 5,26	21,78 ± 3,64	19,78 ± 7,08
Defeitos Totais	36,97 ± 6,58	30,33 ± 2,12	35,88 ± 7,04

Valores na mesma linha seguidos por letras diferentes diferem entre si pela Análise de Variância a 5% de probabilidade.

Vale ressaltar que os tipos de patologias de defeitos maiores mais visualizadas nos três grupos foram gota citoplasmática proximal e contorno anormal da cabeça. Os valores encontrados são similares aos obtidos por Holtz e Foote (1978) que, avaliando o sêmen de coelhos Nova Zelândia, obtiveram uma proporção de espermatozoides com gota citoplasmática proximal sempre menor que 10% e afirmam que a aglutinação de cabeças de espermatozoides é comum nas amostras.

Patologias de gota citoplasmática proximal e distal são comuns em coelhos. Entre as patologias observadas em seu estudo, Badú (2003) discriminou as observadas na membrana acrossômica devido a sua importância na fertilização, em função de sua alta ocorrência.

Os valores de peso corporal, peso testicular, peso epididimário e de índice gonadossomático não apresentaram diferença entre os grupos avaliados ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Pesos corporal, testicular e epididimário e índice gonadossomático de coelhos suplementados com geleia real *in natura* via oral

Parâmetros	G1 (Sem geléia)	G2 (0,5mg geleia)	G (1,0mg geléia)
Peso corporal (Kg)	3,20 ± 0,18	2,95 ± 0,29	3,07 ± 0,33
Peso testículo direito (g)	2,35 ± 0,33*	2,53 ± 0,33*	2,03 ± 0,93*
Peso testículo esquerdo (g)	2,38 ± 0,49*	2,54 ± 0,32*	1,89 ± 1,01*
Peso epidídimo direito (g)	1,12 ± 0,24	1,28 ± 0,30	1,01 ± 0,19
Peso epidídimo esquerdo (g)	1,02 ± 0,25	1,26 ± 0,27	0,97 ± 0,33
Índice gonadossomático (%)	0,14 ± 0,020	0,17 ± 0,027	0,12 ± 0,058

Os parâmetros avaliados não diferiram entre si pela Análise de Variância e pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Kridli e Al-Khetib (2006) estudaram os efeitos de diferentes doses de geleia real em ovelhas fêmeas e não encontraram diferenças significativas no peso corporal dos animais do grupo controle e dos grupos tratados.

Os pesos dos animais estão de acordo com o descrito para esta espécie e com os valores obtidos por Foote (1999). Castro et al. (2002) obtiveram peso corporal dos coelhos de seus estudos um pouco maior, em torno de 4,29 kg. Shimamoto e Sofikitis (1998), em seus

estudos avaliando o alto nível de colesterol na função testicular e no sêmen de coelhos, encontraram peso testicular de  $3,153 \pm 1,01\text{kg}$ , no grupo tratado com alto nível de colesterol e  $3,208 \pm 0,94$ , no grupo controle.

O índice gonadossomático no G1 foi de 0,14%, e de 0,17% e 0,12%, para o G2 e para o G3, respectivamente. Este índice representa o percentual de massa corporal alocado em testículos, que foi expresso em percentual.

De acordo com Costa (2001), várias teorias vêm tentando explicar porque uma espécie aloca proporção de massa corporal em testículos mais que outras. A teoria que consegue explicar as variações em um maior número de espécies baseia-se no comportamento reprodutivo, ou seja, na frequência de cópulas dos reprodutores.

Foram sugeridas duas grandes subdivisões: (1) espécies cujos machos têm baixa frequência copulatória e (2) espécies com alta frequência copulatória. No primeiro grupo estão incluídos espécies com comportamento monogâmico, em que um macho copula com uma única fêmea, e poligâmico extremo, em que um único macho copula todas as fêmeas do grupo (Costa, 2001).

Por sua vez, no segundo grupo incluem-se espécies nas quais vários machos copulam com uma mesma fêmea em estro, no qual se incluem os coelhos. Os animais deste grupo normalmente possuem testículos relativamente menores que aqueles do grupo um. Isso é aparentemente explicado pela pressão de seleção que ocorre devido à competição para produção de progênie e competição dos espermatozóides dentro do trato reprodutivo da fêmea, que ocorre no segundo grupo. Nesses casos é requerida uma maior produção de sêmen, o que vai conferir aos machos destas espécies um tamanho relativo dos testículos (Costa, 2001).

Costa (2001) ressalta ainda, que, nas espécies em que a ovulação é espontânea, a demanda por sêmen pode ser maior que aquelas cuja ovulação é induzida. Da mesma forma, espécies em que as fêmeas têm um estro mais prolongado, com vários dias de duração, normalmente os machos têm maior índice gonadossomático quando comparado com aquelas espécies cujas fêmeas apresentam cio curto, de 24 horas ou menos.

A ingestão diária de 0,5 mg de geleia real aumentou o volume seminal e diminuiu os valores de defeitos espermáticos maiores de coelhos Nova Zelândia, apresentado indícios de efeitos positivos na produção seminal de machos. Não houve nenhum efeito prejudicial da geleia real nas variáveis seminais avaliadas.

## Referências bibliográficas

ANDREAZZI, M.A; SCAPINELLO, C; MORAES et al. Avaliação da qualidade do sêmen em coelhos alimentados com rações contendo diferentes fontes de óleos vegetais. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v.26, n.1, p.87-93, 2004.

- AMOEDO, L.H.G; MURADIAN, L.B.A. Comparação de métodos para a determinação de umidade em geleia real. *Química Nova*, v.25, n.4, p.676-679, 2002.
- BADÚ, C. A. Eficiência reprodutiva de coelhas inseminadas artificialmente e mantidas em sistemas semi-intensivo e extensivo de produção. 2003. *Tese de Mestrado*. UFMG. Departamento de veterinária. 2003, 38p.
- BARBOSA, L.P.; RODRIGUES, M.V.; BALARINI, M.K.; NEVES, M.M.; MELO, B.E.S.; MORAIS, D.B. Qualidade embrionária de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.1, p.146-152, 2009.
- CASTRO, A.C.S; BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.35, p.493-498, 2002.
- COSTA, D. C. Análise morfofuncional da espermatogênese e características seminais de catetos (*Tayassu tajacu*). 2001, *Tese Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 61 p.
- FONSECA, C.A; FILHO, V.R.M; FILHO, A.M. et al. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA*, Belo Horizonte. 82p, 1992.
- FOOTE, R.H. Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reproductive Toxicology*. v.13, p.269-277, 1999.
- HOLTZ, W.; FOOTE, R.H. Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. *Biology of Reproduction*, v.18, p.286-292, 1978.
- HUSEIN, M.Q.; HADDAD, S.G. A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic. *Animal Reproduction Science*, v.93, p. 24-33, 2006.
- KHATTAB, M.M.; RADWAN, A.A.; AFIFI, E.A. Physiological effect of Royal jelly on female reproductive capacity in rabbits. In: *Proceedings of the Fourth International Congresso n Apiculture in Tropical Climate*, Cairo, Egypt, 6-10 November, 1988, IBRA, London, UK.
- KOSHIO, S.; MURADIAN, L.B. Aplicação da clae para determinação do ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geleia real pura e adicionada a mel brasileiro. *Química Nova*. v.26, n.5, p.670-673, 2003.
- KRIDLI, R.T.; AL-KHETIB, S.S. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. *Animal Reproduction Science*, v.92, p.75-85, 2006.
- KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O. et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.68, p.138-145, 2004.
- OLIVEIRA, C.E.A. Avaliação seminal e utilização digestiva em coelho reprodutores submetidos a dietas com diferentes níveis de zinco. 2004, *Tese de Mestrado*. UFMF – Departamento de Veterinária. 2004. 36p.
- MORAIS, A.C.T.; BARBOSA, L.P.; NEVES, M.M.; MATTA, S.L.P.; MORAIS, D.B.; MELO, B.E.S. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.110-118, 2009.
- ROCHA, H.C; RAMOS, P.R.R; FUNARI, S.R.C. Eletroferograma de proteínas de glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* L. submetidas à produção de geleia real. *Boletim da Indústria Animal*. v.60, n.1, p.39-46, 2003.
- SHIMAMOTO, K.; SOFIKITIS, N. Effect of hypercholesterolaemia on testicular function and sperm physiology. *Yonago Acta Medicina*. v.41, p.23-29, 1998.

## **Utilização de diferentes tratamentos com o efeito macho na interrupção do anestro sazonal em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana**

**T. Correia<sup>1</sup>; J. Azevedo<sup>2</sup>; Á. Mendonça<sup>1</sup>; P. Fontes<sup>2</sup>; H. Velasco<sup>3</sup>; R. Maurício<sup>3</sup>; M Cardoso<sup>3</sup>; R. Valentim<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. tcorreia@ipb.pt*

<sup>2</sup>*Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Zootecnia, Apt. 1013, 5001-911 Vila Real*

<sup>3</sup>*Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal.*

### **Resumo**

Este trabalho teve como principal objectivo estudar a eficiência da utilização de três tratamentos distintos com o efeito macho – efeito macho, FGA (-14 dias) + efeito macho e FGA (-7 dias) + efeito macho – na interrupção do anestro sazonal em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. De acordo com os resultados obtidos, no mês de Maio, 89,6% das ovelhas Churras Bragançanas estava em anestro sazonal. O efeito macho *per se* foi pouco eficaz na interrupção do anestro sazonal. Os tratamentos prévios com progestagénios, em particular, o de longa duração (14 dias), melhoraram significativamente a resposta ao efeito macho das ovelhas Churras Galegas Bragançanas.

**Palavras-chave:** Ovinos, Churra Galega Bragançana, efeito macho, anestro sazonal.



## **Utilização de diferentes gonadotropinas na interrupção do anestro sazonal em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana**

**R. Valentim<sup>1</sup>; J. Azevedo<sup>2</sup>; Á. Mendonça<sup>3</sup>; P. Fontes<sup>2</sup>; H. Velasco<sup>1</sup>; R. Maurício<sup>1</sup>; M Cardoso<sup>1</sup>; T. Correia<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal. valentim@ipb.pt*

<sup>2</sup>*Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Zootecnia, Apt. 1013, 5001-911 Vila Real*

<sup>3</sup>*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. Portugal.*

### **Resumo**

Este trabalho teve como principal objectivo estudar a eficiência da utilização da eCG, isolada ou conjuntamente com a hCG, num programa progestagénico curto de interrupção do anestro sazonal em cabras da raça Serrana. De acordo com os resultados obtidos, no mês de Maio, 76,1% das cabras Serranas estava em anestro sazonal. A percentagem de cabras que apresentaram cio foi mais elevada entre as tratadas apenas com eCG do que entre as tratadas com eCG+hCG. Nas primeiras 96 horas pós-tratamentos, todas as cabras estudadas apresentaram níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml. A resposta imediata (1º ciclo ovárico pós-tratamentos) das cabras tratadas apenas com eCG foi superior à das cabras tratadas com eCG+hCG. Porém, nos ciclos ováricos seguintes, o tratamento conjunto de eCG+hCG, relativamente ao de apenas eCG, elevou significativamente as taxas de fertilidade e de prolificidade das cabras Serranas.

**Palavras-chave:** Caprinos, Serrana, gonadotropinas, anestro sazonal.



## **Processo de transformação de Presunto Ibérico, diferenciação com o método utilizado para o Presunto Bísaro**

**R. Barracho; A. Mendonça<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança. alme@ipb.pt*

### **Resumo**

Na agroecologia cabe também o conceito de utilização de raças autóctones, como apoio à biodiversidade. A valorização comercial destas raças fundamenta a sua preservação por parte dos produtores de animais e por parte dos transformadores e dos consumidores, pela qualidade intrínseca dos produtos derivados. O objectivo do presente trabalho é a comparação de parâmetros físico químicos do presunto Ibérico com o presunto bísaro de Vinhais, IG, tal como ele é produzido e comercializado no seu solar de produção.

Para isso, colheram-se amostras de presunto certificado, que foram embaladas em vácuo e refrigeradas, imediatamente após o corte, para posteriores determinações. As amostras foram colhidas a partir da zona central do presunto, mediante corte perpendicular ao eixo do fémur, resultando fatias que englobavam os principais músculos da coxa. Foram também registados o peso de cada presunto, o tempo de salga e o tempo de cura. As amostras de trabalho foram retiradas destas fatias, em duplicado, com a preocupação de conterem quantidades proporcionais dos principais músculos representados na amostra inicial. A partir destas amostras de trabalho foram mais tarde executadas determinações físico químicas, tais como o pH, actividade da água, teor de sal (cloretos), teor de humidade, ácidos gordos intramusculares e intermusculares. Estes resultados foram mais tarde comparados com determinações semelhantes, com origem na bibliografia, também realizadas em presuntos bísaros de Vinhais IG (caderno de especificações) e também com dados bibliográficos relativos a presunto ibérico.

Como resultado, os presuntos de bísaro de Vinhais e os dados do caderno de especificações foram muito semelhantes, como seria de esperar, o mesmo já não acontecendo em relação aos valores consultados na bibliografia para o presunto ibérico. Nestes, o teor de sal é substancialmente mais baixo e o teor de MUFA e PUFA mais elevado, o que parece apontar para uma alimentação rica em alimentos de origem extensiva. Finalmente, é necessário valorizar mais a análise organoléptica como forma de controlo da qualidade final, aspecto que é determinante para a sua penetração de mercado. O tipo de alimentação dos animais é outro aspecto que não foi possível averiguar. Estes dois aspectos, entre outros, irão ser trabalhados em trabalhos posteriores.

**Palavras-chave:** Agroecologia, sustentabilidade, raças autóctones, transformação, presunto.

