

Monitorização da estenfiliose em ensaios de campo da FRUTOESTE, CRL

Daniela Alexandra Pereira Dias

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em **Engenharia
Agrónómica – Especialização em Hortofruticultura e Viticultura**

Orientadores: Engenheira Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Engenheira Maria do Rosário de Jesus Antunes Ferreira

Júri:

Presidente:

Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

2020

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível pela disponibilidade e colaboração de diferentes pessoas e entidades, que de algum modo contribuíram para que se efetivasse. Desta forma, quero expressar a minha gratidão e profundo obrigada.

À Engenheira Cecília Rego, minha orientadora, em primeiro lugar por ter aceitado trabalhar comigo, por todo o apoio, confiança, disponibilidade e exigência. Pelos conselhos a nível académico, profissional e pessoal e pelas oportunidades que me proporcionou durante este período que me fizeram crescer como profissional.

À Engenheira Rosário Antunes, minha orientadora, por todo o apoio, acompanhamento do trabalho de campo, pela paciência, disponibilidade para ensinar, partilha de experiências e aconselhamento profissional e pessoal que me tem dado.

À Mestre Andreia Cabanas, por toda a ajuda em parte do trabalho prático desta dissertação, pela alegria e sorriso com que me recebia no ISA, pelos conselhos, companheirismo, convívio e conversas que tornavam o trabalho mais agradável.

À FRUTOESTE – Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste, CRL, pela oportunidade que me foi dada, pela flexibilidade de tempo e disponibilidade de equipamentos para a realização desta dissertação.

À empresa Idai Nature, pela oportunidade que me proporcionou, disponibilidade, apoio e pelo acompanhamento ao longo do trabalho.

Aos Eng^{os} João Vila Maior, Patrícia Gomes e Rui “Faxuxa” pela disponibilidade incondicional para acompanhar e ajudar nas tarefas e visitas ao ensaio, pelo apoio e convívio.

Aos agricultores, Carlos Eleutério e José Luís, pela cedência dos pomares para a realização dos ensaios, pela informação fornecida e por realizarem as operações que lhes foram pedidas.

Aos meus pais, Paula e Augusto que toda a vida lutaram para me proporcionarem uma boa educação. Pelos valores que me transmitiram, pelo apoio incondicional, por acreditarem nas minhas capacidades e porque nunca deixaram que me faltasse algo.

Aos meus amigos que estiveram sempre lá quando precisei de me distrair, obrigada pela amizade, apoio e força que me transmitiram ao longo deste período e por aturarem a minha parvoíce.

Muito obrigada!

Resumo

A estenfiliose, ou doença das manchas castanhas, está associada ao fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallroth) E. Simmons (teleomorfo *Pleospora allii* (Rabenhorst) Cesati & de Notaris). Atualmente, nas zonas produtoras de pera um pouco por toda a Europa e, particularmente, na região Oeste de Portugal, esta doença tem provocado graves prejuízos nos pomares comerciais de pera 'Rocha', colocando em causa a produção e o rendimento dos agricultores.

Ao longo do ciclo vegetativo foram colhidas diversas amostras (lenha de poda, folhas do ano anterior, flores, frutos, folhas e infestantes) tendo-se isolado e identificado *S. vesicarium*. A partir da amostra de frutos com sintomas também se isolou *Alternaria* sp.

Os resultados obtidos nesta dissertação permitiram concluir que no segundo ano de ensaio, a incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* foi mais baixa no conjunto das diferentes amostras recolhidas e analisadas em laboratório. Esta situação prendeu-se sobretudo com as condições meteorológicas (temperaturas amenas e humidade relativa elevada) que ocorreram durante todo o período vegetativo e, também, com o efeito cumulativo das modalidades em estudo, nomeadamente a remoção do material vegetal e a aplicação do agente de biocontrolo (*Trichoderma* sp.) ao solo.

Os resultados apurados permitiram ainda concluir que nem todas as manchas que ocorriam nos frutos eram causadas por *S. vesicarium*. Obtiveram-se crescimentos identificados como *Alternaria* sp. em vários isolamentos, sendo este um resultado que requer mais estudos científicos para compreender a relação entre estes dois fungos e os sintomas que surgem no campo.

Avaliaram-se ainda três produtos naturais e o seu efeito na redução da estenfiliose através de duas amostras: uma de flores e outra de frutos com sintomas. A estratégia de produtos, contudo, não se revelou eficaz na redução de estenfiliose para o ano de 2019.

Palavras-chave: *Stemphylium vesicarium*, *Trichoderma* sp., incidência, severidade, pereira 'Rocha'.

Abstract

The brown spot disease is associated with the fungus *Stemphylium vesicarium* (Wallroth) E. Simmons (teleomorph *Pleospora allii* (Rabenhorst) Cesati & de Notaris). Nowadays, in pear-producing areas around Europe – particularly in West Portugal – this disease has caused major damages to the commercial ‘Rocha’ pear orchards, putting the production and income of farmers at risk.

Throughout the pear growing cycle, several samples (pruning wood, leaves from the previous year, flowers, fruits, leaves and weeds) were taken, from which *S. vesicarium* was isolated and identified. Additionally, *Alternaria* sp. was also isolated and identified from the fruit sample with symptoms.

According to the results obtained in this dissertation, the incidence and severity of *Stemphylium vesicarium* was lower in the different samples collected and analyzed in the laboratory. This finding is mainly related with the weather conditions (mild temperatures and high relative humidity) during the growing season, as well as to the cumulative impact of cultural practices carried out in the treatments under study, such as the removal of plant debris from soil and application of biocontrol agent (*Trichoderma* sp.) to the soil.

Several *Alternaria* sp. isolates were also obtained from infected fruit tissues. Such result requires further scientific studies in order to understand the relationship between these two pathogens and the symptoms occurring in the field.

Three natural products which could reduce brown spot disease were also tested in other field essay. They were added to the grower fruit practice and their effect was evaluated. It was conclude that the natural products strategy was not effective in reducing the disease.

Keywords: *Stemphylium vesicarium*, *Trichoderma* sp., incidence, severity, ‘Rocha’ pear.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Índice de quadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	xi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Patogénio.....	3
2.2. Sintomas da doença.....	5
2.3. Epidemiologia.....	7
2.4. Meios de luta.....	8
2.4.1. Meios de luta culturais.....	8
2.4.2. Meios de luta biológicos.....	10
2.4.3. Meios de luta químicos.....	11
3. Material e Métodos.....	15
3.1. Ensaio ProtecEstenfilio	15
3.1.1. Delineamento experimental e condições de campo	15
3.1.2. Colheita do material vegetal.....	19
3.1.3. Processamento do material no laboratório	19
3.1.4. Análise de resultados da incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i>	21
3.2. Ensaio Idai Nature.....	21
3.2.1. Delineamento experimental e condições de campo	21
3.2.2. Colheita de material vegetal.....	25
3.2.3. Avaliações de campo	26
3.2.4. Avaliações colheita e pós colheita.....	26

3.2.5.	Processamento do material em laboratório	27
4.	Resultados	28
4.1.	Ensaio ProtecEtenfilio	28
4.1.1.	<i>Stemphylium vesicarium</i> e <i>Alternaria</i> sp. na lenha de poda e folhas do ano anterior.....	28
4.1.2.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas flores	30
4.1.3.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com 12-14 mm.....	31
4.1.4.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com sintomas.....	33
4.1.5.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas folhas com sintomas.....	39
4.1.6.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas infestantes com sintomas.....	40
4.2.	Ensaio Idai Nature.....	42
4.2.1.	Incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas flores	42
4.2.2.	Avaliação de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com sintomas	43
4.2.2.1.	Avaliações de campo	43
4.2.2.2.	Avaliações laboratoriais	45
5.	Discussão	50
6.	Conclusões	52
7.	Referências Bibliográficas	53
	Anexos	I

Índice de quadros

Quadro 1. Modos de ação dos fungicidas (Cavaco, 2016).....	12
Quadro 2. Substâncias ativas homologadas, em Portugal, para o controlo da estenfiliose em pereira (DGAV, 2019).....	13
Quadro 3. Calendarização das operações realizadas nas duas modalidades onde se aplicou o agente de biocontrolo.....	17
Quadro 4. Calendarização das colheitas de material.....	19
Quadro 5. Tratamentos fungicidas efetuados nas duas modalidades.....	24
Quadro 6. Calendarização dos tratamentos efetuados com produtos Idai Nature na modalidade 2.....	25
Quadro 7. Calendarização das recolhas de material.....	25
Quadro 8. Registo da presença ou ausência de esporos de <i>Alternaria</i> sp. ou <i>Stemphylium vesicarium</i> em ramos de poda colhidos no pomar.....	28
Quadro 9. Registo da presença ou ausência de esporos de <i>Alternaria</i> sp. ou <i>Stemphylium vesicarium</i> em folhas colhidas no pomar.....	29

Índice de figuras

Figura 1. Colónia de <i>S. vesicarium</i> em gelose de batata glucosada (PDA).....	3
Figura 2. Dinâmica cíclica das várias estruturas reprodutivas que provocam infeções de estenfiliose (Isidoro & Azevedo, 2005a).	4
Figura 3. Sintomas de estenfiliose nas folhas da pereira 'Rocha': A- manchas castanhas, arredondadas ou oblongas com 1 a 8 mm de diâmetro, em alguns casos com auréola vermelha; B- mancha no limbo em forma de cunha.....	5
Figura 4. Sintomas de estenfiliose nos frutos: A- mancha lateral com auréola vermelha; B- mancha lateral evoluída; C- mancha de estenfiliose na fossa apical.	6
Figura 5. Cancro de onde se isolou <i>S. vesicarium</i> (Foto: R. Bugiani).	7
Figura 6. Localização do pomar e definição das modalidades.	16
Figura 7. Esquema representativo da disposição das árvores no pomar, por modalidade...18	
Figura 8. Ramos de poda etiquetados.	21
Figura 9. Localização do pomar e definição das modalidades.	22
Figura 10. Frutos colhidos para armazenamento em câmara de frio.	27
Figura 11. Conídios de <i>S. vesicarium</i> (A) e de <i>Alternaria</i> sp. (B) (ampliação 400x).	29
Figura 12. Incidência média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas flores, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.....	30
Figura 13. Severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas flores, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	31
Figura 14. Incidência média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com 12-14 mm, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	32
Figura 15. Severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com 12-14 mm, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	32

Figura 16. Incidência média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo. Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).	33
Figura 17. Sintomas de estenfiliose em diferentes zonas de frutos colhidos nas modalidades em estudo: A, polpa, B, zona apical, C, polpa.	34
Figura 18. Valores de temperatura e humidade relativa médias e IRA diário para os meses de: A - junho; B - julho; C – agosto (Dados meteorológicos da estação instalada no pomar do ensaio no âmbito do GO “ProtecEstenfilio”).....	35
Figura 19. Severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos frutos com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo. Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).	36
Figura 20. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical por modalidade. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	37
Figura 21. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M1. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa.	38
Figura 22. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M2. M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo.	38
Figura 23. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M3. M3: aplicação de Condor Shield ao solo.	39
Figura 24. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M4. M4: aplicação de lixívia ao solo.	39
Figura 25. Incidência média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas folhas com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	40

Figura 26. Severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas folhas com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	40
Figura 27. Incidência média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas infestantes com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	41
Figura 28. Severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas infestantes com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.	41
Figura 29. Incidência e severidade médias nas flores de <i>Stemphylium vesicarium</i> para as duas modalidades. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	42
Figura 30. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nas flores para a modalidade M1: testemunha ou estratégia do agricultor.....	43
Figura 31. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nas flores para a modalidade M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	43
Figura 32. Percentagem de frutos por nível de infecção em A - 24/06/2019 B – 16/08/2019. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	44
Figura 33. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical, no campo, por modalidade a 16/08/2019. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	45
Figura 34. Incidência e severidade nos frutos com sintomas de <i>Stemphylium vesicarium</i> para as duas modalidades. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	45
Figura 35. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical nos frutos analisados em laboratório por modalidade. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.	46
Figura 36. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nos frutos com sintomas para a modalidade M1. M1: testemunha ou estratégia do agricultor.....	47

Figura 37. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nos frutos com sintomas para a modalidade M2. M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.....	47
Figura 38. Parâmetros de qualidade medidos à colheita, A- Dureza B- grau Brix. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature (n=7).....	48
Figura 39. Parâmetros de qualidade medidos após conservação em frio, A- Dureza B- grau Brix. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature (n=7).....	49

Lista de abreviaturas e acrónimos

ABC – Agente de BioControlo

ANP – Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha

BSPcast - Brown Spot of Pear forecasting system

COTHN – Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional

DOP – Denominação de Origem Protegida

EC – Concentrado para Emulsão

FA – Fossa apical

GO – Grupo Operacional

HR – Humidade Relativa

INE – Instituto Nacional de Estatística

IRA – Índice de Risco Acumulado

IS – Intervalo de Segurança

ISA – Instituto Superior de Agronomia

OEPP - European and Mediterranean Plant Protection Organization

PDA – gelose de batata glucosada

s.a. – Substância ativa

SC – Suspensão concentrada

SV – *Stemphylium vesicarium*

WG – Grânulos dispersíveis em água

WP – Pó molhável

1. Introdução

A variedade pereira 'Rocha' surgiu ocasionalmente em Sintra no ano de 1836. Pertence à família das Rosáceas, subfamília das Pomóideas, género *Pyrus* e à espécie *Pyrus communis* L.. Em Portugal, existem várias variedades de pera, sendo a 'Rocha' a dominante e representando mais de 90% da produção nacional (Vicente *et al.*, 2017). A área de produção situa-se essencialmente na zona Oeste e foi em 2003 reconhecida com a certificação da União Europeia, Denominação de Origem Protegida (DOP) (ANP, 2019a).

Além de ser o terceiro fruto mais consumido em fresco em Portugal (INE, 2017/2018), 60% da produção é comercializada em mercados estrangeiros, com especial relevância para o Brasil, Marrocos, Reino Unido, França, Alemanha e Espanha (ANP, 2019b). Posiciona-se, assim, como uma cultura de impacto significativo na economia da região Oeste e com uma posição de relevo no setor frutícola nacional.

Segundo previsões do INE (2019), a produtividade da campanha de 2019 situa-se nas 13 toneladas por hectare, valor semelhante ao do ano anterior. Comparativamente ao ano de 2017, assistimos a uma redução de três toneladas por hectare e a menos 0,8 toneladas por hectare, face à média das últimas cinco campanhas. Esta quebra está associada sobretudo às zonas produtoras situadas no Baixo Oeste que foram gravemente afetadas pela estenfiliose.

A estenfiliose ou doença das manchas castanhas está associada ao fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallroth) E. Simmons (teleomorfo *Pleospora allii* (Rabenhorst) Cesati & de Notaris) (Simmons, 1969). Causa estragos nas folhas, ramos, flores e frutos nos quais ocorrem os estragos mais graves, colocando em causa a produção do ano (Diogo *et al.*, 2017). Para além de infetar todos os órgãos da árvore, o patógeno pode também ser isolado a partir de infestantes hospedeiras existentes no enrelvamento dos pomares, representando uma fonte de inóculo potencial.

A doença surgiu na Europa no ano de 1975, em Itália, e rapidamente chegou a outros países produtores como Espanha em 1984, França em 1987, Holanda em 1997 e Bélgica em 2002 (Diogo *et al.*, 2017). Em 1996 foi, pela primeira vez, detetada em Portugal, nas cultivares 'Rocha' e 'Passe Crassane' em pomares da zona Oeste (Sousa *et al.*, 1998).

As condições meteorológicas favoráveis durante quase todo o ciclo vegetativo da cultura, nomeadamente temperaturas amenas e humidade relativa elevada, a existência de um número limitado de fungicidas homologados para a cultura, aliados ao facto de serem realizados vários tratamentos fitossanitários de forma preventiva, em que algumas substâncias ativas já apresentam uma baixa eficácia no controlo da estenfiliose, sugerindo a

existência de populações *S. vesicarium* resistentes, e por vezes algumas práticas culturais (Gomes, 2015; Comporta *et al.* 2017) são fatores que levaram ao aumento da importância desta doença nos últimos dez anos, podendo os prejuízos atingir cerca de 90% (Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

Perante esta situação de diminuição de rendimento, esta dissertação de mestrado teve como objetivo principal monitorizar a presença de estenfiliose num ensaio de campo de pereiras 'Rocha' da FRUTOESTE – Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste, CRL, no âmbito do trabalho de investigação do Instituto Superior de Agronomia (ISA), ambos parceiros do Grupo Operacional (GO) "ProtecEstenfilio", coordenado pelo Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional (COTHN). Avaliou-se a incidência e severidade da doença em diversas amostras de órgãos da árvore e infestantes que compõem o envolvimento do pomar colhidas ao longo do ciclo vegetativo da pereira.

Simultaneamente, num outro ensaio de campo da FRUTOESTE em conjunto com a empresa Idai Nature e também com o ISA, foram testados um conjunto de três produtos naturais com vista à redução da incidência da estenfiliose no pomar.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Patogénio

A estenfiliose é causada por *Stemphylium vesicarium* que pertence ao filo Ascomicota, classe Dotideomicetas, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (Diogo *et al.*, 2017).

Além de provocar estragos na pereira também já foi identificado noutras fruteiras, nomeadamente, na manga e em outras culturas, como é o caso do alho, cebola, espargos e luzerna (Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2019). Estudos realizados revelaram que os isolados de espargos e cebolas não são patogénicos na pereira, porém os da pereira são patogénicos para ambas as culturas referidas (Köhl *et al.*, 2009a). Estes autores consideram que existe pouca informação relativamente à relação entre populações saprófitas e patogénicas e sobre a possibilidade de existir isolados patogénicos específicos para cada hospedeiro. Adiantam ainda que, aparentemente, tanto populações patogénicas como não-patogénicas podem coexistir no mesmo pomar. Recentemente, testes de patogenicidade realizados por Comporta *et al.* (2017) comprovaram esta ocorrência, tendo concluído que nem todos os isolados de *S. vesicarium* em estudo se revelaram patogénicos.

Stemphylium vesicarium caracteriza-se por ter um micélio filamentososo e hialino (Llorente & Montesinos, 2006). *In vitro*, em meio de gelose de batata (PDA - Potato Dextrose Agar, Detroit, USA), os isolados apresentam um micélio acinzentado, espesso, com zonas esbranquiçadas, divergindo a partir do centro da colónia e com escassa formação de estruturas reprodutivas, passando depois a castanho (Figura 1). Alguns isolados produzem colónias com características culturais muito semelhantes às de *Alternaria* sp. tornando a identificação muito difícil e morosa (Sousa *et al.*, 2004).



Figura 1. Colónia de *S. vesicarium* em gelose de batata glucosada (PDA).

O fungo caracteriza-se por apresentar dois estados, um estado assexuado (estado anamórfico) e um estado sexuado (estado teleomórfico) com estruturas reprodutivas distintas em cada um deles (Isidoro & Azevedo, 2005a).

As estruturas reprodutivas do estado assexuado, designam-se por conídios e formam-se na extremidade dos conidióforos, células diferenciadas do micélio aéreo. Apresentam forma oblonga a oval, com uma coloração que vai desde o castanho dourado a verde acastanhado, são multicelulares irregularmente septados, com um a cinco septos transversais e uma a duas séries de septos longitudinais; podem ocorrer constrições nos septos transversais (Simmons, 1969; Silva, 2011).

Em condições adversas, sobre a superfície de tecidos mortos de frutos, folhas infetadas ou infestantes que compõem o enrelvamento do pomar, formam-se as pseudotecas de *Pleospora alli* (Rossi *et al.*, 2005a). Estas estruturas sexuadas apresentam uma coloração castanha a negra, globosas, ostioladas, ligeiramente achatadas com um diâmetro médio de 300 a 400 µm contendo no seu interior ascos. Cada asco contém oito ascósporos. Os ascos, quando maduros, têm paredes bitunicadas e são cilíndricos a clavados (170 a 35 µm). Os ascósporos têm uma dimensão média de 38 x 18 µm, são globosos, alongados, com um tom castanho a castanho-oliváceo, pluricelulares, com três a sete septos transversais consoante o estado de maturação. O número de septos longitudinais varia entre zero e um por septo transversal e dois a três septos no quarto subapical, contendo ainda uma constrição no septo médio (Sousa *et al.*, 2004; Isidoro & Azevedo, 2005a; Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

Na Figura 2 apresenta-se um esquema das várias estruturas reprodutivas do fungo ao longo do ciclo.



Figura 2. Dinâmica cíclica das várias estruturas reprodutivas que provocam infeções de estenfiliose (Isidoro & Azevedo, 2005a).

2.2. Sintomas da doença

Os sintomas de estenfiliose na pereira 'Rocha' caracterizam-se pela presença de manchas necróticas que ocorrem ao longo de todo o período vegetativo nas folhas e frutos (Sousa *et al.*, 2004; Llorente *et al.*, 2012).

Nas folhas, os primeiros sintomas surgem entre abril e junho e são manchas castanhas, arredondadas ou oblongas com 1 a 8 mm de diâmetro, com auréola vermelha em alguns casos (Figura 3A). Com o desenvolvimento da doença, em condições meteorológicas favoráveis, as manchas podem alastrar às nervuras da folha ou à extremidade do limbo e adquirem a forma de cunha (Figura 3B), acabando por provocar desfoliação (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).



Figura 3. Sintomas de estenfiliose nas folhas da pereira 'Rocha': A- manchas castanhas, arredondadas ou oblongas com 1 a 8 mm de diâmetro, em alguns casos com auréola vermelha; B- mancha no limbo em forma de cunha.

As folhas mais jovens são normalmente mais sensíveis comparativamente com as folhas mais velhas (Singh *et al.*, 1999). Semelhantes sintomas podem ser provocados por outros agentes patogénicos, como *Gymnosporangium* sp., *Septoria* sp., *Pseudomonas* sp. e *Alternaria* sp. originando dúvidas na identificação do agente causal (Isidoro & Azevedo, 2005a). Köhl *et al.* (2009b), a partir de folhas com sintomas semelhantes aos de estenfiliose, não isolaram *S. vesicarium*, concluindo que os sintomas referidos não são específicos podendo ser provocados por outros patogénios ou até mesmo por stress abiótico e conduzindo a diagnósticos visuais erráticos.

Desde o vingamento até à colheita, podem formar-se manchas (Figura 4), de características semelhantes às descritas nas folhas, sob a superfície da polpa do fruto (Figura 4A e 4B) e também junto à fossa apical (Figura 4C) (Sousa *et al.*, 2004). Estas

últimas são mais frequentes em frutos jovens e inicialmente têm a aparência de uma podridão seca na zona central que, posteriormente, evolui para o interior da polpa. A infecção de *S. vesicarium* ou de *Alternaria* sp. na fossa apical pode ser favorecida pela filoxera da pereira, *Aphanostigma pyri* Chol., quando esta se instala na fossa apical e se alimenta provocando pequenas feridas (InfoAgro, 2010; Elias, 2015; Bugiani, comunicação pessoal).

Ao aproximar-se a data de colheita a podridão desenvolve-se (Figura 4B), podendo atingir 10 a 20 mm, adquire uma textura mole e pode ocorrer a colonização secundária por fungos saprófitas nas zonas necrosadas, como por exemplo *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., entre outros (Isidoro & Azevedo, 2005a; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2017). Estes frutos doentes têm tendência a amadurecer e caírem precocemente provocando quebras na produção (Sousa *et al.*, 2004).

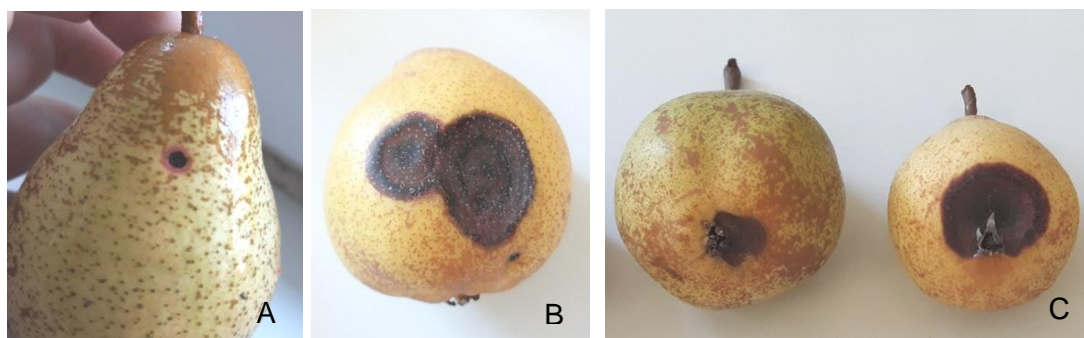


Figura 4. Sintomas de estenfiliose nos frutos: A- mancha lateral com auréola vermelha; B- mancha lateral evoluída; C- mancha de estenfiliose na fossa apical.

Nos pomares, os sintomas surgem maioritariamente próximo da época de colheita podendo comprometer a comercialização dos frutos. Por vezes, os sintomas tendem a agravar-se durante o período de conservação (Comporta *et al.*, 2017).

Trabalhos recentes desenvolvidos em Itália revelaram a presença de cancrios nos ramos da pereira a partir dos quais se isolou *S. vesicarium* (Figura 5). Tal facto sugere que o fungo pode permanecer na madeira durante todo o ano (R. Bugiani, comunicação pessoal).



Figura 5. Cancro de onde se isolou *S. vesicarium* (Foto: R. Bugiani).

2.3. Epidemiologia

O grau de intensidade e evolução da estenfiliose depende da interação existente entre o hospedeiro, agente patogénico e o ambiente (Isidoro & Azevedo, 2005a).

Como já foi referido, o ciclo da estenfiliose caracteriza-se por apresentar dois estados bem diferenciadas, são eles: o estado assexuado que ocorre durante a primavera e verão em que ocorre libertação de conídios de *S. vesicarium*; e o estado sexuado, que abrange outono e inverno, em que se diferenciam as pseudotecas de *P. allii* em material vegetal morto (Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012).

Sob condições adversas, as pseudotecas formam-se nas folhas mortas da pereira, em plantas herbáceas que compõem o enrelvamento, em ramos da pereira e em frutos em decomposição, no solo do pomar (Llorente & Montesinos, 2006). O fungo pode ainda sobreviver sobre lesões do hospedeiro, na forma de micélio dormente (Tavares, 1990).

A maturação destas estruturas de resistência (pseudotecas) depende sobretudo da temperatura e da humidade relativa (HR) e decorre entre um até quatro meses. A HR tem de ser elevada com valores superiores a 98% e as temperaturas ótimas situam-se entre 10 e 15°C. A maturação das pseudotecas diminui para temperaturas de 5°C e acima de 25°C o processo de maturação é suspenso (Llorente & Montesinos, 2006). Consoante as condições meteorológicas, os ascósporos são libertados e disseminados pelo vento e pela chuva, desde fevereiro até junho. As primeiras infeções são denominadas de infeções primárias (Diogo *et al.*, 2017). Diversos autores referem que o principal papel dos ascósporos é o de colonizar os resíduos vegetais presentes no solo e algumas infestantes suscetíveis que mais tarde irão produzir conídios.

Posteriormente, com condições meteorológicas mais amenas, inicia-se a disseminação de conídios pelo vento, que se fixam nos órgãos aéreos das árvores e que na presença de água germinam e causam as infeções secundárias (Sousa *et al.*, 2004).

A existência de conídios estende-se de abril a novembro, com a máxima produção a ocorrer no verão; entre julho e setembro são capturados mais de 90% dos conídios (Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012). O sucesso da infeção depende da temperatura e do período de humectação de folhas e frutos (Diogo *et al.*, 2017). A temperatura ótima para a infeção encontra-se entre 20°C e 25°C conjuntamente com um período de humectação superior a 10 horas (Rossi *et al.*, 2005b). Os conídios somente germinam quando há humectação, ou seja, quando há um filme de água sobre o órgão vegetal (Llorente & Montesinos, 2002). Seis horas de humectação são suficientes para iniciar o processo de infeção (Llorente *et al.*, 2012).

As manchas surgem como resultado da libertação de duas toxinas específicas, SV-toxina I e II, durante a primeira fase de germinação dos conídios que atuam nas membranas plasmáticas de células suscetíveis (Ponti & Cavanni, 1983; Cavanni & Ponti, 1994; Singh *et al.*, 1999, 2000). Estas toxinas ditam a patogenicidade e a agressividade do fungo e desempenham um papel fundamental na colonização do fungo em cultivares suscetíveis (Singh *et al.*, 1999).

2.4. Meios de luta

Nos últimos anos, o controlo da estenfiliose tem-se revelado um desafio para os agricultores e técnicos dada a sensibilidade da pereira 'Rocha' à doença e a pressão da doença. A falta de fungicidas curativos disponíveis no mercado, a existência de possíveis resistências do fungo às substâncias ativas (s.a.) homologadas, as condições meteorológicas favoráveis ao desenvolvimento do fungo durante quase todo o ciclo da cultura e alguma dificuldade por parte dos agricultores em realizarem medidas que conduzam à redução de inóculo nos pomares, têm tornado o combate à estenfiliose difícil (Sousa *et al.*, 2004; Gomes, 2015; Diogo *et al.*, 2017). Perante esta situação, é urgente implementar medidas de controlo da estenfiliose integrando meios de luta culturais, biológicos e químicos e recorrer ao auxílio do modelo de previsão existente (Llorente *et al.*, 2012).

2.4.1. Meios de luta culturais

Os meios de luta culturais envolvem a adoção de um conjunto de práticas culturais que impeçam o desenvolvimento de condições favoráveis aos inimigos das culturas (Amaro,

2003). Para a estenfiliose impõe-se eliminar o inóculo e reduzir as condições de infecção (Isidoro & Azevedo, 2005a).

Estudos realizados comprovaram que resíduos de material vegetal como folhas, frutos, ramos e plantas que compõem o enrelvamento do pomar representam uma fonte inóculo de *S. vesicarium* para a pereira (Köhl *et al.*, 2013; Bugiani, comunicação oral). A eliminação/remoção física destes materiais leva a uma redução significativa do nível de doença no pomar. Segundo Llorente *et al.* (2008), esta diminuição pode ocorrer entre 40 a 44% comparativamente à não execução desta operação. Outros estudos referem que a redução de inóculo pode ir até 60% (Llorente *et al.*, 2010). Aliada a esta prática, a aplicação de ureia à queda das folhas permite acelerar a sua decomposição e conseqüentemente reduzir a formação de estruturas de resistência do fungo (Sousa *et al.*, 2004; Isidoro & Azevedo, 2005a; Köhl *et al.*, 2009a).

Outra medida que visa a diminuição do inóculo presente no enrelvamento do pomar é controlar atempadamente do seu crescimento, através de cortes regulares da vegetação ou com a aplicação de herbicidas (Sousa *et al.*, 2004). A manutenção da linha das árvores limpa de infestantes todo o ano e do coberto vegetal baixo na entrelinha (inferior a 0,20m de altura) são ambas medidas importantes para contrariar o desenvolvimento da doença no pomar (Diogo *et al.* 2017).

No período em que temos frutos com sintomas no pomar é essencial mondá-los de forma a evitar a contaminação de outros frutos no pomar (Rosário Antunes, comunicação pessoal).

É prudente evitar o encharcamento do solo realizando uma rega adequada e eficiente e promover uma correta drenagem do solo, de forma a diminuir a humidade relativa e a humectação no pomar (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006).

As fertilizações, além de influenciarem o estado nutricional das culturas e a qualidade da produção, condicionam a nocividade das doenças (Oliveira *et al.*, 2014). Uma planta equilibrada nutricionalmente, sem carências apresenta uma maior resistência aos ataques dos patógenos e conseqüentemente uma diminuição na intensidade da doença (Gomes, 2015).

Deve efetuar-se podas de inverno, na altura certa do ciclo, não só para se conseguir controlar a produção da árvore, mas fundamentalmente para fomentar o bom arejamento da copa e permitir a penetração da luz solar. As intervenções em verde são igualmente importantes para retirar rebentos que crescem muitas vezes no interior da copa e impedem

a circulação do ar, facilitando o aparecimento de infeções (Sousa *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2014).

2.4.2. Meios de luta biológicos

Paul De Bach em 1964 definiu luta biológica como: “a luta biológica, quando considerada sob o ponto de vista ecológico como uma fase de limitação natural, pode ser definida como a ação de parasitas, predadores ou patogénicos que mantêm a densidade das populações de outros organismos a níveis médios inferiores aos que ocorreriam na sua ausência” (Amaro, 2003).

O uso de agentes biológicos para o controlo da estenfiliose já foi testado recorrendo a estirpes de duas bactérias, *Pseudomonas fluorescens* e *Pantoea agglomerans* como possíveis antagonistas de *S. vesicarium*. Quando foram aplicadas por pulverização às plantas, mantidas condições de laboratório controladas, mostraram ser eficazes na prevenção de infeções de estenfiliose (Montesinos *et al.* 1996). No entanto, quando aplicadas em condições reais de campo não se revelaram eficientes no controlo do patogénio. Esta ocorrência deve-se a uma baixa taxa de sobrevivência das estirpes, a uma fraca colonização das folhas de pereira e a uma menor capacidade competitiva com outros microrganismos mais adaptados à filosfera da pereira (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2010).

Pereira *et al.* (2015) sugerem que o uso de micorrizas como agente de proteção biológica da pereira poderá induzir uma resposta precoce ao ataque do fungo, ou seja, em simbiose com a pereira ‘Rocha’ conseguiriam antecipar a resposta do hospedeiro, levando a uma ativação mais rápida dos mecanismos de defesa da planta e a uma limitação da progressão do patogénio.

Outro estudo científico testou a aplicação ao solo de produtos à base de *Trichoderma* sp. (Rossi & Patteri, 2009). Neste caso, estes produtos reduziram significativamente o número de conídios produzidos nas folhas da pereira e no enrelvamento do pomar. Em laboratório, a supressão dos conídios foi de aproximadamente 99%, já em condições ambientais reais reduziu em 50% o número de conídios. Em condições reais, *Trichoderma* sp. consegue colonizar o enrelvamento e limitar a fase saprófita de *S. vesicarium* (Patteri *et al.*, 2008). No entanto, o sucesso da colonização está dependente das condições meteorológicas, nomeadamente da temperatura, humidade e dos restantes microrganismos do solo (Howel, 2003).

Llorente *et al.* (2008), indicam que os tratamentos que têm por base a remoção dos restos de folhas e frutos do pomar em conjunto com a aplicação de *Trichoderma* sp. ao solo

ostentam ser os métodos mais eficazes para controlo da estenfiliose. A combinação dos dois métodos e a aplicação de fungicidas reduzem a incidência em 50% nos frutos, comparativamente à aplicação apenas de fungicidas (Rossi & Patteri, 2009).

Assim, a aplicação de formulações de *Trichoderma* sp. para controlo da estenfiliose requer ainda alguma investigação sobretudo para conhecer melhor a relação entre *Trichoderma* sp. e *S. vesicarium* e a influência das condições meteorológicas na atividade do *Trichoderma* sp. (Howel, 2003; Patteri *et al.*, 2008). Contudo, a sua utilização, ou até de outros agentes de controlo biológico que possam surgir, representa uma alternativa ou um complemento aos métodos químicos e culturais.

2.4.3. Meios de luta químicos

Os meios de luta acima referidos nem sempre são suficientes para reduzir a incidência de estenfiliose nos pomares, sobretudo naqueles que apresentam elevada quantidade de inóculo e em anos com condições meteorológicas favoráveis ao desenvolvimento do fungo (Sousa *et al.*, 2004).

Recorrer à luta química tem sido a principal estratégia usada pelos agricultores em áreas onde a doença tem uma grande importância económica (Llorente *et al.*, 2010; Llorente *et al.*, 2012), como é o caso da região Oeste. Os produtos fitofarmacêuticos são compostos por substâncias químicas naturais ou de síntese que reduzem ou eliminam as populações de inimigos das culturas (Amaro, 2003; Oliveira *et al.*, 2014). Concretamente, para prevenir ou retardar o desenvolvimento do *S. vesicarium* que causa a estenfiliose, recorre-se à aplicação de fungicidas (Cavaco, 2016).

A estratégia padrão utilizada na aplicação de fungicidas baseia-se em intervalos fixos entre 7 e 14 dias, desde o abrolhamento até poucos dias antes da colheita (Llorente & Montesinos, 2006). Contudo, a eficácia dos fungicidas homologados e disponíveis no mercado tem-se revelado baixa em circunstâncias de elevada pressão da doença, devido à elevada presença de inóculo, condições meteorológicas favoráveis e à elevada suscetibilidade das cultivares, incluindo a 'Rocha' (Llorente *et al.*, 2012).

Esta elevada cadência de tratamentos pressupõem o aumento dos custos de produção (Llorente & Montesinos, 2006) e pode levar ao aumento dos resíduos químicos detetados nos frutos à colheita o que, em alguns casos, pode significar a exclusão de venda para algumas cadeias de supermercados na Europa, que têm esse parâmetro como critério comercial (Köhl *et al.*, 2013).

A seleção de fungicidas deve basear-se na alternância de substâncias ativas com diferentes modos de ação para evitar o aparecimento de populações do fungo resistentes aos fungicidas (Sousa *et al.*, 2004; Diogo *et al.*, 2017). Os fungicidas que atuam num mecanismo específico são, geralmente, os produtos que apresentam maior risco de o fungo adquirir e desenvolver resistência (Cavaco, 2016). No Quadro 1 encontram-se os modos de ação dos fungicidas.

Quadro 1. Modos de ação dos fungicidas (Cavaco, 2016)

IBE (IBS)	Inibidor da biossíntese de esteróis
DMI- IBE Classe I	Inibidor da biossíntese de esteróis na demetilação
IBE Classe II	Inibidor da biossíntese de esteróis na Δ_{14} redutase e $\Delta_5 \rightarrow \Delta_7$ isomerase
IBE Classe III	Inibidor da biossíntese de esteróis na 3cetoreductase e C_4 demetilação
CAA	Inibidor de amidas do ácido carboxílico
QoI	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face externa do citocromo b (“quinone outside inhibitors”)
QoSI	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face externa do citocromo b (“quinone outside inhibitors”), mais precisamente na estigmatelina. Anteriormente designado por QxI, quando ainda era desconhecido o alvo preciso da atuação
Qil	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face interna do citocromo b (“quinone inside inhibitors”)
MBI-R	Inibidor da biossíntese da melanina redutase
SDHI	Inibidor da succinato desidrogenase

Importa perceber também que os fungicidas têm uma atividade biológica diferente sobre o patógeno, podendo ser preventivos, curativos ou erradicantes. Os preventivos atuam sobre os esporos impedindo a germinação e evitam a contaminação da planta pelo fungo; os curativos param ou retardam o desenvolvimento do micélio imediatamente após a infeção e antes dos primeiros sintomas; e os erradicantes, destroem os esporos já formados e impedem a formação de novos esporos (Simões, 2005; Cavaco, 2016).

Em Portugal, as substâncias ativas homologadas atualmente pela DGAV para o controlo da estenfiliose encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2. Substâncias ativas homologadas, em Portugal, para o controlo da estenfiliose em pereira (DGAV, 2019)

Substância ativa	Teor em s.a.	Grupo químico	Formulação	Intervalo de segurança (IS) (dias)
boscalide + piraclostrobina	25,2% + 12,8%	carboximida + estrobilurina	WG	7
captana + trifloxistrobina	60% + 4%	ftalimida + estrobilurina	WG	28
ciprodinil + fludioxonil	37,5% + 25%	anilopirimidina + fenilpirrole	WG	3
ciprodinil + tebuconazol	18,27% + 12,18%	anilopirimidina + triazol	EC	60
cresoxime-metilo	50%	estrobilurina	WG	28
cresoxime-metilo + difenoconazol	25% + 12,5%	estrobilurina + azol	WG	35
clortalonil*	500g/L	cloronitrilo	SC	21
fluopirame + tebuconazol	17,7% + 17,7%	benzamida- piridina + triazol	SC	14
fluaziname	39,9%	dinitroanilinas	SC	7
fluxaproxade	26,5%	pirazol- carboxamida	SC	35
metirame	70%	ditiocarbamato	WG	28
pentiopirade	20,4%	carboxamida	SC	21
piraclostrobina	20%	estrobilurina	WG	21
tebuconazol	25%	triazol	WG	21
trifloxistrobina	50%	estrobilurina	WG	14
zirame	76%	ditiocarbamato	WG	60

*Autorização de emergência para pereira concedida pela DGAV em 2019

Ensaio realizados em Itália revelaram que nos pomares tanto se encontram estirpes sensíveis de *S. vesicarium* como resistentes a alguns fungicidas do grupo das dicarboximidas (procimidona) (Alberoni *et al.*, 2005), das estrobilurinas (cresoxime-metilo, trifloxistrobina e piraclostrobina) e alguns casos ao fludioxonil (Alberoni *et al.*, 2010). Estes fungicidas, juntamente com os ditiocarbamatos (tirame e mancozebe), captana, tebuconazol, clortalonil, tolifluanida e difenoconazol são amplamente usados no combate à estenfiliose (Llorente & Montesinos, 2006; Alberoni *et al.*, 2010). Quando aplicados curativamente demonstraram ser ineficazes devido às características do fungo e em particular ao seu

mecanismo patogénico, que limita a ação curativa dos fungicidas (Isidoro & Azevedo, 2005a). Isto é, os conídios ao germinarem iniciam a produção de toxinas específicas (SV-toxina I e II), ocorre a infeção e os sintomas vão surgir, independentemente da aplicação de fungicidas curativos (Llorente & Montesinos, 2006).

Assim, e de acordo com o que é feito atualmente pelos agricultores, os fungicidas são aplicados preventivamente, entre 15 a 25 aplicações por campanha, para manter economicamente admissíveis os prejuízos inevitáveis que advêm da doença (Llorente & Montesinos, 2006). Ainda assim, sempre que se aplicam produtos de contacto é recomendado repetir os tratamentos caso ocorram períodos de precipitação, regas por aspersão ou após a ocorrência de neblinas com temperaturas entre os 18 e 35°C (Sousa *et al.*, 2004).

O modelo “Brown Spot of Pear forecasting system” (BSPcast) permite prever o risco potencial de infeção para uma dada região e conseqüentemente auxiliar a tomada de decisão. Este modelo entra em consideração com dois parâmetros meteorológicos de máxima importância que afetam o desenvolvimento da estenfiliose; são eles a temperatura média durante o período de humectação e a duração da humectação (Montesinos *et al.*, 1995; Llorente & Montesinos, 2006). Para a região Oeste assume-se o valor de 0,4 para o índice de risco acumulado (IRA), limite a partir do qual se deve proceder a um tratamento fitossanitário dentro das 24 a 32 horas seguintes (Isidoro & Azevedo, 2005b). A utilização deste modelo permite uma redução substancial no número de tratamentos fitossanitários realizados, contribuindo para a redução dos resíduos presentes nos frutos à colheita e, a diminuição do impacto ambiental inerente à aplicação de produtos fitofarmacêuticos (de Jong *et al.*, 2005; Isidoro & Azevedo, 2005b).

Puig *et al.* (2014) propõem a utilização de péptidos antimicrobianos, nomeadamente o BP15 para controlo da estenfiliose. O BP15 inibe o *S. vesicarium in vitro*. Quando aplicado curativamente tem a capacidade de reduzir as infeções nas folhas. Em condições reais de campo e para comprovar a eficácia do péptido BP15, Puig *et al.* (2015), verificaram que o péptido liga-se diretamente às hifas de *S. vesicarium* e inibe rapidamente o crescimento do fungo. Os resultados obtidos indicam que o péptido BP15 é uma boa alternativa ou complemento dos fungicidas clássicos. Contudo, uma das grandes limitações ao uso de péptidos para combate à estenfiliose é o seu custo elevado e ainda o facto de serem necessários mais estudos para obter e otimizar péptidos antimicrobianos para o uso agrícola.

3. Material e Métodos

Este trabalho de mestrado compreende dois ensaios de campo distintos que se realizaram em pomares de dois associados da FRUTOESTE, CRL e com trabalho laboratorial desenvolvido no ISA.

O primeiro ensaio designado por ensaio ProtecEstenfilio desenvolveu-se no âmbito do trabalho de investigação ISA, parceiro do Grupo Operacional (GO) “ProtecEstenfilio”, coordenado pelo COTHN e o segundo ensaio, designado por ensaio Idai Nature realizou-se no âmbito de uma parceria entre a ADISA /ISA, FRUTOESTE, CRL e a empresa Idai Nature.

3.1. Ensaio ProtecEstenfilio

3.1.1. Delineamento experimental e condições de campo

O pomar localizava-se em São Lourenço, localidade no concelho de Mafra (Figura 6) e o critério principal para a escolha da parcela foi o histórico da estenfiliose no pomar, que era bastante elevado.

O pomar caracteriza-se por:

- Porta enxerto: BA29
- Compasso: 1m x 4m
- Polinizadoras: Sim, Beurré Precoce Morettini e Vitória
- Modo de condução: eixo central revestido
- Área total: 2,81 ha
- Ano de plantação: 2011/12
- Orientação: Norte-Sul e Este-Oeste
- Sistema hídrico: Regadio
- Tipo de solo: Franco arenoso, com 78% areia fina, 10% argila, 7% de limo e 5% areia grossa (análise de 18 janeiro 2016 laboratório UTAD)
- Enrelvamento permanente

As parcelas e respetivas modalidades tinham sido seleccionadas no ano anterior, tal como as árvores de onde se recolheu o material vegetal, dado que o ano de 2019 correspondia ao segundo ano do projeto GO.

As modalidades em ensaio encontram-se assinaladas na Figura 6 e correspondem a quatro situações experimentais diferentes:

- Modalidade 1 (M1): testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa
- Modalidade 2 (M2): com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo
- Modalidade 3 (M3): aplicação de Condor Shield ao solo
- Modalidade 4 (M4): aplicação de lixívia ao solo

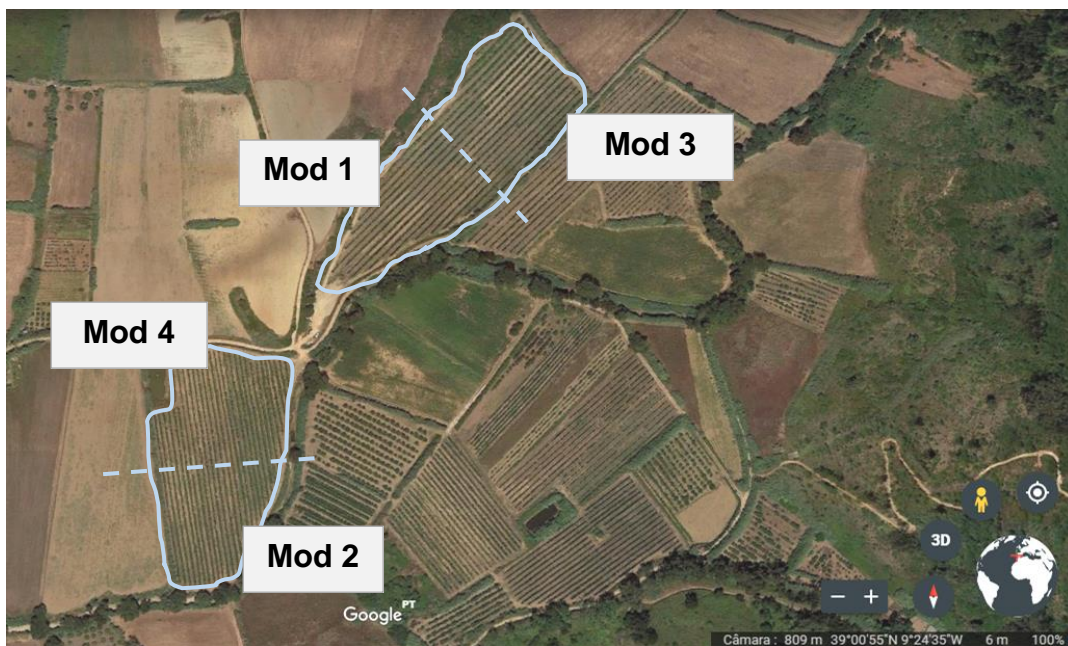


Figura 6. Localização do pomar e definição das modalidades.

A modalidade um é a modalidade testemunha e a modalidade dois tem como objetivo a eliminação do inóculo potencial existente no pomar e, conseqüentemente, reduzir as infeções primárias que possam surgir nas flores, frutos e folhas. Na terceira e quarta modalidades, foram aplicados ao solo o Agente de BioControlo (ABC, Condor Shield e lixívia (biocida, desinfetante), respetivamente.

Na modalidade M3 utilizou-se o CONDOR SHIELD, produto que atua como biofungicida impedindo a proliferação de diversos fungos, incluindo o *S. vesicarium*. Além deste produto, e de forma a favorecer a colonização do *Trichoderma* no solo, aplicaram-se ainda os produtos MYR N e o TIGRE, ambos advêm de um conjunto de extratos vegetais naturais.

- Composição do Condor Shield:
 - *Trichoderma koningii* TK7: 1×10^9 esporos/g
 - pH: 4,5
 - *Rhizoglo mus irregular e* BEG72 e *Funneliformis mosseae* BEG234: 2 esporos/g

- Bactérias da rizosfera: 10³ UFC/g
- Matéria orgânica: 65%
- Composição do MYR N:
 - pH: 4,6
 - Massa volúmica: 1,20 kg/l
 - Matéria orgânica: 33%
 - N orgânico: 5%
- Composição do TIGRE:
 - pH: 4,5
 - N total: 2,8%
 - N orgânico: 2,8%
 - Cu solúvel em água: 4%
- Composição da lixívia
 - hipoclorito de sódio

Cada modalidade é realizada com o propósito de avaliar a presença de *S. vesicarium* em vários tipos de material recolhido ao longo do ciclo vegetativo da pereira.

A oportunidade do tratamento/operação cultural, isto é, a altura do ano em que foram efetuadas as tarefas diversas teve um papel essencial no sucesso e eficácia da intervenção executada no pomar (Quadro 3).

Quadro 3. Calendarização das operações realizadas nas duas modalidades onde se aplicou o agente de biocontrolo

Data	Modalidade	Operação	Dosagem	Alvo
16/03/2019	3	Aplicação MYR N	9 l/ha	Solo
23/03/2019		Aplicação TIGRE	2 l/ha	Solo
28/03/2019		Corta-mato na entrelinha	-	Infestantes
02/04/2019		Aplicação MYR N	9 l/ha	Solo
09/04/2019		Aplicação de CONDOR	2,5 kg/ha	Solo
05/06/2019		Aplicação MYR N	6 l/ha	Solo
12/06/2019		Aplicação de CONDOR	1,5 kg/ha	Solo

28/03/2019		Corta-mato na entrelinha	-	Infestantes
29/03/2019	4	Aplicação de hipoclorito	14 l/ha	Solo
01/06/2019		Aplicação de hipoclorito	14 l/ha	Solo

As diferentes operações foram realizadas pelo agricultor, de acordo com as recomendações do técnico. Na aplicação dos produtos ao solo, modalidade 3 e 4, utilizou-se uma barra de pulverização montada no trator com um débito de 700 l e para a eliminação do material vegetal, na modalidade 2, utilizou-se uma fresa.

Cada modalidade é constituída por oito árvores, marcadas em duas linhas consecutivas, perfazendo um total no ensaio de 32 árvores, na Figura 7 apresenta-se a disposição das modalidades no pomar.

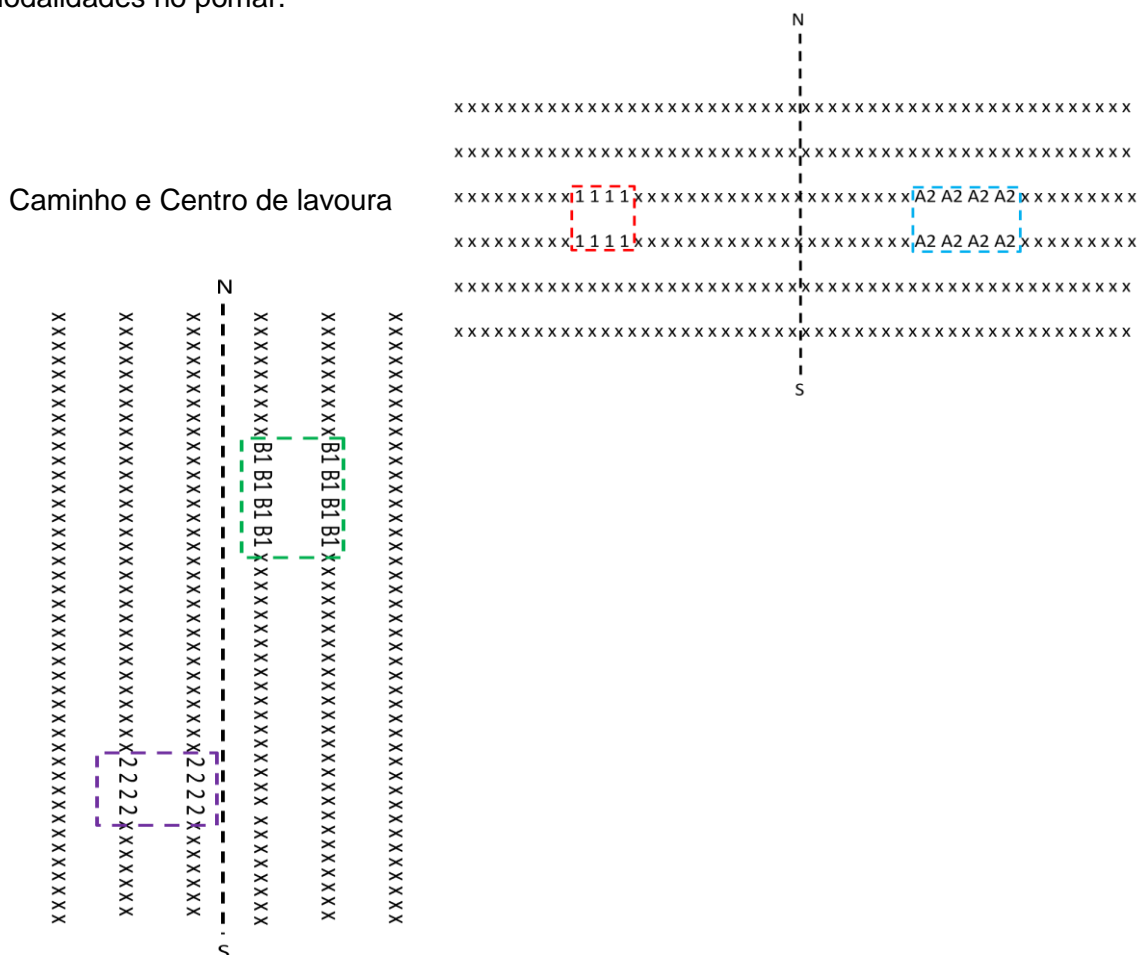


Figura 7. Esquema representativo da disposição das árvores no pomar, por modalidade.

Os tratamentos fitossanitários (Anexo 2), fertilizações e regas efetuadas no ensaio ficaram à responsabilidade do técnico em conjunto com o agricultor.

3.1.2. Colheita do material vegetal

A colheita de material vegetal foi realizada ao longo da campanha, de acordo com o protocolo de trabalho estabelecido pelo GO “ProtecEstenfilio”. No Quadro 4 encontram-se calendarizadas as colheitas de material vegetal efetuadas.

As amostras foram, sempre que possível, colhidas nos dois lados da copa da árvore. Nas primeiras colheitas de material, nomeadamente lenha de poda, folhas do ano anterior, flores e frutos com 12-14 mm, as amostras não apresentavam sintomas de estenfiliose. Pelo contrário, as amostras de infestantes, folhas e frutos antes da colheita já exibiam sintomas associados à estenfiliose (Anexo 3).

Quadro 4. Calendarização das colheitas de material

Estado fenológico (escala BBCH)	Data recolha	Amostra	Colheita	Modalidade
Repouso vegetativo	29/01/2019	Lenha de poda	8 ramos/modalidade (um por árvore)	Modalidade 1
Repouso vegetativo	29/01/2019	Folhas do ano anterior	20 folhas/modalidade (ao longo da modalidade)	Modalidade 1
Floração	15/04/2019	Flores	16 flores/modalidade, uma de cada lado da copa (duas por árvore)	Todas
Frutos em desenvolvimento	06/05/2019	Frutos com 12-14 mm	16 frutos/modalidade, um de cada lado da copa (dois por árvore)	Todas
Frutos em desenvolvimento	06/05/2019	Infestantes com sintomas	10 infestantes/modalidade, plantas inteiras	Todas
Frutos em desenvolvimento	09/07/2019	Folhas com sintomas	16 folhas/modalidade, uma de cada lado da copa (duas por árvore)	Todas
Frutos totalmente desenvolvidos (antes da colheita)	22/08/2019	Frutos com sintomas	16 frutos/modalidade, um de cada lado da copa (dois por árvore)	Todas

3.1.3. Processamento do material no laboratório

No laboratório foram adotados os métodos já anteriormente definidos pelo GO “ProtectEstenfilio”, processando-se as amostras consoante o tipo de material rececionado.

Os materiais vegetais recolhidos (flores, frutos, infestantes e folhas) foram individualmente seccionados em quatro fragmentos e colocados em placas de Petri, contendo aproximadamente 15 mL de PDA e 250mg/l de cloranfenicol.

As amostras com sintomas da doença (frutos com sintomas, infestantes e folhas) foram retiradas da zona com a mancha, desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, durante aproximadamente 30 segundos, e passadas por água destilada esterilizada, também durante um período de 30 segundos, antes de serem secas e colocadas nas respetivas placas de Petri com PDA e antibiótico.

Seguiu-se o período de incubação em estufa a $25\pm 1^\circ\text{C}$ com a duração entre 12 a 15 dias em condições de obscuridade. Após este período procedeu-se à identificação dos isolados, com base nas características culturais e morfológicas. O levantamento dos fungos isolados incluiu outros fungos para além do *S. vesicarium*. Posteriormente, procedeu-se à repicagem das colónias para placas contendo apenas PDA.

Os parâmetros utilizados para avaliar a doença foram a incidência e a severidade. A incidência representa a percentagem de órgãos infetados, isto é, se no isolamento microbiológico temos ou não o fungo em análise. Já a severidade indica a percentagem de fragmentos de órgãos infetados por esse fungo, ou seja, se no isolamento temos quatro fragmentos em quantos deles temos o crescimento do fungo.

Na amostra referente aos frutos com sintomas, estes foram classificados com base na localização do sintoma no fruto, isto é, lateral ou na fossa apical.

As amostras de lenha de poda e folhas do ano anterior, depois de identificadas (Figura 8), foram observadas à lupa binocular para detetar a possível existência de pontuações negras na epiderme que, pudessem corresponder às estruturas de frutificação do fungo. Estas, após localizadas, foram removidas com ajuda de um escalpelo e, montaram-se preparações entre lâmina e lamela com lactofenol. De seguida, foram observadas ao microscópio (Laboralux S, Leitz), utilizando uma ampliação de 400x.



Figura 8. Ramos de poda etiquetados.

3.1.4. Análise de resultados da incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium*

Os resultados apurados relativamente à incidência (percentagem órgãos infetados) e severidade (percentagem de fragmentos de órgãos infetados) de *S. vesicarium* foram submetidos a análise de variância. A comparação das médias efetuou-se recorrendo ao teste de Tukey HSD (com nível de significância de 0,05) no programa STATISTICA 6.0 (Anexo 4).

3.2. Ensaio Idai Nature

3.2.1. Delineamento experimental e condições de campo

O ensaio decorreu num pomar na localidade da Melroeira, concelho de Torres Vedras. A escolha desta parcela para a realização do ensaio prendeu-se com o histórico existente de uma elevada incidência de estenfiliose.

O pomar caracteriza-se por:

- Porta enxerto: BA29
- Compasso: 2,2m x 4,5m
- Polinizadoras: Não
- Modo de condução: eixo central revestido
- Área total: 1,52 ha

- Ano de plantação: 1986
- Orientação: Este-Oeste
- Sistema hídrico: Regadio
- Tipo de solo: argilo limoso, com 7,32% de areia, 59,21% de argila e 33,47% de limo (análise de 11 de dezembro de 2018 laboratório UTAD)
- Enrelvamento permanente

No campo foram ensaiadas duas modalidades (Figura 9):

- Modalidade 1 (M1): testemunha ou parcela do agricultor
- Modalidade 2 (M2): parcela Idai, composta pela estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature

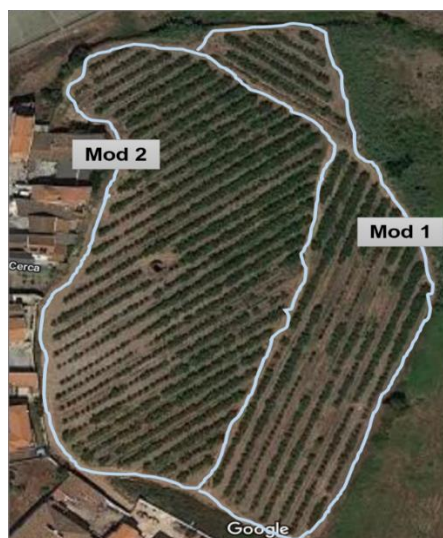


Figura 9. Localização do pomar e definição das modalidades.

Na modalidade 2 foram realizados um conjunto de tratamentos com base em três produtos de origem natural fornecidos pela Idai Nature (produto A, B, C), com vista à redução da estenfiliose no pomar. Estes produtos contribuem para a nutrição e metabolismo vegetal, ativam mecanismos defensivos nas plantas e têm uma ação bioestimulante natural de processos fisiológicos.

Estes produtos foram incluídos na estratégia fitossanitária definida pelo técnico responsável conjuntamente com o agricultor, correspondente à modalidade 1, e aplicados de acordo com as recomendações do corpo técnico da Idai Nature.

O calendário de tratamentos efetuados e os fungicidas utilizados encontram-se discriminados no Quadro 5. Os tratamentos realizados na modalidade 2, com os três produtos Idai Nature em análise apresentam-se no Quadro 6. A aplicação dos tratamentos foi efetuada pelo agricultor, seguindo as recomendações dos técnicos. O equipamento

utilizado foi um pulverizador com um débito de 800 l/ha. Marcaram-se 20 árvores por modalidade de forma aleatória e quatro ramos por árvore, ou seja, um ramo por quadrante onde se realizaram as recolhas de material vegetal para análise laboratorial.

Quadro 5. Tratamentos fungicidas efetuados nas duas modalidades

Data	Nome comercial	Substância ativa	Dose (l ou kg/ha)		IS (dias)	Formulação	Grupo químico	Modo de ação
01/04/2019	Captana sapec 83	captana	1,8	kg	28	WP	ftalimida	preventivo
08/04/2019	Flint	trifloxistrobina	0,1	kg	14	WG	estrobilurina	preventivo
16/04/2019	Sercadis 30 SC	fluxaproxade	0,3	l	35	SC	pirazol-carboximida	preventivo e curativo
22/04/2019	Bravo 500	clortalonil	2	l	21	SC	cloronitrilo	preventivo
06/05/2019	Scala	pirimetanil	0,75	l	14	SC	anilinopirimidinas	preventivo e curativo
11/05/2019	Aliette Flash	fosetil - alumínio	3,75	kg	28	WG	fosfonato	preventivo e curativo
21/05/2019	Fox WG Advance	tebuconazol	0,75	kg	21	WG	triazol	preventivo e curativo
05/06/2019	Luna experience	fluopirame + tebuconazol	0,75	l	14	SC	benzamida-piridina + triazol	preventivo e curativo
21/06/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo
27/06/2019	Bellis	boscalide + piraclostrobina	0,8	kg	7	WG	carboximida + estrobilurina	preventivo e curativo
05/07/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo
12/07/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo

Quadro 6. Calendarização dos tratamentos efetuados com produtos Idai Nature na modalidade 2

Data	Nome	Concentração (ml/L)
20/04/2019	B	2
	A	4
	C	3
30/04/2019	B	2
	A	4
	C	3
20/05/2019	B	2
21/05/2019	A	4
31/05/2019	B	2
	C	3
17/06/2019	B	2
	A	4
27/06/2019	B	2
	C	3
06/07/2019	B	2
	A	4
13/07/2019	B	2
	C	3
22/07/2019	B	2
	A	4

3.2.2. Colheita de material vegetal

No decorrer do ensaio ao longo da campanha foram realizadas duas colheitas de material vegetal (Quadro 7) para posterior análise laboratorial. A primeira foi realizada à floração com o intuito de avaliar as infeções nas flores e as condições com que se iniciava o ensaio no que diz respeito à estenfiliose e a segunda, já em frutos com sintomas antes da colheita.

Quadro 7. Calendarização das recolhas de material

Estado fenológico	Data recolha	Amostra	Colheita
Floração	01/04/2019 e 02/04/2019	Flores	80 flores/modalidade, uma por quadrante (quatro por árvore)
Frutos antes da colheita	16/08/2019	Frutos com sintomas	40 frutos/modalidade, um de cada lado da copa (dois por árvore)

3.2.3. Avaliações de campo

No pomar, os registos, da evolução dos sintomas nos frutos foram semanais a partir de junho e até à colheita. Em dois momentos distintos no ciclo vegetativo, efetuaram-se observações nos frutos segundo o protocolo da OEPP PP/05 (European and Mediterranean Plant Protection Organization) relativo ao pedrado que foi adaptado à estenfiliose (Anexo 1).

A primeira observação do ensaio ocorreu a 24/06/2019, em que foram feitos quatro grupos de duas árvores contíguas por estratégia e foram contabilizados 50 frutos em cada lado da copa destas duas árvores perfazendo um total de 400 frutos observados por modalidade. Estes frutos foram distribuídos por três níveis de infeção: nível 1, se não apresentassem sintomas; nível 2, se tivessem até três manchas; nível 3, se por fruto existissem mais de três manchas.

A segunda observação efetuou-se a 16/08/2019 e baseou-se igualmente no protocolo acima referido. Contabilizou-se ainda a presença de sintomas na região apical *versus* polpa do fruto.

3.2.4. Avaliações colheita e pós colheita

No que respeita à avaliação da qualidade, próximo da colheita (16/08/2019) mediram-se: a dureza com recurso a um penetrómetro manual (Tipo Effegi, Bellevue) com escala de kg/0,5 cm e o grau Brix determinado através de um refratómetro portátil.

Em cada fruto, numa amostra de sete por modalidade, destacou-se a casca para a medição da dureza em dois lados opostos do fruto. Já para o grau Brix realizou-se uma medição individual por cada fruto.

Antes da colheita, foram colhidos 100 frutos por modalidade, de forma aleatória para caixas de campo (Figura 10), com a respetiva identificação da modalidade, tendo sido armazenados numa câmara de atmosfera normal nas instalações da FRUTOESTE, CRL por um período de aproximadamente dois meses e meio.

Após este período, retirou-se as amostras do frio (04/11/2019), e procedeu-se a uma nova avaliação dos parâmetros de qualidade, dureza e grau Brix, utilizando os mesmos equipamentos e metodologia usados na primeira avaliação.



Figura 10. Frutos colhidos para armazenamento em câmara de frio.

3.2.5. Processamento do material em laboratório

No laboratório o processo de análise das amostras fez-se segundo a mesma metodologia descrita no ponto 3.1.3 deste documento, mas apenas para as flores e frutos à colheita com sintomas.

4. Resultados

4.1. Ensaio ProtecEtenfilio

4.1.1. *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. na lenha de poda e folhas do ano anterior

As tentativas realizadas para observação e identificação de esporos de *S. vesicarium* nas preparações microscópicas efetuadas revelaram-se bastante complexas dada a semelhança morfológica existente entre os esporos de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp. que surgiam em simultâneo nas preparações. Na realidade, as duas espécies produzem esporos septados, transversal e longitudinalmente com coloração semelhante que vai desde um castanho dourado a um verde acastanhado, forma oblonga a ovoide e dimensões idênticas. *Alternaria* sp. distingue-se de *Stemphylium* pela conidiogénese dos esporos em cadeia e por estes apresentarem um prolongamento na região apical (Simmons, 1967).

Face a esta vicissitude, optou-se por avaliar a presença das duas espécies em conjunto. No Quadro 8 e Quadro 9 apresentam-se os resultados obtidos, sendo a presença de esporos de *S. vesicarium* ou *Alternaria* sp. representada pelo sinal (+), enquanto que o sinal (-) corresponde à sua ausência.

Quadro 8. Registo da presença ou ausência de esporos de *Alternaria* sp. ou *Stemphylium vesicarium* em ramos de poda colhidos no pomar

Data de observação	Órgão	Amostra	<i>S. vesicarium</i> ou <i>Alternaria</i> sp.
04.02	Ramo1	a	+
		b	+
04.02	Ramo2	a	+
		b	+
04.02	Ramo3	a	+
		b	+
04.02	Ramo4	a	+
		b	+
04.02	Ramo5	a	+
		b	+
04.02	Ramo6	a	+
		b	+
04.02	Ramo7	a	+
		b	+
04.02	Ramo8	a	+
		b	+
04.02	Ramo9	a	+
		b	+
04.02	Ramo10	a	+
		b	+

Quadro 9. Registo da presença ou ausência de esporos de *Alternaria* sp. ou *Stemphylium vesicarium* em folhas colhidas no pomar

Data de observação	Órgão	Amostra	<i>S. vesicarium</i> ou <i>Alternaria</i> sp.
28.02	Folha1	a	+
		b	+
28.02	Folha2	a	+
		b	+
28.02	Folha3	a	+
		b	+
28.02	Folha4	a	+
		b	+
28.02	Folha5	a	-
		b	-
28.02	Folha6	a	-
		b	-
28.02	Folha7	a	-
		b	-
28.02	Folha8	a	-
		b	-
28.02	Folha9	a	-
		b	-
28.02	Folha10	a	-
		b	-

Os esporos de *S. vesicarium* caracterizam-se por apresentarem uma coloração que vai desde um castanho dourado a um verde acastanhado, uma forma oblonga a oval, serem multicelulares e multiseptados, apresentando 1-5 septos transversais e uma ou duas séries de septos longitudinais, com constrições em 1-3 dos maiores septos transversais. As dimensões dos conídios variaram de 21 a 48 μm de comprimento e de 10 a 22 μm de largura (Figura 11A). Os esporos de *Alternaria* sp. eram multicelulares septados transversal e longitudinalmente, apresentavam uma coloração castanho amarelado a olivácea, forma ovóide a alíptica, com cauda cónica ligeiramente afunilada ou cilíndrica, e mais clara que o corpo. As dimensões dos conídios variaram de 20 a 45 μm de comprimento e de 8 a 18 μm de largura (Figura 11B).



Figura 11. Conídios de *S. vesicarium* (A) e de *Alternaria* sp. (B) (ampliação 400x).

Os resultados apurados apontam para uma mais elevada colonização dos ramos de poda em relação às folhas. Foram observados esporos de *S. vesicarium* ou *Alternaria* sp. em 100% dos ramos de poda enquanto em folhas foram observados em 40% das amostras.

4.1.2. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nas flores

A análise laboratorial de flores, usando os parâmetros de incidência e severidade, permitiram quantificar o estado inicial de infeção no ciclo vegetativo para cada uma das modalidades em estudo.

No ano de 2019, durante o período de floração, não existiram condições meteorológicas favoráveis de infeção, o que conduziu a incidências de *Stemphylium vesicarium* nas flores mais baixas comparativamente ao ano passado. No conjunto das quatro modalidades (M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo) obtivemos valores de incidência abaixo dos 50%, sendo a modalidade M3 a que apresenta o valor mais baixo e M1 o valor mais alto (Figura 12). Para a incidência a análise estatística dos resultados não permitiu estabelecer diferenças significativas entre modalidades.

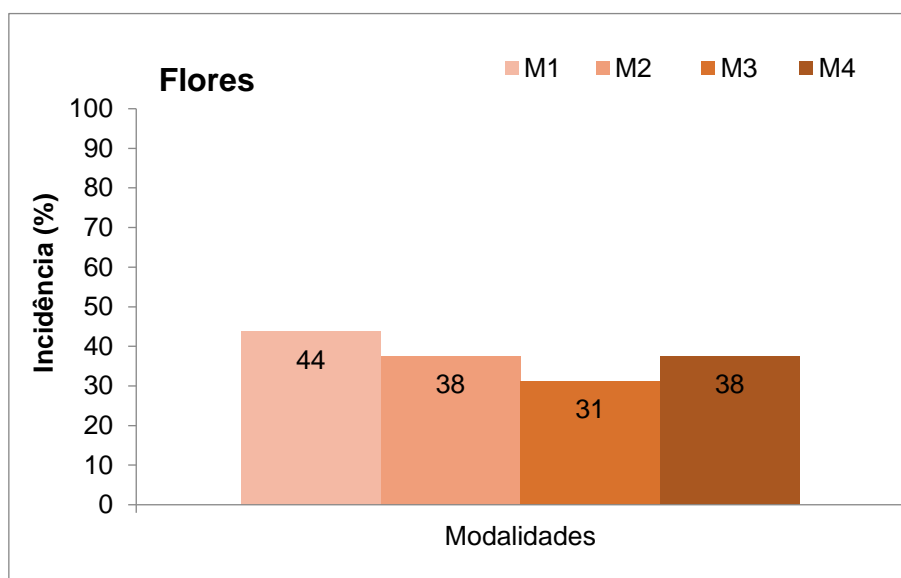


Figura 12. Incidência média de *Stemphylium vesicarium* nas flores, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

A severidade nas flores (Figura 13) apresenta valores abaixo dos 15% em todas modalidades e tal como na incidência o valor mais baixo acontece na modalidade M3 e o mais elevado na M1, não existindo diferenças significativas entre as modalidades.

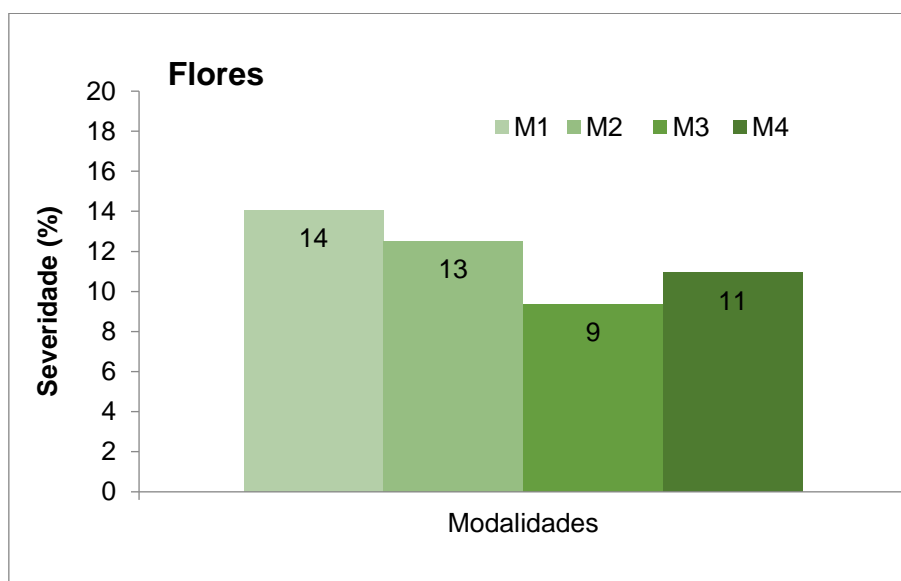


Figura 13. Severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas flores, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

4.1.3. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com 12-14 mm

Os primeiros frutos assintomáticos foram colhidos após o vingamento. A presença de *S. vesicarium* nestes frutos está muitas vezes relacionada com as infeções que ocorreram durante a floração.

Na Figura 14 apresentam-se as incidências médias de *S. vesicarium* nos frutos com 12-14 mm colhidos. A incidência foi baixa em todas as modalidades, sendo de realçar que na modalidade M3 nenhum fruto estava infetado com *S. vesicarium*.

Quanto à severidade de *S. vesicarium*, todos os valores para as quatro modalidades se situaram abaixo dos 10% (Figura 15).

A análise estatística dos resultados da incidência e severidade de *S. vesicarium* não revelou diferenças significativas entre os resultados das diferentes modalidades.

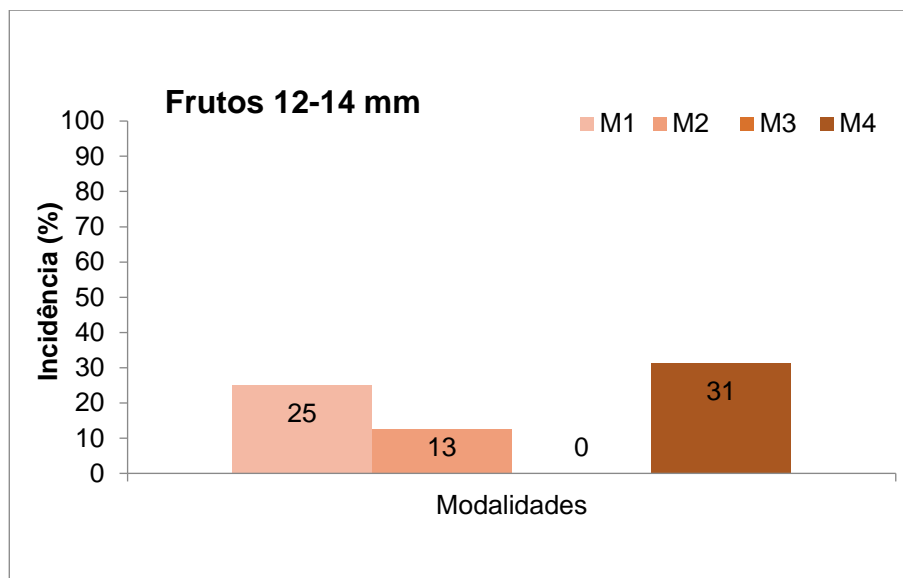


Figura 14. Incidência média de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com 12-14 mm, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

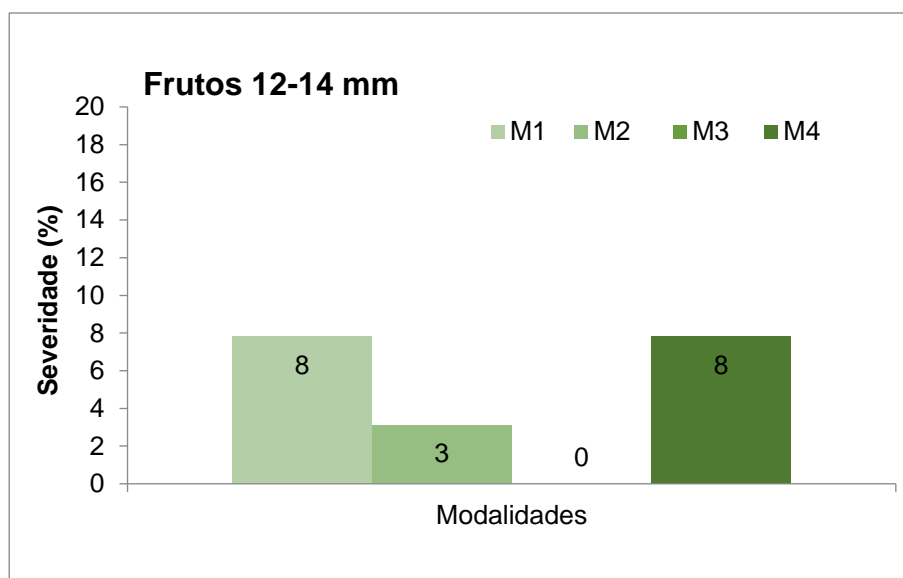


Figura 15. Severidade média de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com 12-14 mm, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

Tendo em conta os resultados obtidos pode-se concluir que as baixas incidências e severidades nas flores conduziram a baixas incidências e severidades nos frutos com 12-14 mm. Tal como se referiu anteriormente, estes resultados são consequência de condições meteorológicas adversas à ocorrência de infeções de estenfiliose.

4.1.4. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com sintomas

As amostras correspondentes aos frutos colhidos com sintomas característicos de estenfiliose revelaram uma incidência que variou entre 100% na modalidade testemunha e 56% na modalidade M2 (Figura 16).

O expectável nestes resultados seria obter incidências de 100% em todas as modalidades, uma vez que todos os frutos foram colhidos com sintomas de estenfiliose (Figura 17). No entanto, tal não se verificou e pressupõe-se que outros fungos são responsáveis por sintomas que no pomar a partir do diagnóstico visual são associados a *S. vesicarium*.

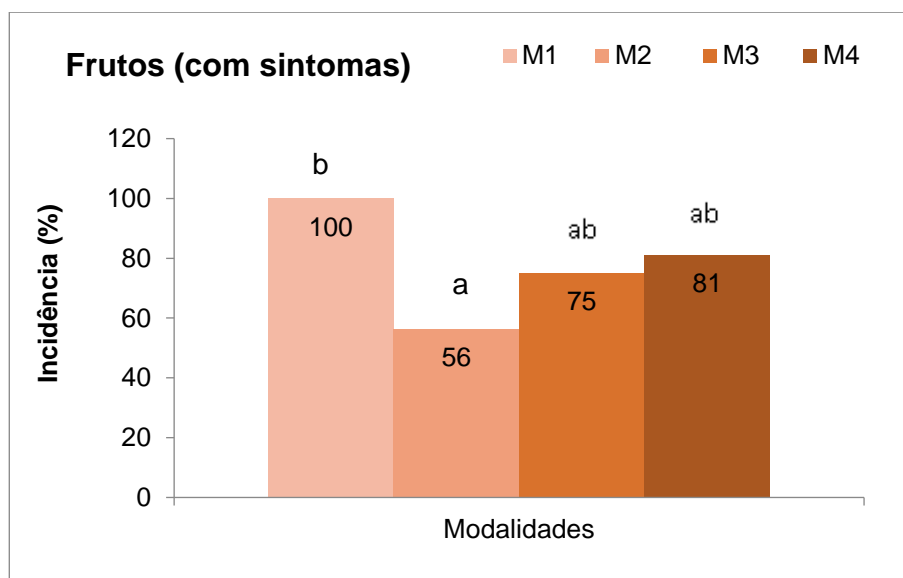


Figura 16. Incidência média de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo. Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

Tendo em conta que tanto as flores como os primeiros frutos apresentavam incidências relativamente baixas esperava-se um ano com menos estragos causados pela estenfiliose. Porém, as condições meteorológicas desde o final de junho e até à colheita, proporcionaram um ambiente favorável ao desenvolvimento do fungo. Humidade relativa elevada, temperatura amena e com constante humectação levaram a um índice de risco acumulado (IRA) superior a 0,4 durante vários dias sobretudo no baixo Oeste, onde se localiza este

ensaio. Esta ocorrência originou incidências elevadas de *S. vesicarium* nos frutos e provocou quebras de produção (Figura 18).



Figura 17. Sintomas de estenfiliose em diferentes zonas de frutos colhidos nas modalidades em estudo: A, polpa, B, zona apical, C, polpa.

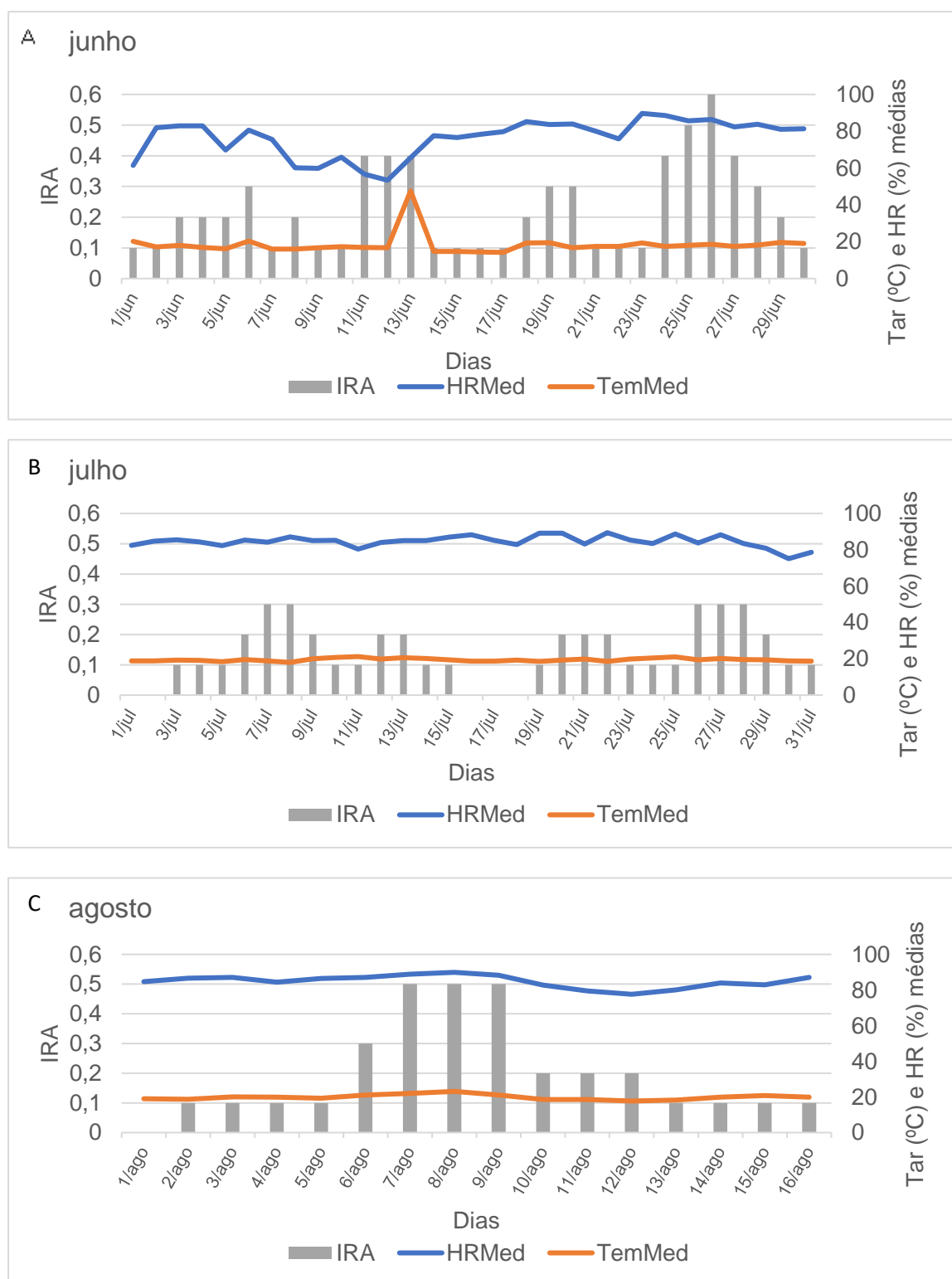


Figura 18. Valores de temperatura e humidade relativa médias e IRA diário para os meses de: A - junho; B - julho; C - agosto (Dados meteorológicos da estação instalada no pomar do ensaio no âmbito do GO "ProtecEstenfilio").

Quanto à severidade, temos valores superiores a 25% para todas as modalidades. A modalidade M1 apresenta o valor mais elevado de 67% e a modalidade M2 com 30% tem a severidade mais baixa para os terceiros frutos (Figura 19).

Tanto para a incidência como para a severidade registaram-se diferenças significativas entre modalidades em estudo.

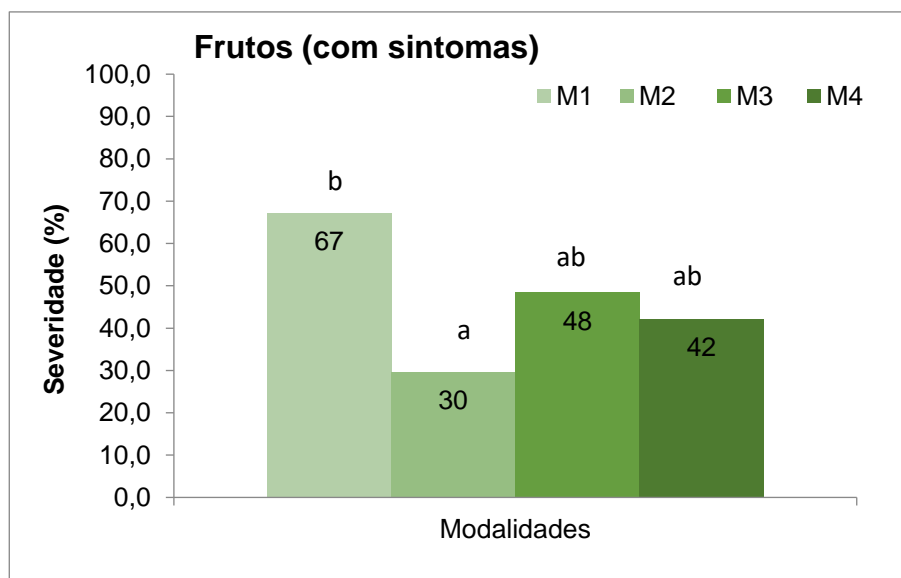


Figura 19. Severidade média de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo. Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

Na Figura 20 apresentam-se a percentagem de sintomas localizados na fossa apical ou na polpa dos frutos colhidos para análise laboratorial por modalidade. Em todas as modalidades os sintomas aparecem maioritariamente na polpa. A modalidade M1 apresenta a maior percentagem de sintomas na fossa apical com 37%, coincidindo também com a maior incidência de *S. vesicarium* nas flores para a mesma modalidade.

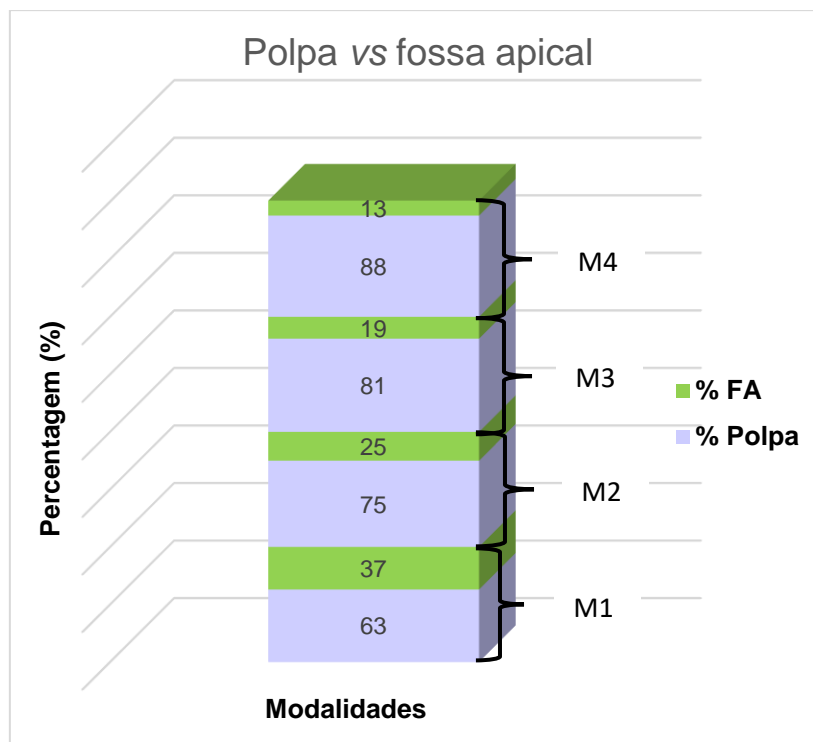


Figura 20. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical por modalidade. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

Os resultados obtidos nos frutos com sintomas no primeiro ano do GO “ProtectEstenfilio” (2018) revelaram que, para além de *Stemphylium vesicarium*, outros fungos poderiam produzir sintomas que se assemelhavam aos provocados pela estenfiliose. Assim, no ano de 2019, durante o levantamento dos fungos presentes nas placas dos isolamentos identificou-se não só *Stemphylium vesicarium* mas também *Alternaria* sp. e outros fungos presentes, quantificando-se a percentagem de cada um por modalidade.

Em todas as modalidades temos a presença de *S. vesicarium* e *Alternaria* sp. de forma expressiva. Na modalidade M1 a percentagem de *S. vesicarium* é maioritária, com 67,2%, e 31,3% de *Alternaria* sp. (Figura 21). Tanto na M2 como na M4, a percentagem de *Alternaria* sp. é superior à de *S. vesicarium*. Na M2 tem 40,6% de *Alternaria* sp. contra 29,7% de *S. vesicarium* (Figura 22). Na modalidade M3, os resultados dos isolamentos indicaram 46,9% de *S. vesicarium* e 21,9% de *Alternaria* sp. (Figura 23). A modalidade M4 tem a maior percentagem de *Alternaria* sp. de entre as quatro modalidades com 56,3% e 46,2% de *S. vesicarium* (Figura 24). Como resultado desta identificação surgiram ainda outras espécies de fungos saprófitas tais como *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., entre outros que surgem não por provocarem sintomas nos frutos, mas sim por colonizarem os tecidos já em estado avançado de maturação e início de decomposição.

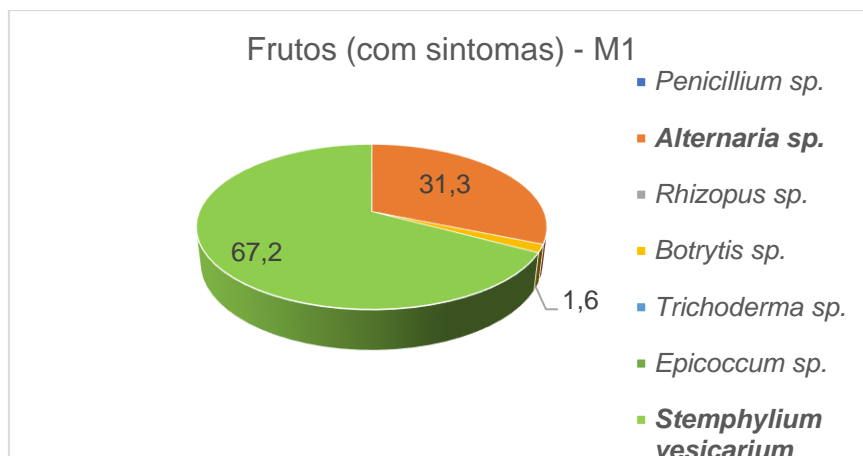


Figura 21. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M1. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa.

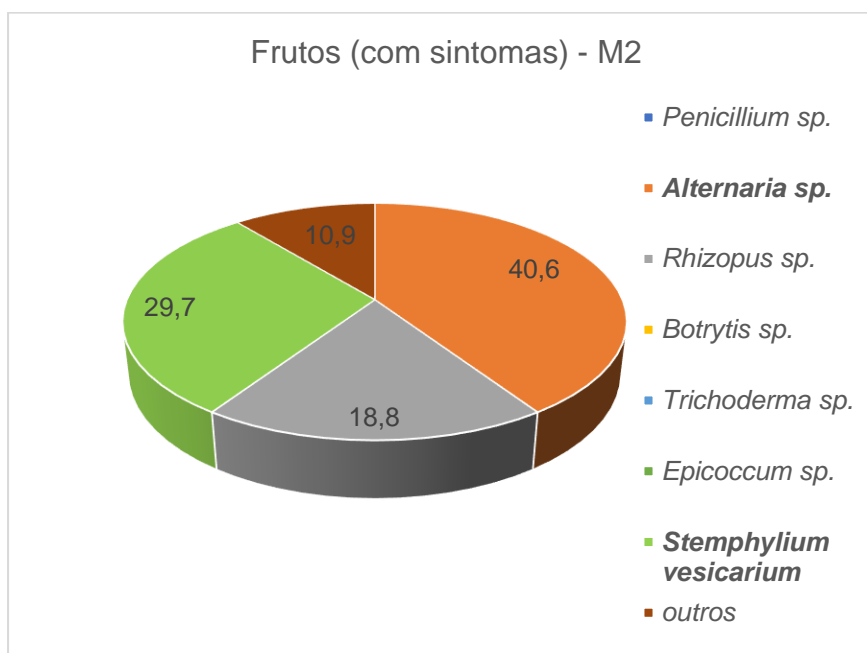


Figura 22. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M2. M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo.

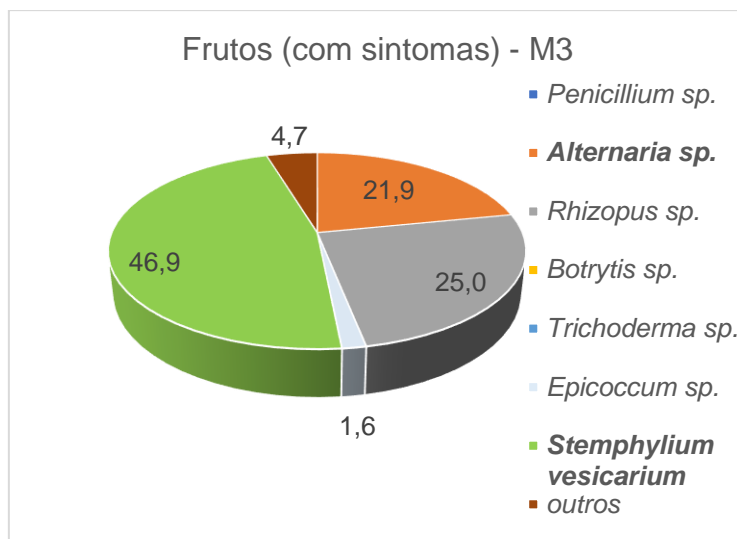


Figura 23. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M3. M3: aplicação de Condor Shield ao solo.

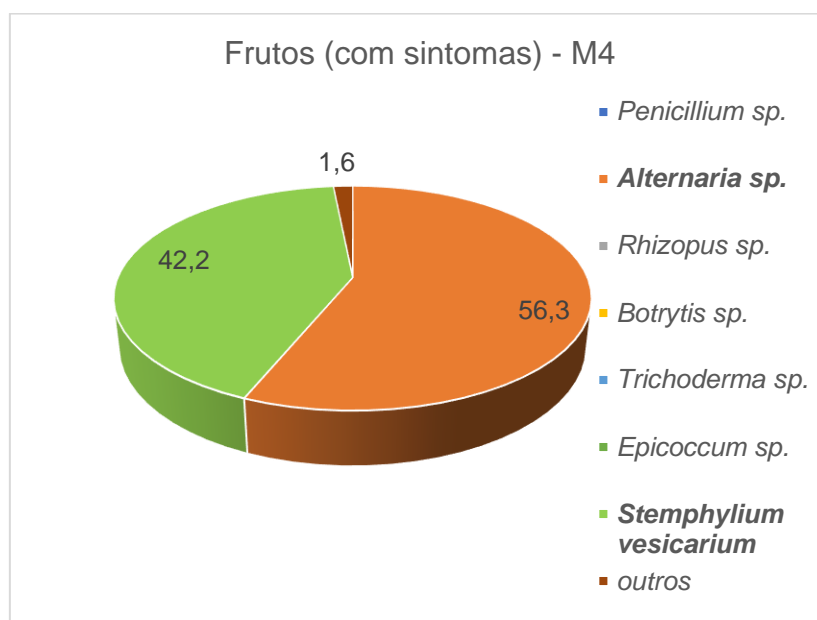


Figura 24. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos dos frutos com sintomas para a modalidade M4. M4: aplicação de lixívia ao solo.

4.1.5. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nas folhas com sintomas

As folhas são o primeiro órgão da pereira onde são visíveis os sintomas de estenfiliose. Neste ano de isolamentos, a incidência foi superior na modalidade M3 com 56% de *S. vesicarium* identificado. Nas restantes modalidades os valores foram de 37% para M1 e abaixo de 20% nas modalidades M2 e M4 (Figura 25). As incidências de 2019 nas folhas com sintomas foram mais baixas comparativamente com os resultados dos ensaios do ano de 2018. Quanto à severidade nas folhas apresentou percentagens baixas, com valores

abaixo dos 15% para todas as modalidades (Figura 26). Não se detetaram diferenças significativas entre modalidades, de acordo com a análise estatística.

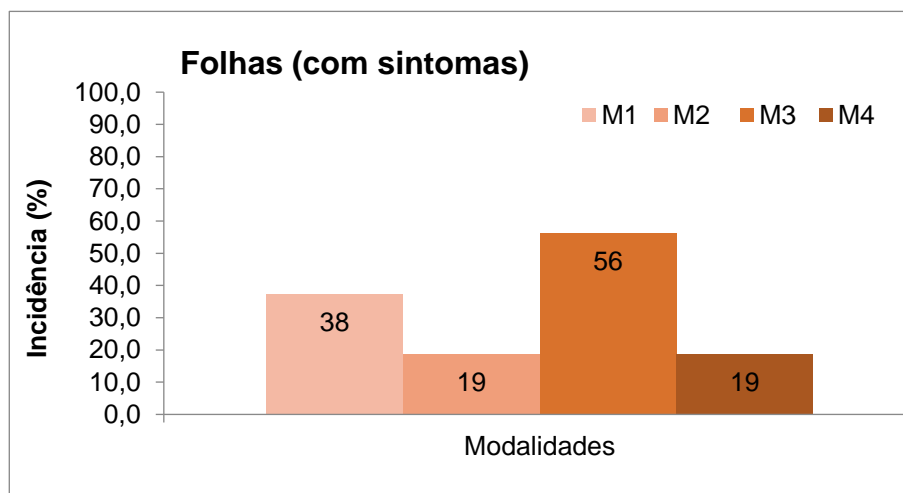


Figura 25. Incidência média de *Stemphylium vesicarium* nas folhas com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

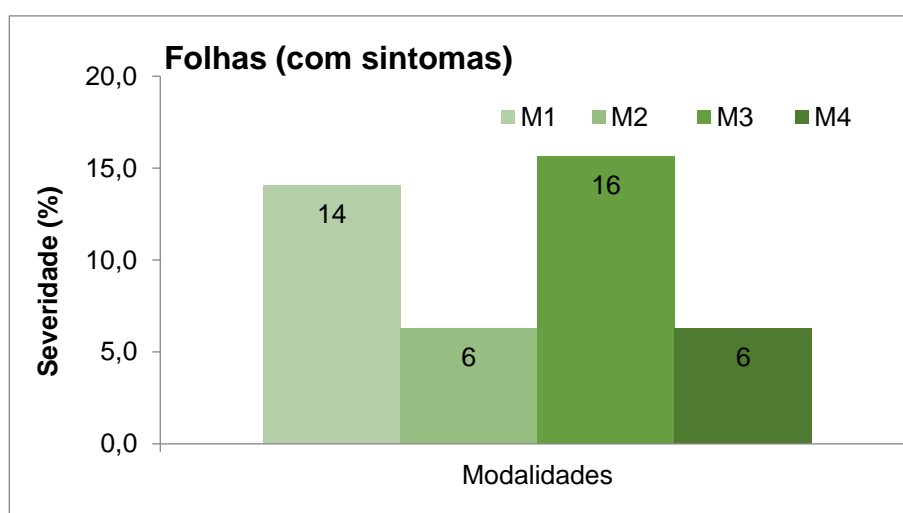


Figura 26. Severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas folhas com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

4.1.6. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nas infestantes com sintomas

Relativamente às infestantes colhidas na entrelinha das quatro modalidades, tanto a incidência como a severidade apresentam valores baixos. Estes variam entre 0% e 30% para a incidência (Figura 27) e 0% e 10% no que respeita à severidade (Figura 28). A

modalidade M1 apresenta o valor mais elevado e a M2 o mais baixo para ambos os parâmetros.

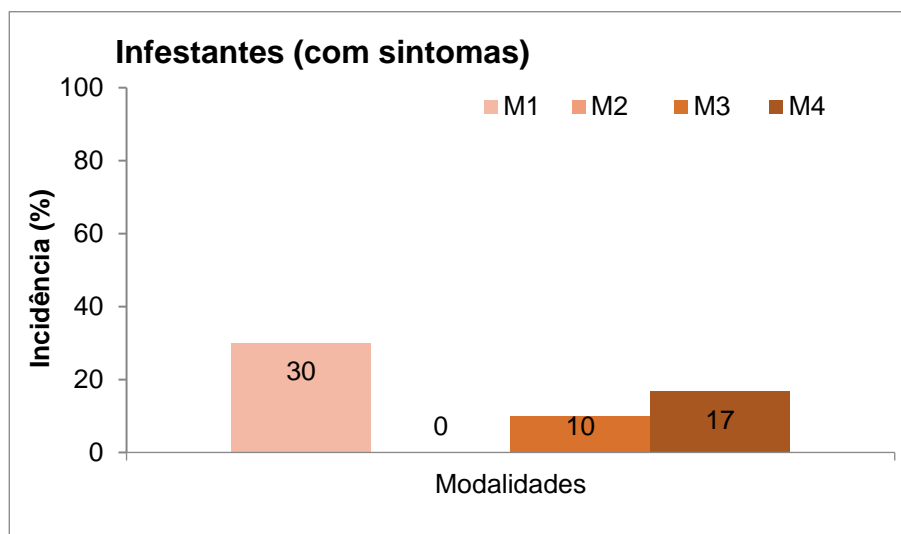


Figura 27. Incidência média de *Stemphylium vesicarium* nas infestantes com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

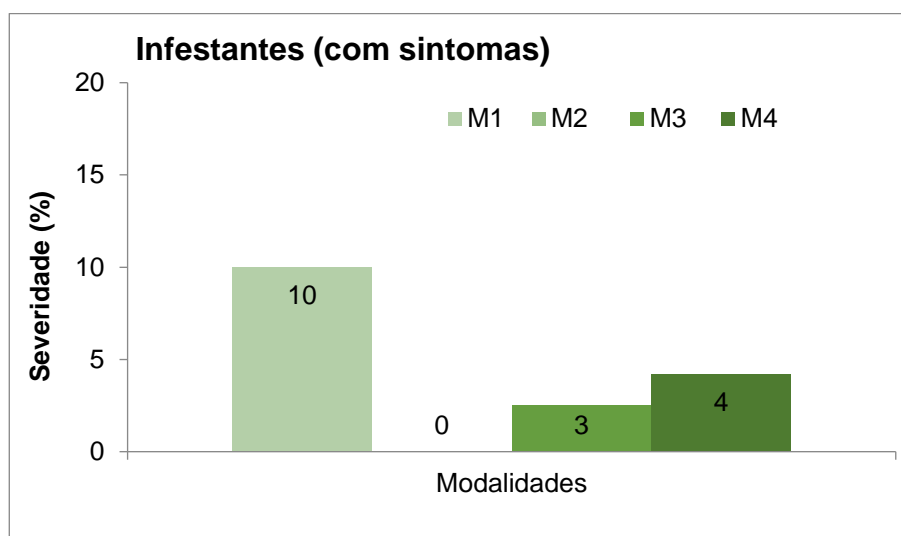


Figura 28. Severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas infestantes com sintomas, nas quatro modalidades. M1: testemunha, resíduos do material vegetal na entrelinha triturados, sem remoção do material do solo, com ou sem linha limpa; M2: com eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhoso do solo; M3: aplicação de Condor Shield ao solo; M4: aplicação de lixívia ao solo.

Foram identificadas um total de 36 infestantes sendo que houve incidência de *S. vesicarium* nas espécies *Lavatera cretica*, *Matricaria maritima* e *Hordeum murinum* na M1, em *Calendula arvenses* na M3 e em *Mentha* sp. na M4 (Anexo 5).

4.2. Ensaio Idai Nature

4.2.1. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* nas flores

As flores colhidas no campo apresentam reduzida incidência e severidade para as duas modalidades em análise, modalidade 1 (M1): testemunha ou estratégia do agricultor e modalidade 2 (M2): parcela Idai, composta pela estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature, designados por A, B e C.

A modalidade M1 apenas apresentou 3% de *S. vesicarium* enquanto na M2 a incidência nas flores era de 18%. Ambas as severidades são baixas e encontram-se abaixo dos 10% (Figura 29).

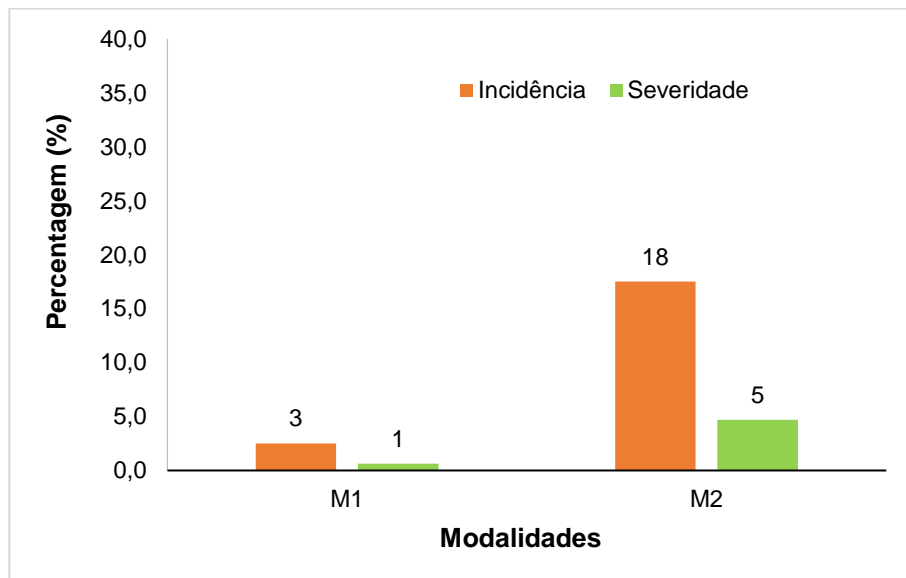


Figura 29. Incidência e severidade médias nas flores de *Stemphylium vesicarium* para as duas modalidades. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

Quanto aos fungos presentes nos isolamentos, procedeu-se à identificação das placas com especial enfoque no *S. vesicarium* e na *Alternaria* sp.

Os resultados da diversidade fúngica por modalidade encontram-se na Figura 30 e Figura 31. Em ambas as modalidades a percentagem de *S. vesicarium* presente é baixa, em que M1 tem 0,63% de *S. vesicarium* e M2 4,7%. Quanto à *Alternaria* sp. os resultados são também eles com uma expressão reduzida, com 5% e 2,8% para M1 e M2, respetivamente.

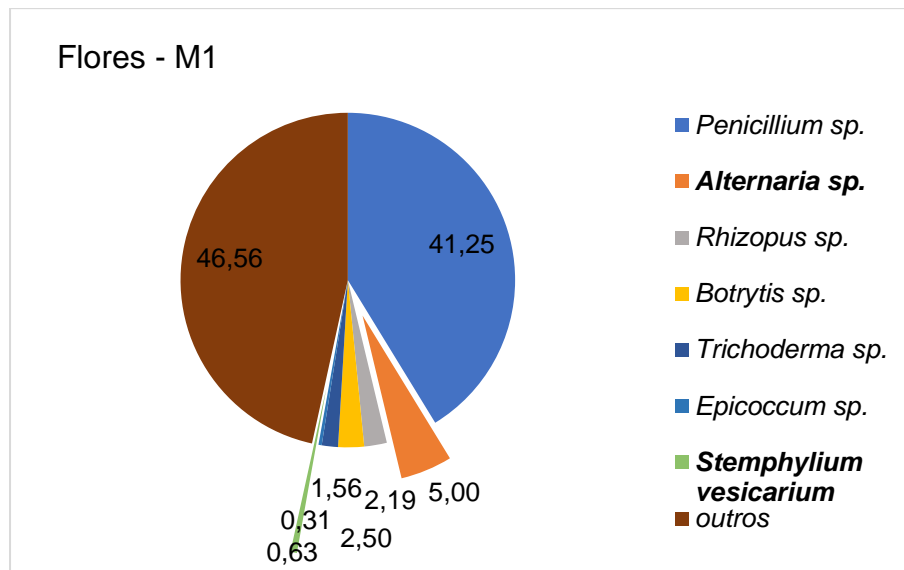


Figura 30. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nas flores para a modalidade M1: testemunha ou estratégia do agricultor.

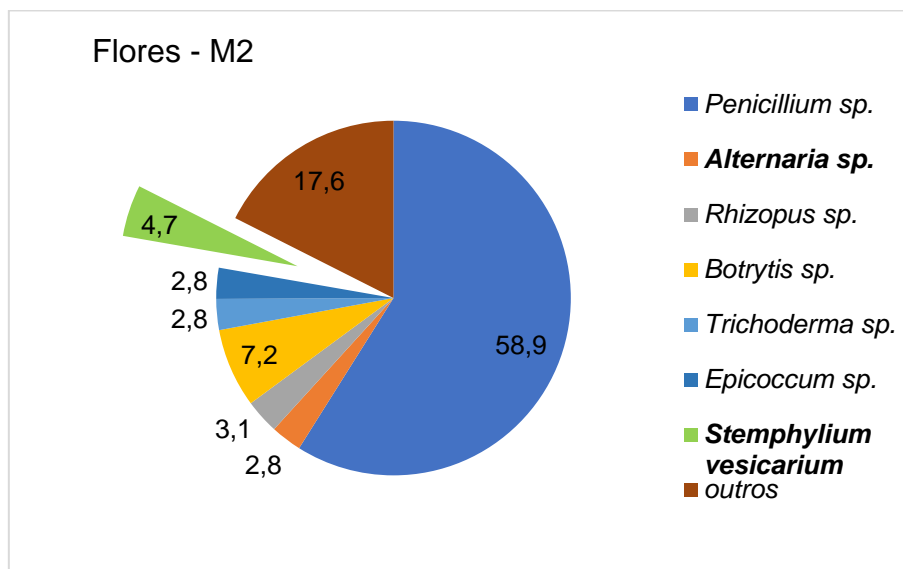


Figura 31. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nas flores para a modalidade M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

Estes resultados de incidências e severidades obtidos com as flores indicavam um ponto de partida favorável para a campanha da pera relativamente à estenfiliose.

4.2.2. Avaliação de *Stemphylium vesicarium* nos frutos com sintomas

4.2.2.1. Avaliações de campo

Os resultados de campo relativos ao protocolo OEPP PP/05 encontram-se na Figura 32 para as duas datas em que foi executado.

Na primeira data (24/06/2019), as manchas de estenfiliose encontrados nos pequenos frutos foram insignificantes. Apenas 3% e 1% dos frutos, para M1 e M2 respectivamente, se incluíam no nível 2, correspondente a frutos com no máximo 3 manchas. As condições meteorológicas não foram favoráveis ao desenvolvimento do fungo permitindo que o pomar se mantivesse em boas condições de fitossanidade (Figura 32A).

Na segunda data (16/08/2019), antes da colheita, ambas as modalidades aumentaram a quantidade de frutos pertencentes ao nível 2 de infecção e na modalidade M1 já se encontraram frutos no nível 3 (mais de três manchas por fruto). No conjunto das duas modalidades as percentagens por nível de infecção são idênticas (Figura 32B).

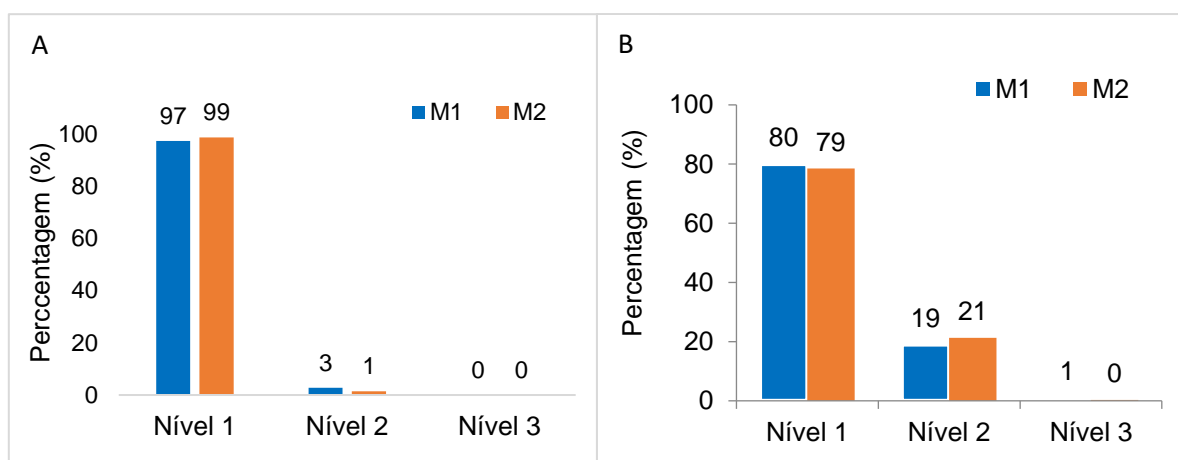


Figura 32. Percentagem de frutos por nível de infecção em A - 24/06/2019 B – 16/08/2019. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

De acordo com o protocolo OEPP, na segunda data, avaliou-se a localização das manchas na polpa ou/e na fossa apical. As duas modalidades apresentam resultados percentuais próximos, com cerca de 65% dos sintomas localizados na polpa e 26% na fossa apical (Figura 33).

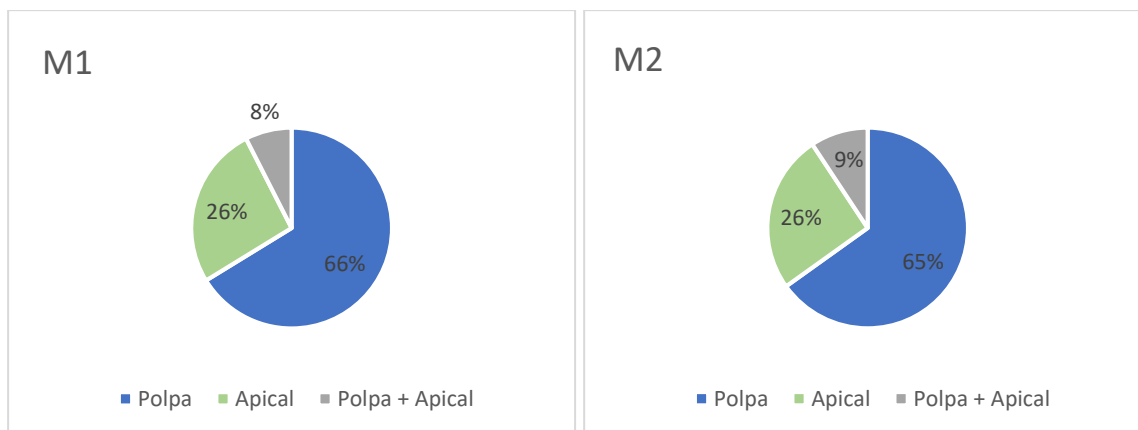


Figura 33. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical, no campo, por modalidade a 16/08/2019. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

4.2.2.2. Avaliações laboratoriais

As amostras de frutos com sintomas de estenfiliose, recolhidas dias antes da colheita, apresentavam resultados diferentes em comparação com os obtidos para as flores. A incidência das duas modalidades é bastante elevada, com valores superiores a 80% enquanto a severidade tem valores superiores a 45% para todas as modalidades. Tanto a incidência como a severidade são superiores na modalidade M2 comparativamente com a modalidade M1, este resultado coincide com a incidência e severidade das flores que já era mais elevada nesta modalidade (Figura 34).

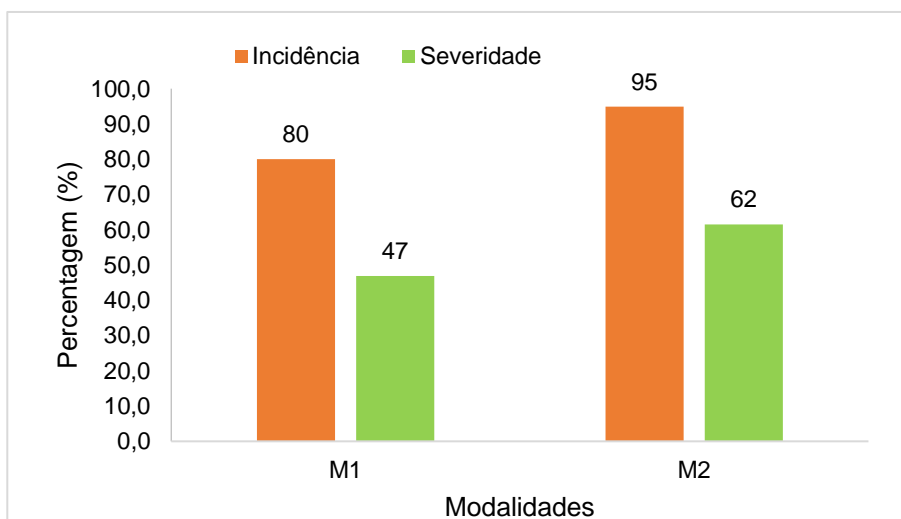


Figura 34. Incidência e severidade nos frutos com sintomas de *Stemphylium vesicarium* para as duas modalidades. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

Dos frutos analisados em laboratório, tal como o que se verificou na amostragem realizada no campo, encontra-se maior percentagem de sintomas na polpa; 75% dos frutos na modalidade M1 têm sintomas na polpa enquanto na modalidade M2 56% apresentam sintomas laterais (Figura 35).

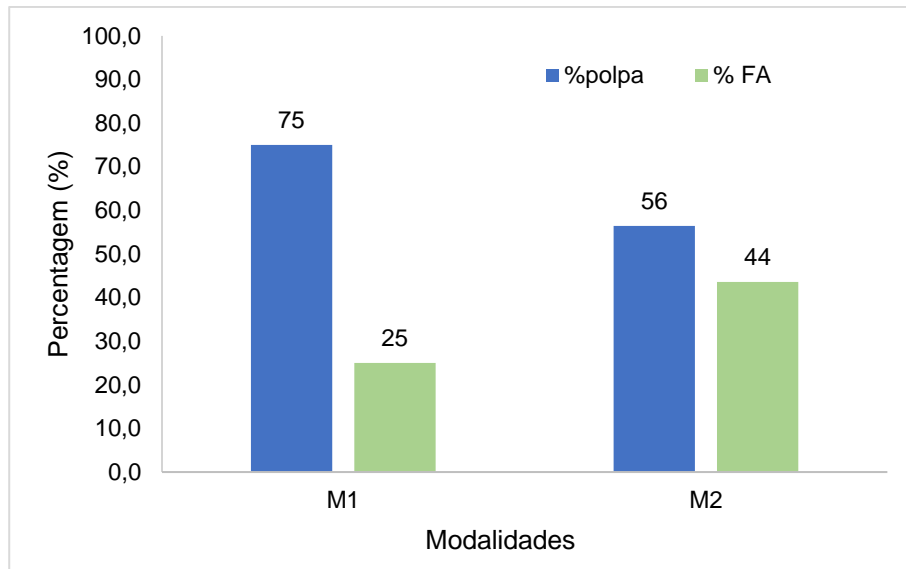


Figura 35. Percentagem de sintomas na polpa e na fossa apical nos frutos analisados em laboratório por modalidade. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

A maior incidência de *S. vesicarium*, como já foi referido, encontra-se na modalidade M2. Quando comparada à diversidade de fungos encontrados nas placas de Petri como resultado dos isolamentos, coincide com a maior percentagem de *S. vesicarium* que se encontra também na modalidade M2, com 61,5%. Em ambas as modalidades obtemos valores elevados de *Alternaria sp.* sendo de realçar na modalidade M1 46,3% versus 48,1% de *S. vesicarium*. Nesta modalidade estes dois fungos apresentam uma percentagem bastante próxima sugerindo que ambos desempenham um papel importante na causa dos sintomas observados (Figura 36 e Figura 37).

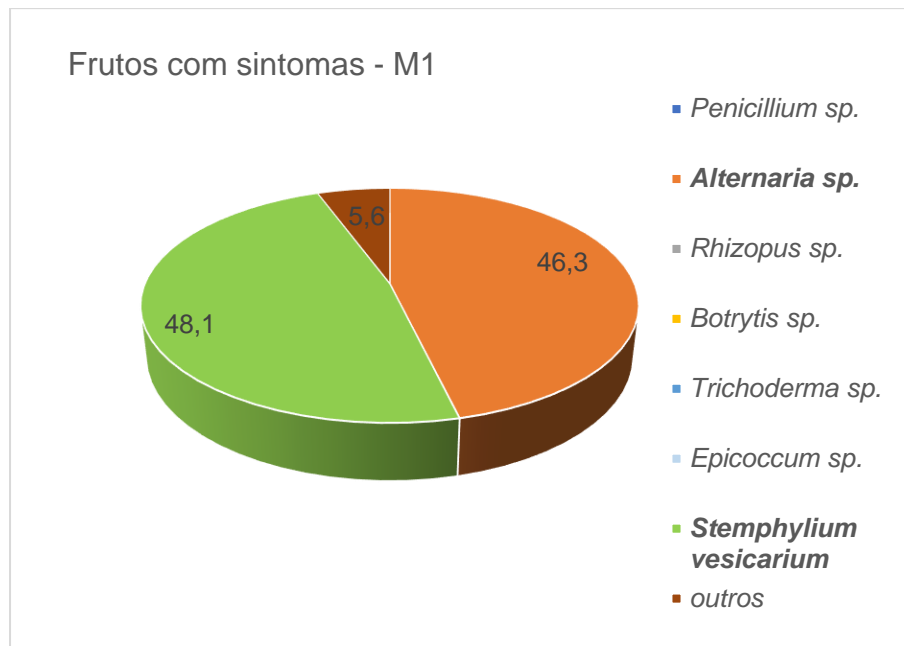


Figura 36. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nos frutos com sintomas para a modalidade M1. M1: testemunha ou estratégia do agricultor.

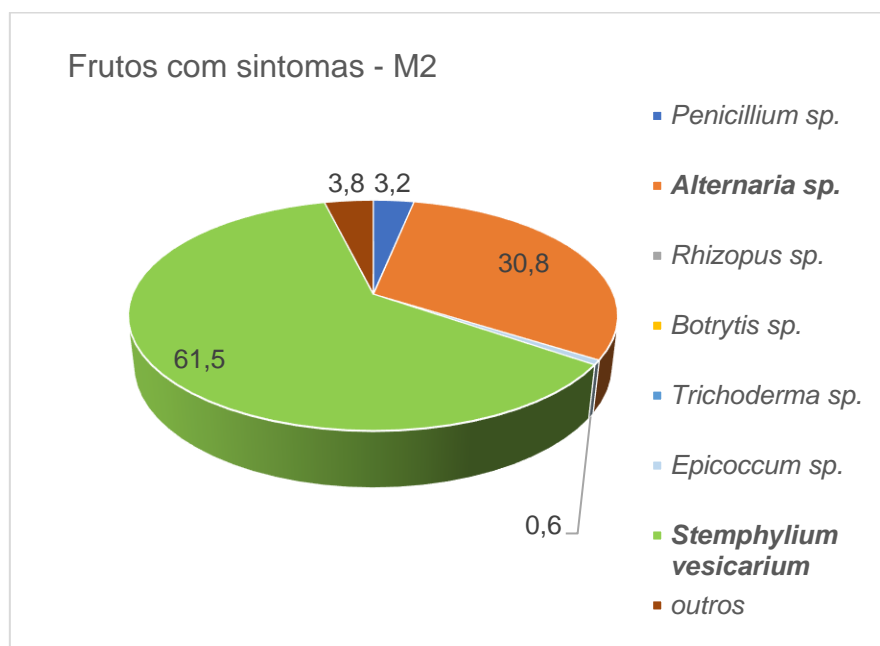


Figura 37. Diversidade de fungos identificados a partir dos isolamentos nos frutos com sintomas para a modalidade M2. M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature.

Para avaliar a qualidade dos frutos antes e depois de submetidos a um período em câmara de frio, usou-se os parâmetros grau Brix e dureza. Os resultados foram semelhantes entre modalidades, apenas com destaque para as durezas que baixaram e o grau Brix aumentou, desde a primeira observação, o que é normal no processo de conservação da fruta (Figura 38 e Figura 39).

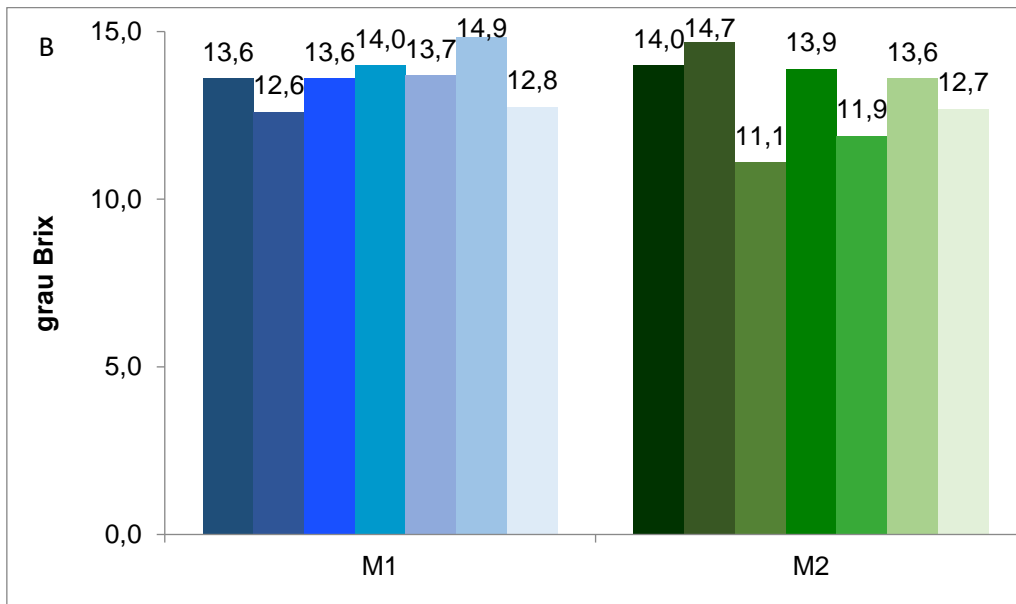
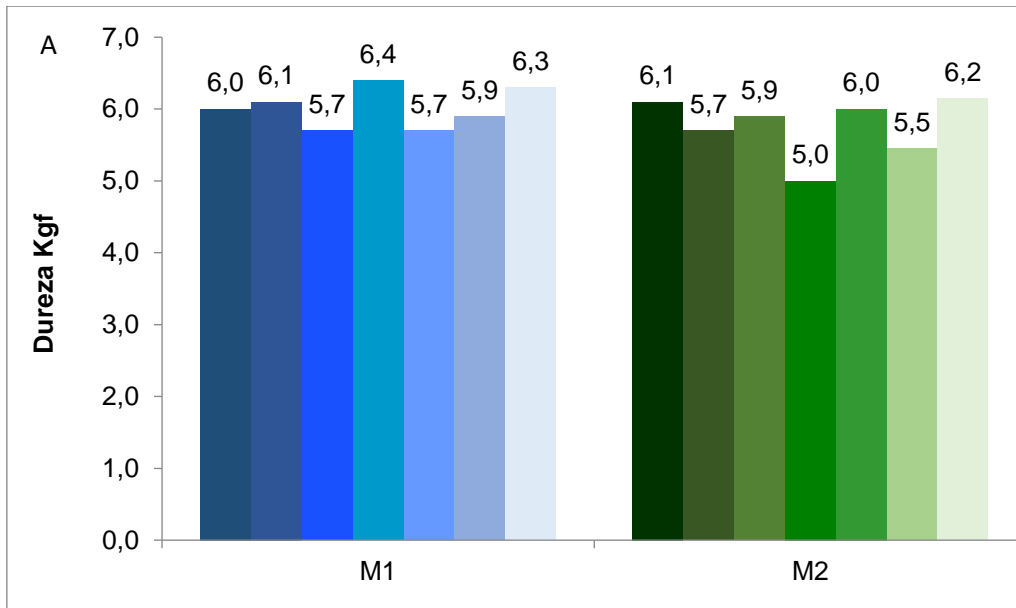


Figura 38. Parâmetros de qualidade medidos à colheita, A- Dureza B- grau Brix. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature (n=7).

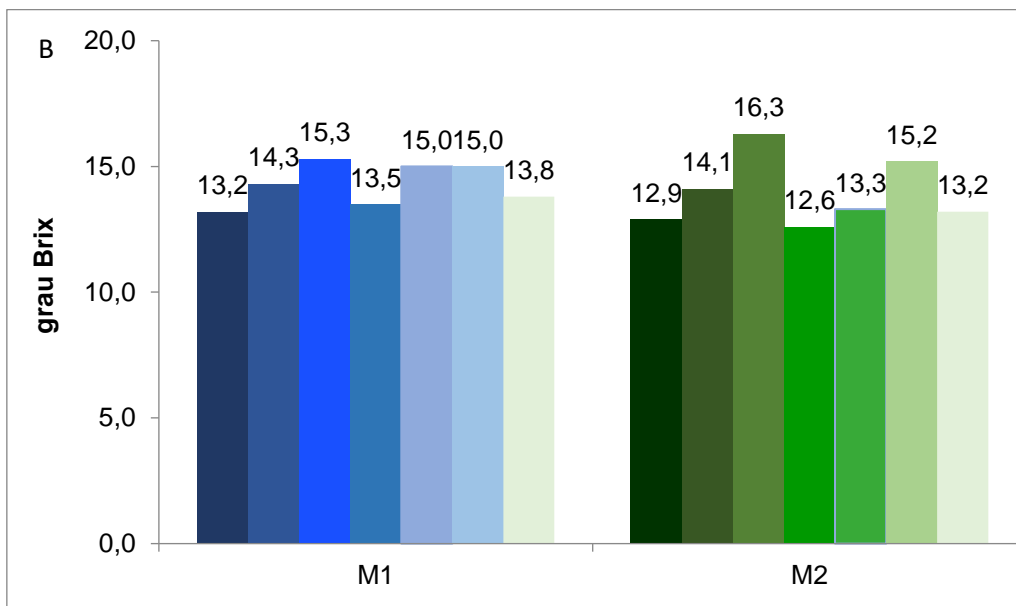
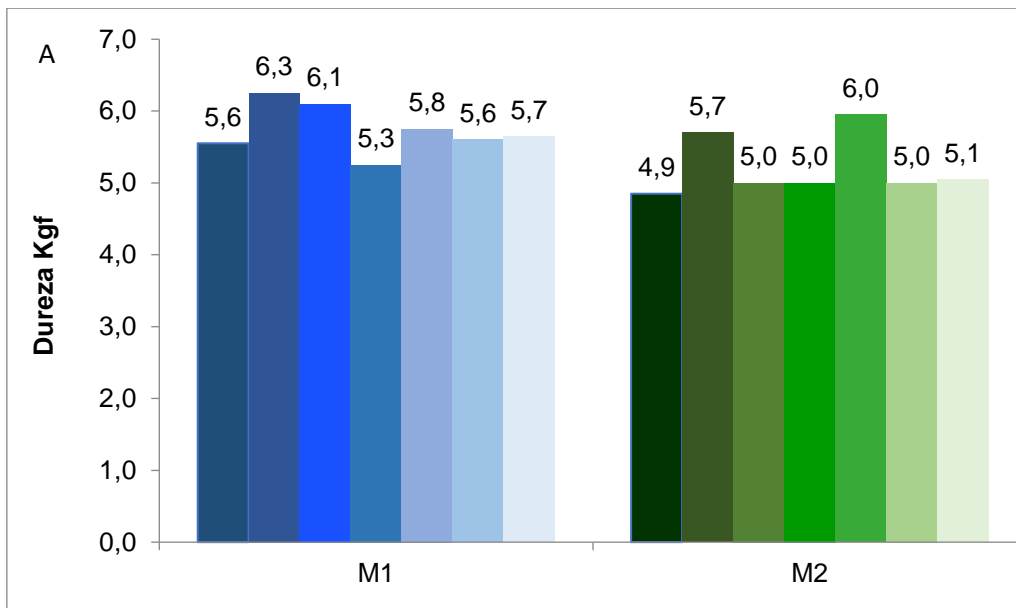


Figura 39. Parâmetros de qualidade medidos após conservação em frio, A- Dureza B- grau Brix. M1: testemunha ou estratégia do agricultor, M2: parcela Idai, estratégia do agricultor mais três produtos da gama Idai Nature (n=7).

5. Discussão

A estenfiliose foi detetada em todos os órgãos da pereira desde a floração até à colheita. Nas amostras de lenha de poda e de folhas do ano anterior também se identificaram pústulas com esporos de *S. vesicarium* e *Alternaria* sp., comprovando que o inóculo persiste no pomar de um ano para o outro (Llorente & Montesinos, 2006).

As condições meteorológicas são chave para ocorrerem infeções. Diferentes autores defendem que com as condições ideais de temperatura, humidade relativa e duração do período de humectação o fungo desenvolve-se rapidamente e obtém a capacidade de provocar sintomas (Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

Desta forma, podemos dividir o período vegetativo da campanha de 2019 em dois momentos distintos. O primeiro momento, desde a floração até ao final de junho, que coincidiu com as colheitas das amostras relativas às flores, frutos com 12-14 mm e infestantes, onde se verificou valores de incidência e severidade baixas para as amostras e em que ocorreram condições meteorológicas adversas à ocorrência de infeções. E, o segundo momento, que decorreu desde finais de junho até à colheita, durante o qual ocorreram longos períodos com elevada humidade relativa, várias horas de humectação e temperaturas amenas que permitiram a colonização dos órgãos da parte aérea da árvore, nomeadamente os frutos, provocando manchas e conseqüentemente aumentasse a incidência e severidade relativamente às amostras anteriores.

No ensaio do GO “ProtectEstenfilio”, a modalidade testemunha (M1) ostenta os valores de incidência e severidade mais elevados para todas as amostras excetuando para as folhas, dentro de resultados estatísticos não significativos. Este resultado é o expectável uma vez que não foi realizada qualquer intervenção ao nível do solo, e tendo em conta que o coberto vegetal e resíduos da cultura são repositório de *Stemphylium vesicarium* e representam uma importante fonte de inóculo para a pereira (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006; Köhl *et al.*, 2013).

As modalidades M2 (remoção do material vegetal) e M3 (aplicação de CONDOR SHIELD) são as que apresentam os valores mais reduzidos para os parâmetros da incidência e severidade, em todas as amostras analisadas. Este é um resultado promissor, que requer mais anos de ensaios, mas vai de encontro a outros trabalhos científicos onde a remoção do material vegetal e a aplicação de *Trichoderma* sp. ao solo obtiveram resultados positivos. Llorente *et al.* (2010) dizem que a redução de inóculo pode ir até 60% e Patteri *et al.* (2008) realizaram estudos onde a aplicação de *Trichoderma* sp. ao solo reduziu o número de conídios, através da limitação da fase saprófita do *S. vesicarium*.

Sendo este o segundo ano de ensaios no âmbito do GO “Protectestenfilio”, estas duas modalidades já contam com o efeito cumulativo das operações que estão a ser realizadas. Isto é, o segundo ano de remoção do material vegetal e da aplicação e colonização do solo por parte *Trichoderma* sp. podem estar a influenciar positivamente a redução de inóculo potencial de *S. vesicarium* no pomar. Llorente *et al.* (2008) defendem que a remoção dos restos de folhas, frutos e ramos do pomar em conjunto com a aplicação de *Trichoderma* sp. ao solo demonstraram ser os métodos mais eficazes para controlo da estenfiliose.

Na campanha de 2018/2019 a grande maioria dos sintomas de estenfiliose, no mesmo pomar em que se realizaram estes ensaios, encontravam-se na fossa apical, indo de encontro com os resultados das flores que apresentavam valores mais elevados tanto de incidência como de severidade. Na campanha de 2019/2020, os resultados das flores, como já foi referido, apresentam incidências de *S. vesicarium* mais baixas, implicando uma menor percentagem de sintomas na fossa apical.

Tal como já se suspeitava, outros fungos podem estar associados às manchas que no campo visualmente se aliam à estenfiliose. Isidoro & Azevedo (2005a) e Köhl *et al.* (2009b), já colocaram a hipótese de existirem outros agentes patogénicos a provocar manchas semelhantes às da estenfiliose causadas por fungos como, *Gymnosporangium* sp., *Septoria* sp., *Pseudomonas* sp. e *Alternaria* sp. Nos ensaios realizados, identificou-se *Alternaria* sp., nos frutos com sintomas, em todas as modalidades em estudo, inclusivamente, na modalidade M4 com uma percentagem superior à de *S. vesicarium*. Neste contexto, é importante perceber se outras espécies de fungos se associam ao *S. vesicarium* transformando a doença das manchas castanhas numa doença complexa causada por um complexo de fungos de diversas espécies (Santos, 2019).

Os resultados apurados no ensaio da Idai Nature não permitiram chegar a uma conclusão significativa sobre o efeito dos produtos no controlo da estenfiliose. Obtiveram-se valores semelhantes de incidência e severidade de *S. vesicarium* tanto nas flores como nos frutos com sintomas em ambas as modalidades. Além disto, a identificação dos fungos realizada nos frutos com sintomas coincidiu com os resultados obtidos no ensaio do GO, em que obtivemos igualmente uma percentagem elevada de *Alternaria* sp. nos isolamentos efetuados em laboratório.

Os dois ensaios que compõem este trabalho revelam que não é só o patógeno *S. vesicarium* que se tem de ter em conta no controlo da doença das manchas castanhas. Ademais, as condições meteorológicas, nomeadamente a temperatura amena e humidade relativa elevada, condicionam de forma significativa o desenvolvimento da doença e os parâmetros da incidência e severidade.

6. Conclusões

O objetivo principal deste trabalho consistia na monitorização da estenfiliose através dos parâmetros da incidência e severidade em dois ensaios de campo da FRUTOESTE, CRL.

No ensaio ProtecEstenfilio podemos retirar algumas conclusões interessantes no decorrer do segundo ano de projeto. A modalidade M2 obteve a incidência e severidade mais baixas para a amostra dos frutos com sintomas e das folhas, enquanto a modalidade M3 possui os resultados de incidência e severidade mais baixos para as amostras dos frutos com 12-14 mm e flores. Perante estes resultados é espectável que o efeito cumulativo das operações culturais que se realizam nas modalidades, particularmente na M2 e M3 se comecem a evidenciar.

Quanto ao ensaio Idai Nature concluímos que um ano de ensaios é curto para se tirarem conclusões concretas e definitivas sobre a estratégia de produtos utilizada. As incidências de estenfiliose para as duas modalidades foram elevadas, não demonstrando efeito dos três produtos usados na modalidade correspondente (M2), continuação dos ensaios de campo, poderá ser interessante analisar se a calendarização e concentração dos produtos utilizados é a mais indicada.

Nos dois ensaios conclui-se que as condições meteorológicas influenciaram bastante a ocorrência de infeções e conseqüentemente a incidência de estenfiliose. Os sintomas na polpa das peras foram dominantes e resultado de infeções que ocorrem a partir de junho.

Com os resultados obtidos nesta dissertação revela-se imperativo perceber a relação, caso exista, entre a *Alternaria* sp. e o *Stemphylium vesicarium* além de compreender o seu envolvimento no aparecimento da doença das manchas castanhas.

7. Referências Bibliográficas

- Ahmad, T., Moosa, A., Farzand, A., Wang, G. & Liu, Y. (2019). First Report of Postharvest Stemphylium Rot of Mango (*Mangifera indica*) Caused by *Stemphylium vesicarium* in Pakistan. *Plant Disease* 103: 3277.
- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D. & Brunelli, A. (2005). Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 113: 211-219.
- Alberoni, G., Cavallini, D., Collina, M. & Brunelli, A. (2010). Characterisation of the first *Stemphylium vesicarium* isolates resistant to strobilurins in Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 126: 453-457.
- Amaro, P. (2003). A luta física e cultural, meios diretos de luta. *A Proteção Integrada*. ISA/Press, Lisboa, Portugal, 123-127.
- ANP (2019a). Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha [<http://perarocha.pt/perarocha/#dop>] (Acedido em 14 de novembro de 2019).
- ANP (2019b). Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha [<http://perarocha.pt/anp/#quem>] (Acedido em 14 de novembro de 2019).
- Cavaco, M. (2016). Guia de Produtos Fitofarmacêuticos – Lista dos Produtos com Autorização de Venda. DGAV Lisboa, Portugal.
- Cavanni, P. & Ponti, I. (1994). Maculatura bruna del pero: una micopatia sempre d'attualità. *Rivista di Frutticoltura* 12: 37-42. (cit. Santos, 2019).
- Comporta, T., Reis, P., Mota, M., Oliveira, C. & Rego, C. (2017). Estenfiliose da Pêra Rocha (Parte 1). *Frutas, Legumes e Flores* 173: 44-45.
- de Jong, P.F., Heijne, B. & Boshuizen, A. (2005). Test of fungicides against *Stemphylium vesicarium* on pear with or without a warning system. *Acta Horticulturae* 671: 615-620.
- DGAV (2019). Direção Geral de Agricultura e Veterinária [http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/guia/finalidades_guia/Insec&Fung/Culturas/pereira.htm] (Acedido em 07 de dezembro de 2019).
- Diogo, E., Sánchez, C., Leão, M. & Sousa, R. (2017). A Estenfiliose da Pereira Rocha em Portugal. *Agrotec* 24: 46-48.

Elias, A. (2015). Pós-colheita de pera Rocha e limão numa central fruteira. MSc, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 73p.

Gomes, P. (2015). *Contributo para o estudo da influência da fertilização na incidência de Estenfiliose em pereira 'Rocha'*. MSc, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 99p.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

INE (2017/2018). Instituto Nacional de Estatística [<https://www.ine.pt/>] (Acedido em 14 de novembro de 2019).

INE (2019). Previsões Agrícolas 31 de julho de 2019. *Destaque à comunicação social*, 4-5.

InfoAgro (2010). Pera – Filoxera [<https://infoagro.cothn.pt/portal/index.php?id=1320>] (Acedido em 21 de dezembro de 2019).

Isidoro, N. & Azevedo, J. (2005a). Estenfiliose (*Stemphylium vesicarium*) da pereira rocha, na região oeste. *Manual técnico de proteção integrada de pera 'Rocha'*. Cadaval: Projeto AGRO nº1, 87-98.

Isidoro, N. & Azevedo, J. (2005b). Avaliação do controlo de estenfiliose (*Stemphylium vesicarium*) em pereira cv. Rocha, através de estratégias convencionais e de um modelo (BSPcast), na região Oeste. *Manual técnico de proteção integrada de pera 'Rocha'*. Cadaval: Projeto AGRO nº1, 99-105.

Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B.H., De Geijn, H.G., Speksnijder, A., Kastelein, P., De Hoog, S. & Van Den Ende, B.G. (2009a). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124: 151-162.

Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B.H., Kastelein, P., Rossi, V. & Waalwijk, C. (2009b). Quantitative Detection of Pear-Pathogenic *Stemphylium vesicarium* in Orchards. *Phytopathology* 99: 1377-1386.

Köhl, J., De Jong, P.F., Kastelein, P., Groenenboom-de Haas, B.H., Anbergen, R.H.N., Balkhoven, H. & Wubben, J.P. (2013). Dynamics of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in necrotic plant residues in Dutch pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 17: 609-619.

- Llorente, I. & Montesinos, E. (2002). Effect of Relative Humidity and Interrupted Wetness Periods on Brown Spot Severity of Pear Caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99-104.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown Spot of Pear: An Emerging Disease of Economic Importance in Europe. *Plant Disease* 90: 1368-1375.
- Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P. & Montesinos, E. (2008). Evaluation of New Methods in Integrated Control of Brown Spot of Pear (*Stemphylium vesicarium*, Teleomorph *Pleospora allii*). *Acta Horticulturae* 800: 825-832.
- Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P., Patteri, E., Bugiani, R., Rossi, V. & Montesinos, E. (2010). Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *European Journal of Plant Pathology* 128: 127-141.
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L. & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees* 26: 239-245.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiana, R., Cavanni, P. & Brunelli, A. (1995). Development and Evaluation of an Infection Model for *Stemphylium vesicarium* on Pear Based on Temperature and Wetness Duration. *Phytopathology* 85: 586-592.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. & Beer, S.V. (1996). Antagonismo of Selected Bacterial Strains to *Stemphylium vesicarium* and Biological Control of Brown Spot of Pear Under Controlled Environment Conditions. *Phytopathology* 86: 856-863.
- Oliveira, A.B., Barata, A., Prates, A., Mendes, F., Bento, F. & Cavaco, M. (2014). *Proteção Integrada das Culturas – Volume 1 conceitos e princípios gerais*. DGAV Lisboa, Portugal, 121p.
- Patteri, E., Bugiani, R., Antoniaci, L. & Rossi, V. (2008). Controllo integrato della maculatura bruna del pero. *Giornate Fitopatologiche* 2: 177-184.
- Pereira, V.T., Sousa, L., Sousa, A.T. & Pais, M.S. (2015). Mechanisms of resistance/tolerance of *Pyrus communis* to *Stemphylium vesicarium*. A transcriptome analysis. *Agroforest Syst* 89: 991-1017.
- Ponti, I. & Cavanni, P. (1983). Indagine preliminare sulla fitotossicità di filtrati colturali di *Stemphylium vesicarium* agente della “maculatura bruna” del pero. *Informatore Fitopatologico*. 9: 55-57. (cit. Santos, 2019).

- Puig, M., Moragrega, C., Ruz, L., Montesinos, E. & Llorente, I. (2014). Postinfection Activity of Synthetic Antimicrobial Peptides Against *Stemphylium vesicarium* in Pear. *Phytopathology* 104: 1192-1200.
- Puig, M., Moragrega, C., Ruz, L., Montesinos, E. & Llorente, I. (2015). Controlling Brown Spot of Pear by a Synthetic Antimicrobial Peptide Under Field Conditions. *Plant Disease* 99: 1816-1822.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S. & Bugiani, R. (2005a). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology* 111: 361-370.
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S. & Natali, P. (2005b). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. *Aerobiologia* 21: 203-216.
- Rossi, V. & Patteri, E. (2009). Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biological Control* 49: 52-57.
- Santos, R.R. (2019). *Incidência e severidade de Estenfiliose em pereira Rocha no Oeste e avaliação da eficácia biológica de fungicidas*. MSc, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 83p.
- Silva, S. (2011). *Caracterização de fungos do género Stemphylium associados a pomóideas em Portugal*. MSc, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 89p.
- Simmons, E.G. (1967). Typication of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
- Simmons, E.G. (1969). Perfect stages of *Stemphylium* IV. *Mycologia* 61: 1-26.
- Simões, J.S. (2005). *Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura*. 1ed. Porto, Portugal, 104p.
- Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K. (1999). Purification and Biological Characterization of Host-Specific SV-Toxins from *Stemphylium vesicarium* Causing Brown Spot of European Pear. *Phytopathology* 89: 947-953.
- Singh, P., Park, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K. (2000). Effects of host-selective SV-Toxin from *Stemphylium vesicarium*, the

cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. *Phytopathology* 148: 87-93. (cit. Santos, 2019).

Sousa, A.J. T, Oliveira, H., Rego, C., Sousa, R., Valdivieso, T., Godinho, J.C. & Branco, J. Q. (1998). *Stemphyliose da pereira em Portugal*. In Actas da 2ª Reunião Bienal da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Oeiras, Portugal, 24-25 Setembro, 68-75.

Sousa, A.J.T., Pina, A.M. & Sousa, A.L.M. (2004). *A Stemphyliose da pereira Rocha em Portugal – Perspetivas para o seu controlo*. 1ed. Alcobaça, Portugal: AVAPI - Associação para a valorização agrícola em produção integrada, 39p.

Tavares, CMSR. (1990). *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons: agente da “maculatura bruna” na pereira. Trabalho da disciplina de Patologia Vegetal. ISA. Lisboa. 31p. (cit. Santos, 2019).

Vicente, P., Pereira, J.H. & Sousa, R.M.M. (2017). Influência do ponto de enxertia no vigor e na produção da pereira ‘Rocha’/Sydo. *Vida Rural* 1824: 34-37.

Anexos

Anexo 1. Protocolo OEPP PP/05

- Método de observação:

Em cada modalidade, ao longo das 2 filas centrais para as observações de campo, selecionar 4 grupos de 2 árvores distribuídos espacialmente ao longo dessas filas, constituindo 1 grupo por 2 árvores contíguas onde se realiza a observação.

Em cada uma das 2 árvores por grupo, observar 25 frutos contíguos em cada lado das copas, perfazendo um total de 100 frutos. No caso, das 2 árvores contíguas não tiverem os frutos necessários poder-se-á observar numa 3^a ou 4^a árvore contígua às primeiras.

Na observação, em cada 25 frutos, quantificar o número de frutos com ou sem manchas de Estenfiliose segundo a tipologia de severidade seguinte:

Nível 1: ausência de sintomas.

Nível 2: até 3 manchas no fruto.

Nível 3: mais de 3 manchas no fruto.

Anexo 2. Tratamentos fungicidas efetuados nas quatro modalidades

Data	Nome comercial	Substância ativa	Dose (l ou kg/ha)		IS (dias)	Formulação	Grupo químico	Modo de ação
01/04/2019	Cerimónia	difenoconazol	0,15	l	14	EC	triazol	preventivo e curativo
01/04/2019	Equador	ciprodinil	0,5	kg	60	WG	anilinopirimidinas	preventivo
12/04/2019	Luna experience	fluopirame + tebuconazol	0,75	l	14	SC	benzamida-piridina + triazol	preventivo e curativo
22/04/2019	Bravo 500	clortalonil	2	l	21	SC	cloronitrilo	preventivo
29/04/2019	Bravo 500	clortalonil	2	l	21	SC	cloronitrilo	preventivo
06/05/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo
13/05/2019	Fox WG Advance	tebuconazol	0,75	kg	21	WG	triazol	preventivo e curativo
22/05/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo
22/05/2019	Alfil WG	fosetil - alumínio	2,5	kg	15	WG	fosfonato	preventivo
03/06/2019	Polyram DF	metirame	2	kg	28	WG	ditiocarbamatos	preventivo
13/06/2019	Stroby WG	cresoxime-metilo	0,2	kg	28	WG	estrobilurina	Preventivo, curativo e anti-esporulante
26/06/2019	Bellis	boscalide + piraclostrobina	0,8	kg	7	WG	carboximida + estrobilurina	preventivo e curativo
23/07/2019	Scala	pirimetanil	0,75	l	14	SC	anilinopirimidinas	preventivo e curativo

Anexo 3. Base de dados FRUTOESTE, colheitas de 2019 - ProtectEstenfilio

Modalidade	Material vegetal	nº flor/fruto/folha	Severidade	Incidência
1	1ªflores	1	25	100
1	1ªflores	2	50	100
1	1ªflores	3	25	100
1	1ªflores	4	0	0
1	1ªflores	5	25	100
1	1ªflores	6	0	0
1	1ªflores	7	0	0
1	1ªflores	8	0	0
1	1ªflores	9	50	100
1	1ªflores	10	25	100
1	1ªflores	11	0	0
1	1ªflores	12	0	0
1	1ªflores	13	0	0
1	1ªflores	14	25	100
1	1ªflores	15	0	0
1	1ªflores	16	0	0
2	1ªflores	1	25	100
2	1ªflores	2	0	0
2	1ªflores	3	25	100
2	1ªflores	4	0	0
2	1ªflores	5	0	0
2	1ªflores	6	0	0
2	1ªflores	7	50	100
2	1ªflores	8	0	0
2	1ªflores	9	25	100
2	1ªflores	10	0	0
2	1ªflores	11	0	0
2	1ªflores	12	0	0
2	1ªflores	13	25	100
2	1ªflores	14	50	100
2	1ªflores	15	0	0
2	1ªflores	16	0	0
3	1ªflores	1	25	100
3	1ªflores	2	0	0
3	1ªflores	3	25	100
3	1ªflores	4	0	0
3	1ªflores	5	0	0
3	1ªflores	6	50	100
3	1ªflores	7	25	100
3	1ªflores	8	25	100
3	1ªflores	9	0	0
3	1ªflores	10	0	0
3	1ªflores	11	0	0
3	1ªflores	12	0	0
3	1ªflores	13	0	0
3	1ªflores	14	0	0
3	1ªflores	15	0	0
3	1ªflores	16	0	0
4	1ªflores	1	25	100
4	1ªflores	2	0	0
4	1ªflores	3	0	0
4	1ªflores	4	0	0
4	1ªflores	5	25	100
4	1ªflores	6	0	0
4	1ªflores	7	25	100
4	1ªflores	8	50	100
4	1ªflores	9	25	100
4	1ªflores	10	0	0

Anexo 3. Base de dados FRUTOESTE, colheitas de 2019 – ProtectEstenfilio (cont.)

Modalidade	Material vegetal	nº flor/fruto/folha	Severidade	Incidência
4	1ªflores	11	0	0
4	1ªflores	12	0	0
4	1ªflores	13	0	0
4	1ªflores	14	0	0
4	1ªflores	15	25	100
4	1ªflores	16	0	0
1	1º frutos	1	50	100
1	1º frutos	2	0	0
1	1º frutos	3	0	0
1	1º frutos	4	0	0
1	1º frutos	5	0	0
1	1º frutos	6	0	0
1	1º frutos	7	0	0
1	1º frutos	8	0	0
1	1º frutos	9	25	100
1	1º frutos	10	0	0
1	1º frutos	11	0	0
1	1º frutos	12	25	100
1	1º frutos	13	0	0
1	1º frutos	14	25	100
1	1º frutos	15	0	0
1	1º frutos	16	0	0
2	1º frutos	1	0	0
2	1º frutos	2	0	0
2	1º frutos	3	0	0
2	1º frutos	4	25	100
2	1º frutos	5	0	0
2	1º frutos	6	25	100
2	1º frutos	7	0	0
2	1º frutos	8	0	0
2	1º frutos	9	0	0
2	1º frutos	10	0	0
2	1º frutos	11	0	0
2	1º frutos	12	0	0
2	1º frutos	13	0	0
2	1º frutos	14	0	0
2	1º frutos	15	0	0
2	1º frutos	16	0	0
3	1º frutos	1	0	0
3	1º frutos	2	0	0
3	1º frutos	3	0	0
3	1º frutos	4	0	0
3	1º frutos	5	25	100
3	1º frutos	6	0	0
3	1º frutos	7	0	0
3	1º frutos	8	0	0
3	1º frutos	9	0	0
3	1º frutos	10	0	0
3	1º frutos	11	25	100
3	1º frutos	12	25	100
3	1º frutos	13	25	100
3	1º frutos	14	0	0
3	1º frutos	15	25	100
3	1º frutos	16	0	0
1	3º frutos	1	75	100
1	3º frutos	2	75	100
1	3º frutos	3	75	100

Anexo 3. Base de dados FRUTOESTE, colheitas de 2019 – ProtectEstenfilio (cont.)

Modalidade	Material vegetal	nº flor/fruto/folha	Severidade	Incidência
1	3º frutos	4	75	100
1	3º frutos	5	25	100
1	3º frutos	6	25	100
1	3º frutos	7	75	100
1	3º frutos	8	75	100
1	3º frutos	9	100	100
1	3º frutos	10	75	100
1	3º frutos	11	25	100
1	3º frutos	12	100	100
1	3º frutos	13	100	100
1	3º frutos	14	75	100
1	3º frutos	15	75	100
1	3º frutos	16	25	100
2	3º frutos	1	25	100
2	3º frutos	2	0	0
2	3º frutos	3	25	100
2	3º frutos	4	50	100
2	3º frutos	5	0	0
2	3º frutos	6	50	100
2	3º frutos	7	75	100
2	3º frutos	8	100	100
2	3º frutos	9	75	100
2	3º frutos	10	50	100
2	3º frutos	11	25	100
2	3º frutos	12	0	0
2	3º frutos	13	0	0
2	3º frutos	14	0	0
2	3º frutos	15	0	0
2	3º frutos	16	0	0
3	3º frutos	1	25	100
3	3º frutos	2	75	100
3	3º frutos	3	25	100
3	3º frutos	4	0	0
3	3º frutos	5	100	100
3	3º frutos	6	75	100
3	3º frutos	7	25	100
3	3º frutos	8	25	100
3	3º frutos	9	0	0
3	3º frutos	10	0	0
3	3º frutos	11	100	100
3	3º frutos	12	100	100
3	3º frutos	13	75	100
3	3º frutos	14	75	100
3	3º frutos	15	75	100
3	3º frutos	16	0	0
4	3º frutos	1	0	0
4	3º frutos	2	50	100
4	3º frutos	3	75	100
4	3º frutos	4	100	100
4	3º frutos	5	25	100
4	3º frutos	6	75	100
4	3º frutos	7	0	0
4	3º frutos	8	25	100
4	3º frutos	9	0	0
4	3º frutos	10	50	100
4	3º frutos	11	50	100
4	3º frutos	12	50	100
4	3º frutos	13	50	100

Anexo 3. Base de dados FRUTOESTE, colheitas de 2019 – ProtectEstenfilio (cont.)

Modalidade	Material vegetal	nº flor/fruto/folha	Severidade	Incidência
4	3º frutos	14	50	100
4	3º frutos	15	50	100
4	3º frutos	16	25	100
1	folhas	1	50	100
1	folhas	2	25	100
1	folhas	3	0	0
1	folhas	4	0	0
1	folhas	5	0	0
1	folhas	6	25	100
1	folhas	7	0	0
1	folhas	8	0	0
1	folhas	9	0	0
1	folhas	10	0	0
1	folhas	11	50	100
1	folhas	12	0	0
1	folhas	13	25	100
1	folhas	14	50	100
1	folhas	15	0	0
1	folhas	16	0	0
2	folhas	1	0	0
2	folhas	2	50	100
2	folhas	3	0	0
2	folhas	4	0	0
2	folhas	5	0	0
2	folhas	6	25	100
2	folhas	7	0	0
2	folhas	8	0	0
2	folhas	9	0	0
2	folhas	10	0	0
2	folhas	11	0	0
2	folhas	12	0	0
2	folhas	13	0	0
2	folhas	14	0	0
2	folhas	15	25	100
2	folhas	16	0	0
3	folhas	1	25	100
3	folhas	2	25	100
3	folhas	3	0	0
3	folhas	4	25	100
3	folhas	5	0	0
3	folhas	6	25	100
3	folhas	7	25	100
3	folhas	8	0	0
3	folhas	9	25	100
3	folhas	10	0	0
3	folhas	11	0	0
3	folhas	12	50	100
3	folhas	13	25	100
3	folhas	14	25	100
3	folhas	15	0	0
3	folhas	16	0	0
4	folhas	1	0	0
4	folhas	2	0	0
4	folhas	3	0	0
4	folhas	4	0	0
4	folhas	5	0	0
4	folhas	6	0	0

Anexo 3. Base de dados FRUTOESTE, colheitas de 2019 – ProtectEstenfilio (cont.)

Modalidade	Material vegetal	nº flor/fruto/folha	Severidade	Incidência
4	folhas	7	0	0
4	folhas	8	0	0
4	folhas	9	0	0
4	folhas	10	25	100
4	folhas	11	25	100
4	folhas	12	0	0
4	folhas	13	0	0
4	folhas	14	50	100
4	folhas	15	0	0
4	folhas	16	0	0

Anexo 4. Análise de variância e comparação de médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos no ensaio no GO "ProtectEstenfilio"

Incidência e severidade de *S. vesicarium* em flores – análise de variância

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	90000,0	1	90000,00	36,30252	0,000000
"Var1"	1250,0	3	416,67	0,16807	0,917517
Error	148750,0	60	2479,17		

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	8789,06	1	8789,063	30,54299	0,000001
"Var1"	195,31	3	65,104	0,22624	0,877780
Error	17265,63	60	287,760		

Incidência e severidade de *S. vesicarium* em frutos com sintomas – análise de variância

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	390625,0	1	390625,0	250,0000	0,000000
"Var1"	15625,0	3	5208,3	3,3333	0,025272
Error	93750,0	60	1562,5		

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	140625,0	1	140625,0	134,6633	0,000000
"Var1"	11718,8	3	3906,3	3,7406	0,015660
Error	62656,3	60	1044,3		

Incidência e severidade de *S. vesicarium* em frutos com sintomas - comparação de médias dos resultados (Teste Tukey)

Modalidades	Incidência	1	2
2	56	a	
3	75	a	b
4	81	a	b
1	100		b

Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$

Modalidades	Severidade	1	2
2	30	a	
4	42	a	b
3	48	a	b
1	67		b

Os valores afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$

Anexo 4. Análise de variância e comparação de médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos no ensaio no GO "ProtectEstenfilio" (cont.)

Incidência e severidade de *S. vesicarium* em folhas - análise de variância

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	68906,3	1	68906,25	32,91045	0,000000
"Var2"	15468,8	3	5156,25	2,46269	0,071121
Error	125625,0	60	2093,75		

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	7119,14	1	7119,141	26,60584	0,000003
"Var2"	1201,17	3	400,391	1,49635	0,224684
Error	16054,69	60	267,578		

Anexo 5. Espécies e infestantes identificadas e número de exemplares

Espécies de infestantes	Nº de exemplares
<i>Alopercurus myosuroides</i>	1
<i>Ammi majus</i>	1
<i>Atriplex prostata</i>	2
<i>Beta vulgaris</i>	1
<i>Calendula arvensis</i>	1
<i>Cirsium arvensis</i>	1
<i>Convolvulus arvensis</i>	1
<i>Dactylis glomerata</i>	2
<i>Erodium cicutarum</i>	1
<i>Fumaria sepium</i>	2
<i>Hordeum murinum</i>	1
<i>Lavatera cretica</i>	2
<i>Lythrum junceum</i>	1
<i>Matricaria maritima</i>	3
<i>Medicago polymorpha</i>	1
<i>Mentha sp.</i>	1
<i>Picris echioides</i>	3
<i>Poa pratensis</i>	1
<i>Ranunculus sardous</i>	2
<i>Rapistrum rugosum</i>	1
<i>Rumex crispus</i>	4
<i>Rumex sp.</i>	1
<i>Senecio vulgaris</i>	1
<i>Sonchus oleraceus</i>	1
Nº total de espécies identificadas	36