

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

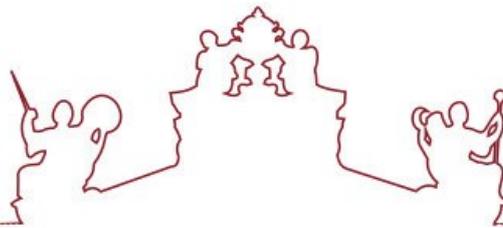
Dissertação

Avaliação do efeito de fungicida sistémico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Carolina Almeida dos Reis Antão

Orientador(es) | Professora Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos
Professora Maria do Rosário Fernandes Félix

Évora 2023



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

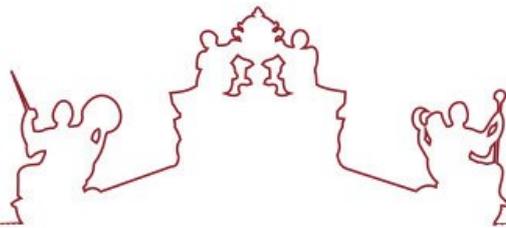
Dissertação

Avaliação do efeito de fungicida sistémico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Carolina Almeida dos Reis Antão

Orientador(es) | Professora Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos
Professora Maria do Rosário Fernandes Félix

Évora 2023



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos (Universidade de Évora) (Orientador)
Maria Doroteia Murteira Rico da Costa Campos (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

Agradeço à Universidade de Évora e aos professores que conheci e fizeram parte do meu percurso académico, em especial, às minhas orientadoras, a Professora Doutor Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos e a Professora Doutor Maria do Rosário Fernandes Félix, pela orientação, disponibilidade, incentivo, apoio e paciência na redação e desenvolvimento escrito e prático da dissertação de mestrado.

Agradeço à empresa Vitacress Portugal, em especial, à minha orientadora Engenheira Clárisse Boto, pela oportunidade de realizar a dissertação e pelo incentivo e apoio incondicional na elaboração da parte prática e escrita da dissertação.

Acredito que não poderia ter melhores orientadoras para conseguir levar esta etapa até ao fim.

Agradeço também à Engenheira Catarina Maria pela ajuda e pelo incentivo dado ao longo deste desafio.

Quero agradecer com todo o meu amor, à minha família, nomeadamente à minha mãe, Ana Almeida, irmãs, Mariana Almeida e Renata Almeida, e à Carolina Silva e Mário Silva que, ao longo destes quase sete anos de universidade, me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus objetivos mesmo que no meio encontrasse obstáculos. Agradeço também ao meu namorado, Miguel Cutileiro, pelo companheirismo, amizade e, por estar sempre ao meu lado ao longo destes anos, apoiando as minhas escolhas e incentivando-me sempre a concluir os objetivos a que me proponho.

Não me posso esquecer também de agradecer aos meus amigos que estiveram sempre presentes em todas as etapas da minha vida principalmente esta que foi considerada uma das etapas mais desafiantes e aos meus colegas, que partilharam o percurso académico, que foram peças fundamentais na construção do meu “eu” profissional e pessoal.

Esta foi uma das etapas mais difíceis do meu percurso académico e poder chegar ao fim deste capítulo da minha vida, faz-me sentir muito orgulhosa daquilo que construí.

RESUMO

O espinafre é uma cultura bastante afetada por fungos de solo que, conseqüentemente, afetam a sua produtividade. Neste trabalho averiguou-se a eficácia do tratamento prévio das sementes com um fungicida sistémico que contém a substância metalaxyl-M no combate às doenças causadas por fungos do solo. Para o efeito realizaram-se quatro ensaios em condições de temperaturas elevadas, com duas variedades diferentes, designadas por vA e vB (por sigilo imposto pela empresa), sendo uma modalidade com tratamento fúngico da semente (T) e a modalidade controlo (NT) sem tratamento. Neste estudo, também se realizaram análises qPCR ao solo que foram correlacionadas com a avaliação visual de sintomas sugestivos de infeção por agentes fitopatogénicos do solo. Concluiu-se que, as espécies *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* poderão ter causado os sintomas sugestivos observados nas plantas. Este estudo também permitiu concluir que o tratamento prévio das sementes, até ao momento, é a solução mais eficaz no controlo de fungos de solo.

Palavras-chave: *Damping-off*; Espinafre (*Spinacia oleracea* L.); Nutrição da planta; Temperaturas; Tratamento de semente.

Evaluation of the effect of systemic fungicide in the pre-treatment of spinach seeds (*Spinacia oleracea* L.), to control plant losses at crop establishment during the hot season

ABSTRACT

Spinach is a crop greatly affected by soilborne fungi, which consequently decreases its productivity. This work investigated the effectiveness of pre-treatment of seeds with a systemic fungicide containing the substance metalaxyl-M in combating diseases caused by soilborne fungi. For this purpose, four trials were conducted under high temperature conditions, with two different varieties, designated vA and vB (for company confidentiality). Being one modality with fungal seed treatment (T) and the control modality (NT) without treatment. In this study, soil qPCR analyses were also performed and correlated with visual assessment of symptoms suggestive of infection by soilborne phytopathogens. It was concluded that *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* species may have caused the suggestive symptoms observed on the plants. This study also concluded that seed pre-treatment, so far, is the most effective solution for controlling soilborne fungi.

Keywords: *Damping-off*; Plant nutrition; Seed treatment; Spinach (*Spinacia oleracea* L.); Temperatures.

Índice Geral

Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice de Quadros.....	x
Índice de Figuras	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1. A Cultura do Espinafre	3
2.1.1. Classificação Taxonómica	5
2.1.2. Classificação Botânica e Aspetos Botânicos Com Interesse Agronómico	5
2.1.3. Características Nutricionais	7
2.1.4. Classificação das Variedades	10
2.1.5. Condições Edafoclimáticas no Desenvolvimento Vegetativo e Reprodutivo do Espinafre	12
2.1.5.1. Fases de Desenvolvimento e Crescimento da Cultura do Espinafre	12
2.1.5.2. Tipo de Solo.....	14
2.1.5.3. Fertilização	14
2.1.5.4. Necessidades Hídricas	15
2.2. Descrição de uma Cultura de Espinafre Produzida para “Baby Leaf”	16
2.3. Os Nitratos.....	18
2.4. Testes de Germinação de Sementes	20
2.5. Matéria Fresca (MF) e Matéria Seca (MS).....	22
2.6. Tratamento de Sementes Realizados no Controlo de Doenças de Solo.....	23
2.7. Doenças Causadas por Microrganismos Patogénicos do Solo	26
2.7.1. Efeitos de Fatores Abióticos no Desenvolvimento de Doenças.....	27
2.7.1.1. Efeito da Temperatura	27
2.7.1.2. Efeito da Humidade.....	27
2.7.1.3. Efeito dos Nutrientes	28
2.7.2. Efeitos de Fatores Bióticos no Desenvolvimento de Doenças	29
2.7.3. Doenças Causadas por Organismos Pertencentes ao Filo Oomicota.....	31
2.7.3.1 <i>Pythium</i> spp.....	31

2.7.3.1.1. Sintomas	32
2.7.3.1.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	33
2.7.3.2. <i>Phytophthora</i> spp.	35
2.7.3.2.1. Sintomas	36
2.7.3.2.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	36
2.7.4. Doenças Causadas por Fungos Pertencentes ao Filo Deuteromicota	38
2.7.4.1. <i>Alternaria</i> spp.	39
2.7.4.1.1. Sintomas	39
2.7.4.1.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	41
2.7.4.2. Fungos Causadores de Murchidões Vasculares e Podridão Radicular e do Colo	43
2.7.4.2.1. <i>Fusarium</i> spp.	44
2.7.4.2.1.1. Sintomas	44
2.7.4.2.1.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	46
2.7.4.2.2. <i>Verticillium</i> spp.	49
2.7.4.2.2.1. Sintomas	49
2.7.4.2.2.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	51
2.7.4.3. <i>Sclerotinia</i> spp.	53
2.7.4.3.1. Sintomas	53
2.7.4.3.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	54
2.7.5. Doenças Causadas por Fungos Pertencentes ao Filo Basidiomicota	56
2.7.5.1. <i>Rhizoctonia</i> spp.	57
2.7.5.1.1. Sintomas	57
2.7.5.1.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida	59
2.7.6. Gestão de Doenças Causadas por Fungos Fitopatogénicos	61
3. Materiais e Métodos	66
3.1. Testes de Germinação de Semente	66
3.1.1. Resultados Obtidos a Partir dos Testes de Germinação	66
3.1.1.1. Percentagem de Germinação (%) ou Faculdade Germinativa (%)	67
3.1.1.2. Energia Germinativa (%)	67
3.1.1.3. Pureza (% de peso)	67
3.1.1.4. Valor Cultural (%)	68
3.2.1. Localização dos Ensaios	68
3.2.2. Caracterização Edafoclimática	69
3.2.2.1. Caracterização Pedológica	69

3.2.2.2. Caracterização Climática.....	69
3.2.3. Delineamento dos Ensaios de Campo.....	70
3.3. Colheita e Análise de Amostras de Solo para a Deteção de Fungos de Solo.....	71
3.4. Avaliação Visual de Plantas Doentes e Observação de sintomas de Doença.....	72
3.5. Determinação da Matéria Fresca e da Matéria Seca	72
3.6. Colheita e Análise de Amostras de Folhas para Avaliação do Estado Nutricional.....	73
3.7. Produtividade nos Ensaios.....	74
4. Resultados e Discussão	74
4.1. Testes de Germinação de Semente.....	74
4.2. Ensaios de Campo	77
4.3. Colheita e Análise de Amostras de Solo para a Deteção de Fungos de Solo.....	82
4.3.1. Relação da Presença dos Fungos de Solo com Fatores Abióticos.....	86
4.4. Avaliação Visual de Plantas Doentes e Observação de Sintomas de Doença.....	87
4.5. Determinação da Matéria Fresca e da Matéria Seca	92
4.6. Análise do Estado Nutricional de Folhas de Espinafre	93
4.7. Produtividade nos Ensaios.....	95
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	97
6. Referências Bibliográficas	99
7. Apêndices.....	115

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Produção de espinafre a nível mundial em toneladas por ano (Fonte: Adaptado de InfoAgro, 2022).	3
Quadro 2 - Classificação taxonômica da cultura de espinafre (Fonte: Adaptado de Valero, 2020). .	5
Quadro 3 - Composição média do espinafre expressa por 100 g de parte comestível (Fonte: USDA, 2023).	9
Quadro 4 - Características agronômicas e botânicas da semente de espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015).	12
Quadro 5 - Percentagem de germinação (%) e dias para a emergência consoante a temperatura (Fonte: Adaptado de Valero, 2020).	13
Quadro 6 - Temperaturas cardinais para o espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015 e Navarrete, 2006).	13
Quadro 7 - Exportação total de nutrientes pela cultura de espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015).	14
Quadro 8 - Calendarização dos ensaios realizados nos campos BR1 (1ª Sementeira) e BR2 (2ª Sementeira).	70
Quadro 9 - Intervalo de valores considerado “Adequado” de acordo com o nutriente analisado (Fonte: Adaptado de um documento fornecido pelo laboratório, 2022).	73
Quadro 10 - Parâmetros avaliados nos ensaios de germinação da semente de variedade A e variedade B.	74
Quadro 11 - Detecção de fungos fitopatogênicos mediante análise molecular qPCR.	82
Quadro 12 - Matéria seca (MS) (g) obtida em cada ensaio, em ambas as sementeiras.	92
Quadro 13 - Produtividade nos ensaios de espinafre.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Área cultivada (ha), Produção total (t) e Produtividade (t/ha) de espinafre em Portugal nos anos de 2018 a 2020 (Fonte: Adaptado de INE 2018, 2019, 2020 e 2021).	4
Figura 2 - Triângulo da doença com os três fatores que originam a doença nas plantas (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).	29
Figura 3 - Necroses da semente (A), semente de feijão saudável e diversas sementes e plântulas infetadas por <i>Pythium</i> spp. (B) e <i>damping-off</i> de plântulas de pepino infetadas por <i>Pythium</i> spp. (C) (Fonte: Agrios, 2005).	32
Figura 4 - Micélio e estruturas assexuadas (esporângios) num tecido radicular infetado por <i>Pythium</i> spp. (A) (Observação microscópica Ampliação 400x) e estrutura sexuada (oósporo) correspondente a <i>Pythium</i> spp. (Observação microscópica Ampliação 1000x) (B) (Fonte: Agrios, 2005).....	33
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Pythium</i> spp., causando <i>damping-off</i> em pré-emergência (A) e pós-emergência (B) (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).....	35
Figura 6 - Caule morto de uma planta de soja (Fonte: Agrios, 2005).	36
Figura 7 - Estruturas reprodutivas e respetivos esporos assexuados, de resistência e sexuais correspondentes a <i>Phytophthora</i> spp. (Observação microscópica) (Fonte: Adaptado de Abade et al., 2022).....	37
Figura 8 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico <i>Phytophthora</i> spp. (Fonte: Adaptado de Abade et al., 2022).	38
Figura 9 - Plantas de espinafre doentes com sintomas de manchas nas folhas (A), folha doente com manchas pretas características na página superior da folha (B) e manchas pretas características na página inferior de uma folha de espinafre (C) (Fonte: Kipkoge, 2019).	40
Figura 10 - Conídios de <i>Alternaria</i> spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).....	41
Figura 11 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico <i>Alternaria</i> spp. na cultura do tomate (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).	43
Figura 12 - Planta de tomate infetada (descoloração necrótica severa dos tecidos vasculares) (A) e planta de espinafre infetada com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i> (descoloração castanho-escura a preta) (Fonte: Agrios, 2005 (A) e Du Toit et al., 2005 (B)).	45
Figura 13 - Tipo de conídios e conidióforos produzidos pelo fungo mitospórico <i>Fusarium</i> spp. (Fonte: Agrios, 2005).	46
Figura 14 - Macroconídios (A) e microconídios (B) do agente fitopatogénico <i>Fusarium</i> spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias cortesia de (A) R.J. McGovern e (B) R. Cullen, Departamento de Patologia Vegetal, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).	47

Figura 15 - Ciclo da doença da murchidão do <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na cultura do tomate (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).	48
Figura 16 - Corte longitudinal das raízes e coroa (A) e do caule (B) de uma planta de espinafre saudável (esquerda) e de uma planta infetada ((direita) – descoloração castanho-pálida (A)) e microesclerotos no tecido vascular (B) (Fonte: Du Toit et al., 2005).	50
Figura 17 - Sintomas de murchidão causada pelo agente fitopatogénico <i>Verticillium</i> spp. na cultura de espinafre (Fonte: Du Toit et al., 2005).	50
Figura 18 - Conídios inseridos no conidióforo referentes a <i>Verticillium</i> spp. (Observação microscópica) (A) e conídios nos vasos do xilema (Observação microscópica) (B) (Fonte: Berlinger & Powelson, 2000 (A e B)).	51
Figura 19 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico <i>Verticillium</i> spp. (Fonte: Adaptado de Berlinger & Powelson, 2000).	52
Figura 20 - Esclerotos pretos do fungo dentro de um caule de uma planta de tomate (Fonte: Fotografias tiradas por K. Pernezny - Agrios, 2005).	54
Figura 21 - Ciclo de vida da espécie <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).	56
Figura 22 - Apodrecimento da raiz e do caule em plantas de repolho (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).	59
Figura 23 - Micélio típico de <i>Rhizoctonia</i> spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).	59
Figura 24 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico <i>Rhizoctonia</i> spp. (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).	61
Figura 25 - Localização dos ensaios (Campos BR1 e BR2) (Fonte: Google Earth, 2023).	68
Figura 26 - Temperatura do ar (°C) vs. Humidade relativa do ar (%) – 1ª Sementeira (A) e 2ª Sementeira (B).	69
Figura 27 - Percentagem de sementes vA não tratada (A), vA tratada (B), vB não tratada (C), vB tratada (D), germinadas ao longo do tempo.	75
Figura 28 - Germinação e emergência das plântulas (A), aparecimento das primeiras 2 folhas verdadeiras (B), aparecimento das 4 folhas verdadeiras (C) e aparecimento das 6 folhas verdadeiras (D). Na Figura a régua de 20 cm serviu como escala.	77
Figura 29 - Número de plantas perdidas num m ² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT (A), Ensaio 1-vA T (B), Ensaio 2-vB NT (C) e Ensaio 2-vB T (D)).	79
Figura 30 - Número de plantas perdidas num m ² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT (A), Ensaio 1-vA T (B), Ensaio 2-vB NT (C) e Ensaio 2-vB T (D)).	79
Figura 31 - Média de plantas perdidas por <i>damping-off</i> , num m ² (%) no final do ciclo cultural do espinafre na 1ª Sementeira (A) e na 2ª Sementeira (B).	80

Figura 32 - Planta sintomática na fase cotiledonar.....	87
Figura 33 - Plantas sintomáticas após o aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras.	87
Figura 34 - Plantas sintomáticas (primeiro par de folhas - A e com cotilédones - B).....	88
Figura 35 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes (A, B, C e D).	88
Figura 36 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes do ensaio 1 variedade A não tratada (A) e do ensaio 1 variedade A tratada (B).	89
Figura 37 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes do ensaio 2 variedade B não tratada (A) e do ensaio 2 variedade B tratada (B).....	89
Figura 38 - Análise do estado nutricional das folhas de espinafre (2ª Sementeira).	93

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

NO_2^- – Ião Nitrito

NO_3^- – Ião Nitrato

°C – Graus Celsius

B – Boro

BAP – Balança Alimentar Portuguesa

Ca – Cálcio

Cu – Cobre

Fe – Ferro

K – Potássio

MF – Matéria fresca

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

MP – Saladas minimamente processadas

MS – Matéria seca

N – Azoto

NO – Óxido nítrico

NOC – Compostos do tipo N-nitroso

NT – Não tratada

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Fósforo

S – Enxofre

T – Tratada

USDA – Departamento da Agricultura dos Estados Unidos

vA – Variedade A

vB – Variedade B

Zn – Zinco

1. INTRODUÇÃO

A empresa Vitacress teve o seu início em 1951, em Hampshire e em 2008 tornou-se parte do grupo RAR - Sociedade de Controle (Holding), S.A. As áreas de produção, designadas por quintas, estão distribuídas entre Portugal, Reino Unido, Alemanha e Espanha sendo que, a Vitacress Portugal (designada nesta dissertação por Vitacress) situa-se no Sudoeste Alentejano e no Algarve, com 720 hectares de produção, dos quais 90 % ao ar livre. Líder no mercado dos produtos frescos direciona a sua produção para saladas “prontas a comer” e plantas herbáceas aromáticas, designadas por ervas aromáticas, em qualquer época do ano. A nível nacional, a especialização da Vitacress foca-se na produção de folhas *baby*, destacando-se o espinafre como a sua maior cultura. Estas são folhas jovens e, por isso, mais tenras, nutritivas e saborosas e muito apreciadas pelo consumidor. Posteriormente, são vendidas embaladas para o mercado ibérico (Portugal e Espanha) e a granel para o Reino Unido. Para além disso, a empresa é especializada também em produtos como o agrião de água e as plantas aromáticas, o que lhe permite ser um dos líderes europeus no fornecimento de produtos vegetais minimamente processados (Agrios, 2005; Koike et al., 2003; *Vitacress – Naturalmente*, 2023).

A empresa Vitacress opera em três quintas; 1) a Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros na qual se cultiva maioritariamente em modo de produção biológico, destacando-se culturas como as alfaces, o espinafre, a rúcula selvagem, os coentros, a beterraba ‘Bulls Blood’, a acelga, os canónigos, entre outras; 2) a Quinta da Azenha onde para além de algumas das culturas mencionadas anteriormente também se produzem Brássicas (pertencentes à família Brassicaceae), sendo todas as culturas produzidas em modo de produção convencional e 3) a Quinta de Almancil, onde se produziu inicialmente, e se produz atualmente o agrião de água convencional e biológico e as ervas aromáticas. A empresa tenta implementar o Modo de Produção Biológico bem como outras medidas de proteção ambiental. Refira-se que 10 % dos terrenos são orientados para o aumento da biodiversidade através de plantas que produzem alimento e abrigo para várias espécies como insetos e que, deste modo, se tornam auxiliares no controlo de pragas. Todos os dias são um desafio para implementar novas técnicas e novas práticas culturais, no âmbito da sustentabilidade, que permitam um desenvolvimento de novos produtos garantindo, desta forma, a sustentabilidade a vários níveis. É dada uma enorme importância à sustentabilidade, assentando esta em quatro linhas de ação que permitem garantir um impacto positivo, não comprometendo os recursos que serão necessários às gerações futuras (*Vitacress – Naturalmente*, 2023). Deste modo, dedica-se ao cultivo sustentável, processamento e distribuição de produtos frescos de qualidade (Vitacress, 2019).

O espinafre, cultura mais produzida pela Vitacress, tem muitas perdas de plantas em campo. Esta cultura tem uma grande importância para a empresa, até porque é a mais utilizada nas saladas minimamente processadas (MP). Habitualmente, as folhas “baby leaf” são vendidas no que se designa como produtos minimamente processados ou IV Gama, prontas a consumir após a abertura da embalagem uma vez que, já foram devidamente higienizadas, selecionadas, cortadas e embaladas. “Baby leaf” é um conceito direcionado às hortaliças colhidas e consumidas com folhas não completamente desenvolvidas, sendo o intervalo de tempo entre a sementeira e a colheita mais reduzido do que o habitual ciclo comercial e apresentadas já lavadas, selecionadas e embaladas (MP). Estas devem ser macias, com um sabor acentuado e uma aparência agradável para o consumidor. Na constituição das saladas MP é frequente a utilização de diferentes espécies em simultâneo com formas, cores, texturas e sabores distintos e com um melhor valor nutricional. Neste conceito de “baby leaf” são utilizados vegetais como a alface, o agrião, a beterraba, a rúcula, a chicória e o espinafre, que podem ser comercializados, embalados individualmente ou em porções familiares, misturados ou vendidos numa única espécie sendo que, este conceito pode ter bastante interesse no incentivo ao consumo, com realce para a população mais nova. Estas folhas são colhidas inteiras o que permite que tenham menos pontos de oxidação, mantendo melhor as suas características e sabor por um tempo mais longo (Purquerio et al., 2013).

A cultura do espinafre apresenta grandes perdas no campo, que são causadas principalmente por fungos de solo. Deste modo, e com o objetivo de se perceber se a utilização de sementes tratadas com fungicidas sistémicos auxiliam no controlo destas doenças de solo, foi realizado um estudo para averiguar a eficácia do tratamento prévio das sementes com fungicida sistémico que contém a substância ativa metalaxyl-M, usando duas variedades comerciais de espinafre para produção de *Spinacia oleracea* L. “baby leaf”, variedade A (vA) e variedade B (vB), em condições de temperaturas elevadas.

Para tal, realizaram-se ensaios de campo nos quais se avaliaram as perdas de plantas, em %, durante o ciclo cultural da planta. Realizaram-se também análises qPCR ao solo de forma a perceber qual (is) a (s) espécie (s) detetada (s) no solo e avaliou-se visualmente os sintomas sugestivos de infeção por agentes fitopatogénicos do solo detetados no espinafre, de forma a complementar o estudo. Também foram desenvolvidos ensaios de germinação para determinar o potencial máximo de germinação, em %, das duas variedades em estudo, realizaram-se análises nutricionais às folhas e analisou-se a quantidade de matéria fresca e seca obtida em cada ensaio e a produtividade nos ensaios.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A CULTURA DO ESPINAFRE

O espinafre (*Spinacia oleracea* L.) pertence ao género *Spinacia*, família Amarantaceae, sub-família Chenopodiaceae. Trata-se de uma planta herbácea anual, usada para produção de folha e bienal, para produção de semente. É uma planta hortícola originalmente cultivada na estação fria. Em áreas temperadas, pode ser cultivada durante todo o ano (Conte et al., 2008). A forma silvestre não é conhecida, no entanto, há relatos de que o espinafre é originário da região do Cáucaso, próximo do Irão, Afeganistão e Turquestão (Valero, 2020).

Esta planta foi cultivada pela primeira vez na Pérsia há mais de 2.000 anos e utilizada como cultura pelos chineses no século VI. Supõe-se que terá chegado à região do Próximo Oriente entre os séculos IV e X, tendo sido introduzido na Península Ibérica pelos árabes no século XI. Por volta do século XV, a cultura já se encontrava dispersa na maior parte da Europa. É consumido na Europa e Norte de África há mais de mil anos (Almeida, 2015).

Na Europa os principais produtores mundiais de espinafre são a França, a Itália, a Alemanha, e a Holanda; Portugal apresenta um valor bastante expressivo (Quadro 1). A China e o Japão também são considerados produtores principais de espinafre (InfoAgro, 2022).

Quadro 1 - Produção de espinafre a nível mundial em toneladas por ano (Fonte: Adaptado de InfoAgro, 2022).

Número	País	Produção de espinafre em 2002 (toneladas/ano)
1	China	7.811,000
2	Estados Unidos	328.180
3	Japão	320.000
7	França	109.511
8	Itália	90.000
12	Alemanha	55.139
14	Países Baixos	40.000
17	Portugal	14.000

O espinafre, em Portugal, é consumido em elevadas quantidades sendo produzido em diferentes modos de produção, ar livre e ambiente protegido (Robalo, 2021).

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística, nos anos 2018, 2019 e 2020, a área cultivada e a produção total em Portugal foi de 436, 554 e 993 hectares e 6.946, 7.807 e 8.886 toneladas, respetivamente (Figura 1), tendo-se verificado uma proporcionalidade direta entre estes dois fatores, tal como se verifica pelo gráfico da Figura 1.

Avaliação do efeito de fungicida sistémico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

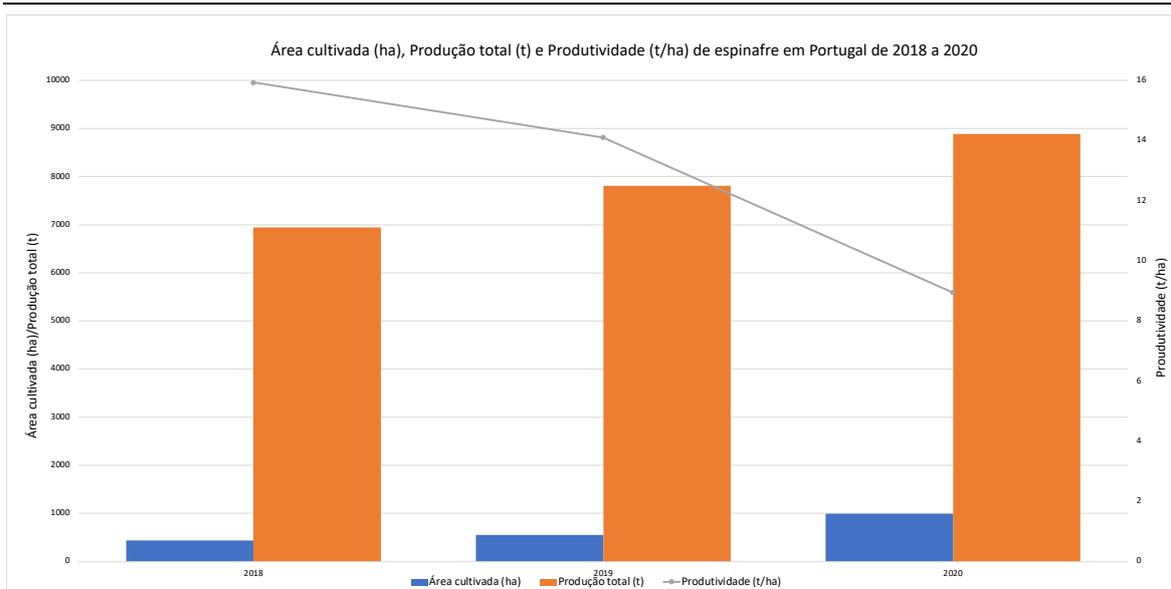


Figura 1 - Área cultivada (ha), Produção total (t) e Produtividade (t/ha) de espinafre em Portugal nos anos de 2018 a 2020 (Fonte: Adaptado de INE 2018, 2019, 2020 e 2021).

O mercado global registou um aumento no consumo de espinafre de 5,4 % para 32 milhões de toneladas em 2020. O volume total de consumo aumentou a uma taxa média anual de mais 4,6 % entre 2012 e 2020. A China com 29 milhões de toneladas constitui o país com o maior volume de consumo de espinafre compreendendo aproximadamente 92 % do volume total. Em 2020, os Estados Unidos da América com 44 mil toneladas e o Canadá com 37 mil toneladas representam os principais importadores de espinafre em todo o mundo, representando aproximadamente 41 % do total das importações. O Reino Unido com 20 mil toneladas ocupa a próxima posição no ranking, seguido da Alemanha com 16 mil toneladas, a Bélgica com 14 mil toneladas, o México com 12 mil toneladas e a Holanda com 11 mil toneladas. Todos estes países em conjunto detinham cerca de 37 % das importações totais. Os seguintes importadores são a França com 7,7 mil toneladas, a Singapura com 6,2 mil toneladas e a Polónia com 4,1 mil toneladas e juntos representaram 9,1 % do total das importações. A crescente procura por produtos saudáveis devido ao aumento da população global continuará a ser o principal impulsionador do mercado. A expansão da procura por alimentos nutritivos impulsionará especialmente o mercado de espinafre biológico. A IndexBox prevê que o mundo consumirá 42 milhões de toneladas de espinafre até 2030 (IndexBox, 2021).

2.1.1. CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA

A classificação taxonômica do espinafre de nome científico *Spinacia oleracea* L. é a seguinte (Quadro 2) (Valero, 2020).

Quadro 2 - Classificação taxonômica da cultura de espinafre (Fonte: Adaptado de Valero, 2020).

Reino	Plantae
Sub-reino	Embryobionta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sub-classe	Caryophyllidae
Ordem	Caryophyllales
Família	Amaranthaceae
Sub-família	Chenopodiaceae
Gênero	<i>Spinacia</i>
Espécie	<i>Spinacia oleracea</i> L.

2.1.2. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ASPETOS BOTÂNICOS COM INTERESSE AGRONÓMICO

Os espinafres são um vegetal herbáceo anual, no qual se distinguem duas variedades botânicas de espinafre, a primeira é a *Spinacia oleracea* L. var. *spinosa*, cujo seu nome é originado pela forma dos aquênios que possuem pericarpo pontiagudo, folhas pontiagudas e é uma variedade adaptada para cultivar no Inverno. A segunda variedade corresponde a *Spinacia oleracea* L. var. *inemis* que é derivada da primeira, no entanto, apresenta aquênios lisos e arredondados e folhas de várias formas. Esta é uma planta de raiz pivotante que enraíza superficialmente, levemente engrossada e pouco ramificada e caule muito curto e rudimentar. Esta segunda é a variedade correspondente ao espinafre comum e inclui a grande maioria de variedades comerciais utilizadas nos dias de hoje (Valero, 2020).

Passam-se a descrever alguns aspectos morfológicos e fisiológicos com interesse agronômico.

Relativamente ao sistema radicular, é aprumado, pouco ramificado e superficial. O sistema caulinar apresenta duas fases de crescimento: vegetativa e reprodutiva. Podendo também a primeira fase ser designada de fase de roseta.

Durante a primeira fase, o sistema pode crescer ereto ou prostrado, baixo (cerca de 15 a 30 cm) e não ramificado, constituído por um caule muito curto que suporta uma roseta de folhas dispostas alternadamente. Esta fase dá-se após a germinação e o estado de plântula em que a planta adquire a forma de roseta, com as folhas inseridas no caule. A altura da planta na fase de roseta é de 15 a 25 cm, mas a haste floral pode atingir 80 cm (Almeida, 2015).

A segunda fase, inicia-se com a emissão de hastes florais que se ramificam podendo atingir quase um metro de altura, as folhas têm lâmina glabra, de superfície lisa, ondulada ou encaracolada, com borda inteira, podendo apresentar formas diferentes, mas habitualmente são triangular-ovaladas. O pecíolo é côncavo, longo (entre um a dois terços do comprimento total da folha), fino (menos de 1 cm), de coloração esverdeada em direção à lâmina, em contraste com a cor rosada que apresenta no ponto de inserção com o caule (Valero, 2020).

As folhas são caulíferas, mais ou menos alternadas e pecioladas, de forma e consistência muito variáveis e dependendo da variedade podem ser ovais ou triangulares. A cor das folhas é de verde-escuro a verde-claro, dependendo da variedade cultivada, estão dispostas em roseta e têm um limbo de forma ovada, alongada ou pontiaguda sendo que a sua superfície pode ser lisa ou apresentar rugosidades bolbosas semelhantes às da couve-lombarda (Valero, 2020). Nas folhas completamente expandidas, o comprimento dos pecíolos é semelhante ao do limbo, mas diminui progressivamente das folhas mais velhas para as mais jovens (Almeida, 2015).

As flores podem ser masculinas e femininas, as masculinas estão agrupadas em número de 6-12 nas espigas terminais ou axilares, apresentando coloração verde formados por um perianto com 4-5 pétalas e 4 estames e as femininas encontram-se em glomérulos axilares e são formadas por um perianto bi ou tetradentado, com ovários uniovulares, estilete único e estigma dividido em 3-5 segmentos (InfoAgro, 2022).

A semente de espinafre é um fruto seco e indeiscente (Hallavant & Ruas, 2014), rodeada pelo pericarpo, composta de células parcialmente lenhificadas (Magnée, 2022).

O espinafre é uma cultura que apresenta como vantagem importante, o seu rápido desenvolvimento podendo se desenvolver entre 60-90 dias, dependendo da época em que é semeado (Navarrete, 2006).

É uma planta de dias longos, portanto permanece no estado vegetativo quando se encontra em condições de um fotoperíodo mais curto que o mínimo crítico e é quando a duração do dia a que a cultura está exposta ultrapassa este nível crítico que a emissão da haste floral se inicia. Em condições de temperaturas elevadas e dias longos, o espinafre floresce e produz sementes (fase reprodutiva). O fotoperíodo crítico para a floração varia entre 12,5 e 15 horas, podendo considerar-se o valor de 14 horas na maioria das cultivares. A ocorrência de temperaturas elevadas após a indução floral acelera o alongamento da haste floral. Na fase de floração, o crescimento vegetativo é muito reduzido ou nulo. As novas folhas que se formam nesta fase são pequenas, estreitas e pontiagudas. A vernalização, que ocorre a temperaturas entre 4,5 e 10 °C, favorece a precocidade do espigamento na Primavera, logo que o fotoperíodo se torne propício. A vernalização das sementes também reduz o fotoperíodo crítico para a floração. As plantas femininas tendem a produzir um maior número de folhas e a espigar mais tardiamente do que as plantas masculinas

(Almeida, 2015). Este aspeto é de grande interesse sob o ponto de vista produtivo, sendo de evitar condições promotoras de floração.

A espécie é classificada principalmente como dioica, no entanto, existem variedades monoicas e hermafroditas (Wadlington & Ming, 2018). É uma espécie diploide que contém seis pares de cromossomas por célula somática ($2n=12$ cromossomas). A expressão sexual no espinafre é controlada por um único par de cromossomas sexuais (XY) (Ma et al., 2022).

Diversos autores afirmam que a polinização do espinafre é anemófila. Após a polinização pelo vento e posterior fertilização, este frutifica em aquénios a partir do ovário súpero uniovulado, que permanece incluído no perianto inerte ou espinescente. Vários autores afirmam que a semente é circundada pelo pericarpo membranoso que pode ser liso ou espinhoso (Navarrete, 2006), o que poderá ter consequências ao nível da germinação. O fruto é um utrículo, seco e indeiscente, monospermico, que é utilizado como semente. As sementes podem ser irregulares espinhosas, normalmente cultivadas no inverno, mas pouco usadas atualmente, ou sementes redondas e lisas, mais habituais (Almeida, 2015) .

2.1.3. CARATERÍSTICAS NUTRICIONAIS

A maioria das Quenopodiáceas hortícolas, onde se insere a cultura do espinafre, é cultivada pelas suas folhas, consumindo-se os caules tenros, podendo ser apresentada no mercado, em fresco ou processada, e, dentro desta última, na forma de congelados ou enlatados (Almeida, 2015; Morelock & Correll, 2008). Por isso é que o espinafre tem importância agronómica durante o seu ciclo vegetativo uma vez que o órgão de consumo deste vegetal são as folhas. Acresce que a qualidade das folhas diminui quando o ciclo reprodutivo começa, e após a floração perde o valor enquanto produto alimentar.

Os vegetais de folhas verdes dos quais o espinafre faz parte, são utilizados desde os tempos antigos como alimento uma vez que, contêm muitos nutrientes e minerais (Ashok Kumar C.K* et al., 2013). O espinafre desempenha um papel muito importante na dieta portuguesa uma vez que, é consumido diariamente em boas quantidades durante todo o ano (Correia et al., 2010; Machado et al., 2018). A nível europeu faz parte dos vegetais de folha mais consumidos (Martín León & Luzardo, 2020).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que uma alimentação saudável deve garantir a ingestão de 400 gramas ou cinco porções de hortícolas diariamente. De acordo com a Balança Alimentar Portuguesa (BAP), entre 2009 e 2017, a disponibilidade de hortícolas para consumo aumentou cerca de 14,5 %, consequência do aumento da produção e superfície agrícola nacional com hortícolas. O consumo aparente de hortícolas manteve-se relativamente estável com

285,8 g/hab/dia, comparativamente ao consumo 286,3 g/hab/dia estimado entre 2012-2015 (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

É um alimento baixo em calorias e gorduras, no entanto, é rico em minerais, fibras, vitaminas e fitoquímicos e tem uma elevada atividade antioxidante. Os fitoquímicos bioativos distribuídos ubiquamente na natureza podem constituir pigmentos que conferem uma aparência colorida aos alimentos ou produtos do metabolismo secundário que protegem as espécies de plantas de ataques ambientais e aumentam o seu funcionamento e valor nutricional (Machado et al., 2018; Murcia et al., 2020). Os fitoquímicos que estão predominantemente associados à qualidade do espinafre baby são os fenóis totais, carotenoides totais, atividades antioxidantes totais e flavonoides totais devido à sua natureza antioxidante (Bergquist, 2006). O espinafre é um alimento rico em valor nutricional, sendo uma boa fonte de antioxidantes naturais como compostos fenólicos ou flavonoides, clorofilas, ácido cafeico, quercetina, patuletina, espinacetina, jaceidina, tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e polifenóis e é rico em vitamina A (provitamina A e retinol), riblofavina, B-caroteno, ácidos fólicos e minerais como cálcio, ferro, fósforo, sódio, potássio, molibdénio, selénio, zinco (Ashok Kumar C.K* et al., 2013; Garcia, 2022; Murcia et al., 2020). É ainda rico em ácido oxálico e ácido ascórbico.

Desde há muito que é reconhecido o seu valor nutricional, já na década de 60 do século passado. O valor nutritivo específico das folhas de espinafre é relativo ao conteúdo alto de ferro (4-6 mg por 100 g de peso seco), por isso, a planta possui um elevado poder anti-anémico (Nešković & Čulafić, 1988).

Tem um elevado conteúdo em água (92 %) e proporções muito baixas em carboidratos, lípidos. No entanto, o teor em proteína (2,9 %) é importante. A baixa concentração de lípidos e açúcares permite que o espinafre seja um alimento diurético, presente nas dietas equilibradas (Murcia et al., 2020; Robalo, 2021).

O espinafre acumula oxalato que em elevadas concentrações nos fluídos corporais podem cristalizar em forma de oxalato de cálcio e causar litíase renal, que na gíria é designada por “Pedras nos rins” (Dias, 2019; Robalo, 2021). O oxalato de cálcio é um composto anti-nutricional que pode reduzir a biodisponibilidade de magnésio e mesmo de ferro (Almeida, 2015).

A presença de ecdisterona no espinafre levou a que fossem realizados estudos que evidenciaram o seu efeito no desempenho atlético dos participantes, após o consumo durante 10 semanas do equivalente a 4 quilos de espinafres crus por dia comparando com participantes que receberam placebos. Assim surgiu a recomendação de incluir esta substância presente nos espinafres na lista de substâncias proibidas, doping (Isenmann et al., 2019).

O Quadro 3 apresenta a composição média do espinafre expressa por 100 g de parte comestível.

Quadro 3 - Composição média do espinafre expressa por 100 g de parte comestível (Fonte: USDA, 2023).

Parâmetros	Quantidade
Água (g)	91,4
Energia (kcal)	23
Proteína (g)	2,86
Lípidos (g)	0,39
Carboidratos (g)	3,63
Fibra (g)	2,2
Açúcares (g)	0,42
Vitamina A (mg)	469
Vitamina B6 (mg)	0,195
Vitamina B12 (ug)	0
Vitamina C (mg)	28,1
Vitamina D (D2+D3) (mg)	0
Vitamina K (ug)	483,5
Riboflavina (mg)	0,189
Niacina (mg)	0,724
Tiamina (mg)	0,078
Potássio (mg)	558
Cálcio (mg)	99
Fósforo (mg)	49
Magnésio (mg)	79
Sódio (mg)	79
Ferro (mg)	2,71
Zinco (mg)	0,53
Manganês (mg)	0,897

Sugere-se que compostos que impedem a bioatividade de glicoglicerolipídios possam estar contidos no extrato etanólico de espinafre. Desta forma, a fração de glicoglicerolipídica do espinafre pode inibir a atividade polimerase (DNA polimerase), em mamíferos, o crescimento de células cancerígenas cultivadas em humanas e proliferação de tumor sólido *in vivo* com administração oral. Esta fração pode ajudar na prevenção do cancro, além de ser um alimento funcional com atividade anticancerígena (Maeda et al., 2010).

O espinafre por ser um vegetal rico em ferro tornou-se uma prioridade na produção de vacinas comestíveis. As tentativas de utilizar os métodos convencionais para desenvolver vacinas contra a infecção por HIV ainda está em estudo. Recentemente, a proteína Tat do HIV-1 tem sido explorada como uma boa vacina com ampla ação e com ação sub-tipo não específica.

Curiosamente, foi desenvolvido um espinafre transgênico que expressa uma boa quantidade de proteína Tat A sem que afete a qualidade das folhas desenvolvidas. No entanto, como este espinafre transgênico provoca uma resposta imune ainda por descobrir, desenvolver-se uma vacina comestível à base de plantas contra a doença infecciosa, AIDS tornou-se uma expectativa. A cultura do espinafre foi selecionada para servir de veículo para administração oral da vacina contra a doença de antraz que é uma doença infecciosa grave causada pela bactéria gram-positiva conhecida como *Bacillus anthracis* (Naik, 2022).

2.1.4. CLASSIFICAÇÃO DAS VARIEDADES

Segundo Almeida (2015), é interessante, do ponto de vista hortícola, conhecer critérios de classificação das variedades, tais como:

1. Porte da planta
 - a. Ereto, semi-ereto ou prostrado. Neste caso, se a colheita for mecanizada é importante escolher uma variedade de porte ereto.
2. Tipo de folhas
 - a. Tamanho, intensidade da cor verde e forma.
3. Rugosidade do limbo
 - a. Variedades de folhas lisas, folhas semi-rugosas ou folhas rugosas.
4. Aptidão
 - a. Fresco ou congelado.
5. Adaptação à época de produção
 - a. Outono-inverno e primavera-verão.

Estas são também classificadas de acordo com a forma da semente, posição da folha e comprimento do pecíolo (Nešković & Čulafić, 1988).

A época de produção é um importante critério de classificação das variedades, diferencia-se entre época de outono-inverno e de primavera-verão, sendo que as variedades se destinam a uma das épocas tendo em conta diversos fatores como a velocidade de crescimento, a cor, a germinação, entre outros fatores. Comercialmente o espinafre é classificado com base nas características das folhas (Robalo, 2021). Cada tipo de folha tem um destino final específico consoante a sua aparência e sabor o que permite que se destinem para mercados distintos, de produtos processados ou frescos.

Considerando este último critério, é de destacar a classificação apresentada por Avsar (2011) e por Welbaum (2015), na qual se distinguem três principais variedades de espinafre:

- Folha lisa
 - Caracterizadas por terem folhas alisadas sem vincos em forma de espada, usada preferencialmente para processamento;
- Folha savoy
 - Caracterizadas por terem folhas mais encaracoladas, vincadas e mais crocantes, usada especialmente para venda em fresco.
- Baby leaf
 - Caracterizada por ser um tipo de folha usado preferencialmente em saladas devido ao seu sabor e textura delicada.

Existem também variedades com características intermédias, que contêm folhas tipo semi-savoy distinguindo-se por terem folhas ligeiramente enrugadas (Mahr, 2022; Morelock & Correll, 2008). Note-se que as variedades de folhas savoy, devido à sua aparência e sabor, têm maior vida útil e têm menos ácido oxálico do que as que contêm folhas lisas. As folhas savoy e semi-savoy são mais populares para consumo em fresco, enquanto as folhas lisas são mais adequadas para consumo processado. A popularidade das variedades lisas tem vindo a aumentar com a crescente procura por espinafres frescos, em particular por espinafre “baby leaf” (Lucier et al., 2004; Simko et al., 2014).

Posteriormente, e em termos de adaptação ao meio abiótico, dois dos fatores importantes a considerar na escolha de uma variedade são a tolerância ao espigamento precoce e a resistência a doenças. Desta forma, as variedades híbridas que são mais produtivas e apresentam uma maior proporção de plantas femininas, tornam-se vantajosas pois produzem mais e espigam mais tardiamente do que as masculinas (Almeida, 2015). Na escolha de uma variedade também é importante considerar a resistência às temperaturas elevadas e a fotoperíodos de dias longos (primavera-verão) o que obviamente se reflete numa maior resistência ao espigamento como já foi referido, logo numa dificuldade ou na demora da emissão da haste floral.

2.1.5. CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E REPRODUTIVO DO ESPINAFRE

O espinafre é uma planta preferencialmente de clima temperado e o melhor produto é obtido nas estações frias (Magnée, 2022; Navarrete, 2006). Não suporta temperaturas excessivamente elevadas e resiste a temperaturas extremamente baixas (Valero, 2020). O espinafre é uma cultura com ciclo cultural curto, entre 60-90 dias, dependendo da época em que é semeada e apresenta tolerância a geadas fracas (Navarrete, 2006).

No caso de uma “baby leaf”, a cultura poderá se desenvolver em aproximadamente 22 dias, durante o Verão e 60-65 dias, durante o Inverno.

2.1.5.1. FASES DE DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO DA CULTURA DO ESPINAFRE

A semente é uma estrutura importante para manter a capacidade de produção das plantas (Rifna et al., 2019; Sharififar et al., 2015). As características agronômicas e botânicas das sementes são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Características agronômicas e botânicas da semente de espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015).

Caraterísticas agronômicas e botânicas da semente de espinafre		Valor
Número de sementes por grama		80-115
Peso de 100 sementes (g)		8,7-12,5
Pureza física mínima (% em massa)		97
Faculdade germinativa (%)	Mínima	75
	Variedades comerciais	85
Duração da faculdade germinativa (anos)		4
Localização das reservas		Endosperma
Tipo de germinação		Epígea

Em média, entre a sementeira e a emergência é necessário um somatório térmico de 111 °C acima de uma temperatura-base de 0,1 °C. Embora a duração da faculdade germinativa considerada em diversa bibliografia seja de 4 anos, as sementes com mais de 1 ano tendem a ter uma faculdade germinativa mais reduzida, menor que 80 %, e uma germinação mais lenta e irregular (Almeida, 2015). A temperatura é um fator abiótico que influencia a percentagem de germinação e o número de dias para a emergência como se pode observar no Quadro 5.

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Quadro 5 - Percentagem de germinação (%) e dias para a emergência consoante a temperatura (Fonte: Adaptado de Valero, 2020).

Temperatura (°C)	Germinação (%)	Dias para a emergência
0	83	63
5	96	23
10	91	12
15	82	7
20	65	6
25	50	5
30	30	6
35	0	0

Alguns autores estudaram o efeito da temperatura na germinação da semente de espinafre, tendo em conta intervalos de temperatura de 5 °C. Foi possível observar que a germinação varia consoante a temperatura a que as sementes são sujeitas e influenciará os dias para a emergência (Quadro 5). As condições ótimas são encontradas quando o solo, onde as sementes são instaladas, apresenta uma faixa de temperatura entre 10 a 15 °C, podendo estas emergir após 10 a 12 dias. É, por isso, que nesta faixa de temperatura se obtém a melhor razão percentual de germinação. Diversos autores referem que, no entanto, a faixa de temperatura considerada ótima fica entre 15 a 25 °C, devido ao facto de se obter uma boa relação entre o período de emergência e germinação (Quadro 5) (Valero, 2020).

Quadro 6 - Temperaturas cardinais para o espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015 e Navarrete, 2006).

Parâmetro	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	
Danos por congelamento	-5	60-70	
Quebra do desenvolvimento	5		
Germinação	Mínima		2-5
	Ótima		20-25
	Máxima		25-30
Desenvolvimento vegetativo	Mínima		5-7
	Ótima		15-20
	Máxima		25-32

Adicionalmente, autores afirmam que, no entanto, em condições de temperatura mínima (5 °C), a semente pode levar mais de 20 dias a germinar (Navarrete, 2006). A uma temperatura de 0 °C, as sementes também têm a capacidade de germinar, no entanto, a germinação dura cerca de 2 meses. A uma temperatura de 25 °C, a faculdade germinativa é drasticamente reduzida (30 %) e acima de uma temperatura de 30 °C, as sementes não germinam. Em condições de campo, a emergência das plântulas pode durar 8 (15-25 °C) a 20 (5-10 °C) dias. As temperaturas cardinais para o estado de germinação e para o desenvolvimento vegetativo são as apresentadas no Quadro 6. A germinação ótima ocorre a uma temperatura de 20 °C, em aproximadamente 7 dias. A

temperatura mínima para o crescimento da cultura é de 5 °C, no entanto, o desenvolvimento é muito lento quando a temperatura é inferior a 10 °C. As temperaturas baixas induzem a produção de folhas mais pequenas, mais espessas e mais ásperas e favorecem a acumulação de ácido oxálico nas folhas. Quando existem condições de temperaturas superiores a 15 °C e condições de dias longos, superior a 14 horas, as plantas entram na fase reprodutiva. Quando as temperaturas do ar são superiores a 25 °C, estas tendem a prejudicar a qualidade, reduzindo a espessura e a intensidade da cor das folhas (Almeida, 2015). Para o desenvolvimento normal da espécie é necessária uma temperatura média mensal mínima de 6 °C (Valero, 2020).

2.1.5.2. TIPO DE SOLO

A cultura do espinafre adapta-se bem a solos franco-arenosos, férteis, bem drenados, ricos em matéria orgânica e com elevada capacidade de retenção de água. A compactação do solo é a principal limitação edáfica à cultura. Esta cultura desenvolve-se mal em solos ácidos, vegetando bem no intervalo de pH entre 6,5 e 8,0 sendo o intervalo ótimo de 6,5 a 7,0 (Almeida, 2015; Morelock & Correll, 2008). A percentagem de germinação da semente de espinafre diminui quando estamos perante sementeiras realizadas em solos muito ácidos (Valero, 2020). Também quando a cultura se encontra em solos ácidos, os pecíolos apresentam uma cor avermelhada, por outro lado, quando a cultura se encontra em solos alcalinos pode ocorrer clorose férrica. O espinafre tem tolerância à salinidade do solo moderada a elevada (Almeida, 2015).

2.1.5.3. FERTILIZAÇÃO

Apresentam-se os valores indicativos referentes à exportação total de nutrientes pela cultura do espinafre (Quadro 7), e realça-se que esta exportação varia em função da produtividade, número de cortes e variedade utilizada.

Quadro 7 - Exportação total de nutrientes pela cultura de espinafre (Fonte: Adaptado de Almeida, 2015).

Produtividade (t. ha⁻¹)	N (kg. ha⁻¹)	P₂O₅ (kg. ha⁻¹)	K₂O (kg. ha⁻¹)	CaO (kg. ha⁻¹)	MgO (kg. ha⁻¹)
11	90	28	110	30	16
20	95	35	100	-	-
36	58	39	174	32	9
83	91	27	233	23	20

A cultura do espinafre, por ser de ciclo curto exerce uma elevada procura de nutrientes num curto espaço de tempo, que devem estar disponíveis para a planta (Valero, 2020). Quando colhida jovem como “baby leaf”, a absorção de nutrientes é relativamente baixa (Koike et al., 2011).

De modo, a aumentar a proporção de folhas e suportar as elevadas taxas de crescimento, esta cultura deve ser bem fertilizada (Almeida, 2015). A taxa de fertilização deve ser determinada tendo em conta o objetivo da cultura de espinafre (“baby leaf”, espinafre jovem, entre outros), o tipo de solo, o resultado das análises de solo e o histórico recente da cultura (Koike et al., 2011). A fertilização de cobertura deve fornecer os nutrientes necessários na fase final do ciclo cultural uma vez que cerca de dois terços da biomassa total da cultura é produzida no terço final do ciclo cultural. Em termos de fornecimento dos nutrientes necessários à cultura, o azoto deve ser repartido aplicando 50% na fertilização de fundo e os restantes 50% repartidos em uma ou duas fertilizações de cobertura, cerca de 3 semanas após a sementeira. A quantidade de N fornecido à planta pode aumentar de modo a otimizar a produtividade e a coloração das folhas (Almeida, 2015).

A falta de N poderá originar, uma coloração diferente das folhas, podendo levar à presença de caules curtos e finos se a deficiência estiver num estado avançado sendo que este tipo de sintomatologia poderá prejudicar a produtividade da cultura (Valero, 2020). Note-se que a quantidade de N adicionada e a quantidade de N disponível no solo antes da sementeira afetam o teor de NO_3 no espinafre (Breimer, 1982). Vários autores, afirmam que o fósforo e o potássio devem ser aplicados durante a preparação do solo (Valero, 2020). O potássio tem um efeito benéfico na qualidade através da melhoria da textura e da turgescência das folhas (Almeida, 2015). Na maioria dos solos, a disponibilidade de fósforo é máxima quando o pH do solo está entre 5,5-7,0, diminuindo a sua disponibilidade quando o pH for inferior a 5,5 e subindo a sua disponibilidade quando o pH for superior a 7,0. A retenção e a menor disponibilidade para as plantas, quando o pH é baixo, resulta da reação do ferro, alumínio e hidróxidos (Valero, 2020).

2.1.5.4. NECESSIDADES HÍDRICAS

A cultura do espinafre beneficia da constante disponibilidade de água no solo. O sistema radicular superficial explora um volume reduzido de solo e, deste modo, há uma exigência de regas com maior frequência (Almeida, 2015) para que o solo se mantenha uniformemente húmido, uma vez que o espinafre não se adapta ao excesso de água porque é sensível à asfixia radicular (Koike et al., 2011). Deste modo, a quantidade e a frequência com que a cultura é regada dependerá de diversos fatores, climáticos e de solo. Em culturas de ciclo curto como é o caso do espinafre “baby leaf” e do espinafre jovem é utilizada a rega por aspersão. Esta rega permite que a quantidade de água seja fornecida com menor débito permitindo um maior controlo no aparecimento e propagação de doenças causadas por fungos de solo e no apodrecimento das raízes, coroa e folhas inferiores uma vez que, se o solo estiver em condições de saturação isso contribuirá para o seu aparecimento e propagação e, posterior, apodrecimento de diversas partes da cultura. Caso haja

alternância de períodos de abundância de água e de déficit hídrico, isto pode favorecer o espigamento (Almeida, 2015).

2.2. DESCRIÇÃO DE UMA CULTURA DE ESPINAFRE PRODUZIDA PARA “BABY LEAF”

As variedades mais utilizadas e mais indicadas na produção de “baby leaf” são normalmente variedades que possuem um crescimento ereto o que permite minimizar o contacto com o solo, mantendo as folhas limpas e facilitando a colheita, uma vez que estas são colhidas numa fase em que a planta apresenta somente 6 a 8 folhas verdadeiras (DGADR-Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento rural, 2008, 2018). O espinafre “baby leaf” é colhido após um ciclo cultural mais curto e semeado em maiores densidades, ou seja, com menor espaçamento na entrelinha do que o espinafre comum, o que proporciona uma folha mais pequena (Bergquist, 2006) o que torna a sementeira de espinafre “baby leaf” desafiante e relativamente mais dispendiosa do que outros tipos de espinafre (Koike et al., 2011; Magnée, 2022).

O espinafre é produzido em sistemas de produção convencionais e biológicos, com maior crescimento para o modo de produção biológico devido à crescente sensibilização dos consumidores para os potenciais riscos ambientais da utilização de fungicidas e para os riscos de segurança alimentar de resíduos de fungicidas que podem aparecer em culturas consumidas em fresco provenientes de sistemas de produção convencionais (Magnée, 2022). No entanto, neste estudo, o espinafre foi semeado em modo de produção convencional pois o tratamento de semente, só é permitido neste modo de produção.

Relativamente à preparação do solo para a sementeira, é aconselhável que o solo esteja livre de infestantes e resíduos da cultura anterior. A preparação da cama da semente é realizada com o recurso a máquinas agrícolas que descompactam o solo em profundidade e o preparam para a instalação da cultura. Após este processo, é realizada a incorporação da matéria orgânica com a adubação de fundo e depois o terreno é armado em camalhões. Posteriormente, é realizada a sementeira da cultura.

Todos os herbicidas, fungicidas e inseticidas são aplicados tendo em conta fatores abióticos e bióticos pois estes são cruciais na tomada de decisão da aplicação de produtos fitofarmacêuticos na proteção da cultura.

A aplicação de herbicidas deve ser realizada preferencialmente em pré-emergência. Os inseticidas devem ser aplicados tendo em conta o nível económico de ataque da praga. Todas as aplicações de fitofármacos são realizadas com o recurso a um pulverizador de jato projetado. A adubação de fundo e a adubação de cobertura são realizadas com um espalhador centrífugo.

Sabendo que o espinafre é uma cultura que não tolera o excesso de água, e que necessita que o solo esteja com um nível de humidade adequado para um desenvolvimento mais rápido tem de ser feita uma boa gestão da rega, ou seja, regas com pouco débito e com muita frequência. A rega é feita essencialmente pela manhã sendo que é gerida de acordo com diversos fatores como o vento, precipitação, temperatura, aplicação de adubo, entre outros. No caso do espinafre, a rega é feita por aspersão. Neste estudo, foi fornecido um caudal médio de 420 l/h durante cerca de 6 horas, de 3 em 3 dias, informação a título meramente indicativo.

Na época de verão é necessário aumentar a frequência com a qual é fornecida água à planta porque existe maior evapotranspiração. Normalmente a rega é gerida tendo em conta as diferentes fases de produção do espinafre. São feitas duas a três regas até à sementeira, após a sementeira rega-se novamente e quatro a cinco dias após faz-se nova rega. Após estas regas é feita uma aplicação de 3 em 3 dias (daí a média referida anteriormente). O número de regas aumenta até se aproximar o dia da colheita sendo que 36 a 48 horas antes da colheita, deixa-se de regar a cultura.

Quando a planta atinge o número pretendido de 6 a 8 folhas verdadeiras e cumprindo com os intervalos de segurança dos produtos aplicados, pode-se iniciar a colheita. A decisão da colheita do espinafre depende do tamanho da folha sendo que o tamanho depende das condições de crescimento como a temperatura, irradiação e disponibilidade de água e nutrientes. Depende também das condições climatéricas, da carga de trabalho no local de produção e da procura pelo produto (Ott et al., 2008). A colheita é feita mecanicamente com o recurso a uma máquina de corte e, posteriormente, o produto é colocado em caixas que vão diretamente do campo para a fábrica onde se inicia todo o processo de lavagem e embalagem.

Este tipo de espinafre é normalmente vendido fresco em sacos de polipropileno e o tempo máximo de armazenamento é de aproximadamente 10 dias, a uma temperatura recomendada de aproximadamente 0 °C (Wills et al., 1998).

O espinafre “baby leaf” é uma cultura que apresenta a vantagem de ter um ciclo cultural e uma vida útil curta, tornando-o naquilo a que chamam um “excelente modelo de cultura” (Bergquist, 2006).

2.3. OS NITRATOS

O nitrato é um composto de azoto que ocorre naturalmente em concentrações moderadas nos mais variados ambientes (Robalo, 2021). Este é um constituinte natural nas plantas, sendo que a sua concentração dentro da planta varia consoante diversos fatores ambientais e genéticos (Maynard et al., 1976). A concentração de nitratos nas plantas depende da espécie utilizada, da utilização de fertilizantes de azoto e das condições de crescimento da cultura (Abubaker et al., 2010). Desta forma, o aumento da concentração de nitratos nas folhas é o resultado de todos os fatores que aumentam a concentração total de azoto do tecido que está relacionada com a aplicação de fertilizantes azotados sendo estes, o principal fator que influencia o teor de nitratos em culturas vegetais (Abubaker et al., 2010; Cantliffe, 1973; Okazaki et al., 2008).

Na produção comercial de espinafre estima-se que cerca de 60 % do azoto é perdido por lixiviação devido ao sistema radicular superficial e ao ciclo curto da cultura. No entanto, embora o espinafre necessite de quantidades de azoto significativas para o seu desenvolvimento, é pouco eficaz na redução de nitrato (NO_3^-) (Joshi et al., 2020).

Diversos fatores influenciam a acumulação de nitratos nas plantas, incluindo a falta de luz solar e água, a variedade, a maturidade, o tipo e a quantidade de fertilizante azotado aplicado, os níveis de nitratos no solo e a qualidade da água de rega. Para além destes aspetos, a acumulação de nitratos depende da genética da planta e do poder de fornecimento de nitrato do solo (Castro et al., 2009; Correia, 2009; Maynard et al., 1976; Ott et al., 2008; Santamaria, 2006; Vieira et al., 1998). Verifica-se que a acumulação de nitratos é maior durante os meses correspondentes às estações de outono e inverno do que durante as estações de primavera e verão. As plantas acumulam maior concentração de nitratos (NO_3^-) sob condições de baixa luminosidade e durante condições de fotoperíodo reduzido (Barcelos et al., 2016). Fatores como baixa temperatura e excesso de azoto, também proporcionam maior concentração de nitratos nas folhas.

A acumulação de nitratos em culturas “baby leaf” depende das características do solo, da utilização de fertilizantes, da época de colheita e do tamanho do vegetal e condições de conservação (Aires et al., 2013).

Vários autores referem que a concentração de nitratos varia também consoante as partes da planta onde estas concentrações são analisadas (Ott et al., 2008). Estas também variam consoante a idade da planta (Maynard et al., 1976). A concentração de nitratos é menor nas estruturas florais e é mais elevada, por ordem crescente, nos frutos ou grãos, nas folhas, raízes e pecíolos ou caules (Ott et al., 2008). Estudos realizados por Breimer (1982) comprovaram que as folhas mais velhas tinham uma concentração muito maior do que as folhas mais jovens. Os vegetais de folhas destacam-se por serem bons acumuladores de nitrato devido ao seu rápido crescimento

e porque os nitratos tendem a se acumular principalmente nas folhas, parte comestível (Kmecl et al., 2019; Quijano et al., 2017; Salehzadeh et al., 2020). Exemplo disso, é a cultura do espinafre (Santamaria, 2006) que é um vegetal de folha verde que normalmente contem elevados níveis de nitratos (Cantliffe, 1973; Correia, 2009) que podem ser prejudiciais para a saúde humana (Barcelos et al., 2016).

De acordo com a Comissão Europeia (CE) foram definidos limites máximos permitidos em culturas de folhas verdes. Estes limites referentes à concentração de nitratos nos espinafres são de 3.500 mg NO_3^- /kg quando se trata de alimentos frescos e de 2.000 mg NO_3^- /kg quando se trata de alimentos processados (conservados, ultracongelados ou congelados) (União Europeia, 2011).

Pavlek (1982), citado por Nešković & Ćulafić (1988), referiu que “nos países desenvolvidos, até 80 % do espinafre produzido é processado como comida enlatada ou congelada”. Esta situação parece manter-se sendo que Correia et al., (2010) indica que os vegetais são a principal fonte de nitratos na dieta, estimando-se que cerca de 80 a 95 % do nitrato presente na dieta humana deriva do seu consumo (Habermeyer et al., 2015; Hord et al., 2009; Karwowska & Kononiuk, 2020).

De acordo com o conhecimento atual, presume-se que a ingestão de vegetais é benéfico para a população apesar dos seus teores de nitrato e nitrito (Correia et al., 2010), sendo que este consumo tem sido associado à redução do risco e da mortalidade ligados às doenças cardiovasculares, à obesidade e a algumas neoplasias (Marques, 2012). No entanto, os níveis de concentração de nitratos são um problema para a saúde humana (Ott et al., 2008) que em elevadas quantidades pode provocar problemas como hipotireoidismo ou metemoglobinemia em bebés e cancro em adultos (Cunningham, 2013; Karwowska & Kononiuk, 2020; Kobayashi et al., 2015; L’Hirondel & L’Hirondel, 2002). O nitrito, que advém da redução do nitrato, ou que pode estar presente como aditivo alimentar, é o composto que apresenta riscos para a saúde humana (Maynard et al., 1976). Os nitratos apresentam baixa toxicidade, mas cerca de 5 % dos nitratos ingeridos são transformados em nitritos pelas enzimas nitrato redutase, na boca e no trato gastrointestinal (Correia et al., 2010; Tamme et al., 2006), que depois no estômago são convertidos em óxido nítrico (NO) e compostos do tipo N-nitroso (NOC). Estes reagem posteriormente com as aminas e com as amidas originando nitrosamidas e nitrosaminas (Correia, 2009), cujo carácter carcinogénico, teratogénico e mutagénico é reconhecido desde os anos 50 do século passado (Marques, 2012).

As melhores práticas culturais e correta preparação dos alimentos são medidas que permitem a redução de N nos vegetais frescos (Ott et al., 2008).

2.4. TESTES DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES

A realização de testes de germinação de sementes deve ser feita no estrito cumprimento das regras apresentadas pelas entidades responsáveis a nível internacional e nacional, neste trabalho a International Seed Testing Association (ISTA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

De acordo com as normas International Seed Testing Association (ISTA), a germinação de uma semente refere-se ao desenvolvimento das estruturas do embrião a um determinado estágio de desenvolvimento que permite perceber se a semente tem ou não aptidão para se desenvolver numa planta normal, sob condições favoráveis de campo (International Seed Testing Association, 2010).

Para que uma plântula se desenvolva até se tornar uma planta normal deve ter as seguintes estruturas: sistema radicular (raiz primária) e parte aérea (hipocótilo, epicótilo e cotilédones (um ou mais). Plântulas normais são plântulas que demonstram potencial para continuar o seu desenvolvimento dando origem a plantas normais, quando desenvolvidas sob condições favoráveis. Plântulas anormais são plântulas que não mostram o seu potencial para continuar o seu desenvolvimento dando origem a plantas normais, mesmo se desenvolvendo em condições favoráveis sendo que, estas plântulas podem ser plântulas danificadas, deformadas ou deterioradas apresentando diversos defeitos, quer ao nível do sistema radicular, quer ao nível da parte aérea. O objetivo final é que todas as sementes germinem demonstrando o seu potencial, no entanto, isso nem sempre acontece, devido a vários fatores tais como o tipo de semente, se são 1) sementes duras que permanecem sem absorver água por um período mais longo que o normal e se apresentam no final do teste aspeto de sementes recém colocadas no substrato, isto é, não intumescidas, ou se são 2) sementes dormentes que embora sejam viáveis não germinam, mesmo estando em condições específicas para a espécie em teste ou ainda se são 3) sementes mortas que no final do teste não germinam, não são duras, nem dormentes, apresentando-se, geralmente, amolecidas, atacadas por microrganismos não indicando nenhum sinal de início de germinação. Aquando da escolha do tipo de substrato a utilizar para a realização do teste deve-se ter em conta 1) o tamanho da semente, 2) a exigência da semente relativa à quantidade de água, 3) a sensibilidade da semente à luz e 4) a facilidade que o substrato oferece para a realização das contagens e para a avaliação das plântulas (Ministério da Agricultura, 2009). Existem vários tipos de papel utilizados em laboratório de acordo com a espécie vegetal utilizada, sendo o papel de filtro humedecido o mais utilizado.

Nas amostras a testar devem ser contabilizadas 400 sementes ao acaso, organizadas em repetições de 4 de 100 sementes cada, ou 8 com 50 sementes ou 16 com 25 sementes

(International Seed Testing Association, 2010; Milivojević et al., 2018; Ministério da Agricultura, 2009). As restantes sementes devem ser conservadas até ao final dos testes, podendo vir a ser utilizadas na repetição do mesmo, se necessário (Ministério da Agricultura, 2009). As sementes devem ser colocadas uniformemente distribuídas no substrato, dentro de placas de Petri e devem estar suficientemente afastadas de modo a minimizar a competição e a contaminação entre as sementes e plântulas em desenvolvimento. Deve-se optar, por um lado, por realizar a germinação das sementes por cima de uma ou mais camadas de papel de filtro ou, por outro lado, por realizar a germinação das sementes entre duas camadas de papel de filtro, mantendo sempre a humidade relativa da placa de Petri a um nível que impeça a secagem total da placa (International Seed Testing Association, 2010).

O substrato deve estar húmido o suficiente para que as sementes recebam a quantidade de água necessária para germinarem; tratando-se de papel de filtro, este não deve ser demasiado humedecido uma vez que, o facto de haver excesso de água limita a aeração prejudicando a germinação da semente. Após o fornecimento da quantidade de água necessária para que a semente germine, a adição subsequente de água fica ao critério do analista, no entanto deve ser evitada sempre que possível pois, aumenta as variações entre as repetições e entre os testes de germinação. É importante garantir que o substrato se mantém suficientemente húmido durante todo o teste de modo a evitar o re-humedecimento do substrato pelo que se devem manter as amostras em ambiente com valores de humidade à volta de 90 % para que não haja perdas de água por evaporação e/ou manter os recipientes fechados. Para que não seja necessário adicionar mais água durante os testes, pode-se também calcular a quantidade de água a ser adicionada utilizando a relação volume de água (mL) por peso do substrato (g). Algumas pesquisas indicam que, para a maioria das sementes, deve ser adicionado um volume de água em quantidade equivalente a 2,0 a 3,0 vezes o peso do substrato (Ministério da Agricultura, 2009).

As sementes para germinarem, utilizando um meio de cultivo adequado, devem ser sujeitas a uma determinada temperatura que está definida pelas normas ISTA. Para além disso, devem estar num local iluminado de modo a favorecer o desenvolvimento das estruturas essenciais das plântulas, facilitando a avaliação e reduzindo a possibilidade de ataque de microrganismos.

Para cada espécie existe uma duração de tempo diferente. A contagem do número de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) germinadas tem duas fases, a primeira contagem é feita ao 7º dia e a segunda contagem é feita ao 21º dia.

Se no final do período do teste, algumas sementes apenas tenham iniciado a germinação, pode se prolongar o teste por mais sete dias ou até metade do período indicado. O teste pode ser dado como concluído antes do tempo indicado, caso já se tenha obtido a germinação máxima. Durante a realização dos testes, devem-se retirar as plântulas que atingiram o completo

desenvolvimento das estruturas essenciais. No entanto, plântulas anormais que tenham outros defeitos devem ser deixadas até à última contagem. Se for necessário, pode-se adiar a primeira contagem de modo a que, as plântulas atinjam o desenvolvimento adequado (Ministério da Agricultura, 2009).

2.5. MATÉRIA FRESCA (MF) E MATÉRIA SECA (MS)

Esta cultura tem como finalidade a comercialização de “baby-leaf”, embalada, caracterizada por uma grande perecibilidade e uma vida útil curta. Assim a determinação da matéria seca tem uma grande importância uma vez que, a uma maior ou menor quantidade de água presente no produto corresponde uma melhor ou pior conservação do material. Um elevado teor de humidade, dificulta a conservação de alimentos. Deste modo, para que se compare fidedignamente dados de análises realizados num tempo diferente e em locais diferentes, é determinante que todos os dados das análises químicas realizadas sejam expressos na base de matéria seca, já que o teor de humidade presente interfere na comparação do valor nutritivo de dois ou mais alimentos. A determinação pode ser realizada por métodos diretos ou indiretos. No processo indireto, a diferença de peso deve-se à perda de água. No entanto, outras substâncias voláteis como os ácidos gordos são perdidos pelo aquecimento. Este método indireto, utilizado para a determinação da matéria seca residual, divide-se em duas fases, a pré-secagem e a secagem definitiva (Laboratório Nutrição e Metabolismo Animal, 2022).

2.6. TRATAMENTO DE SEMENTES REALIZADOS NO CONTROLO DE DOENÇAS DE SOLO

Os agentes patogénicos transmitidos pela semente e os agentes patogénicos habitantes do solo prejudicam o desenvolvimento da cultura e, conseqüentemente, a sua produtividade. Tem sido demonstrado que existe uma grande diversidade de fungos no interior das sementes (Chun et al., 2021; Tr et al., 2019). Os tratamentos realizados às sementes podem ser uma forma mais eficaz e menos dispendiosa na gestão de doenças de plantas uma vez que, estes podem proteger as plantas dos agentes patogénicos que, posteriormente podem vir a desenvolver doenças (Cummings et al., 2009).

A International Seed Testing Association criada no final da década de 1920 e com o aumento da perceção dos danos causados pelos agentes fitopatogénicos transmitidos pela semente, tanto durante o armazenamento como após o desenvolvimento das plântulas, tem desenvolvido novas opções de tratamento de sementes (Ayesha et al., 2021). Os tratamentos realizados à semente ocorrem em pré-sementeira e podem ocorrer de três formas diferentes, através de; 1) tratamento, 2) revestimento ou 3) peletização da semente (Pedrini et al., 2017) sendo o tratamento da semente, o método mais comum (Ayesha et al., 2021).

No método do 1) tratamento da semente, as sementes podem ser tratadas à base de fungicidas, inseticidas ou rodenticidas (White & Hoppin, 2004). Contudo, a maior parte destas sementes são tratadas à base de fungicidas (White & Hoppin, 2004) com formulações secas ou húmidas. É possível o tratamento destas à base de bio-formulantes como microrganismos dos géneros *Pseudomonas*, *Trichoderma* e *Rhizobium*, que permitem melhorar o desempenho da cultura em campo (Ayesha et al., 2021). Os tratamentos aplicados diretamente à semente, permitem reduzir a carga de agentes fitopatogénicos na superfície ou no interior da semente sem afetar a sua viabilidade e aptidão. Estes são realizados de modo que não haja perturbação do metabolismo da planta, protegendo a cultura contra doenças. Estes tratamentos podem superar a dormência e melhorar a germinação, através da alteração da integridade física das coberturas das sementes, permitindo que a semente complete as fases iniciais da germinação sob condições mais favoráveis (Katzman et al., 2001). Isto permitirá ter outros benefícios como a melhoria na emergência das sementes e a melhoria do vigor da planta (Ayesha et al., 2021).

O método do 2) revestimento da semente é geralmente realizado por indústrias quando se tem em vista lotes de sementes em elevada quantidade (Ayesha et al., 2021). Este assegura uma melhor proteção da semente durante a primeira etapa de vida protegendo a plântula de fungos do solo (Bejo Port., 2022). O revestimento de sementes melhora o estabelecimento e crescimento das plantas, garantindo a proteção das plantas e reduzindo o stress abiótico (Amirkhani et al., 2016; Kangsopa et al., 2018). Este método tem diversas vantagens, a superfície da semente fica mais lisa,

facilitando a sementeira e a cor, que por vezes, é adicionada, torna as sementes mais visíveis no solo. As sementes podem ser revestidas por diversos materiais, no entanto, empresas de sementes têm evoluído no sentido de utilizarem revestimentos mais sustentáveis que se decompõem completamente, diminuindo o tempo de secagem, o que significa um menor consumo de energia e, desta forma, um menor impacto ambiental (Bejo Port., 2022). O material mais utilizado no revestimento das sementes são os fungicidas, pesticidas, inseticidas, nematicidas, e herbicidas (Pedrini et al., 2017), no entanto, proteínas como o colagénio proveniente de resíduos de peixe tem sido testado como material promissor que pode ser utilizado no revestimento de sementes devido às suas características nutricionais e caráter pró-ambiental, no entanto, ainda está a ser alvo de estudos mais profundos (Skwarek et al., 2021).

Por último, 3) a peletização da semente é uma prática em culturas nas quais a semente é pequena como a cebola (Ayesha et al., 2021) cenoura (Ayesha et al., 2021; Jyoti & Bhandari, 2016) e a alface, o que facilita a sementeira (Jyoti & Bhandari, 2016). Consiste em envolver uma semente com uma pequena quantidade de material inerte que as torna uniformes em tamanho e forma (Jyoti & Bhandari, 2016) com o intuito de melhorar a eficiência (Incote, 2022; Jyoti & Bhandari, 2016) e a rapidez do processo de sementeira, otimizar as condições para uma ótima germinação e proporcionar proteção às plantas. Este método proporciona um espaço extra na semente permitindo a adição de produtos para proteção, nutrição e desenvolvimento saudável de plântulas. Tal como no processo de revestimento da semente, na peletização também se pode adicionar uma coloração que torne a semente mais visível no solo e que evidencie a sua qualidade. No processo de peletização são utilizados pós e líquidos cuidadosamente selecionados para formar uma cobertura ao redor da semente uma vez que há uma enorme variação nas características das sementes e nas exigências da cultura. A semente é totalmente recoberta perdendo a sua forma original, não podendo ser possível a identificação de que tipo de cultura se trata (Incote, 2022). Reduz a taxa de deterioração principalmente em hortaliças, reduz a perda quantitativa e qualitativa além de manter a qualidade da semente por mais tempo de armazenamento (Jyoti & Bhandari, 2016).

As sementes também podem ser tratadas na altura da colheita de modo a manter a qualidade durante o armazenamento e o transporte das mesmas. Este armazenamento após o tratamento à base de fungicidas, por um longo período, pode resultar na fitotoxicidade do metabolismo da planta (Lamichhane et al., 2020).

Relativamente ao tratamento de sementes em pré-sementeira com o auxílio de fungicidas sistêmicos, é uma estratégia muito importante e a mais utilizada nas práticas agrícolas da maioria das culturas em todo o mundo, fazendo-se correntemente em países como os Estados Unidos, Austrália e França (Lamichhane et al., 2020; White & Hoppin, 2004; You et al., 2020). Este

tratamento visa a gestão das doenças que afetam muitas culturas agrícolas em todo o mundo (Ayesha et al., 2021).

A gestão de fungos fitopatogênicos utilizando fungicidas é importante para garantir a segurança alimentar (Steinberg & Gurr, 2020). Existem diversos grupos de fungicidas como triazóis, fenilpirróis, fenilamidas, benzimidazóis e estrobilurinas que são utilizados no tratamento de sementes (Zeun et al., 2013). O metalaxyl-M, substância utilizada no tratamento de sementes das variedades em estudo, é uma substância ativa que pertence à família química (grupo) das fenilamidas (Syngenta, 2019). Várias experiências mostram que algumas estirpes de fungos podem desenvolver resistência a fungicidas que contêm esta substância ou outras fenilamidas (Pánek et al., 2022; Syngenta, 2019). Por isso, é que a utilização de fungicidas pertencentes a este grupo, no tratamento de sementes, só são utilizados apenas uma vez na época de crescimento, como preventivos. Isto permite que haja um menor risco dos agentes fitopatogênicos do solo desenvolverem resistência (Syngenta, 2019).

O espinafre, cultura vegetal produzida para diversos mercados, é uma cultura suscetível a muitos agentes fitopatogênicos transmissíveis pelo solo que podem causar problemas de germinação e emergência (Syngenta, 2019). Os fungicidas sistêmicos com a substância metalaxyl-M são utilizados no controle de doenças de plantas causadas por fungos Oomicetas (Sukul & Spiteller, 2000). No entanto, também existem outras espécies de fungos que causam doenças nas plantas tais como os fungos pertencentes às classes Ascomiceta e Dothideomiceta e pertencentes ao grupo de fungos patogênicos denominados de fungos imperfeitos e que se tentam controlar através do mesmo método. Estes causam podridões nas raízes e, conseqüentemente, a morte de sementes ou plântulas e *damping-off* (Cummings et al., 2009). Esta substância é um inibidor eficaz no crescimento do micélio (Farih, 1981) e na formação de esporângios (Matheron & Porchas, 2000), no entanto, não inibe a penetração do fungo dentro da planta hospedeira, só inibe o crescimento micelial na planta (Cohen, 1979). Por outro lado, apesar de muitas das sementes biológicas comerciais e de alguns tratamentos feitos à semente terem sido desenvolvidos para proteger as sementes e as plântulas contra agentes fitopatogênicos, diversos produtos têm sido otimizados para serem utilizados na produção biológica tendo eficácia contra variados fungos (Cummings et al., 2009). No entanto, até ao momento, o tratamento de sementes tem sido a forma mais eficaz de controlar os diversos agentes fitopatogênicos do solo.

2.7. DOENÇAS CAUSADAS POR MICRORGANISMOS PATOGENICOS DO SOLO

As doenças de plantas são cada vez mais um problema na produção de espinafre em Portugal. Estas impedem o cultivo e o crescimento da planta, uma vez que a podem destruir parcialmente ou no seu todo, reduzindo significativamente o rendimento e a qualidade do produto final (Agrios, 2005; Koike et al., 2003; Panth et al., 2020; Xu et al., 2022).

As doenças podem ser causadas por fatores abióticos e bióticos. No caso dos fatores abióticos, como a temperatura, a humidade, os nutrientes, os poluentes, entre outros, quando estes se encontram em níveis acima ou abaixo de um determinado intervalo tolerado pelas plantas causam doenças denominadas de doenças abióticas sendo os três primeiros fatores os mais relevantes. Os fatores bióticos englobam microrganismos fitopatogénicos que podem causar doenças denominadas de doenças bióticas. Os agentes fitopatogénicos perturbam o metabolismo das células vegetais e podem sobreviver no solo durante muitos anos (Agrios, 2005; Koike et al., 2003). As condições quando subótimas podem ser devastadoras durante a germinação das sementes e a emergências das plântulas (Magnée, 2022). Juntamente com as pragas e as espontâneas, as doenças, interferem anualmente na produção ou destroem entre 31-42 % de todas as culturas produzidas no mundo. Estima-se uma média de perdas totais de 36,5 % sendo que, 14,1 % são causadas por doenças o que significa que 14,1 % das colheitas são perdidas, o que se torna um problema económico (Agrios, 2005).

A população mundial continua a aumentar enquanto os recursos naturais continuam a diminuir e, desta forma, os maiores desafios baseiam-se em reduzir as perdas de alimentos e baseiam-se na melhoria da qualidade alimentar, protegendo sempre o meio ambiente (Agrios, 2005; Lahlali et al., 2022). Para tal, é necessário conhecer como a doença se desenvolve, quais os agentes causadores e, a partir daí, começar a estabelecer formas de controlar os agentes fitopatogénicos causadores de determinada doença.

No caso do espinafre, quando estas doenças causam problemas severos levam a uma diminuição da produção da cultura (Waheed et al., 2021) e a uma diminuição da qualidade da colheita (Larsson & Gerhardson, 1992). Fungos habitantes do solo como *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. podem causar uma perda de rendimento de 50 % a 75 % para muitas culturas, como as hortícolas (Panth et al., 2020). No entanto, muitas das doenças causadas pelos agentes fitopatogénicos são difíceis de prever, detetar, diagnosticar e de controlar a tempo uma vez que o solo é um ambiente extremamente complexo o que leva a que também seja complexo entender todos os aspetos destas doenças (Koike et al., 2003).

2.7.1. EFEITOS DE FATORES ABIÓTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

2.7.1.1. EFEITO DA TEMPERATURA

As temperaturas baixas ou elevadas favorecem ou inibem a expressão de certos genes envolvidos na resistência ou na suscetibilidade a doenças. Tanto as plantas como os agentes fitopatogênicos requerem determinadas temperaturas mínimas para crescerem e realizarem as suas atividades. Na presença de temperaturas elevadas, os agentes fitopatogênicos tornam-se ativos e quando as condições lhes são favoráveis podem infectar as plantas e, conseqüentemente, causar doenças. Os agentes fitopatogênicos diferem pela preferência nas temperaturas mais altas ou mais baixas, crescendo e desenvolvendo-se mais rapidamente consoante a temperatura é mais alta, como por exemplo, os microrganismos do género *Fusarium* que prosperam a temperaturas mais baixas, enquanto os do género *Phytophthora* prosperam a temperaturas mais amenas. Este efeito da temperatura no desenvolvimento da doença depende da interação hospedeiro-agente fitopatogénico (Agrios, 2005).

2.7.1.2. EFEITO DA HUMIDADE

Tal como a temperatura, a humidade também influencia o desenvolvimento de doenças nas plantas (Agrios, 2005; Romero et al., 2022). Esta humidade pode se desenvolver na superfície da planta ou ao redor das raízes devido à chuva ou à água de rega que ao se concentrar nestas zonas cria humidade. Esta, é um fator indispensável para a germinação dos esporos e para a sua penetração no hospedeiro através do tubo germinativo e também é essencial para a ativação de agentes fitopatogênicos antes da infeção da planta. Para além disso, a humidade, na forma de chuva ou rega, também pode ajudar à distribuição e disseminação do agente fitopatogénico na planta ou de planta para planta. Na maior parte das doenças que afetam as partes subterrâneas das plantas como as raízes e tubérculos e as plantas jovens, a gravidade da doença pode estar relacionada com a quantidade de humidade do solo e é maior quanto mais perto do ponto de saturação, como por exemplo, no caso de doenças causadas por *Pythium* spp, em que este se movimenta e propaga-se melhor em solos húmidos em que existe uma película de água continua enquanto que, no caso da *Phytophthora*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*, estes originam sintomas quando o solo está húmido mas não com excesso de água. Outros dois exemplos, que têm o seu melhor desenvolvimento quando os solos têm menos água são o caso do *Fusarium* em que este se desenvolve razoavelmente em solos bastante secos e o caso do *Verticillium* em que este se desenvolve melhor quando a planta está em stress hídrico (Agrios, 2005).

2.7.1.3. EFEITO DOS NUTRIENTES

A nutrição da planta afeta a sua taxa de crescimento e a capacidade de ativação dos seus mecanismos de defesa contra as doenças bióticas e abióticas. Realçam-se os macronutrientes nutrientes como azoto, fósforo, potássio, cálcio, cobre e magnésio, mas também muitos micronutrientes como boro, zinco e ferro, entre outros. Por um lado, a quantidade de azoto em elevadas quantidades proporciona um crescimento jovem e nutritivo, um período vegetativo prolongado e um atraso na maturação da planta o que torna a planta mais suscetível a agentes fitopatogénicos. Por outro lado, a ausência de azoto leva a que a planta seja mais fraca, cresça mais lentamente e envelheça mais rapidamente e, por isso, estas plantas são também suscetíveis a agentes causadores de doença. A reduzida disponibilidade de azoto aumenta a suscetibilidade a agentes fitopatogénicos como *Pythium* spp. No entanto, evidências colocam em causa que não seja a quantidade mas sim a forma de azoto (amoniacal ou nítrica) disponível para o hospedeiro ou agente fitopatogénico, a causadora da gravidade ou da resistência à doença (Agris, 2005). O azoto na forma nítrica pode favorecer algumas doenças, alterando a virulência e o crescimento dos agentes fitopatogénicos e aumentando a suscetibilidade do hospedeiro. Pesquisas indicam que o aumento dos níveis de nitratos pode aumentar a severidade do *damping-off* causado por *Verticillium* spp. e reduzir o *damping-off* causado por *Fusarium* spp. (Koike et al., 2003).

O fósforo está descrito como fazendo aumentar a resistência aos agentes fitopatogénicos, melhorando o equilíbrio entre nutrientes na planta ou acelerando a sua maturação ao contrário do potássio que atrasa a maturação da cultura. Isto permite que a planta não seja infetada por agentes fitopatogénicos que preferem tecidos mais jovens. O fósforo e o potássio também reduzem a gravidade da doença em algumas culturas como é o caso da doença mal-do-pé da cevada e da podridão do caule do milho, respetivamente. Desta forma, o potássio parece ter um efeito direto nos estados de estabelecimento e desenvolvimento do agente fitopatogénico no hospedeiro e um efeito indireto na infeção. O cálcio por sua vez reduz a severidade de várias doenças causadas por agentes fitopatogénicos como *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* e *Fusarium* principalmente a espécie *Fusarium oxysporum*. O efeito na resistência a doenças resulta do efeito sobre a composição das paredes celulares e a resistência à penetração dos agentes fitopatogénicos. Estudos mostraram que quando os níveis de alguns micronutrientes como o ferro, o cobre e o manganês, são aumentados ou diminuídos, os níveis de doença podem diminuir ou aumentar, dependendo do tipo de agente fitopatogénico que esteja a causar a infeção. É assim de extrema importância a nutrição adequada das plantas de modo a estarem mais protegidas de novas infeções e mais capazes de limitar as infeções existentes. Contudo, mesmo esta nutrição equilibrada pode afetar o desenvolvimento de

uma doença, quando a concentração dos nutrientes diminui ou aumenta a partir de um determinado intervalo (Agrios, 2005).

2.7.2. EFEITOS DE FATORES BIÓTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

No caso das doenças bióticas, para que estas ocorram há três fatores interligados: O hospedeiro tem de ser compatível com o agente fitopatogénico e as condições climáticas e ambientais têm de ser favoráveis ao desenvolvimento do agente fitopatogénico (Agrios, 2005; Lamichhane et al., 2018). O conjunto destes constitui o triângulo da doença representado na Figura 2.



Figura 2 - Triângulo da doença com os três fatores que originam a doença nas plantas (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

Os agentes fitopatogénicos do solo podem ser denominados de habitantes do solo ou invasores do solo¹, transitórios do solo² ou podem funcionar e viver como organismos não agentes fitopatogénicos do solo sob certas condições que em contacto com tecidos vegetais mortos e em decomposição denominam-se de sapróbios ou saprófitos³ (Koike et al., 2003). O grupo de agentes fitopatogénicos mais importante são os fungos (organismos multicelulares) porque são estes que causam a maior parte das doenças vegetais transmitidas pelo solo (Koike et al., 2003).

As doenças causadas por estes fungos ou pseudo-fungos de solo são agrupadas de acordo com os sintomas que causam (deterioração da semente, podridão das raízes e da zona do colo, podridões vasculares, *damping-off*, manchas nas folhas, ferrugem, entre outras), de acordo com o órgão da planta que afetam (doenças das raízes, do caule e da folhagem) ou de acordo com os tipos

¹ Agentes fitopatogénicos habitantes ou invasores do solo são agentes fitopatogénicos capazes de sobreviver no solo por um tempo relativamente longo.

² Agentes fitopatogénicos transitórios do solo são agentes fitopatogénicos capazes de sobreviver no solo por um tempo relativamente curto.

³ Sapróbios ou saprófitos são organismos que vivem da matéria orgânica em decomposição.

de plantas afetadas (doenças de culturas arvenses, hortícolas, entre outras), no entanto, também se agrupam de acordo com o que causa a doença (Agris, 2005; Koike et al., 2003).

O *damping-off* é uma consequência do ataque da planta a diferentes agentes fitopatogénicos, causando a morte antes e/ou após a sua emergência. Os sintomas de *damping-off* podem ocorrer em pré-emergência, incluindo o apodrecimento das sementes antes da germinação e o apodrecimento das plântulas antes da sua emergência acima do solo, e em pós-emergência o que inclui o apodrecimento das plântulas e da planta, e, geralmente, a morte após a emergência (Lamichhane et al., 2018).

O tipo, a quantidade e a gravidade das perdas causadas por doenças de plantas variam consoante a planta hospedeira, o agente fitopatogénico, a localização, o meio ambiente, as medidas de controlo e a combinação destes fatores (Agris, 2005; Lamichhane et al., 2018). No caso da cultura do espinafre, o *damping-off* ocorre frequentemente em épocas do ano quentes e húmidas e após um historial de produção frequente de espinafre (ou outra cultura hospedeira) (Correll et al., 1994).

Quando há interferência nas funções fisiológicas das plantas por parte dos agentes fitopatogénicos ou dos fatores ambientais adversos, as atividades celulares são interrompidas, alteradas ou inibidas e, conseqüentemente, as células funcionam mal ou morrem, o que origina a doença numa planta. Isto provoca mudanças visíveis na forma, função ou integridade da planta que conferem os sintomas de doença, como por exemplo, se existir uma infeção nas raízes, estas apodrecem e ficam incapazes de absorver a água e os nutrientes do solo (Agris, 2005).

Alguns fungos podem persistir no solo por um longo período de tempo produzindo estruturas de sobrevivência resilientes que são libertadas no solo através das operações culturais e através da decomposição de material vegetal infetado (Koike et al., 2003).

O inóculo da maioria dos agentes fitopatogénicos radiculares situa-se nos 10 cm do perfil do solo, no entanto, as operações culturais poderão redistribuir a posição destes no perfil do solo. No solo existem também outros organismos que competem com estes agentes fitopatogénicos por recursos limitados e muitos dos microrganismos do solo são direta ou indiretamente antagonistas destes agentes fitopatogénicos (Koike et al., 2003). Neste estudo o foco serão os fungos e pseudo-fungos fitopatogénicos do solo que afetam a cultura do espinafre provocando doenças que destroem partes da planta e que levam à perda na produção. Os fungos de solo mais importantes e relevantes para o estudo em causa pertencem aos géneros *Alternaria* (Filo: Deuteromicota), *Fusarium* (Filo: Deuteromicota), *Rhizoctonia* (Filo: Basidiomicota), *Sclerotinia* (Filo: Deuteromicota) e *Verticillium* (Filo: Deuteromicota) e os pseudo-fungos, *Phytophthora* (Filo: Oomicota) e *Phytium* (Filo: Oomicota) (Agris, 2005; *Dictionary of the Fungi*, 2022).

2.7.3. DOENÇAS CAUSADAS POR ORGANISMOS PERTENCENTES AO FILO OOMICOTA

Dentro do Filo Oomicota os géneros *Pythium* e *Phytophthora* pertencentes à família Phythiaceae e Peronosporaceae, respetivamente, são os géneros mais importantes enquanto causadores de doenças em plantas (Agrios, 2005; Beakes et al., 2014; van der Plaats-Niterink, 1981).

As doenças causadas por oomicetas são de dois tipos; 1) doenças que afetam partes da planta presentes no solo ou em contacto com o solo, como por exemplo, raízes, caules inferiores, tubérculos, sementes e frutas sendo estas causadas pelo género *Pythium* e algumas espécies de *Phytophthora* e 2) doenças que afetam apenas ou principalmente partes da planta acima do solo, como as folhas, caules jovens e frutos sendo estas causadas por algumas espécies de *Phytophthora*. O género *Pythium* no espinafre pode causar podridão de sementes, *damping-off* e podridão radicular enquanto o género *Phytophthora* pode causar podridão das raízes e caules (Agrios, 2005). Estas podem causar danos às culturas, no entanto, nem todas as espécies são consideradas fungos fitopatogénicos. Por um lado, a maioria das espécies são saprófitas que decompõem a matéria orgânica e reciclam nutrientes sendo que algumas são benéficas como agentes de controlo biológico, por outro lado, algumas são consideradas fungos fitopatogénicos (saprófitas e invasores oportunistas) e são estas as que causam as doenças nas plantas (Amorim et al., 2011; Pegg & Manners, 2014a; Schroeder et al., 2013).

2.7.3.1 *PYTHIUM* SPP.

Existem diversas espécies do género *Pythium* que causam doenças nas plantas e a sua identificação é importante porque variam consoante o hospedeiro e as temperaturas necessárias ao seu desenvolvimento (Pegg & Manners, 2014a). As doenças causadas por fungos do género *Pythium* afetam várias estruturas de diversas culturas incluindo sementes, plântulas e raízes (Agrios, 2005). As espécies de *Pythium* que podem causar *damping-off* no espinafre podem ser o *Pythium aphanidermatum*, *Pythium paroecandrum* (Naiki et al., 1986), *Pythium ultimum*, *Pythium heterothallicum*, *Pythium sylvaticum* (Larsson, 1994) e *Pythium spinosum* (Hirayamai & Tojo, 1999).

No entanto, estudos anteriores caracterizaram *Pythium ultimum* como o agente fitopatogénico causador do *damping-off* mais prevalente nos campos de espinafres na Suécia (Europa) (Larsson, 1994), na Califórnia (EUA) (Koike et al., 2011) e na Geórgia (USA) (Sumner et al., 1976). Esta espécie é uma vasta espécie hospedeira capaz de infetar diversas culturas incluindo a beterraba, cenoura, soja, espinafre, tomate e trigo (Rai Mahendra et al., 2020). Os maiores danos são causados à semente e às raízes das plântulas durante a germinação, antes ou após a emergência (Agrios, 2005; Magnée, 2022).

Pythium spp. pode estar presente nas raízes jovens e caules de plântulas e em raízes com funções transportadoras de água e nutrientes de plantas mais velhas. A fase de plântula é extremamente suscetível ao ataque por *Pythium* spp. e, quando as condições ambientais são favoráveis, o potencial para perdas graves é constante (Pegg & Manners, 2014a). As infecções causadas por *Pythium* são mais graves quando o solo está húmido por longos períodos de tempo, quando a temperatura é desfavorável, abaixo de 10 °C, para a planta hospedeira, quando há excesso de azoto no solo e quando a mesma cultura é plantada no mesmo lugar por vários anos consecutivos (Agrios, 2005).

2.7.3.1.1. SINTOMAS

Os sintomas provocados por *Pythium* spp. são idênticos e até confundidos com várias doenças radiculares causadas por fungos do género *Phytophthora*, *Aphanomyces*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Chalara* (Pegg & Manners, 2014a) que proliferam causando um rápido colapso e morte da radícula (Agrios, 2005). *Pythium* spp. pode causar *damping-off*, apodrecimento da semente, corte e podridão do caule e podridão da parte aérea, no entanto, geralmente atacam o tecido imaturo designado por “root tip” que é o primeiro tecido que entra em contacto com a zona do solo fora da rizosfera (Alves Barboza, 2014; Pegg & Manners, 2014a). Na Figura 3 observa-se o sintoma mais geral, *damping-off*.



Figura 3 - Necroses da semente (A), semente de feijão saudável e diversas sementes e plântulas infetadas por *Pythium* spp. (B) e *damping-off* de plântulas de pepino infetadas por *Pythium* spp. (C) (Fonte: Agrios, 2005).

No caso das sementes de plantas suscetíveis (Figura 3 (A)), quando estas são semeadas em solos infestados e atacadas por fungos que originam necroses (morte dos tecidos), estas sementes não germinam, ficam moles e suaves e, conseqüentemente, acabam por ficar necróticas, murcham e desintegram-se (Agrios, 2005) como se observa na Figura 3 (A). No entanto, estas podem ser atacadas antes da emergência (Figura 3 (B)) prejudicando a germinação da semente e a emergência da plântula ou após a emergência (Figura 3 (C)) dando-se a morte da planta. As plantas, são atacadas nas raízes e, algumas vezes, nos caules. A zona atacada pelo agente fitopatogénico, fica encharcada e descolorida acabando por colapsar (Agrios, 2005; Pegg & Manners, 2014a). A parte basal do caule da plântula fica mais macia e mais fina do que as partes acima desta e que não foram

invadidas. Este ataque proporciona a queda da plântula no solo (Agrios, 2005). Após a queda da planta, o fungo continua a invadi-la o que origina a murchidão e a morte (Figura 3 (C)). As plantas que sobrevivem a uma infecção precoce podem adquirir uma forma atrofiada e com folhas amarelas devido ao facto de a plântula não conseguir absorver água e nutrientes suficientes através do sistema radicular que está danificado (Pegg & Manners, 2014a).

Se a infecção ocorrer quando a planta está mais desenvolvida e possui células espessas, o avanço do fungo é interrompido no ponto de infecção e apenas se desenvolvem pequenas lesões (Agrios, 2005). Por isso é que quando este agente fitopatogénico infeta plantas mais velhas, estas raramente morrem, no entanto, pode ocorrer a morte da radícula. As plantas mais velhas normalmente desenvolvem lesões nas raízes e no caule, as raízes apodrecem acabando por ocorrer a perda de raízes finas e pelos radiculares (extensões longas das células epidérmicas da raiz) e o crescimento da planta pode ser retardado, provocando o atrofio da planta e, conseqüentemente, a diminuição drástica dos rendimentos da cultura. No entanto, quando ocorre o atrofio da planta, esta pode murchar e morrer (Agrios, 2005; Pegg & Manners, 2014a).

2.7.3.1.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O pseudo-fungo *Pythium* spp. tem duas fases de reprodução, a assexuada e a sexuada. Para entender a capacidade que o fungo *Pythium* tem de causar doenças, é necessário saber como os esporângios (esporos assexuados), os zoósporos (esporos assexuados), oósporos (esporos sexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam (Pegg & Manners, 2014a).

As estruturas reprodutivas (Figuras 4 (A) e (B)) de *Pythium* (Figura 5) podem ser observadas na Figura 4 (A e B).

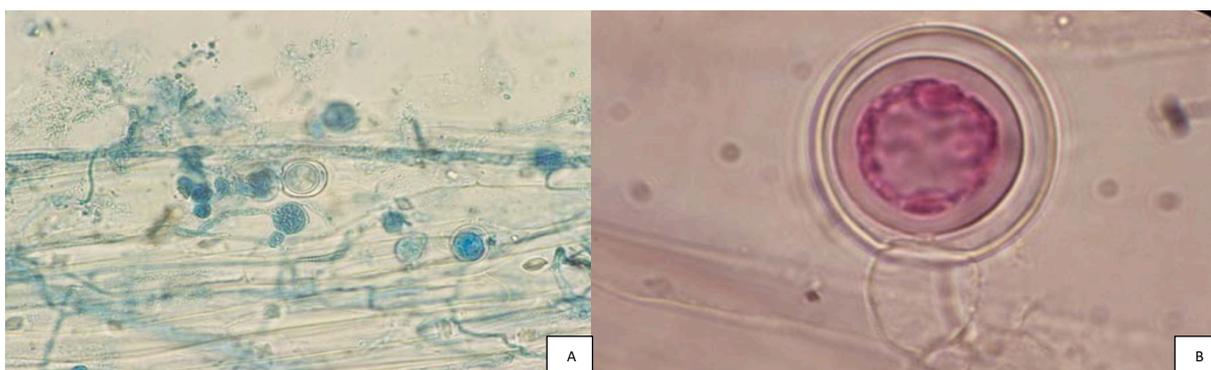


Figura 4 - Micélio e estruturas assexuadas (esporângios) num tecido radicular infetado por *Pythium* spp. (A) (Observação microscópica Ampliação 400x) e estrutura sexuada (oósporo) correspondente a *Pythium* spp. (Observação microscópica Ampliação 1000x) (B) (Fonte: Agrios, 2005).

O fungo *Pythium* é um organismo unicelular pertencente ao filo Oomicota de onde fazem parte muitos flagelados unicelulares, os zoósporos que são formados a partir da reprodução assexuada (Abad et al., 2022). Os zoósporos são dispersos através de águas superficiais, escoamento de água de áreas infetadas, salpicos de água e podem também ser dispersos na água de rega. Algumas espécies de *Pythium* podem ser dispersas por via aérea através do vento (Pegg & Manners, 2014a). É através da disponibilidade de água livre que os zoósporos se movimentam e infetam a planta. Desta forma, quando o solo húmido é fortemente infestado com este agente fitopatogénico, quer as sementes, quer as plântulas jovens instaladas nesse solo podem ser atacadas por ele (Agrios, 2005). Quando as plantas são colocadas próximas umas das outras e a humidade é elevada, o fungo pode se propagar como um micélio (Pegg & Manners, 2014a) que se desenvolve nas raízes. Este dá origem aos esporangióforos que contêm na sua extremidade os esporângios (Figura 4 (A)), produzindo 100 ou mais zoósporos flagelados que são libertados, germinam e penetram no tecido do hospedeiro iniciando a infeção (Agrios, 2005). Os oósporos (Figura 4(B)) são reproduzidos sexualmente através da união entre dois gametas diferentes, o oogónio (gameta feminino) e o anterídio (gameta masculino) e são libertados através de material vegetal em decomposição (Pegg & Manners, 2014a). São resistentes a níveis de temperatura e de humidade adversas e servem como um estado de sobrevivência e de resistência/reposo do fungo. Estes germinam de maneira semelhante aos esporângios sendo esta germinação de ambos determinada principalmente pela temperatura. Temperaturas acima de 18 °C favorecem a germinação por tubos germinativos, enquanto temperaturas entre 10-18 °C induzem a germinação por meio de zoósporos (Agrios, 2005). A patogenicidade da *Pythium ultimum* que causa o *damping-off* é mais elevada sob condições de elevada humidade por um longo período de tempo (Agrios, 2005; Schmitthenner, 1970) e sob temperaturas de solo desfavoráveis para a planta hospedeira (Agrios, 2005; Paulitz & Baker, 1987). Podem contaminar a maioria dos equipamentos utilizados no manuseamento do material vegetal e equipamento utilizado pelo operador como, por exemplo, calçado. Esta propagação também é ajudada pelo movimento de solo infestado (Pegg & Manners, 2014a). O ciclo de vida de *Pythium* pode ser observado na Figura 5.

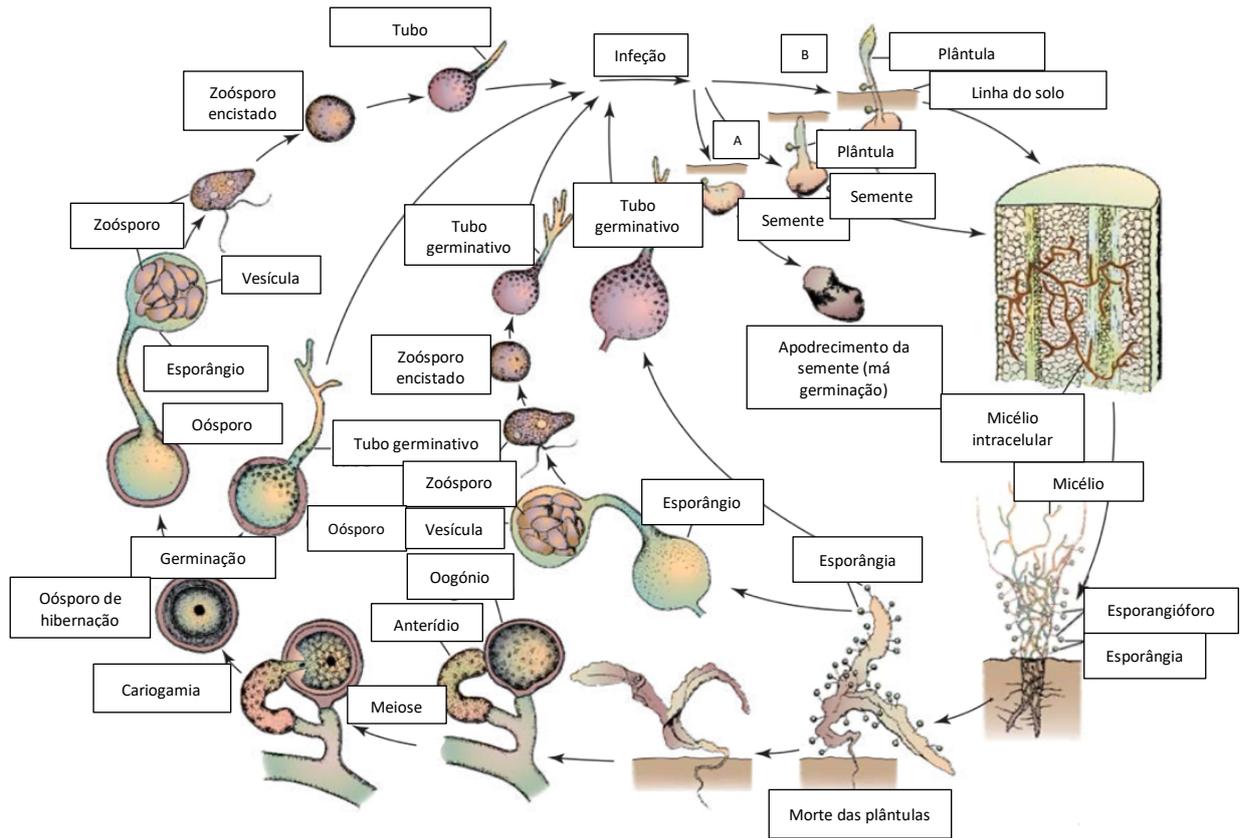


Figura 5 - Ciclo de vida de *Pythium* spp., causando *damping-off* em pré-emergência (A) e pós-emergência (B) (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

2.7.3.2. PHYTOPHTHORA SPP.

As espécies de *Phytophthora* spp. causam diversas doenças que são consideradas devastadoras em muitas culturas diferentes (Agrios, 2005). A maioria das espécies causa sintomas semelhantes ao do pseudo-fungo *Pythium* como podridões de raízes, *damping-off* em pré e/ou pós-emergência, podridões de caules inferiores, tubérculos e rebentos. No entanto, algumas espécies podem causar manchas nas folhas (Agrios, 2005; Magnée, 2022).

Este agente fitopatogénico causa danos em toda a parte do mundo onde os solos são muito húmidos para o ótimo crescimento de plantas suscetíveis e onde a temperatura permanece bastante baixa, à volta de 15-23 °C (Agrios, 2005). As espécies que causam doenças consideradas extremamente destrutivas em hortícolas são *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora syringae* (Agrios, 2005).

2.7.3.2.1. SINTOMAS

A maioria das espécies de *Phytophthora* causam o apodrecimento das raízes e dos caules inferiores em diversas culturas. Pode-se observar na Figura 6, a morte do caule de uma planta de soja (Agrios, 2005).



Figura 6 - Caule morto de uma planta de soja (Fonte: Agrios, 2005).

Plantas infetadas com o agente fitopatogénico *Phytophthora* apresentam, inicialmente, sintomas de seca e carência nutricional tornando-se plantas fracas e suscetíveis ao ataque de outros agentes fitopatogénicos ou suscetíveis a outras condições que sejam a causa da morte das plantas. Nas plantas afetadas pela podridão radicular, as raízes jovens estão na sua maior parte mortas enquanto as raízes mais velhas apresentam lesões necróticas. Este agente fitopatogénico pode levar ao declínio de todo o sistema radicular, acabando a planta por morrer (Agrios, 2005).

2.7.3.2.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O pseudo-fungo *Phytophthora* tem duas fases de reprodução, a assexuada e a sexuada. Para entender a capacidade que o fungo *Phytophthora* tem de causar doenças, é necessário saber como os clamidósporos (esporos assexuados), os zoósporos (esporos assexuados), oósporos (esporos sexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam.

As estruturas reprodutivas do género *Phytophthora* podem ser observadas na Figura 7.

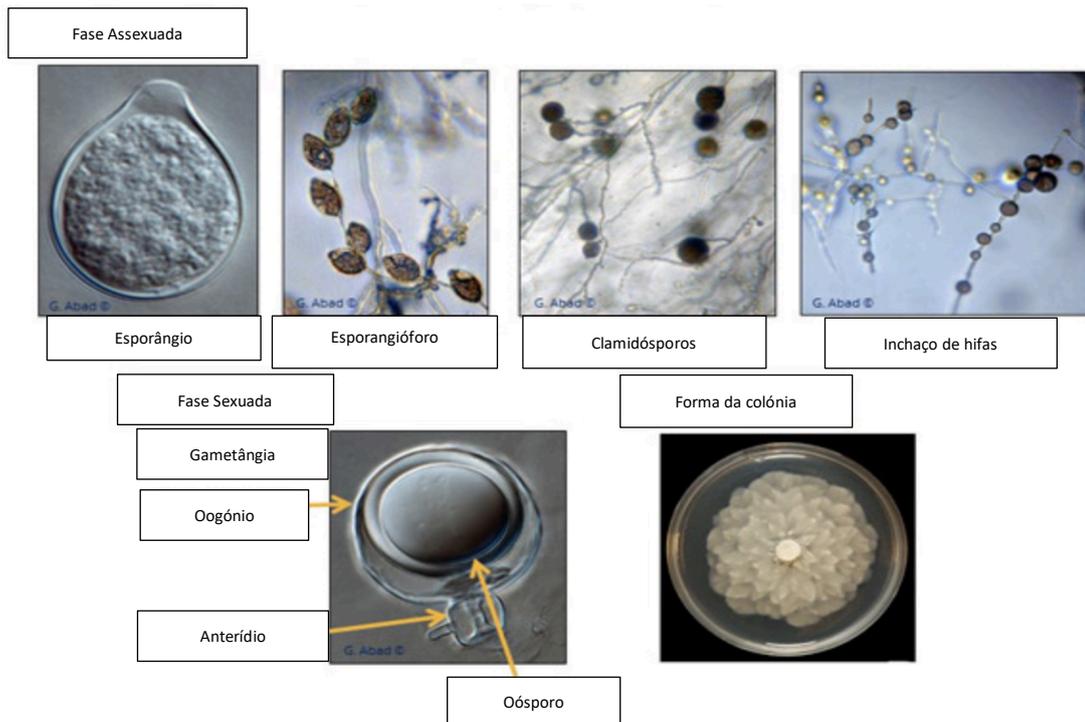


Figura 7 - Estruturas reprodutivas e respectivos esporos assexuados, de resistência e sexuais correspondentes a *Phytophthora* spp. (Observação microscópica) (Fonte: Adaptado de Abade t al., 2022).

A *Phytophthora* é um organismo unicelular pertencente ao filo Oomicota, de onde fazem parte muitos flagelados unicelulares, os zoósporos que são formados a partir da reprodução assexuada (Abad et al., 2022). As espécies que causam podridões de raízes e caules sobrevivem a invernos frios ou verões quentes e secos em estruturas reprodutivas sexuais como os oósporos, em estruturas assexuadas e de resistência como os clamidósporos ou na forma de micélio, em raízes ou caules infetados. Estas estruturas também têm a capacidade de sobreviverem no solo. Na primavera, os clamidósporos e os oósporos germinam em condições húmidas para formar os esporângios. Os esporângios libertam pequenos esporos com capacidades de se movimentar na película de água, os zoósporos. Tal como no pseudo-fungo *Pythium*, os zoósporos podem movimentar-se na água livre que está na superfície das folhas ou no solo encharcado, no entanto, são suscetíveis à seca (Abad et al., 2022; Agrios, 2005). Ao se movimentarem na água do solo infetam as raízes de hospedeiros suscetíveis (Agrios, 2005). Estes são atraídos pelas raízes das plantas enquanto se movimentam pelo solo formando quistos (Abad et al., 2022) que germinam para formar estruturas microscópicas denominadas de hifas. Desta forma, o agente fitopatogénico desenvolve-se e cresce nos tecidos da planta de modo a obter nutrientes, acabando por infetar a planta. Desta forma, a *Phytophthora* produz mais clamidósporos ou oósporos que estruturas denominadas de esporângio e, por isso, o ciclo de vida continua (Abad et al., 2022). O ciclo de vida da espécie *Phytophthora* spp. pode ser observado na Figura 8.

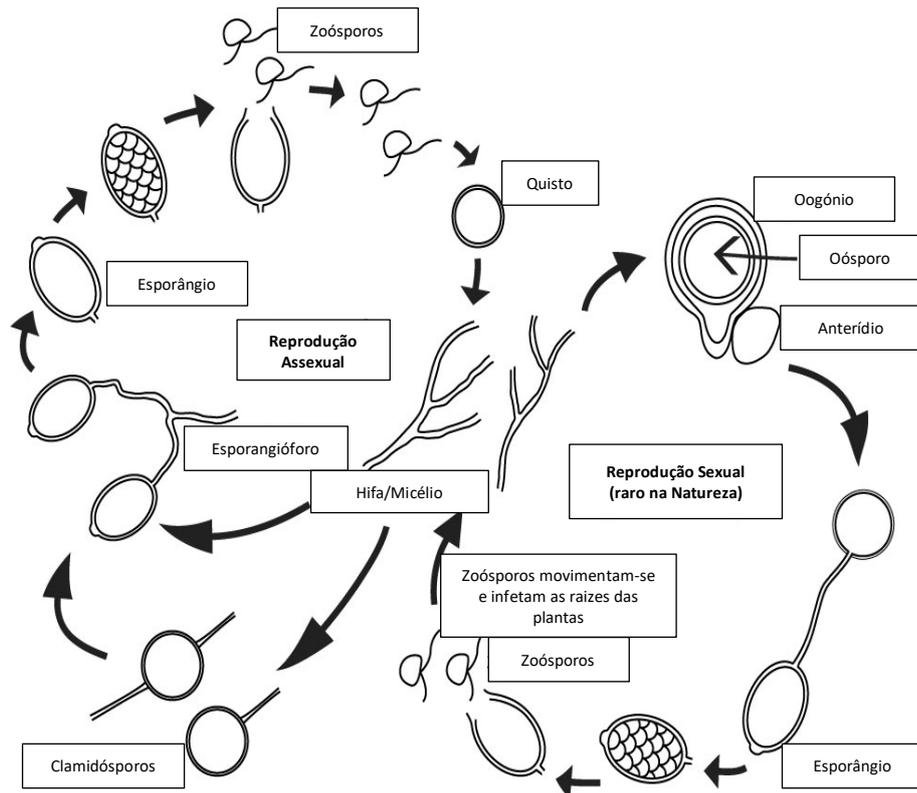


Figura 8 - Ciclo de vida do agente fitopatogênico *Phytophthora* spp. (Fonte: Adaptado de Abade et al., 2022).

2.7.4. DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS PERTENCENTES AO FILO DEUTEROMICOTA

Os fungos mitospóricos, pertencentes ao reino Fungi, filo Deuteromicota são denominados de deuteromicetas ou fungos imperfeitos. São fungos imperfeitos uma vez que a fase sexuada é desconhecida e só se reproduzem através de esporos assexuados formados por mitose como esporos do tipo conídios e clamidósporos. Comportam-se como fungos mitospóricos por que se reproduzem, dispersam e infetam originando doenças e hibernam como micélio, conídios e clamidósporos ou em todas estas formas. Produzem um micélio haploide com paredes cruzadas, conídios nas extremidades de conidióforos e causam diversas doenças em diversos tipos de plantas como manchas nas folhas, ferrugens, cancrs, manchas nos frutos, podridão dos frutos, antracnoses, podridão do caule, podridão da raiz, colonização vascular e podridão mole. Alguns dos fungos mitospóricos mais comuns e que causam principalmente sintomas foliares, mas também causam outros sintomas numa diversidade de plantas hospedeiras é o fungo fitopatogênico *Alternaria*. No entanto, fungos fitopatogénicos dos géneros *Fusarium* e *Verticillium* que causam a colonização vascular também são dois dos fungos mitospóricos mais comuns. O fungo *Sclerotinia* spp. é um fungo pertencente ao filo Deuteromicota, no entanto, é considerado um fungo estéril porque não produz esporos conhecidos, quer esporos assexuados, quer esporos sexuados, em condições de campo (Agrios, 2005).

2.7.4.1. *ALTERNARIA* SPP.

Entre as doenças mais frequentes e destrutivas em oleráceas (legumes ou vegetais usados na alimentação) estão as doenças causadas por *Alternaria* spp., que agregando as perdas totais, estão entre as mais altas causadas por agentes fitopatogénicos podendo causar perdas nas culturas de 6 a 100 %, caso não sejam adotadas medidas de controlo adequadas (Agrios, 2005; Marraiki et al., 2012; Töfoli et al., 2015). Nos últimos anos, esta doença tem sido considerada uma das mais importantes com o surgimento de novas espécies, aumentando a agressividade e a dificuldade no seu controlo. As doenças causadas por *Alternaria* spp. são típicas de épocas como a primavera e o verão, no entanto, podem causar danos nas épocas de outono e inverno quando estes são mais atípicos. São caracterizadas pela redução prematura da área foliar, perda de vigor das plantas, quebra de pecíolos, pedúnculos, hastes e caules, presença de frutos necróticos, redução do ciclo de vida e do potencial produtivo. O aumento da suscetibilidade à doença normalmente está associado a tecidos que tenham alcançado a maturidade ou plantas em fase reprodutiva uma vez que nesta fase ocorre a procura de maior concentração de açúcares e nutrientes para a formação de frutos, tubérculos, bolbos, raízes e rebentos novos em detrimento da folhagem mais velha, o que favorece o processo infeccioso nos órgãos exportadores de nutrientes. Também as plantas debilitadas por viroses, que estão malnutridas e sujeitas a constantes oscilações climáticas são mais propensas à doença (Töfoli et al., 2015).

2.7.4.1.1. SINTOMAS

Os sintomas tendem a aparecer inicialmente nas folhas mais velhas evoluindo para as partes mais jovens da planta (Töfoli et al., 2015). Desta forma, aparecem sintomas como manchas cloróticas e necróticas que mais tarde se tornam lesões irregulares na superfície superior das folhas inferiores e médias, no entanto, este fungo também pode causar *damping-off* das plântulas, podridão do caule e podridão de tubérculos e frutos (Agrios, 2005; Aslam et al., 2019; Czajka et al., 2015; Marraiki et al., 2012).

No espinafre o principal sintoma descrito denomina-se de Mancha Foliar sendo o nome mais comum Mancha de *Alternaria*. Este sintoma é causado pelo agente causal *Alternaria spina* (Töfoli et al., 2015). Aslam et al. (2019) e Marraiki et al. (2012), identificaram a espécie *Alternaria alternata* como o agente causal do espinafre. As manchas nas folhas podem ser manchas isoladas ou em grupo, necróticas, circulares ou angulares, com características anéis concêntricos, bordos bem definidos e envoltos ou não por um halo amarelo (Töfoli et al., 2015). Na Figura 9 (A, B e C), observam-se alguns sintomas causados pela espécie *Alternaria alternata* nas folhas de espinafre.



Figura 9 - Plantas de espinafre doentes com sintomas de manchas nas folhas (A), folha doente com manchas pretas características na página superior da folha (B) e manchas pretas características na página inferior de uma folha de espinafre (C) (Fonte: Kipkoge, 2019).

Estas manchas iniciam-se na forma de pontos necróticos que adquirem uma coloração preta, e ao se desenvolverem, coalescem causando a destruição do limbo (Agrios, 2005; Aslam et al., 2019; Czajka et al., 2015; Marraiki et al., 2012; Töfoli et al., 2015). Estas manchas normalmente, aparecem em elevado número e tamanho (Agrios, 2005; Töfoli et al., 2015).

As folhas mais baixas e senescentes são atacadas normalmente em primeiro lugar e a doença progride no sentido ascendente fazendo com que as folhas afetadas fiquem amarelas e se tornem senescentes, acabando por secar e cair (Agrios, 2005). As lesões nos caules, hastes e pecíolos são de cor castanho-escuro e relativamente à sua forma são alongadas, deprimidas, podendo ou não apresentar halos concêntricos (Töfoli et al., 2015). As lesões do caule que se desenvolvem nas plântulas podem desenvolver cancrios que podem aumentar de tamanho, acabando por circundar o caule e matar a planta (Agrios, 2005). Nas plântulas ou plantas jovens, como acontece em culturas da família das solanáceas, brássicas e apiáceas, podem formar-se lesões no colo das plântulas, acabando estas por murcharem, sofrerem estrangulamento ou sofrerem *damping-off*, o que causa a sua morte. Nas raízes, as lesões são extensas, escuras, levemente afundadas, deprimidas e podem apresentar fendas (Agrios, 2005; Töfoli et al., 2015). Em alturas do ano em que os períodos são quentes e húmidos, as lesões nas folhas, caules, pecíolos, frutos, raízes e tubérculos geralmente são recobertas por um micélio de cor negra que é formado por conídios e conidióforos do fungo (Töfoli et al., 2015). Muitas das espécies de *Alternaria* são principalmente saprófitas (Agrios, 2005; Singh V et al., 2015) e, por isso, não infetam tecidos vegetais vivos e crescem apenas em tecidos vegetais mortos ou em decomposição e, no máximo, em tecidos senescentes ou velhos como pétalas velhas, folhas velhas e frutas maduras. Desta forma, por vezes, é difícil entender se a causa da doença é derivada do agente fitopatogénico ou se este é um contaminante secundário. Por outro lado, muitas espécies de *Alternaria* também produzem toxinas que afetam plantas diferentes ou são específicas do hospedeiro. Em algumas exceções, as doenças são mais prevalentes em tecidos mais velhos e senescentes, particularmente, em plantas que crescem mal devido a algum tipo de stress (Agrios, 2005).

2.7.4.1.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O fungo *Alternaria* spp. só tem a fase de reprodução assexuada e para entender a capacidade que o fungo tem de causar doenças, é necessário saber como os conídios (esporos assexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam.

Este agente fitopatogénico produz esporos assexuados através da reprodução assexuada denominados de conídios (Figura 10). O estágio conidial ou assexual é frequentemente denominado de estágio anamorfo, mitospórico ou imperfeito. É através deste estado assexuado que o fungo na sua grande maioria se reproduz e causa a maioria das infeções (Agrios, 2005). A estrutura reprodutiva de *Alternaria* spp. pode ser observada na Figura 10.

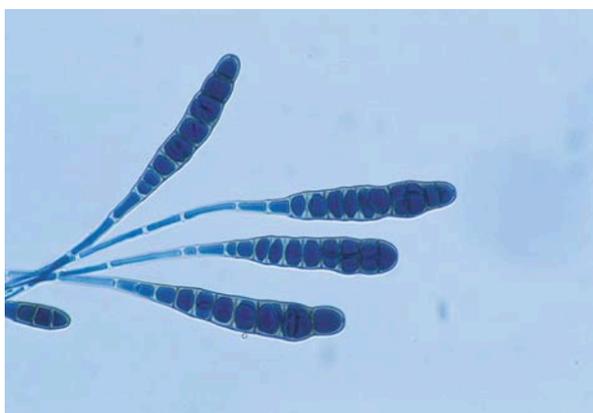


Figura 10 - Conídios de *Alternaria* spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).

Este agente fitopatogénico tem um micélio de cor escura e nos tecidos mais velhos e que estão doentes produzem conidióforos curtos, simples e eretos que contêm cadeias simples e ramificadas de conídios. O fungo *Alternaria* infeta principalmente a folhagem das plantas com os seus esporos conídios (Agrios, 2005). Quando estes estão presentes na cultura, a sua disseminação é feita através da água, chuva, vento, poeiras e insetos (Rotem, 1994). No entanto, os trabalhadores e equipamentos agrícolas e os animais em contacto com as folhas molhadas podem disseminar o fungo (Rotem, 1994; Töfoli et al., 2015). Nas áreas infetadas, é produzida uma elevada quantidade de conídios que se espalham para outras áreas e causam mais infeções (Agrios, 2005).

O agente fitopatogénico sobrevive em restos de cultura e hospedeiros intermediários podendo sobreviver em equipamentos agrícolas, caixas usadas ou sementes. O fungo pode permanecer viável no solo na forma de micélio, de conídios ou clamidósporos, em restos de plantas infetadas, em folhas caídas e nas sementes de plantas infetadas e até como conídios no solo (Agrios, 2005; Töfoli et al., 2015). Neste caso, quando as plantas perenes são infetadas, os agentes fitopatogénicos podem hibernar como micélio nos tecidos infetados e quando são transportados com as sementes de plantas anuais, pode ocorrer o *damping-off* das plântulas

(Agrios, 2005). Os conídios deste agente fitopatogénico são muito resistentes a baixos níveis de humidade, podendo permanecer viáveis até um ano nestas condições (Töfoli et al., 2015).

A doença pode apresentar alto poder destrutivo em condições de elevadas temperaturas e humidade (Töfoli et al., 2015). A ocorrência de uma epidemia severa está sempre associada a temperaturas diárias por volta de 25 a 32 °C. De acordo com a referência bibliográfica, as temperaturas mínimas, ótimas e máximas necessárias para a germinação dos conídios são de 5-7 °C, 25-27 °C e 30-32 °C, respetivamente. No entanto, não é só a temperatura o fator importante para a germinação dos conídios, mas também a humidade que pode ser suprida pela chuva, água de rega ou orvalho. A presença de água livre na superfície foliar, através destas três formas de obter humidade, é essencial para a germinação, infeção e esporulação do fungo. De uma forma geral, os maiores índices de mancha-de-alternária ocorrem em condições de 40 % de humidade relativa, durante o dia e 95 %, durante a noite. Se houver humidade e as temperaturas forem adequadas, os conídios germinam e infetam rapidamente as plantas podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula, por ferimentos ou através dos estomas. No entanto, o facto de haver uma frequente ocorrência de períodos húmidos com períodos secos pode favorecer a doença (Figura 11) (Töfoli et al., 2015). A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro e provocando alterações em diversos processos fisiológicos que se manifestam na forma de sintomas exteriores. Em condições de campo, as lesões surgem 3 a 5 dias após a inoculação (Töfoli et al., 2015), no entanto, em condições controladas podem aparecer pontuações negras 24 horas após a inoculação (Slavov et al., 2014; Töfoli et al., 2015). O ciclo de vida de *Alternaria* spp. pode ser observado na Figura 11.

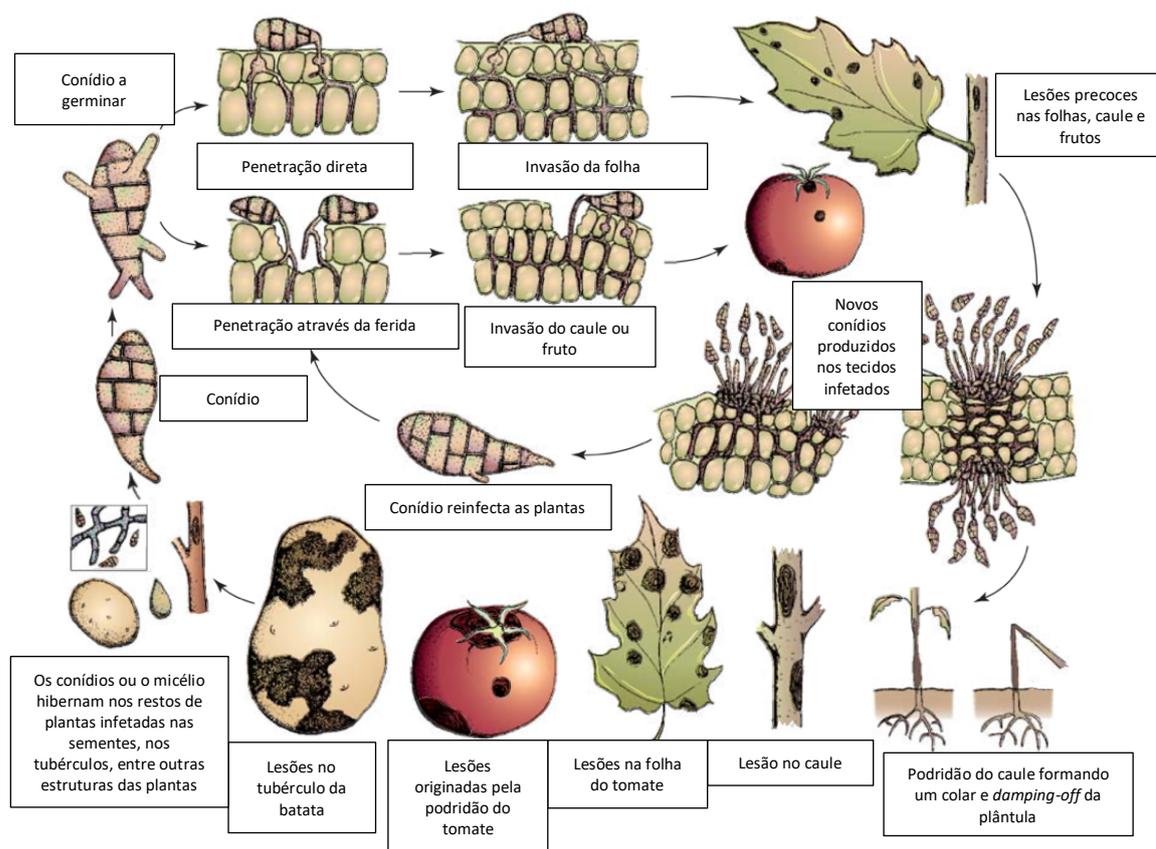


Figura 11 - Ciclo de vida do agente fitopatogênico *Alternaria* spp. na cultura do tomate (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

2.7.4.2. FUNGOS CAUSADORES DE MURCHIDÕES VASCULARES E PODRIDÃO RADICULAR E DO COLO

As doenças denominadas de murchidões vasculares são doenças generalizadas e muito destrutivas. Os sintomas causados e que conseguimos observar num período de tempo mais ou menos rápido é a murchidão, o escurecimento e a morte das folhas e dos rebentos das plantas e, em último caso, a morte completa da planta (Agrios, 2005; Bahadur, 2021; LeBlanc et al., 2017; Xiong & Zhan, 2018). Associados a esta sintomatologia há sobretudo dois géneros de fungos, *Fusarium* e *Verticillium* (Agrios, 2005) mais propriamente a espécie *Fusarium oxysporum* (Bahadur, 2021; Volesky et al., 2022). Todas as doenças que causam murchidões vasculares têm certas características em comum. As folhas infectadas ou partes de plantas infectadas perdem a turgescência, tornam-se flácidas e a coloração vai de uma coloração verde-clara a amarelo-esverdeado, acabando por murchar e cair.

Nos cortes transversais de caules e ramos infectados, as áreas necróticas descoloridas aparecem como anéis completos ou interrompidos consistindo em tecidos vasculares descoloridos. Nos vasos do xilema de caules e raízes infectadas, estão normalmente estruturas como micélio, e

esporos do agente causal originando o entupimento dos vasos (Agrios, 2005; Bahadur, 2021). Grande parte das vezes, as células do parênquima que circundam os vasos do xilema são estimuladas por secreções do agente fitopatogénico e dividem-se excessivamente, e isso combinado com o facto de as paredes dos vasos estarem mais finas e fracas leva a que haja uma redução do diâmetro ou colapso completo dos vasos. As toxinas secretadas nos vasos xilémicos pelos fungos causadores de murchidão são transportadas para as folhas, causando a redução da síntese de clorofila ao longo das nervuras e a redução da fotossíntese, interrompendo a permeabilidade das membranas celulares das folhas e a sua capacidade de controlar a perda de água através da transpiração, resultando em epinastia foliar, murchidão, necrose intervenal, escurecimento e morte (Agrios, 2005).

2.7.4.2.1. *FUSARIUM* SPP.

Várias espécies de *Fusarium* podem causar doenças nas culturas, sendo no entanto a espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* o agente causal que origina a doença na cultura do espinafre (Foss & Jones, 2005; E. Gatch, 2013; E. W. Gatch & du Toit, 2017; Volesky et al., 2022; Waheed et al., 2021). Os sintomas podem ser observados precocemente tanto em pré-emergência como em pós-emergência (Correll et al., 1994; Magnée, 2022). A murchidão das plantas ocorre como resultado da presença e atividades do agente fitopatogénico nos vasos do xilema da planta. Plantas inteiras podem morrer em poucas semanas embora em plantas perenes a morte pode ocorrer vários meses ou anos após a infeção. Enquanto a planta infetada estiver viva, os fungos causadores da murchidão vascular permanecem nos tecidos vasculares, mais propriamente no xilema, e em algumas células envolventes. Somente quando a planta infetada morre devido à doença, os fungos movem-se para outros tecidos e esporulam na superfície ou perto da superfície da planta morta (Agrios, 2005).

2.7.4.2.1.1. SINTOMAS

A murchidão causada por *Fusarium* spp. é uma doença fúngica que causa a murchidão e a morte de plantas de espinafre em qualquer estágio de crescimento. É considerada a doença mais grave das culturas de sementes de espinafre (Foss & Jones, 2005). A doença causa elevadas perdas, especialmente nas variedades suscetíveis e quando as temperaturas do solo e do ar são bastante elevadas durante grande parte da época do ano. (Agrios, 2005; Waheed et al., 2021). Esta doença é favorecida por solos quentes e ácidos (E. W. Gatch & du Toit, 2017). O ataque deste agente fitopatogénico na cultura do espinafre pode levar a uma perda da colheita de 100 %, se não for controlada no campo (Foss & Jones, 2005; Waheed et al., 2021). Os primeiros sintomas aparecem

como uma leve clorose inter-nervuras das folhas jovens. Posteriormente, as folhas mais velhas apresentam epinastia causada pela queda dos pecíolos. Plantas infetadas na fase de plântula murçam e morrem após o aparecimento dos primeiros sintomas. As plantas mais velhas no campo podem murchar e morrer repentinamente se a infecção for severa e se o clima for favorável ao agente fitopatogénico. Nas plantas mais velhas, o clareamento das nervuras e a epinastia foliar são seguidos por atrofia das plantas, amarelecimento das folhas inferiores, formação ocasional de raízes adventícias, murchidão das folhas e caules jovens, desfolha, necrose marginal das restantes folhas e, por último, a morte da planta (Agrios, 2005; Bahadur, 2021; Waheed et al., 2021). Normalmente, estes sintomas aparecem apenas num dos lados do caule e progridem ascendentemente até que a folhagem e o caule morrem. Nos cortes transversais próximos à base do caule da planta infetada, é evidente o aparecimento de um anél necrótico na área dos feixes vasculares como se pode observar na Figura 12. A extensão ascendente da descoloração depende da gravidade da doença. As raízes, como se pode observar na Figura 12 também são infetadas e após um período inicial de desnutrição, as raízes laterais menores apodrecem (Agrios, 2005). Em estados avançados de desenvolvimento da doença, há medida que os tecidos da planta começam a envelhecer, o agente fitopatogénico move-se para fora do tecido vascular e coloniza o tecido morto e em decomposição produzindo massas de esporodóquios (Figura 15) nos resíduos da colheita. Os esporodóquios produzem grande número de macroconídios que eventualmente retornam ao solo (Bahadur, 2021; Mace et al., 1981). Na Figura 12 pode-se observar o corte transversal do caule de duas plantas, tomate e espinafre, ambas infetadas.



Figura 12 - Planta de tomate infetada (descoloração necrótica severa dos tecidos vasculares) (A) e planta de espinafre infetada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (descoloração castanho-escuro a preta) (Fonte: Agrios, 2005 (A) e Du Toit et al., 2005 (B)).

Nas podridões das raízes, as raízes de plantas jovens apresentam uma descoloração avermelhada que se torna mais escura e maior com o tempo. Esta descoloração pode cobrir a raiz principal e o caule abaixo da linha do solo ou pode aparecer como estrias que se estendem até à

linha do solo. Ao longo da raiz principal aparecem cancrs longitudinais, enquanto as raízes laterais que são pequenas, morrem. O crescimento das plantas é retardado e em alturas em que o tempo é mais seco, as folhas podem adquirir uma coloração amarela e podem até cair. Por vezes, as plantas infetadas desenvolvem raízes secundárias e radículas abaixo da linha do solo, o que pode ser suficiente para levar a planta à maturidade e à produção de uma colheita razoavelmente boa. No entanto, em muitos casos as plantas infetadas declinam e morrem com ou sem sintomas de murchidão (Agrios, 2005).

2.7.4.2.1.2. Condições Favoráveis e Ciclo de Vida

O fungo *Fusarium* spp. só tem a fase de reprodução assexuada e para entender a capacidade que o fungo tem de causar doenças, é necessário saber como os conídios e clamidósporos (esporos assexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam. Como se trata de um fungo mitospórico pertencente ao filo deuteromicota, este fungo produz conídios que nascem no conidióforo (Figura 13) e que infetam a planta (Agrios, 2005) e três tipos de esporos que podem ser observados na Figura 14. A estrutura reprodutiva assexuada de *Fusarium* spp. pode ser observada na Figura 13.

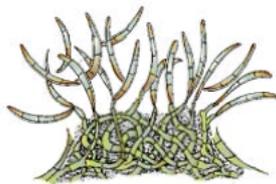


Figura 13 - Tipo de conídios e conidióforos produzidos pelo fungo mitospórico *Fusarium* spp. (Fonte: Agrios, 2005).

O *Fusarium* spp. produz três tipos de esporos, os microconídios (Figura 14 (B)) que são os esporos produzidos com maior frequência e abundância, os macroconídios (Figura 14 (A)) que são os esporos típicos deste agente fitopatogénico e os clamidósporos que são esporos produzidos dentro ou nos terminais dos micélios mais velhos ou nos macroconídios. Todos estes tipos de esporos são produzidos nas culturas deste fungo e provavelmente no solo, embora apenas os clamidósporos possam sobreviver no solo por muito tempo (Agrios, 2005; Bahadur, 2021). Estas estruturas de *Fusarium* spp. (Figura 15) podem ser observadas na Figura 14.

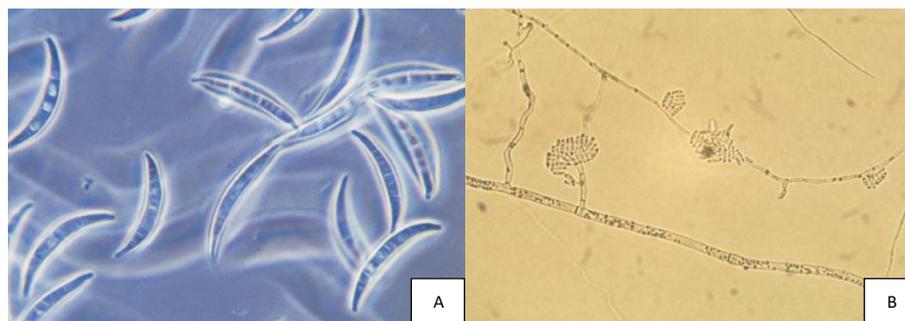


Figura 14 - Macroconídios (A) e microconídios (B) do agente fitopatogénico *Fusarium* spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias cortesia de (A) R.J. McGovern e (B) R. Cullen, Departamento de Patologia Vegetal, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).

Quando as plantas saudáveis se desenvolvem e crescem em solos que estejam contaminados, o tubo germinativo dos esporos ou o micélio penetram diretamente nas pontas das raízes ou penetram nas raízes através de feridas ou no ponto de formação das raízes laterais. O micélio avança intercelularmente através do córtex radicular e ao atingir os vasos do xilema penetra nestes pelas cavidades das células lenhificadas permanecendo exclusivamente nos vasos e percorrendo através dele no sentido ascendente em direção ao caule e à coroa da planta. Enquanto nos vasos, o micélio se ramifica e produz microconídios que se desprendem e são transportados no sentido ascendente através da seiva. Estes microconídios germinam na altura em que o seu movimento ascendente é interrompido, o micélio penetra na parede superior do vaso e mais microconídios são produzidos no seguinte vaso. O micélio também avança lateralmente nos vasos adjacentes, penetrando-os através das cavidades das células lenhificadas (Figura 15) (Agrios, 2005). A combinação destes processos denominados de entupimento dos vasos são responsáveis pela limitação do fornecimento de água e nutrientes à planta (Agrios, 2005). As plantas mais velhas infetadas exibem folhas mais velhas cloróticas, a maturidade é precoce, existe baixa produção de semente e ocorre a morte prematura das plantas (Foss & Jones, 2005).

Este é um agente fitopatogénico habitante do solo sobrevivendo em restos de plantas infetadas no solo como micélio e em todas as suas formas de esporos, no entanto, é mais comum que sobrevivam na forma de clamidósporos (Agrios, 2005; Bahadur, 2021; Volesky et al., 2022). Como é o caso da espécie *Fusarium oxysporum*, que persiste no solo na forma de clamidósporos com uma vida longa ou como micélio, colonizando espécies não hospedeiras (Gordon et al., 1989; Volesky et al., 2022) ou resíduos de culturas (Gordon & Okamoto, 1990). No entanto, o agente fitopatogénico pode persistir durante muitos anos no solo na ausência de uma cultura hospedeira (Bahadur, 2021; Foss & Jones, 2005) e também pode sobreviver nas sementes, causando doenças em campos que previamente estavam livres desta doença (Foss & Jones, 2005). A curtas distâncias espalham-se através da água de rega e dos equipamentos agrícolas contaminados e a longas distâncias espalham-se principalmente através de plantas transplantadas que estão infetadas ou

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

através do solo que está infestado com o agente fitopatogénico (Agrios, 2005; Bahadur, 2021). Quando uma área é infestada com este agente fitopatogénico, normalmente, permanece por um tempo indeterminado (Agrios, 2005). O agente fitopatogénico desenvolve-se rapidamente a temperaturas de aproximadamente 27 °C e pH inferior a 6,5 (Syngenta, 2023).

Estudos realizados por Bassi e Goode (1978) através do isolamento do agente fitopatogénico causador da doença no espinafre demonstraram que o inóculo transmitido por sementes era provavelmente a fonte principal de disseminação do agente fitopatogénico, no entanto, existem outras formas de disseminação como as poeiras, o vento e a movimentação de solo infestado pelos trabalhadores e equipamentos agrícolas que se tornam fontes de inóculo de *Fusarium oxysporum* (Mace et al., 1981). O ciclo de vida do *Fusarium* spp. pode ser observado na Figura 15.

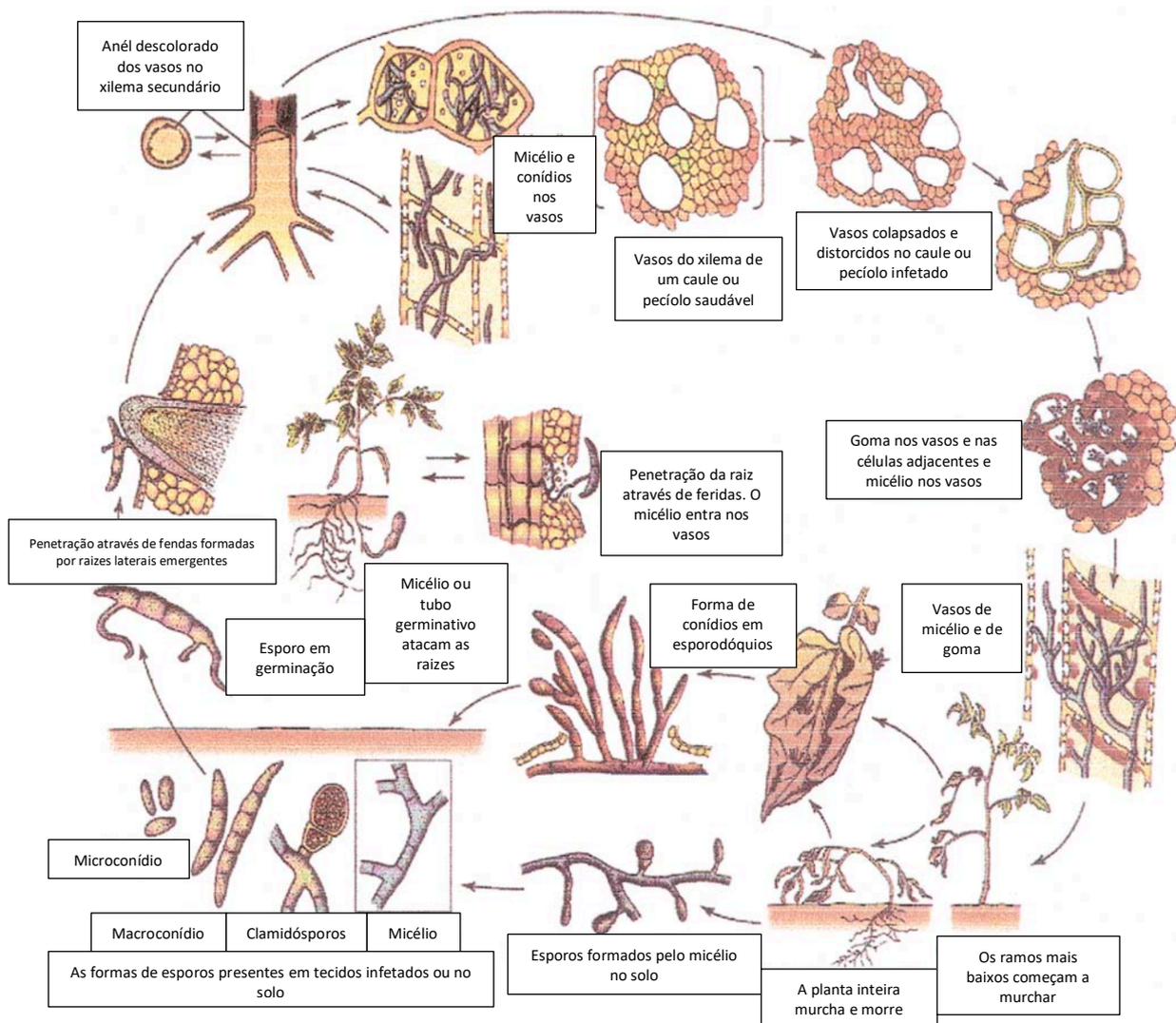


Figura 15 - Ciclo da doença da murchidão do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na cultura do tomate (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

2.7.4.2.2. *VERTICILLIUM* SPP.

A murchidão causada por fungos do gênero *Verticillium* é uma doença que aparece nas culturas por todo o mundo, no entanto, é mais significativa nas regiões temperadas e especialmente em regiões regadas (Berlanger & Powelson, 2000).

É um agente fitopatogénico habitante do solo e que também pode vir em sementes contaminadas (Du Toit et al., 2005). A espécie *Verticillium dahliae* é altamente sistêmica na cultura do espinafre e pode ser transmitida facilmente por semente nesta cultura (BASSI & MJ, 1978; Du Toit et al., 2005; Feng et al., 2014; Maruthachalam et al., 2013).

Este gênero ataca mais de 200 espécies de plantas, incluindo na sua maioria os vegetais, flores, árvores de frutos, morangos, culturas plantadas, plantas ornamentais perenes e árvores de sombra e de floresta. Algumas estirpes de *Verticillium* apresentam especialização em hospedeiros, mas a maioria ataca uma enorme diversidade de plantas hospedeiras. Quando o agente fitopatogénico *Verticillium* aparece pela primeira vez no campo, é uma doença considerada suave e específica de um local, no entanto, com o passar do tempo há medida que o inóculo se acumula e surgem novas estirpes mais virulentas do fungo, os ataques tornam-se sucessivamente mais severos e generalizados (Agrios, 2005).

É bastante preocupante no espinafre produzido através de sementes porque, por um lado, como referido anteriormente, o agente fitopatogénico é facilmente transmitido por sementes e porque, por outro lado, as estirpes que infetam o espinafre, podem infetar algumas culturas que crescem em rotação com o espinafre (Atallah et al., 2010; Bhat & Subbarao, 1999; Du Toit et al., 2005).

2.7.4.2.2.1. SINTOMAS

Os sintomas são quase idênticos aos da murchidão do *Fusarium*. Na maioria das áreas e em muitos hospedeiros, o *Verticillium* induz a murchidão quando as temperaturas são mais baixas do que aquelas que causam a murchidão do *Fusarium* (Agrios, 2005). Os sintomas variam de hospedeiro para hospedeiro. Em geral, observa-se uma clorose e necrose foliar prematura e uma descoloração vascular dos caules e raízes, no entanto, estes sintomas são caraterísticos de todos os hospedeiros (Berlanger & Powelson, 2000; Volesky et al., 2022). Quando os dias são mais quentes e com maior intensidade da luz solar, os sintomas de murchidão são mais evidentes (Berlanger & Powelson, 2000). Para além desta diferença, os sintomas desenvolvem-se mais lentamente e geralmente aparecem apenas na parte inferior ou externa da planta em alguns dos ramos. Em alguns hospedeiros, esta doença desenvolve-se principalmente em plântulas que normalmente morrem logo após a infeção. As infeções tardias são as mais comuns que fazem com

que as folhas superiores caíam e outras folhas desenvolvam manchas cloróticas irregulares que se tornam necróticas com o tempo. As plantas mais velhas infetadas com o agente fitopatogénico *Verticillium* são normalmente atrofiadas e os tecidos vasculares apresentam uma descoloração característica acastanhada. A infeção pode também resultar na desfolha, murcha gradual e morte de ramos sucessivos ou colapso abrupto e, por último, a morte de toda a planta (Agrios, 2005). Os sintomas que afetam as raízes (Figura 16 (A)), coroa (Figura 16 (A)), caule (Figura 16 (B)) e folhas (Figura 17) podem ser observadas nas Figuras 16 e 17.



Figura 16 - Corte longitudinal das raízes e coroa (A) e do caule (B) de uma planta de espinafre saudável (esquerda) e de uma planta infetada ((direita) – descoloração castanho-pálida (A) e microesclerotos no tecido vascular (B) (Fonte: Du Toit et al., 2005).



Figura 17 - Sintomas de murchidão causada pelo agente fitopatogénico *Verticillium* spp. na cultura de espinafre (Fonte: Du Toit et al., 2005).

2.7.4.2.2.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O *Verticillium* spp. pertence à classe de fungos deuteromicetos (fungos imperfeitos) uma vez que não possui estágio sexual conhecido (Berlanger & Powelson, 2000). Desta forma, como só tem a fase de reprodução assexuada, para entender a capacidade que o fungo tem de causar doenças é necessário saber como os conídios e os esclerotos (esporos assexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam.

Este fungo produz conídios de curta duração que nascem no conidióforo (Figura 18 (A)) e microesclerotos, sendo estes últimos os que infetam a planta (Agrios, 2005). Os conídios são esporos unicelulares que possuem hifas especializadas produzidas ao redor de cada conidióforo (Berlanger & Powelson, 2000). A estrutura reprodutiva de *Verticillium* spp. pode ser observada na Figura 18 (A e B).

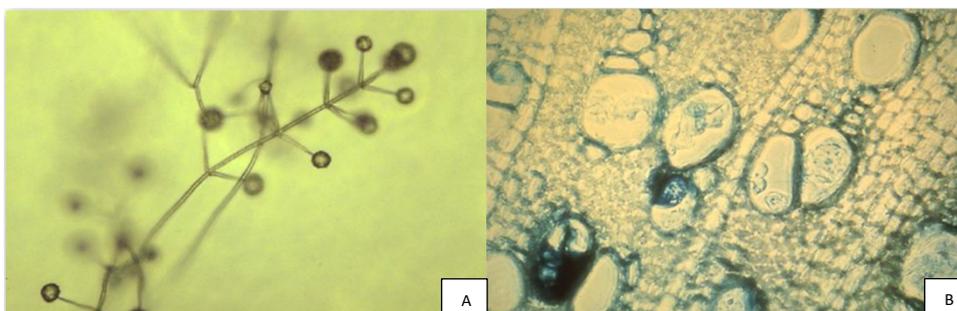


Figura 18 - Conídios inseridos no conidióforo referentes a *Verticillium* spp. (Observação microscópica) (A) e conídios nos vasos do xilema (Observação microscópica) (B) (Fonte: Berlanger & Powelson, 2000 (A e B)).

Este agente fitopatogénico penetra nas raízes jovens das plantas hospedeiras diretamente ou através de feridas (Agrios, 2005) começando, desta forma, a infeção (Figura 19) (Berlanger & Powelson, 2000). Os microesclerotos são estimulados a germinar por exsudatos de raízes e plantas hospedeiras e não hospedeiras. O fungo penetra na raiz da planta suscetível na região de alongamento e o córtex é colonizado. A partir do córtex, as hifas invadem os vasos do xilema onde se formam os conídios (Figura 18 (A) e (B)). A colonização vascular ocorre à medida que os conídios são absorvidos pela planta junto com a água. Devido ao material fúngico e aos produtos de reação do hospedeiro, o sistema vascular fica obstruído, impedindo que a água atinja as partes superiores da planta. As folhas e os caules uma vez que não recebem água começam a apresentar sintomas de murchidão e clorose foliar (Berlanger & Powelson, 2000). Há medida que a planta doente envelhece, o fungo torna-se saprófita e coloniza os tecidos em decomposição ou mortos. Durante a colonização, o fungo produz microesclerotos que são massas de hifas melanizadas e que são libertados no solo com a decomposição do material vegetal. O fungo sobrevive por muitos anos

como microesclerotos ou como micélio ou conídios no sistema vascular de plantas perenes (Berlanger & Powelson, 2000; Volesky et al., 2022).

Em geral, este agente fitopatogénico quando estabelecido no solo, a disseminação ocorre principalmente pelo cultivo do solo e pelo movimento do solo através do vento e da água (Berlanger & Powelson, 2000). No entanto, o fungo também é disseminado por sementes contaminadas, por estacas vegetativas e tubérculos, pelas águas superficiais e pelo solo que pode conter até 100 ou mais microesclerotos por grama (Agrios, 2005; Volesky et al., 2022). As densidades do inóculo e a severidade da doença tendem a aumentar de ano para ano quando as culturas plantadas são suscetíveis (Berlanger & Powelson, 2000).

A murchidão causada pelo agente fitopatogénico *Verticillium* spp. é favorecida na presença de solos húmidos e de temperaturas à volta de 21 a 27 °C (Berlanger & Powelson, 2000). A temperatura ideal para a infeção pela espécie *Verticillium dahliae* é por volta de 21 a 30 °C (Volesky et al., 2022) e é um pouco mais comum em regiões mais quentes (Agrios, 2005). O *Verticillium* spp. é frequentemente encontrado em áreas não cultivadas o que mostra que o fungo é nativo dos solos e que pode atacar culturas suscetíveis assim que são plantadas (Agrios, 2005). O ciclo de vida da espécie *Verticillium dahliae* pode ser observado na Figura 19.

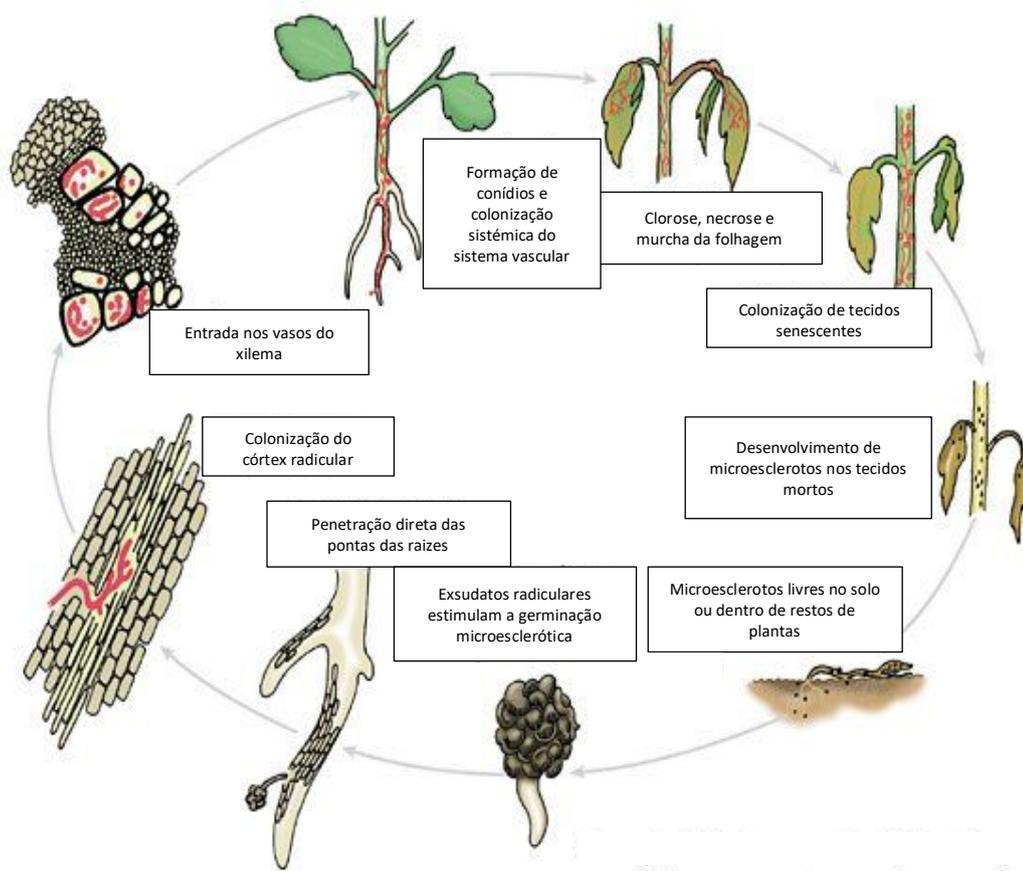


Figura 19 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico *Verticillium* spp. (Fonte: Adaptado de Berlanger & Powelson, 2000).

2.7.4.3. *SCLEROTINIA* spp.

O Fungo *Sclerotinia* spp. é um fungo que pertence ao reino Fungi, filo Deuteromicota. Em condições de campo não produz esporos assexuados e sexuados e, por isso, é considerado um fungo estéril. Os fungos do género *Sclerotinia*, principalmente as espécies *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia minor* causam doenças destrutivas em diversas plantas, principalmente nos vegetais e flores. Estas doenças ocorrem em todo o mundo e afetam todos os estágios de crescimento das plantas, incluindo plântulas, plantas adultas e produtos provenientes da colheita (Agrios, 2005).

As doenças causadas pelo agente fitopatogénico *Sclerotinia* spp. nos vegetais são frequentemente causadas pela espécie *Sclerotinia sclerotiorum*. A *Sclerotinia* spp. tem uma ampla gama de hospedeiros que inclui culturas como o bróculo, repolho, couve-flor, cenoura, aipo, feijão, alface, tomate, espinafre, entre outras, incluindo flores (Laemmlen, 2002; Rudolph et al., 2022). Estas causam elevadas perdas, quer no campo, quer pós-colheita. Os sintomas variam com o hospedeiro ou com a parte do hospedeiro afetada e com as condições ambientais (Agrios, 2005). Existem diversos nomes pelos quais as doenças provocadas por *Sclerotinia* spp. são conhecidas tais como podridão do algodão, mofo branco, podridão mole aquosa, podridão do caule, queda, podridão da coroa, ferrugem das flores, entre outros (Agrios, 2005; Rudolph et al., 2022).

2.7.4.3.1. SINTOMAS

Dependendo das culturas, assim os sintomas são diferentes (Agrios, 2005). O sintoma típico das doenças causadas por este agente fitopatogénico é o aparecimento de um micelial branco e algodinoso em crescimento na planta infetada, no qual após este crescimento se desenvolvem corpos de resistência grandes e compactos denominados de esclerotos (Agrios, 2005; Rudolph et al., 2022). À medida que este fungo coloniza os tecidos do hospedeiro, produz uma lesão com uma coloração castanha-clara a castanha-acinzentada. Também pode ocorrer a degradação severa do tecido, originando uma podridão mole (Laemmlen, 2002). Na base dos caules de plantas infetadas desenvolvem-se inicialmente lesões pálidas ou castanho-escuras. As lesões são rapidamente cobertas por manchas brancas de micélio fúngico (Agrios, 2005; Rudolph et al., 2022). Nos estágios iniciais da infeção, a folhagem normalmente parece normal e as plantas podem estar infetadas (Agrios, 2005).

Quando o fungo cresce completamente através do caule e este apodrece, a folha acima da lesão acaba por murchar e morre rapidamente. Após isso, a planta inteira colapsa e morre (Agrios, 2005; Rudolph et al., 2022). No entanto, em alguns casos, a infeção pode começar na folha e depois propagar-se para o caule através da folha. As folhas e os pecíolos das plantas como é o caso da cultura da alface colapsam e morrem quando o fungo infecta a base do caule e as folhas inferiores.

Este agente fitopatogénico também pode causar doenças após a colheita da cultura e se a doença se desenvolver após a colheita, no armazém, a podridão dissemina-se para as raízes, bolbos e rebentos adjacentes, produzindo órgãos podres e estes podem colapsar produzindo uma podridão mole aquosa coberta pelo micélio branco do fungo (Agrios, 2005).

No caso da espécie *Sclerotinia sclerotiorum*, esta pode atacar a raiz da planta hospedeira e o caule na linha do solo ou perto dela, onde são observados pela primeira vez (Laemmlen, 2002; Rudolph et al., 2022). As lesões desenvolvem-se no caule e o agente fitopatogénico destrói gradualmente o tecido vascular da coroa, acabando a planta por murchar e tombar. Para além disto, produz esporos que podem ser disseminados através do ar. Desta forma, não é incomum ver infeções desta espécie na folhagem de plantas que são atacadas por outra espécie ou por esta espécie. Partes de flores senescentes são um local ideal para este agente fitopatogénico colonizar. A partir deste tecido, o agente fitopatogénico pode invadir folhas, caules e frutos saudáveis (vagens) por isso é que a *Sclerotinia sclerotiorum* poder ser um agente fitopatogénico tão importante nas culturas de flores, culturas de sementes e feijões secos (Laemmlen, 2002). Os sintomas e as estruturas reprodutivas que infetam as culturas podem ser observadas na Figura 20.



Figura 20 - Esclerotos pretos do fungo dentro de um caule de uma planta de tomate (**Fonte:** Fotografias tiradas por K. Pernezny - Agrios, 2005).

2.7.4.3.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *Sclerotinia* (Figura 21) tem a fase de reprodução sexuada e assexuada e para entender a capacidade que o fungo tem de causar doenças, é necessário saber como os esclerotos (estruturas de resistência), ascósporos (esporos sexuados) e os fragmentos miceliais se disseminam. Em algumas espécies, os esclerotos (Figura 20) causam a infeção produzindo

filamentos de micélio que atacam e infetam diretamente os caules de plantas jovens. Sob condições húmidas, a forma de infecção primária mais comum é provavelmente através da germinação dos esclerotos embora na espécie *Sclerotinia sclerotiorum* quase todas as infecções sejam iniciadas por ascósporos (Agrios, 2005). No entanto, em condições de campo o que é produzido são os esclerotos e, dessa forma, são essas as estruturas mais importantes.

A espécie *Sclerotinia sclerotiorum* produz um micélio denso, branco e algodinoso (Laemmlen, 2002; Rudolph et al., 2022) na superfície do hospedeiro e nas superfícies adjacentes do solo (Laemmlen, 2002) e até em órgãos carnudos de armazenamento infetados (Agrios, 2005). Dentro desta massa micelial, formam-se densos corpos brancos de fungos que se tornam pretos e de textura dura à medida que amadurecem, que se denominam de esclerotos (Laemmlen, 2002; Rudolph et al., 2022). Os esclerotos podem ser formados internamente na medula do caule ou podem ser formados na parte externa do caule (Agrios, 2005), agem como sementes e permitem que o fungo sobreviva por vários anos no solo (Laemmlen, 2002).

Os tecidos invadidos parecem mais escuros do que os saudáveis e tornam-se macios e aquosos (Agrios, 2005). A atividade deste agente fitopatogénico é favorecida por elevadas humidades de solo, elevadas humidades do ar e temperaturas frias (Laemmlen, 2002). O desenvolvimento ocorre geralmente durante o final da primavera, após períodos fresco 10 a 16 °C e húmido e é suprimida quando as temperaturas atingem os 27 °C (Rudolph et al., 2022).

A espécie *Sclerotinia sclerotiorum* hiberna e sobrevive no solo como esclerotos sobre ou dentro de tecidos infetados ou como micélio em restos de plantas infetadas ou em plantas mortas (Agrios, 2005; Laemmlen, 2002). A maioria dos esclerotos têm uma vida curta (vários meses) no solo na ausência de um hospedeiro. Em condições secas, os esclerotos mantêm a sua viabilidade por mais de 10 anos (Laemmlen, 2002). Na primavera ou no início do verão, os esclerotos germinam e produzem caules finos que terminam numa pequena estrutura denominada de apotécio que se desenvolve em dias nublados e frios (Rudolph et al., 2022) em forma de disco onde são produzidos ascos e ascósporos (Agrios, 2005). Os ascósporos podem se dispersar através de salpicos de água de rega ou chuva (dispersão a curta distância) e correntes de ar (dispersão a longa distância). O movimento de esclerotos ou solos infestados através de ferramentas, equipamentos agrícolas e pessoas pode resultar numa maior propagação da doença (Rudolph et al., 2022). O ciclo de vida da espécie *Sclerotinia sclerotiorum* pode ser observado na Figura 21.

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

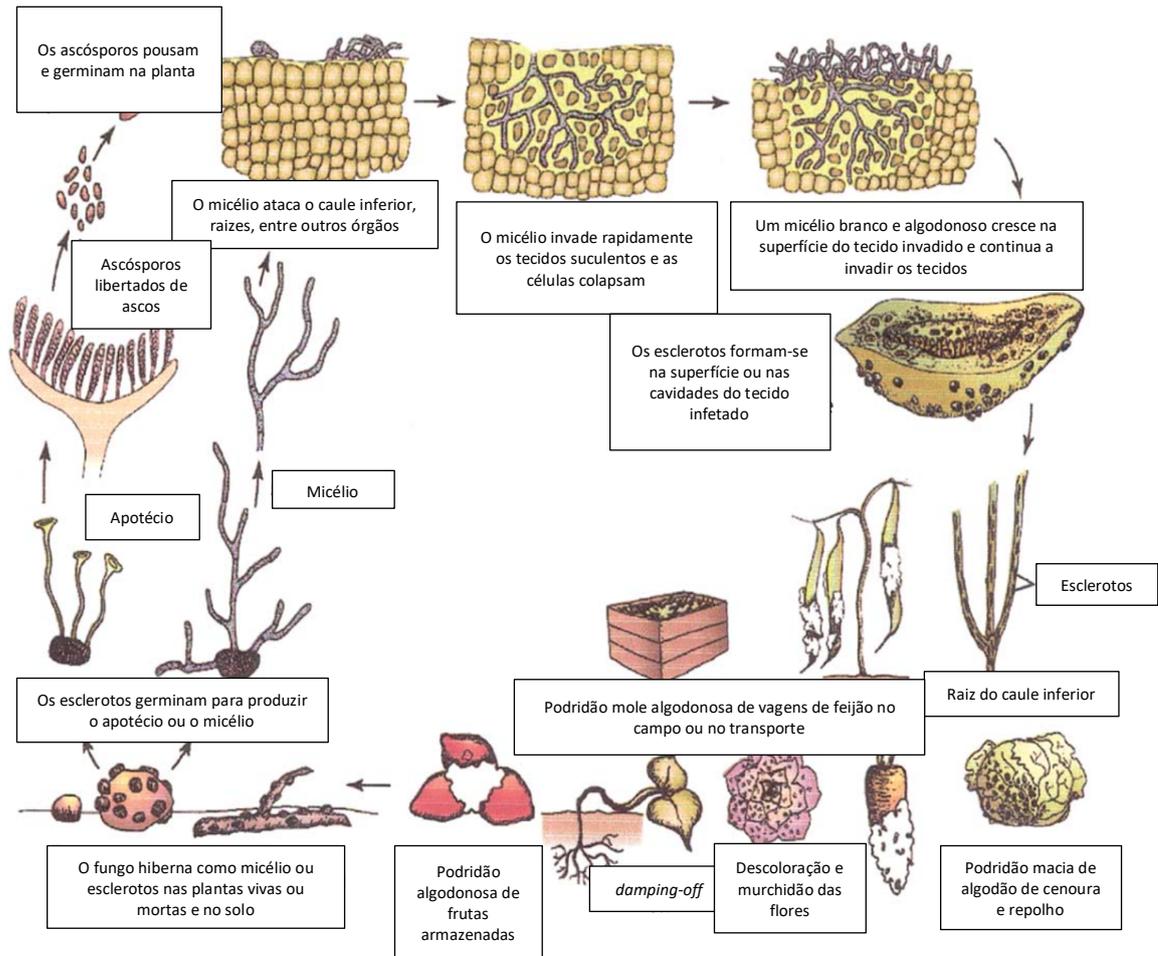


Figura 21 - Ciclo de vida da espécie *Sclerotinia sclerotiorum* (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

2.7.5. DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS PERTENCENTES AO FILO BASIDIOMICOTA

Rhizoctonia spp. é um fungo que pertence ao reino Fungi, filo Basidiomicota. Em condições de campo, algumas espécies, produzem esporos sexuais denominados de basidiósporos numa estrutura denominada de basídio e, por isso, são considerados basidiomicotas. No entanto, estes esporos são extremamente raros na natureza e, portanto, de pouco valor na identificação do fungo e, desta forma, este fungo é considerado um fungo estéril (Agrios, 2005).

As doenças causadas por *Rhizoctonia* spp. ocorrem em todo o mundo e causam perdas em quase todos os vegetais e flores, várias culturas plantadas, ornamentais perenes, arbustos e árvores (Agrios, 2005). Estes fungos habitam o solo e causam doenças graves em diversos hospedeiros (Agrios, 2005) como plantas hortícolas e culturas arvenses (Pegg & Manners, 2014b), afetando as raízes, caules inferiores, tubérculos, rebentos e outras partes de plantas que se desenvolvem no solo (Agrios, 2005), folhas e frutos (Pegg & Manners, 2014b). Nos solos de áreas agrícolas, florestas e outros ambientes naturais podem ser encontradas várias estirpes diferentes (Pegg & Manners, 2014b).

2.7.5.1. *RHIZOCTONIA* SPP.

A espécie mais importante é a *Rhizoctonia solani* (Agrios, 2005; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). Todas as espécies pertencentes ao gênero *Rhizoctonia* existem principalmente como micélio estéril e, às vezes, como pequenos esclerotos. O micélio é hialino na fase jovem, tornando-se de coloração amarela ou castanha-clara com a idade. As características de ramificação são geralmente as únicas disponíveis para a identificação do fungo como *Rhizoctonia*. Sob certas condições, o fungo produz esclerotos semelhantes a tufo de células curtas e largas e pequenos esclerotos de coloração castanha a preto, sendo estes comuns em alguns hospedeiros, como a batata (Agrios, 2005).

A fase perfeita ou sexual da espécie *Rhizoctonia solani* é *Thanatephorus cucumeris* (Telemorfo) (Agrios, 2005; Pegg & Manners, 2014b; Senapati et al., 2022). Este fungo raramente produz esporos sexuais denominados de basidiósporos (Pegg & Manners, 2014b). Sob certas condições, este fungo produz esclerotos que funcionam como clamidósporos (Gabor et al., 2013).

Rhizoctonia spp. pode estar presente nas raízes de uma planta doente sem ser patogênica podendo-se confundir os sintomas causados por outro fungo com os causados por *Rhizoctonia* spp. Este agente fitopatogênico pode interagir com outros agentes fitopatogênicos radiculares e sob condições ambientais favoráveis pode causar um complexo de doenças radiculares que pode resultar em doenças mais graves do que as causadas por um só agente fitopatogênico (Pegg & Manners, 2014b).

2.7.5.1.1. SINTOMAS

No geral, este agente fitopatogênico causa podridões da raiz e do caule (Agrios, 2005; González García et al., 2006). No entanto, os sintomas podem variar de cultura para cultura, com a fase de crescimento em que a planta é infetada e com as condições ambientais predominantes (Agrios, 2005). Também pode causar podridões em frutas e vagens que se encontram no solo ou próximas do solo como é o caso da cultura do pepino, tomate, beringela e feijão (Agrios, 2005; Naito, 1996, 2006). Na grande maioria, os sintomas mais comuns são o *damping-off* de plântulas, em pré e/ou pós-emergência, podridão da raiz, podridão do caule ou cancro do caule de plantas, em crescimento ou cultivadas (Agrios, 2005; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018; Magnée, 2022). Em alguns hospedeiros, este agente fitopatogênico também causa o apodrecimento dos órgãos de armazenamento e manchas foliares que podem estar separadas por um tecido verde ou fundidas formando uma massa maior de tecido doente (Agrios, 2005). As plântulas que morrem após a emergência podem desenvolver cancos do caule perto da superfície do solo (Pegg & Manners, 2014b).

Plantas espessas e carnudas como as leguminosas e os tubérculos da batata podem apresentar lesões visíveis de coloração acastanhada e cavidades das células lenhificadas mortas, antes de as plantas morrerem. Após a emergência, o fungo ataca o caule deixando-o encharcado, mole e incapaz de sustentar a plântula que acaba por cair e morrer (Agrios, 2005). No entanto, por outro lado, as plântulas emergem e não morrem, mas os cancrios de coloração castanho-avermelhado estão presentes no caule denominando-se esta doença de Ferrugem ou Haste de arame (Pegg & Manners, 2014b).

Nas plantas mais velhas, a invasão do fungo é limitada aos tecidos corticais externos, que desenvolvem lesões alongadas, de coloração castanho-avermelhada. Estas podem aumentar em comprimento e largura até circundarem o caule e a planta acabar por morrer. O caule antes de a planta morrer pode ficar preto-acastanhado e pode ser dobrado ou torcido sem quebrar, originando a doença do Caule de arame. Outro dos sintomas é o cancro do caule das plântulas que é comum em culturas como o algodão, tabaco e outras plântulas que escaparam à fase que origina o *damping-off* ou murchidão das plântulas (Figura 22). Desenvolve-se sob condições que não são favoráveis à doença. As lesões aparecem como cancrios afundados de coloração castanho-avermelhada que circundam o caule próximo à linha do solo. À medida que a temperatura do solo aumenta consoante a época do ano, as plantas afetadas podem apresentar recuperação parcial devido ao crescimento de novas raízes. No entanto, outro sintoma que também pode aparecer nas plantas são as lesões radiculares que se formam em plântulas e em plantas parcialmente desenvolvidas ou adultas. As lesões são de coloração castanho-avermelhada e, geralmente, aparecem primeiramente abaixo da linha do solo. No entanto, em condições de clima frio e húmido as lesões aumentam em todas as direções e podem aumentar em tamanho e número para incluir toda a base da planta e a maioria das raízes, o que resulta no enfraquecimento, amarelecimento e, por vezes, na morte da planta (Agrios, 2005).

Nas plantas consideradas plantas baixas como a alface e o repolho, as folhas mais baixas que tocam no solo ou próximas do solo são atacadas nos pecíolos e nervuras centrais. As lesões são de coloração castanho-avermelhada e são levemente afundadas e ao se desenvolverem, toda a folha torna-se castanho-escura e viscosa. A infeção espalha-se das folhas inferiores para as restantes folhas até que a maioria das folhas ou todas as folhas são invadidas e apodrecidas com micélio e esclerotos que atravessam os tecidos ou ficam hospedados entre as folhas. (Agrios, 2005).

A doença pode se espalhar de folha para folha ou de caule para caule. Ocorre durante períodos de elevada humidade. A desfolha severa e manchas foliares também podem ocorrer, designando-se esta doença de Ferrugem foliar (Pegg & Manners, 2014b). Os sintomas detetados nas culturas podem ser observadas na Figura 22.



Figura 22 - Apodrecimento da raiz e do caule em plantas de repolho (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).

2.7.5.1.2. CONDIÇÕES FAVORÁVEIS E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *Rhizoctonia* spp. (Figura 24) tem a fase de reprodução sexuada e assexuada e para entender a capacidade que o fungo tem de causar doenças, é necessário saber como os esclerotos (estruturas de resistência) e os fragmentos miceliais se disseminam. O micélio de *Rhizoctonia* spp. pode ser observado na Figura 23.



Figura 23 - Micélio típico de *Rhizoctonia* spp. (Observação microscópica) (Fonte: Fotografias pertencentes ao Departamento de Fitopatologia, Universidade da Flórida - Agrios, 2005).

O agente fitopatogênico é transmitido por sementes e solo (Agrios, 2005; Senapati et al., 2022), hibernando geralmente como micélio (Figura 23) ou esclerotos em sementes infetadas ou solo (Agrios, 2005; Senapati et al., 2022) e/ou sobre plantas perenes infetadas ou material propagativo como por exemplo, tubérculos de batata. O fungo está presente na maioria dos solos e uma vez estabelecido no campo, permanece indefinidamente (Agrios, 2005). Quando os solos secam, o fungo torna-se dormente como micélio de parede espessa ou produz esclerotos que lhe

permitem sobreviver por muitos anos. A infecção é iniciada quando os esclerotos ou hifas são atraídos para as plantas por exsudatos químicos de células vegetais em crescimento. Após o contacto, as hifas do fungo crescem sobre a superfície eventualmente formando estruturas que facilitam a infecção do hospedeiro e permitem que o fungo penetre nos tecidos da planta e absorva nutrientes para o crescimento e desenvolvimento contínuo dos fungos. A penetração também pode ocorrer através de aberturas naturais como os estomas ou através de feridas. À medida que o fungo mata as células vegetais, as hifas continuam a crescer e a colonizar o tecido morto, muitas vezes formando os esclerotos. Quando o material vegetal fresco se torna disponível, um novo inóculo é produzido e o ciclo de vida repete-se (Figura 24). Não produz esporos basidiósporos, mas várias doenças importantes resultam da infecção por basidiósporos (Pegg & Manners, 2014b).

Este dissemina-se com a chuva, a água de rega ou a água proveniente de inundações, através de máquinas agrícolas ou outro equipamento que movimenta o solo contaminado e, através de materiais de propagação infetados ou contaminados. Em alguns hospedeiros, o fungo pode até ser transportado na semente. Para a maioria das estirpes do fungo, a temperatura ideal para a infecção é de cerca de 15 a 18 °C, no entanto, algumas estirpes são mais ativas sob temperaturas mais elevadas, até cerca de 35 °C (Agrios, 2005). A doença é mais severa em solos moderadamente húmidos do que em solos encharcados ou secos. A infecção de plantas jovens é mais grave quando o crescimento da planta é lento devido às condições ambientais adversas para a planta (Agrios, 2005). O ciclo de vida de *Rhizoctonia* sp. pode ser observado na Figura 24.

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

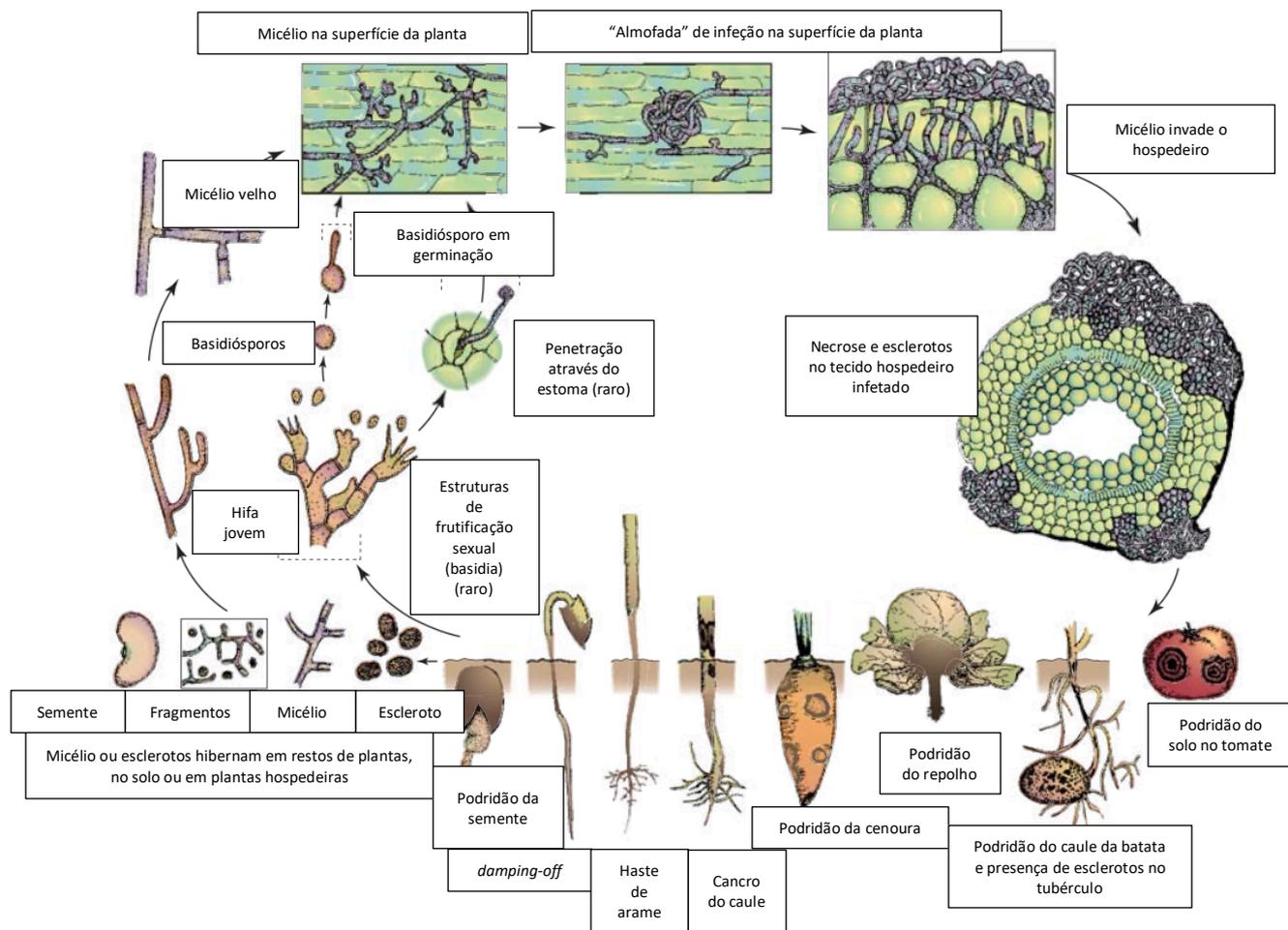


Figura 24 - Ciclo de vida do agente fitopatogénico *Rhizoctonia* spp. (Fonte: Adaptado de Agrios, 2005).

2.7.6. GESTÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS FITOPATOGÉNICOS

A complexidade e a diversidade das doenças de plantas causadas por fungos permitiram o desenvolvimento de um número elevado de abordagens no seu controlo. As características do ciclo de vida de cada fungo, as preferências de habitat e o seu desempenho sob certas condições ambientais são alguns dos fatores mais importantes a serem considerados na tentativa de controlar as doenças. Apesar de algumas doenças conseguirem ser controladas por apenas um tipo ou um tipo de estratégia, normalmente, é necessária uma combinação de medidas para que o controlo seja satisfatório. Uma gestão das doenças é obrigatória para que se consiga mitigar os problemas fitossanitários causados por fungos (Agrios, 2005).

As medidas de controlo cultural ou biológico mais comuns são (Agrios, 2005; Panth et al., 2020; Xu et al., 2022):

- A utilização de variedades de plantas resistentes – É a medida mais utilizada e que controla melhor as doenças;
- A utilização de sementes ou material de propagação livres de agentes fitopatogénicos;
- A destruição de partes de plantas ou refugos que abrigam o agente fitopatogénico;
- Remoção e queima de restos de plantas infetadas;
- A destruição de plantas espontâneas ou hospedeiros alternativos do agente fitopatogénico;
- A utilização de ferramentas e recipientes limpos;
- Drenagem adequada dos campos e promoção da circulação de ar nas plantas;
- Rotação de culturas;
- Suporte ou utilização de microrganismos antagonistas ou patogénicos do fungo que causa a doença na planta.

Para muitas das doenças causadas por fungos, o método mais eficaz e, por vezes, o único disponível é a aplicação de fungicidas nas plantas, nas sementes e/ou no solo onde as plantas serão cultivadas (Agrios, 2005). No entanto, podem ser controladas por fungos de solo e por bactérias do solo. Relativamente às bactérias do solo, as doenças mais comuns controladas por estas são as podridões radiculares e *damping-off* causadas por oomicetas como o *Pythium* e a *Phytophthora* e por deuteromicetas e basidiomicetas como o *Fusarium* e a *Rhizoctonia*, respetivamente (Agrios, 2005; Lamichhane et al., 2018).

Em algumas doenças, o fungo está na semente e o controlo só pode ser obtido através do tratamento da semente com fungicidas que são absorvidos e distribuídos pela planta (fungicidas sistémicos) ou por água quente (Agrios, 2005). No entanto, os fungos fitopatogénicos comportam-se de maneira diferente e, desta forma, necessitam de algumas medidas específicas e que controlem a doença. Também é importante, identificar as espécies causadoras da doença do espinafre uma vez que nem todas as espécies são específicas do hospedeiro em causa.

No caso do agente fitopatogénico *Pythium*, as doenças causadas pelo fungo são difíceis de controlar após a infeção da raiz (Pegg & Manners, 2014a). Medidas como realizar as sementeiras quando as temperaturas são favoráveis ao crescimento mais rápido das plantas, evitar a aplicação de fertilizantes azotados em elevadas quantidades e métodos como o condicionamento osmótico, hidratação controlada de sementes antes da sementeira, têm se mostrado um bom controlo do

agente fitopatogénico (Agrios, 2005). Para além destes, a seleção de campos bem drenados e solos bem arejados é também uma medida de controlo deste fitopatogénico (Lamichhane et al., 2018).

No caso do agente fitopatogénico *Phytophthora*, o controlo da podridão radicular causada por este agente fitopatogénico depende da suscetibilidade das culturas que são semeadas em solos livres do agente fitopatogénico ou em solos leves e que drenem bem e rápido (Agrios, 2005). No campo, o tratamento de sementes à base de fungicidas é o método preventivo mais importante. O diagnóstico preciso da doença é essencial quando são utilizados fungicidas para o controlo da doença. Os produtos à base de químicos, que controlam as doenças causadas por fungos de solo podem não ser eficazes contra uma doença causada, como por exemplo, por fungos como o *Pythium* (Pegg & Manners, 2014a). Estudos afirmam que a utilização de fungicidas sistêmicos no controlo de *damping-off* e podridões de raízes causadas pelos agentes fitopatogénicos *Pythium* e *Phytophthora* têm sido excelentes no seu controlo, podendo ser aplicados como tratamento de sementes ou tratamento ao solo (Agrios, 2005). Estes para além de serem utilizados preventivamente podem também ser utilizados como um tratamento local para controlar a doença. Quando aplicados após a infeção raramente funcionam como curativos e a doença pode reaparecer (Pegg & Manners, 2014a).

No caso do agente fitopatogénico *Alternaria*, a aplicação de fungicidas adequados, é uma medida recomendada como a primeira medida a implementar uma vez que a *Alternaria* é facilmente transmitida no início do ciclo, com o objetivo de impedir a ocorrência de *damping-off* de plântulas bem como evitar a entrada e a disseminação da doença (Singh V et al., 2015; Töfoli et al., 2015). Fertilizantes à base de azoto em quantidades adequadas normalmente reduzem a taxa de infeção por *Alternaria* (Agrios, 2005). Deste modo, uma adubação equilibrada baseada na aplicação de azoto, fósforo, magnésio e adubos silicatados, adubação verde, matéria orgânica pode aumentar o vigor das plantas malnutridas e stressadas reduzindo a severidade da doença. Também as práticas culturais que permitem a redução da humidade e o tempo em que a superfície foliar está molhada são estratégias que podem contribuir para a redução desta doença. Minimizar a rega em períodos críticos e a eliminação dos restos culturais após a colheita são medidas que pretendem diminuir as fontes de inóculo da doença e impedir a entrada da doença em novas sementeiras (Töfoli et al., 2015). A monda também é uma medida de controlo uma vez que as infestantes são hospedeiros alternativos das doenças (Hassan et al., 2010). A utilização de agentes biológicos com propriedades antagónicas como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* e *Fusarium* sp. são eficazes no controlo de *Alternaria* sp. de sementes (Singh V et al., 2015).

No caso do agente fitopatogénico *Fusarium*, quando a planta é infetada, não existe tratamento e, por isso, a gestão concentra-se nas práticas preventivas e de controlo cultural (Volesky et al., 2022). Desta forma, existem medidas de controlo como a utilização de fungos

antagonistas como as bactérias *Trichoderma* e *Gliocladium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, entre outros, tornando-se um método de controlo deste fungo. A utilização de sementes tratadas com fungicidas e a fertilização à base de azoto na forma de nitrato podem ajudar a reduzir as perdas (Agris, 2005). Estudos mostram que devem ser utilizadas variedades menos suscetíveis à murchidão de *Fusarium*, na produção de verão, uma vez que esta é mais severa em épocas em que as temperaturas são elevadas. Sementes tratadas com fungicidas apropriados para reduzir o potencial de introdução de *Fusarium oxysporum f. sp. spinaciae* em novos campos é uma opção viável (Brian, 2016).

No caso do agente fitopatogénico *Verticillium*, o controlo da doença é difícil porque a infeção ocorre através das raízes (Berlanger & Powelson, 2000). Quando a planta é infetada, não existe tratamento e, por isso, a gestão concentra-se nas práticas preventivas e de controlo cultural (Volesky et al., 2022). Como é um agente fitopatogénico transmitido pelo solo, facilmente transmitido por sementes e altamente sistémico, a espécie *Verticillium dahliae* apresenta obstáculos significativos para o desenvolvimento de um plano de gestão integrada para a murchidão causada pelo agente fitopatogénico na produção de sementes de espinafre (Du Toit et al., 2005). Medidas como a fumigação do solo pode ser lucrativa quando utilizada para proteger culturas de alto valor, no entanto, tem um custo elevado em grandes áreas. A inativação térmica via solarização do solo tem sido um método que se tem mostrado útil no controlo de *Verticillium* em regiões com elevadas temperaturas de verão e baixa pluviosidade. Além disso, a utilização de cobertura morta com fertilização à base de azoto amoniacal parece reduzir os danos causados pelo agente fitopatogénico em algumas plantas, como por exemplo, na beringela (Agris, 2005). Outros meios como a seleção do local mais adequado considerando o histórico do cultivo, ou seja, das culturas anteriormente cultivadas uma vez que algumas plantas podem não ser hospedeiras, mas podem servir como reservatório deste agente fitopatogénico em alguns ambientes, também é uma medida de controlo. A rotação de culturas também é outro meio de controlo, no entanto, como a estrutura de sobrevivência, o microescleroto, persiste no solo por muito tempo, mesmo na ausência de um hospedeiro suscetível, é importante a utilização de hospedeiros que não sejam apenas “não hospedeiros” mas que permitam reduções significativas dos microesclerotos no solo como, por exemplo, rotações específicas com culturas como o bróculo que levam a reduções significativas nas populações de microesclerotos, a longo prazo. A aplicação de azoto e fósforo de forma adequada reduz a gravidade dos sintomas em algumas espécies de plantas. No caso da rega, a limitação da quantidade de água aplicada no campo pode reduzir a gravidade da doença em algumas espécies de plantas como é o caso da cultura da batata pois o excesso de água, principalmente no início da época de crescimento resulta num aumento da infeção e, portanto, num aumento da gravidade da doença (Berlanger & Powelson, 2000).

No caso do agente fitopatogénico *Sclerotinia*, o controlo das doenças depende de diversas práticas culturais e de pulverizações à base de químicos (Agrios, 2005; Rudolph et al., 2022) e deve ser realizado utilizando uma combinação de ambos (Laemmlen, 2002). Poucas variedades apresentam resistência a este agente fitopatogénico. Como os esclerotos permanecem viáveis no solo por um tempo mínimo de 3 anos e uma vez que, nem todos germinam ou morrem ao mesmo tempo, os campos infetados devem ser plantados com culturas não suscetíveis como culturas de grãos pequenos durante pelo menos 3 anos. A pulverização do solo ou das plantas com fungicidas apropriados antes e durante o estágio de suscetibilidade ao agente fitopatogénico tem se mostrado um bom meio de controlo da doença. A utilização de fungos micoparasitários como *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Sporodesmium sclerotivorum* e *Trichoderma viride* num solo infestado por *Sclerotinia* spp. tem se mostrado uma solução viável ao nível do controlo biológico porque estes destroem os esclerotos existentes ou inibem a formação de novos, reduzindo acentuadamente a população do fungo no solo (Agrios, 2005). A utilização de rega gota-a-gota reduz drasticamente os fatores de humidade do solo, humidade do ar e de temperaturas perto da superfície do solo e, por consequência, reduz a incidência de doenças causadas pelo agente fitopatogénico (Laemmlen, 2002). Medidas como a rotação de culturas não hospedeiras como o milho, trigo, cevada, entre outras, a não reutilização do solo ou meios de cultivo de culturas hortícolas em recipientes, maior espaçamento entre plantas permitindo um melhor fluxo de ar, evitar ferir as plantas, desinfetar ferramentas e equipamentos agrícolas, recipientes, calçado que possam estar infestados com o agente fitopatogénico, são também algumas das medidas de controlo de *Sclerotinia* spp. (Rudolph et al., 2022).

No caso do agente fitopatogénico *Rhizoctonia*, o controlo das doenças é difícil. Desde 1980, que se desenvolvem meios alternativos a esta doença como cobertura de campo com materiais vegetais ou com plástico fotodegradável. Sempre que possível, quer seja na produção utilizando estufas, quer seja na produção ao ar livre, o solo deve ser esterilizado com vapor ou tratado com produtos químicos. A utilização de sementes certificadas limpas, rotações com culturas não hospedeiras para reduzir a carga de inóculo no solo e, quando possível, a utilização de cultivares resistentes, são também medidas de controlo deste agente fitopatogénico (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). Por outro lado, a utilização de tratamento de sementes com fungicidas (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018; Senapati et al., 2022) sistémicos (Ganesha Naik et al., 2017) é uma medida de controlo deste agente fitopatogénico uma vez que protegem as plântulas de sofrerem *damping-off* em pré-emergência, ajudam a garantir o desenvolvimento de um sistema radicular saudável, tornando as plantas menos suscetíveis à infeção, aumentando o rendimento (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). Não se deve regar demasiado a cultura porque a doença é mais grave em solos muito húmidos. Reduzir o stress das plantas não permitindo o acúmulo de elevados níveis

de sais solúveis na zona radicular e desinfetar as máquinas e equipamentos regularmente também são medidas de controlo (Pegg & Manners, 2014b). O controlo biológico tem sido muito promissor como estratégia na gestão de *Rhizoctonia solani*. Extratos de plantas, de alho, gengibre, cravo inibem mais de 80 % do crescimento micelial (Chakrapani et al., 2020; Rajeswari et al., 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Por interesses comerciais, em qualquer um dos ensaios, as variedades utilizadas, o nome dos produtos fitofarmacêuticos, as doses utilizadas, as empresas às quais estes produtos e variedades pertencem e o nome do laboratório no qual foram realizadas as análises, não podem ser revelados. As variedades serão designadas pelas letras (vA, vB). O ensaio sem tratamento de semente, de controlo, será designado pela letra NT e o ensaio no qual foi utilizada semente tratada com a substância ativa metalaxyl-M será designado por T.

3.1. TESTES DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE

Os testes de germinação foram realizados na Universidade de Évora de acordo com as normas ISTA para determinar o potencial máximo de germinação, em %, das duas variedades em estudo (International Seed Testing Association, 2010; Ministério da Agricultura, 2009). Desta forma, foi possível comparar a qualidade das duas variedades distintas e estimar a germinação em campo sabendo que a germinação avaliada em laboratório nem sempre corresponde à de campo, devido à variação das condições climatéricas/ambientais.

Para a realização dos ensaios de germinação de semente utilizaram-se quatro placas de Petri para cada modalidade (vA NT e T, vB NT e T), e foram colocadas 100 sementes em cada placa. As sementes foram sujeitas a uma temperatura de 15 °C, utilizou-se como meio de cultivo o papel de filtro humedecido. As contagens foram feitas ao 3º, 7º, 10º, 21º, 23º, 26º e 30º dia, apesar de acordo com as regras do ISTA os dias para contagens serem o 7º dia e o 21º dia.

3.1.1. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DOS TESTES DE GERMINAÇÃO

O resultado imediato do teste de germinação é a média do valor obtido em cada e a soma das percentagens de plântulas normais, anormais, sementes duras, dormentes e mortas obviamente deve ser 100 %; estes devem ser os valores que devem constar como resultados (Milivojević et al., 2018; Ministério da Agricultura, 2009).

No final do teste de germinação é possível determinar os valores correspondentes a alguns dos conceitos importantes para avaliar a qualidade da semente testada. Deste modo, é necessário definir alguns conceitos, de acordo com as normas ISTA.

3.1.1.1. PERCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%) OU FACULDADE GERMINATIVA (%)

Indica a proporção do número de sementes que produziram plântulas classificadas como “normais” sob determinadas condições e dentro do período especificado para determinada espécie analisada. Ou seja, a percentagem de germinação indica a percentagem de plântulas normais obtidas durante o período definido para o seu teste (International Seed Testing Association, 2010).

3.1.1.2. ENERGIA GERMINATIVA (%)

Indica a percentagem de plântulas normais germinadas encontradas na primeira contagem da análise do poder germinativo. É um indicador da velocidade de germinação utilizado para comparar amostras com o mesmo poder de germinação. Quanto maior a energia de germinação, maior o valor da semente. Este tende a diminuir com o passar do tempo, por isso é um índice da juventude da semente e do seu estado de conservação. Uma semente com uma boa energia de germinação também possui uma boa força de sustentação e, por isso, poderá ter germinação homogênea o que permite uma melhor emergência da plântula no solo. A energia germinativa é calculada através da Fórmula (1) (Nalin, 2010).

$$\text{Energia Germinativa (\%)} = \frac{100N}{\sum[(n1 \times t1) + (n2 \times t2) + (n3 \times t3)]} \quad (1)$$

Legenda:

- N – Número de sementes da amostra analisada;
- n – Número de sementes germinadas (nos diferentes intervalos de tempo);
- t – Duração da germinação das sementes.

3.1.1.3. PUREZA (% DE PESO)

Indica a determinação da composição percentual por peso da amostra de trabalho (Ministério da Agricultura, 2009). As normas ISTA referem que a pureza é calculada através da Fórmula (2).

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Peso de sementes puras (g)}}{\text{Peso total da amostra (g)}} \times 100 \quad (2)$$

3.1.1.4. VALOR CULTURAL (%)

Indica a qualidade da semente obtida em função do poder de germinação e do grau de pureza. Expressa o valor real da semente (Nalin, 2010). O valor cultural é calculado através da Fórmula (3).

$$\text{Valor cultural (\%)} = \frac{\text{Germinação (\%)} \times \text{Pureza (\%)}}{100} \quad (3)$$

3.2. Ensaio de Campo

3.2.1. LOCALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

Os ensaios de campo foram realizados no Bracial, parcela pertencente à Quinta dos Cativos, localizada na Boavista dos Pinheiros, na região de Odemira, em campos devidamente identificados, BR1 (37°34'38.8"N 8°41'32.1"W) (1ª Sementeira) e BR2 (37°34'41.7"N 8°41'24.4"W) (2ª Sementeira) (Figura 25).



Figura 25 - Localização dos ensaios (Campos BR1 e BR2) (Fonte: Google Earth, 2023).

3.2.2. CARATERIZAÇÃO EDAFOCLIMÁTICA

3.2.2.1. CARATERIZAÇÃO PEDOLÓGICA

Os ensaios de campo foram realizados em solo com textura franco arenoso, sendo que este tipo de textura é maioritariamente areia. Os valores médios analisados anualmente são areia com valores entre 86-92 %, argila com valores entre 4,7-7,5 % e limo com valores entre 3,8-6,4 %.

O intervalo de pH do solo está entre 6,0 e 7,0. Este solo tem baixo teor de matéria orgânica.

3.2.2.2. CARATERIZAÇÃO CLIMÁTICA

A freguesia da Boavista dos Pinheiros pertence ao concelho de Odemira. A temperatura varia entre 7 °C a 30 °C e raramente é inferior a 4 °C ou superior a 35 °C. A estação quente dura 3,1 meses de junho a setembro, com temperaturas máximas médias diárias acima de 27 °C. O mês mais quente é agosto, com uma temperatura máxima média diária de 29 °C e mínima média diária de 18 °C. A estação fresca dura 3,7 meses de novembro a março, com temperaturas máximas médias diárias abaixo de 18 °C. O mês mais frio é janeiro, com uma temperatura máxima média diária de 8 °C e mínima média diária de 15 °C (*Clima, Condições Meteorológicas e Temperatura Média Por Mês de Odemira (Portugal), 2022*).

Os dados meteorológicos foram obtidos através da estação meteorológica pertencente à Quinta da Boavista dos Pinheiros que fornece dados como temperatura do ar e do solo, radiação solar, humidade relativa do ar, precipitação, direção do vento, velocidade do vento, evapotranspiração de referência diária, entre outros. Neste estudo foram utilizados fatores climatéricos como a temperatura do ar (°C) e a humidade relativa do ar (%) uma vez que são fatores climatéricos que proporcionam o aparecimento de fungos habitantes do solo. A temperatura do solo (°C) também é um fator climatérico bastante importante na análise destes ensaios, no entanto, a estação meteorológica não fornece dados referentes a este fator e, por isso, não foi possível tê-lo em conta neste estudo. Estes dados podem ser observados nos Apêndices B e C e nas Figura 26 (A) e (B).

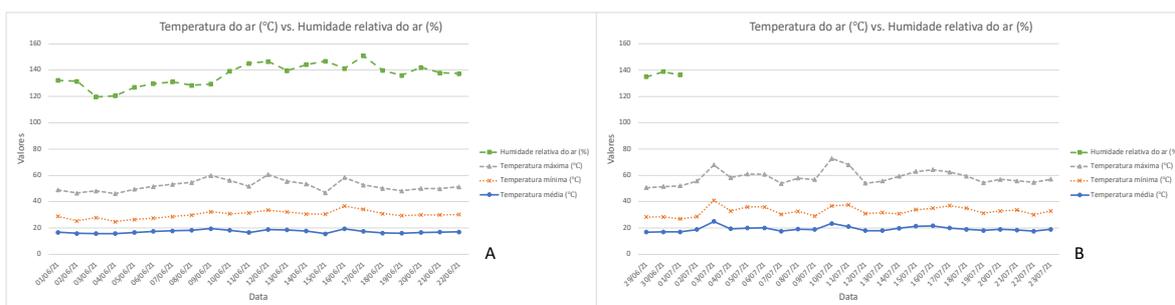


Figura 26 - Temperatura do ar (°C) vs. Humidade relativa do ar (%) – 1ª Sementeira (A) e 2ª Sementeira (B).

Durante a realização da primeira sementeira que decorreu de dia 01 de junho até 22 de junho de 2021 (dia em que ocorreu a última avaliação dos ensaios antes da colheita), a temperatura média do ar foi de 17,22 °C e a humidade relativa média do ar foi de 84,22 % e durante a realização da segunda sementeira que decorreu de dia 29 de junho até 23 de julho de 2021 (dia em que ocorreu a última avaliação dos ensaios antes da colheita), a temperatura média do ar foi de 19,39 °C. Não existe registo do valor da humidade relativa do ar durante a segunda sementeira.

3.2.3. DELINEAMENTO DOS ENSAIOS DE CAMPO

Para uma melhor compreensão das etapas realizadas esquematizou-se no Quadro 8 todos os processos realizados em cada ensaio.

Quadro 8 - Calendarização dos ensaios realizados nos campos BR1 (1ª Sementeira) e BR2 (2ª Sementeira).

BR1	1º Ensaio - Semente vA não tratada vs. tratada	2º Ensaio - Semente vB não tratada vs. tratada
Número de camas	3 camas com semente não tratada e 2 camas com semente tratada	
Pré-sementeira - Fertilização de fundo	Aplicação da adubação de fundo	
	Sementeira	
Pós-sementeira Fertilização de cobertura	Aplicação de Produtos Fitofarmacêuticos	
	2ª Semana - Adubação de Cobertura	
	3ª Semana - Adubação de Cobertura	

Foram realizadas duas sementeiras em datas e campos diferentes sendo que, em cada sementeira foram realizados dois ensaios. Em todos os ensaios, a adubação de fundo foi realizada de acordo com os planos pré-definidos pela empresa, aplicada sempre que ocorre a preparação do solo para uma nova sementeira. Desta forma realizaram-se duas sementeiras em meses distintos, início de junho (1ª Sementeira) e finais de junho/início de julho (2ª Sementeira), de modo a perceber se haveria diferenças nas perdas por *damping-off* causadas por fungos de solo, uma vez que os dados meteorológicos foram diferentes e estes são fatores fundamentais para o aparecimento dos fungos de solo.

Todos os herbicidas, fungicidas e inseticidas autorizados e aplicados nas sementeiras da cultura de espinafre, foram os mesmos que se utilizaram nestes ensaios. Estes foram aplicados sempre que necessário, tendo em conta fatores abióticos e bióticos. Os adubos de cobertura foram fornecidos à planta de acordo com as suas necessidades nutritivas.

No primeiro ensaio foi semeado espinafre baby leaf vA. A cada ensaio correspondiam 5 camas com a mesma variedade semeada, com duas modalidades, “Ensaio 1-vA NT” que é referente

à utilização de semente de variedade A não tratada em que se avaliaram três camas⁴ e a modalidade “Ensaio 1-vA T” que é referente à utilização de semente de variedade A tratada com a substância ativa metalaxyl-M em que se avaliaram duas camas. No segundo ensaio foi semeado espinafre baby leaf vB e foi repetido o delineamento apresentado para o primeiro ensaio, com a modalidade “Ensaio 2-vB NT” que é referente à utilização de semente de variedade B não tratada e “Ensaio 2-vB T” que é referente à utilização de semente de variedade B tratada com a substância ativa metalaxyl-M.

As observações dos ensaios de campo foram feitas com a periodicidade de dois dias, com condições climáticas distintas. Estas foram realizadas tendo em conta o número de plântulas germinadas e emergidas antes do aparecimento das primeiras duas folhas. A designação de 1ª Sementeira ou 2ª Sementeira é referente à sementeira de junho e à sementeira de finais de junho/inícios de julho, respetivamente. A realização destes ensaios carecia de experiência anterior, pelo que se realizaram constantes adaptações que visavam uma melhor eficácia nas observações.

Na primeira sementeira, que engloba os ensaios 1 e 2, em cada ensaio foram observadas as perdas por m² em três talhões⁵ distintos (A, B e C) previamente marcados no campo. Nos ensaios realizados constatou-se que o número médio de plântulas ou plantas emergidas num m² só foi inferior na variedade B tratada. Na segunda sementeira, que engloba os ensaios 1 e 2, em cada ensaio foram observadas as perdas por m² em cinco talhões distintos (A, B, C, D e E) previamente marcados no campo. No final, foi feita a média de perdas totais para ambas as sementeiras (Apêndices T e Y).

Estas observações permitiram avaliar as perdas nas diversas fases de desenvolvimento das plantas e as perdas totais até à fase em que a planta exibiu as 6-8 folhas verdadeiras.

3.3. COLHEITA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO PARA A DETEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO

Foram realizadas análises ao tipo de solo presente no campo BR1 e BR2 (campos onde se realizaram os ensaios de campo) de forma a detetar a existência de fungos fitopatogénicos, através de técnicas moleculares sendo que, a análise molecular utilizada foi feita através de uma sonda específica qPCR realizada a partir da extração de ácidos nucleicos de 250 mg de amostra homogeneizada. Esta análise foi realizada por um laboratório que presta serviços à empresa, portanto, a forma como a amostra foi analisada e os resultados apresentados, são estabelecidos pelo próprio laboratório.

⁴ A palavra “camas” é a designação dada a cada camalhão de 1 m por 1 m sobre o qual realizam a sementeira.

⁵ Talhão – Designação dada ao espaço onde foram analisadas as perdas de plantas, com uma área de 25 cm por 25 cm que, posteriormente, foi extrapolado para m².

Deste modo, foram analisadas as espécies de fungos fitopatogénicos mais predominantes nos campos da Quinta sendo esta seleção feita com base no historial da cultura. Foram realizadas duas análises, uma antes da realização da adubação de fundo e outra após a colheita do espinafre. Estas análises foram repetidas uma vez que se realizaram duas sementeiras e a amostra foi retirada em forma de “X” para se obter uma amostra mais heterogénea. As amostras referentes ao campo BR1 foram analisadas nos dias 19/05/2021 e 25/06/2021 e as amostras referentes ao campo BR2 foram analisadas nos dias 23/06/2021 e 28/07/2021.

As análises realizadas antes da realização da adubação de fundo foram designadas por “Antes da adubação de fundo” e as análises realizadas após a colheita do espinafre designadas por “Após a colheita”.

O resultado obtido indicará se a espécie de fungo está presente ou ausente e quando a espécie de fungo está presente no solo, é indicada também a quantidade de concentração, em Ct, da referida espécie.

3.4. AVALIAÇÃO VISUAL DE PLANTAS DOENTES E OBSERVAÇÃO DE SINTOMAS DE DOENÇA

A avaliação visual de plantas doentes e a observação de sintomas de doença é essencial de forma a complementar o estudo. Desta forma, selecionaram-se em campo plantas ao acaso com raiz, nas diversas fases de desenvolvimento da planta, desde a germinação até a planta obter as 6 a 8 folhas verdadeiras e avaliou-se a existência de sintomatologia sugestiva de infeção por fungos de solo que é constituída por necroses e cloroses das zonas afetadas, de forma a determinar a possível espécie ou espécies que poderão ter causado os sintomas observados.

3.5. DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA FRESCA E DA MATÉRIA SECA

De acordo com o protocolo laboratorial PL9-MS definido pelo Laboratório de Nutrição e Metabolismo Animal da Universidade de Évora, para determinar a matéria fresca e a matéria seca de uma amostra existem vários procedimentos a ter em consideração como é possível consultar no Apêndice A.

Realizaram-se duas sementeiras em campo e, por isso, os parâmetros medidos após a primeira e a segunda colheita de espinafre foram os mesmos. Após a segunda colheita as amostras foram congeladas antes de se proceder à determinação da matéria fresca e seca, para que o producto não ficasse danificado.

Foram realizadas as colheitas de espinafre de cada ensaio e foram pesadas as quantidades de matéria fresca totais. Dessas colheitas foi contabilizado o número de folhas por cada 100 g de peso fresco. Após este processo foi novamente feita a pesagem da matéria fresca total

correspondente a cada ensaio e foi feita a pré-secagem do produto em estufa a 60 °C, homogeneizando a amostra. Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa para estabilizarem o seu peso. Por último, procedeu-se à pesagem final da matéria seca e, de seguida, moeu-se o produto. Após o produto estar moído, procedeu-se à primeira pesagem de matéria seca⁶ e colocou-se na estufa a 105 °C para, posteriormente, se proceder à segunda pesagem.

3.6. COLHEITA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE FOLHAS PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Foram realizadas análises às folhas de espinafre colhidas na segunda sementeira (ensaio do campo BR2), de modo a avaliar os níveis dos macro⁷ e micronutrientes⁸ presentes.

Como macronutrientes destacam-se o Azoto (N), o Fósforo (P), o Potássio (K), o Magnésio (Mg), o Cálcio (Ca) e o Enxofre (S) e como micronutrientes destacam-se o Boro (B), o Cobre (Cu), o Ferro (Fe), o Manganês (Mn) e o Zinco (Zn) sendo que estes nutrientes foram analisados de acordo com os métodos e técnicas estabelecidas pelo laboratório. O laboratório referido tem em conta causas associadas à forma de fertilizar, ao solo e/ou ao clima como causas associadas à carência de nutrientes.

O laboratório tem uma escala pré-definida que indica se o valor do nutriente é “Baixo”, “Adequado” ou “Alto” e um quadro com um intervalo de valores considerado “Adequado” (Quadro 10).

Quadro 9 - Intervalo de valores considerado “Adequado” de acordo com o nutriente analisado (Fonte: Adaptado de um documento fornecido pelo laboratório, 2022).

Valores de referência	
Nutriente	Intervalo "Adequado"
Azoto (N)	4,00 - 6,00
Fósforo (P)	0,30 - 0,60
Potássio (K)	5,00 - 8,00
Magnésio (Mg)	0,60 - 1,00
Cálcio (Ca)	0,70 - 1,20
Boro (B)	25 - 60
Cobre (Cu)	5 - 25
Ferro (Fe)	60 - 200
Manganês (Mn)	30 - 250
Zinco (Zn)	25 - 100

⁶ A determinação da matéria seca residual é feita em duplicado.

⁷ A quantidade de macronutrientes foi analisada em percentagem (%).

⁸ A quantidade de micronutrientes foi analisada em mg/kg.

3.7. PRODUTIVIDADE NOS ENSAIOS

A colheita do espinafre foi realizada cerca de 22 dias após a sementeira e obtiveram-se parâmetros como a quantidade por kg, o número de caixas utilizadas e a produtividade (kg/m^2), para cada ensaio. Entende-se como caixa, uma embalagem com capacidade de 5 kg. Na segunda colheita, não foi possível obter valores para cada ensaio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTES DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE

O número total de sementes germinadas foi de 305 sementes vA não tratada, 148 sementes vA tratada, 306 sementes vB não tratada e 289 sementes vB tratada. Os valores que permitiram calcular a percentagem de germinação/faculdade germinativa (%) foram registados nos Apêndices D, E, F e G. Conforme as equações apresentadas no capítulo 3.1.1., foi possível obter o valor da energia germinativa (%), pureza (% e peso) e valor cultural (%). No entanto, o valor de pureza (% de peso) considerado foi de 100,00 que corresponde ao número de sementes puras, informação confirmada em campo uma vez que as sementes eram todas da mesma variedade. Deste modo, obtiveram-se os resultados do Quadro 10.

Quadro 10 - Parâmetros avaliados nos ensaios de germinação da semente de variedade A e variedade B.

Testes de germinação à semente de variedade A e B				
Parâmetros avaliados	Semente vA não tratada	Semente vA tratada	Semente vB não tratada	Semente vB tratada
Percentagem de germinação/Faculdade germinativa (%)	76	37	77	72
Energia germinativa (%)	10	26	8	7
Pureza (% de peso)	100	100	100	100
Valor cultural (%)	76	37	77	72

Tendo sido realizadas repetições dentro da mesma variedade e da mesma modalidade observou-se a percentagem de germinação (%) ao longo do tempo (dias), como se pode observar na Figura 27 (A, B, C e D).

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

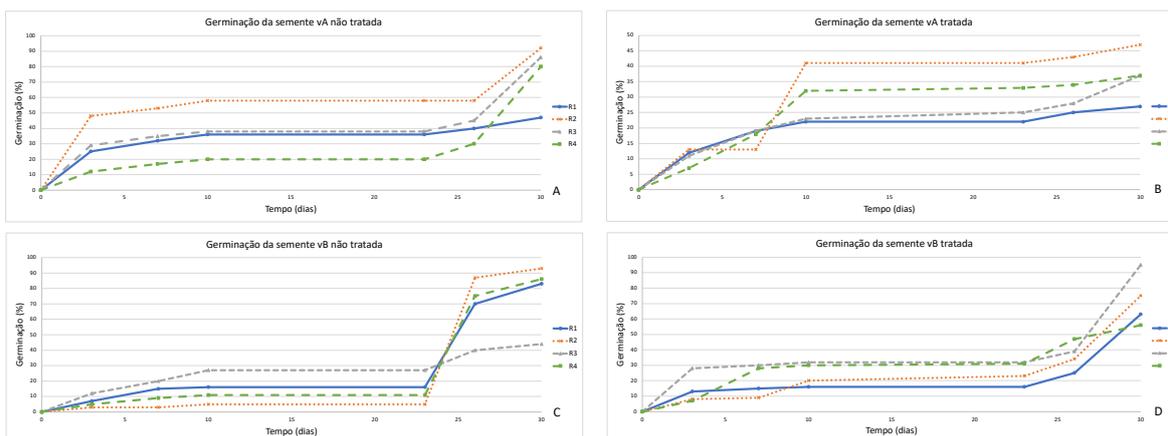


Figura 27 - Percentagem de sementes vA não tratada (A), vA tratada (B), vB não tratada (C), vB tratada (D), germinadas ao longo do tempo.

Como foram realizadas quatro repetições para cada variedade e modalidade, observou-se a percentagem de germinação (%) ao longo do tempo (dias) o que permitiu tirar diversas conclusões. Relativamente à Figura 27 (A), referente à percentagem de sementes vA não tratada germinadas ao longo do tempo, concluiu-se que houve um aumento na percentagem de sementes germinadas nas quatro repetições. A segunda repetição-R2, foi onde ocorreu uma maior germinação, de 92 %. No caso da percentagem de sementes vA tratada (Figura 27 (B)), observa-se que houve aumentos e diminuições na percentagem de sementes germinadas. A segunda repetição-R2, foi onde ocorreu uma maior germinação, só de 47 %. No caso da percentagem de sementes vB não tratada (Figura 27 (C)), concluiu-se que ao longo do tempo houve um aumento na percentagem de sementes germinadas nas quatro repetições. A segunda repetição-R2, foi onde ocorreu uma maior germinação, de 93 %. Por último, no caso da percentagem de sementes vB tratada (Figura 27 (D)), concluiu-se que houve um aumento na percentagem de sementes germinadas. A terceira repetição-R3, foi onde ocorreu uma maior germinação, de 95 %.

Ao comparar a germinação de sementes da variedade A não tratada com a da variedade A tratada, (Quadro 10) observa-se que a percentagem de germinação média é 2,05 vezes maior na variedade A não tratada; ao comparar a germinação da variedade B não tratada com a variedade B tratada, observa-se que a percentagem de germinação média é 1,07 vezes maior na variedade B não tratada, logo muito semelhantes. Por outro lado, ao comparar a germinação das variedades como a germinação da variedade A não tratada com a variedade B não tratada, observa-se que a percentagem de germinação média é 1,01 vezes maior na variedade B não tratada; ao comparar a germinação da variedade A tratada com a variedade B tratada, observa-se que a germinação média é 1,95 vezes maior na variedade B tratada. É importante salientar que esta última comparação não foi confirmada em campo, uma vez que a germinação em campo foi maior na variedade A tratada

do que na variedade B tratada, o que permite concluir que outros fatores poderão ser a causa da má germinação verificada em campo.

No caso da variedade A, a energia germinativa da semente não tratada é maior porque, como refere Nalin (2010) a percentagem de germinação à primeira contagem foi maior. Nalin (2010), também refere que uma semente com boa energia de germinação possui uma boa força de sustentação. Por outro lado, a semente vA não tratada tem uma boa velocidade de germinação. Desta forma, a semente poderá germinar homoganeamente em campo, o que implicará uma melhor emergência das plântulas no solo, facto comprovado com as observações em campo. No caso da variedade B, a energia germinativa da variedade B tratada é maior, no entanto, em campo não se verifica uma germinação homogénea.

A semente de variedade B não tratada, teve um valor cultural mais elevado logo, como refere Nalin (2010) é uma semente de boa qualidade. No entanto, a diferença entre a variedade A não tratada e a variedade B não tratada é de 1 % o que permite concluir que, tendo em conta todos os parâmetros avaliados, a variedade A não tratada também é uma semente de boa qualidade e ambas poderão ter uma boa performance em campo, o que foi confirmado nos ensaios no campo.

4.2. ENSAIOS DE CAMPO

Ao longo das observações em campo foi registado, em papel (Apêndices H, I, J, K, L, M, N e O) e fotograficamente, como se pode observar na Figura 28 (A, B, C e D), a evolução do desenvolvimento do espinafre “baby leaf”, até adquirir as 6 folhas verdadeiras.

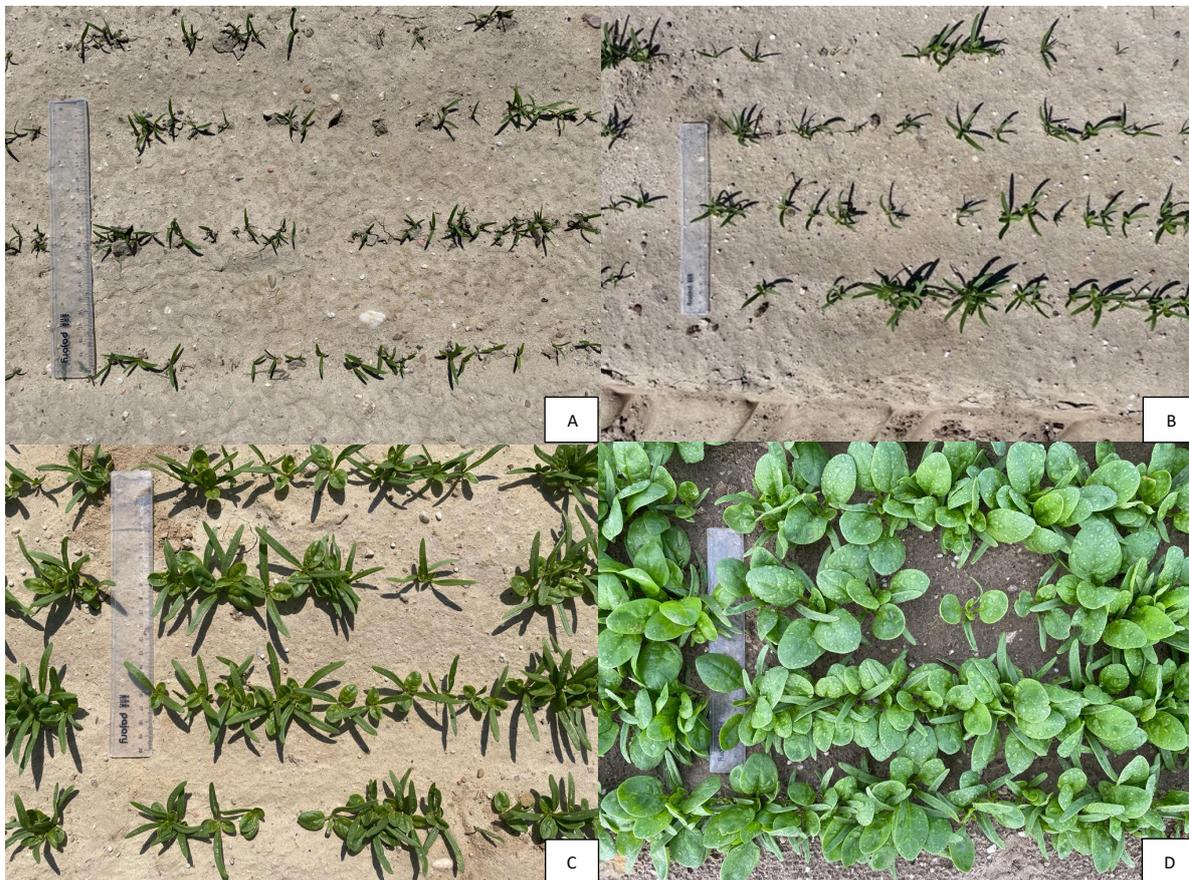


Figura 28 - Germinação e emergência das plântulas (A), aparecimento das primeiras 2 folhas verdadeiras (B), aparecimento das 4 folhas verdadeiras (C) e aparecimento das 6 folhas verdadeiras (D). Na Figura a régua de 20 cm serviu como escala.

Em termos de germinação, ambas as variedades não tratadas, tiveram uma boa germinação, assim como a variedade A tratada, o que permitiu um desenvolvimento homogêneo do espinafre em campo, a exceção foi a variedade vB tratada na qual se verificou uma má germinação, em ambas as sementeiras, o que foi confirmado no campo pela sua performance na fase de germinação. Magnée (2022) relata que a má emergência de algumas variedades poderá ser resultado de fatores abióticos como: níveis elevados de umidade do solo e temperaturas altas (>15 °C), interferindo com a disponibilidade de oxigênio para o embrião da semente; a compactação do solo também pode influenciar a emergência das plantas. O vigor das sementes também pode ter sido um dos fatores que influenciou a tolerância à infecção da planta por agentes patogênicos na fase de pré-emergência.

Comparativamente à semente de variedade B, a semente de variedade A foi a que teve melhor germinação, sem ter havido diferenças entre modalidades e entre sementeiras.

Na segunda sementeira verificou-se que a germinação da semente vB tratada foi melhor, no entanto, a semente vB não tratada continuou a ter uma melhor performance, em termos de germinação, excluindo a hipótese de o tratamento da semente com metalaxyl-M ser uma das causas que afetou o desenvolvimento final da semente vB tratada. Resultados relatados por Zagade et al., (2012) mostram que a utilização de metalaxyl tem efeito na melhoria da germinação da semente, o que não é coincidente com o observado em campo e por isso, o metalaxyl-M poderá não ser o causador da má germinação em campo. No entanto, a má germinação em campo não afetou o posterior desenvolvimento da planta, em ambas as sementeiras.

Relativamente às perdas de plântulas e plantas por *damping-off* sugestivas de serem causadas por fungos fitopatogênicos habitantes do solo, foi possível, observar a evolução dessas perdas (Apêndices P, Q, R, S, U, V, W e X), através da recolha e contagem do número de plantas sintomáticas, durante a primeira (Figura 29 (A, B, C e D)) e segunda sementeira (Figura 30 (A, B, C e D)).

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

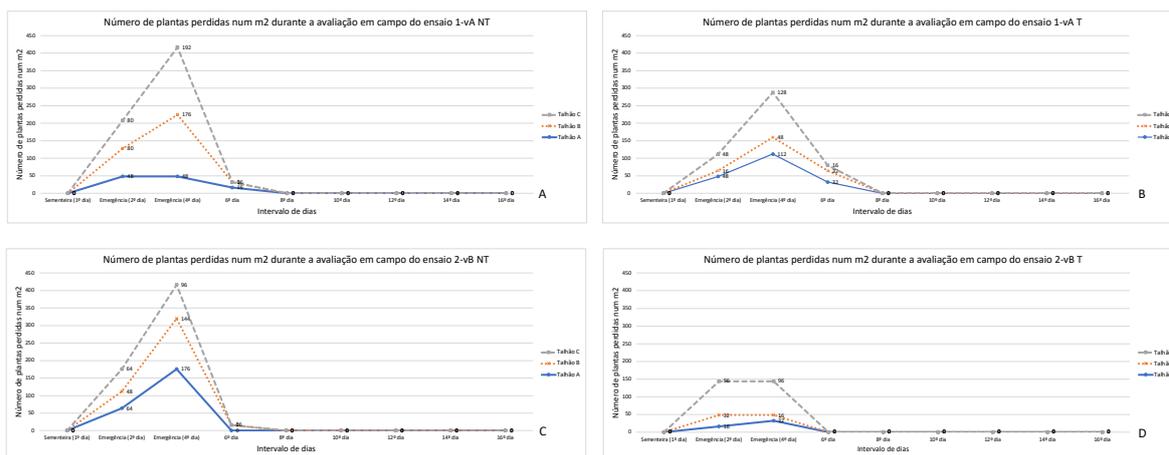


Figura 29 - Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT (A), Ensaio 1-vA T (B), Ensaio 2-vB NT (C) e Ensaio 2-vB T (D)).

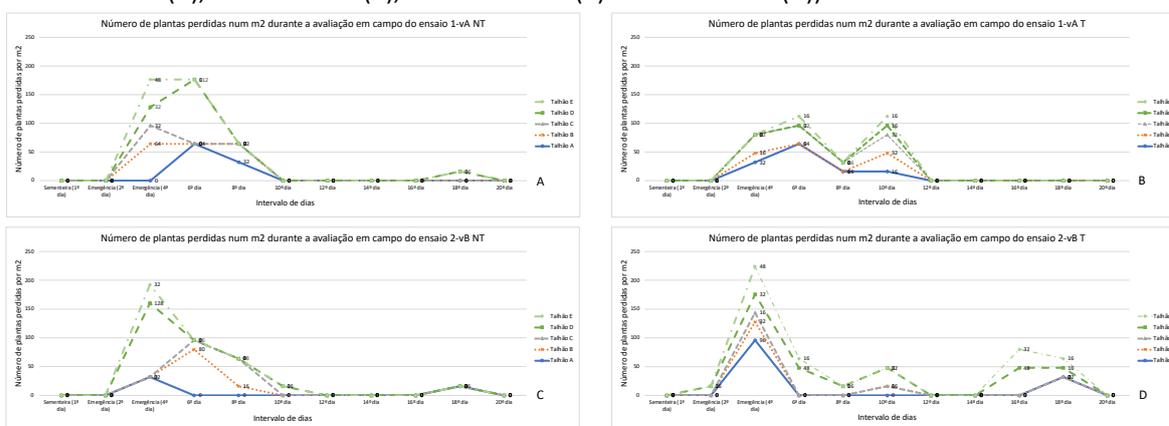


Figura 30 - Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT (A), Ensaio 1-vA T (B), Ensaio 2-vB NT (C) e Ensaio 2-vB T (D)).

Na primeira sementeira, observou-se a evolução dessas perdas em três talhões (Figuras 29 (A, B, C e D)) e na segunda sementeira em cinco talhões (Figura 30 (A, B, C e D)). Numa primeira sementeira, com as observações em campo ao Ensaio 1-vA NT, Ensaio 1-vA T e Ensaio 2-vB NT e, de acordo com a Figura 29 (A, B e C), respetivamente, observou-se que nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura existiu maior quantidade de plantas perdidas sendo que, o máximo ocorreu ao 4º dia com a emergência total das plantas em campo. A exceção foi o talhão A do Ensaio 1-vA NT em que o número de plantas perdidas foi igual, no 2º e no 4º dia de observação. No entanto, no ensaio 2-vB T (Figura 29 (D)) observou-se que no talhão A, existe um pico máximo ao 4º dia, no talhão B, ao 2º dia e no talhão C, o número de plantas perdidas foi igual, no 2º e no 4º dia de observação.

Numa segunda sementeira, com as observações em campo ao Ensaio 1-vA NT e, de acordo com a Figura 30 (A), observou-se que nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura, nos talhões B, C e E, existiu maior quantidade de plantas perdidas sendo que, o máximo ocorreu ao 4º dia com

a emergência total das plantas em campo. No entanto, nos talhões A e D o máximo ocorreu ao 6º dia de observação.

Com as observações em campo ao Ensaio 1-vA T e, de acordo com a Figura 30 (B), observou-se que o maior número de perdas também não foi registado nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura. No talhão A, o pico máximo onde existiu uma maior quantidade de plantas perdidas foi ao 6º dia. Nos talhões B e D, foi ao 10º dia. No entanto, no talhão C, o número de plantas perdidas foi igual, no 4º dia, no 6º dia e no 10º dia de observação. Por último, no talhão E, o número de plantas perdidas foi igual, ao 6º e ao 10º dia de observação.

Com as observações em campo ao Ensaio 2-vB NT e, de acordo a Figura 30 (C), observou-se que nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura, nos talhões A, D e E, existiu maior quantidade de plantas perdidas sendo que, o máximo ocorreu ao 4º dia com a emergência total das plantas em campo. No talhão B, o máximo ocorreu ao 6º dia e no talhão C ocorreu ao 8º dia de observação.

Com as observações em campo ao Ensaio 2-vB T e, de acordo a Figura 30 (D), observou-se que nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura, nos talhões A, B, C e E, existiu maior quantidade de plantas perdidas sendo que, o máximo ocorreu ao 4º dia com a emergência total das plantas em campo. No talhão D, o número de plantas perdidas foi igual, ao 6º e ao 16º dia de observação.

Após a observação minuciosa da evolução de perdas ao longo do ciclo cultural do espinafre, nos diversos ensaios de campo, analisou-se a média de plantas perdidas, em %, no final do ciclo cultural, após a primeira (Figura 31 (A)) e segunda sementeira (Figura 31 (B)), como se pode observar na Figura 31 obtida através dos dados evidenciados nos Apêndices T e Y, respetivamente. Na segunda sementeira, a observação em campo foi mais minuciosa e mais precisa uma vez que, foi analisado um maior número de talhões a fim de obter maior acuidade nas conclusões.

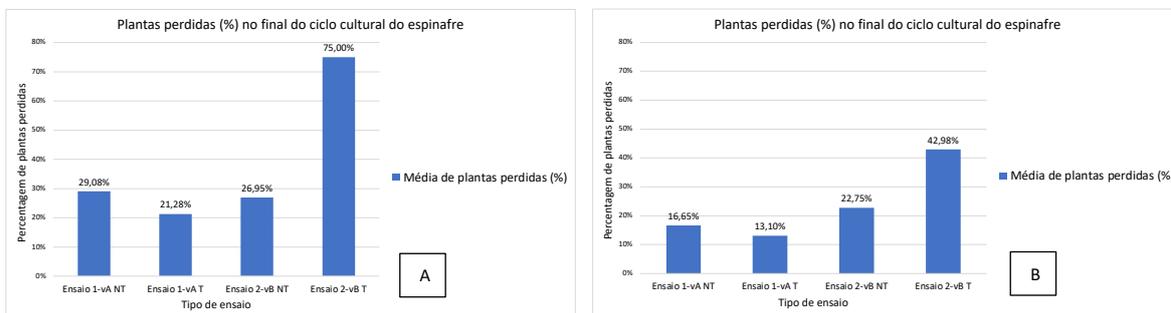


Figura 31 - Média de plantas perdidas por *damping-off*, num m² (%) no final do ciclo cultural do espinafre na 1ª Sementeira (A) e na 2ª Sementeira (B).

Após a primeira sementeira (Figura 31 (A)), o ensaio com menos perdas por *damping-off* foi o Ensaio 1-vA T com uma média de 21,28 % de perdas totais e o ensaio com mais perdas foi o Ensaio 2-vB T com uma média de 75,00 % de perdas totais. Após a segunda sementeira (Figura 31 (B)), o ensaio com menos perdas por *damping-off* foi o Ensaio 1-vA T com uma média de 13,10 % de perdas totais e o ensaio com mais perdas foi o Ensaio 2-vB T com uma média de 42,98 % de perdas totais.

Por um lado, comparando o Ensaio 1-vA NT e o Ensaio 1-vA T, a média de perdas totais por m² na semente vA não tratada foi superior à média de perdas totais por m² na semente vA tratada, 29,08 % e 21,28 %, respetivamente. O contrário não acontece comparando o Ensaio 2-vB NT e o Ensaio 2-vB T, em que se observou que a média de perdas totais por m² na semente vB não tratada foi inferior à média de perdas totais por m² na semente vB tratada, 26,95 % e 75,00 %, respetivamente, o que se deve ao facto de a média total de plantas emergidas num m² no Ensaio 2-vB T ter sido inferior à do Ensaio 2-vB NT, proporcionando uma maior perda de plantas.

Por outro lado, comparando o Ensaio 1-vA NT e o Ensaio 1-vA T, a média de perdas totais por m² na semente vA não tratada foi superior à média de perdas totais por m² na semente vA tratada, 16,65 % e 13,10 %, respetivamente. O contrário não acontece comparando o Ensaio 2-vB NT e o Ensaio 2-vB T, em que se observou que a média de perdas totais por m² na semente vB não tratada foi inferior à média de perdas totais por m² na semente vB tratada, 22,75 % e 42,98 %, respetivamente.

Os resultados atuais acerca da menor perda de plantas na modalidade de semente tratada são semelhantes aos de Zagade et al., (2012) que relatam que a utilização de metalaxyl tem um efeito sinérgico para reduzir a podridão da semente, reduzindo significativamente a mortalidade da planta, causada, neste caso, por *Pythium*. Outro estudo realizado por Hwang et al., (2001), é coincidente com os resultados relatados por Zagade et al., (2012) em plantas de ervilha, reduzindo o impacto de *Pythium* na podridão de sementes e *damping-off* de plântulas.

Comparando todos os ensaios e modalidades, a discrepância de perdas totais (%) relativa à semente vB não tratada e à semente vB tratada na segunda sementeira, poderá ser justificada pelo facto de a média total de plantas emergidas num m² ter sido inferior às que germinaram nos ensaios em foi utilizada semente vA não tratada e tratada. No caso da primeira sementeira, isto só se aplicou à semente vB tratada uma vez que foi a única em que a média total de plantas emergidas num m² foi inferior.

4.3. COLHEITA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SOLO PARA A DETEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO

Através do laboratório foram analisadas as seguintes espécies de fungo e, de acordo, com a deteção feita foram indicadas as quantidades em Ct, da espécie correspondente (Quadro 11). Tendo em conta uma escala pré-definida pelo laboratório assim se pode analisar a pressão da espécie no solo analisado, quanto menor o valor de Ct, maior a concentração da espécie no solo. As análises realizadas antes da realização da adubação de fundo foram designadas por “Antes da adubação de fundo” e as análises realizadas após a colheita do espinafre designadas por “Após a colheita”, como está evidenciado no Quadro 11. No Quadro 11, a designação “NA” significa que a espécie de fungo não foi analisada e o sinal “-” significa que não existe quantidade, em Ct, uma vez que a espécie não foi detetada.

Quadro 11 - Deteção de fungos fitopatogénicos mediante análise molecular qPCR.

Espécies de fungos analisados	Campo BR1				Campo BR2			
	Antes da adubação de fundo (Ct)	Resultado	Após a colheita (Ct)	Resultado	Antes da adubação de fundo (Ct)	Resultado	Após a colheita (Ct)	Resultado
<i>Alternaria</i> spp.	27,87	Presente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Botrytis cinerea</i>	32,08	Presente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bremia lactucae</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium variabile</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Colletotrichum</i> spp. (I)	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. dematium</i> f. <i>spinaciae</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Erysiphe</i> spp.	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Fusarium</i> spp.	19,48	Presente	20,75	Presente	20,72	Presente	21,72	Presente
<i>Fusarium equiseti</i>	NA	NA	25,34	Presente	26,17	Presente	26,07	Presente
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,71	Presente	22,99	Presente	24,94	Presente	25,45	Presente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	27,35	Presente	31,56	Presente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>cucumerinum</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium solani</i>	22,24	Presente	22,54	Presente	24,77	Presente	23,58	Presente
<i>Fusarium proliferatum</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Fusarium verticillioides</i>	NA	NA	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Oidium brassicae</i>	32,71	Presente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Phytophthora</i> spp.	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> (Raça 1)	30,75	Presente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> (Raça 2)	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pythium</i> spp. (I)	NA	NA	27,80	Presente	29,97	Presente	29,37	Presente
<i>Pythium</i> spp. (II)	NA	NA	27,69	Presente	29,56	Presente	34,54	Presente
<i>Pythium aphanidermatum</i>	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Pythium irregulare</i>	-	Ausente	33,64	Presente	34,61	Presente	-	Ausente
<i>Pythium tracheiphilum</i>	-	Ausente	29,78	Presente	-	Ausente	33,23	Presente
<i>Pythium ultimum</i>	24,45	Presente	23,92	Presente	26,31	Presente	25,83	Presente
<i>Rhizoctonia solani</i>	32,40	Presente	30,51	Presente	-	Ausente	-	Ausente
<i>Sclerotinia minor</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Sclerotinia rolfii</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Septaria lactucae</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Stemphylium</i> spp.	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Verticillium albo-atrum</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Verticillium dahliae</i>	-	Ausente	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Uma vez, mencionado na revisão da literatura, os fungos fitopatogénicos mais importantes e mais relevantes para o estudo em causa pertencem aos géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* e *Verticillium*.

Com a análise realizada, Quadro 11, podemos afirmar quais as espécies de fungos fitopatogênicos de solo detetados nos campos BR1 e BR2, antes da adubação de fundo e após a colheita.

Na amostra retirada do campo BR1, antes da adubação de fundo, foram detetadas elevadas concentrações de fungos das espécies *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Phytium ultimum*. Em concentrações médias, foram detetados fungos da espécie *Alternaria* spp. e da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Por último, numa concentração mais baixa foi detetada a espécie de fungo *Rhizoctonia solani*. Após a colheita, foram detetadas elevadas concentrações de fungos das espécies *Fusarium* spp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp. grupo (I), *Pythium* spp. grupo (II) e *Pythium ultimum*. Numa concentração média, foi detetada a espécie de fungo *Phytium tracheiphilum*. Por último, em concentrações mais baixas foram detetados fungos das espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, *Pythium irregulare* e *Rhizoctonia solani*.

Na amostra retirada do campo BR2, antes da adubação de fundo, foram detetadas elevadas concentrações de fungos das espécies *Fusarium* spp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Pythium ultimum*. Em concentrações médias, foram detetados fungos das espécies *Pythium* spp. grupo (I) e *Pythium* spp. grupo (II). Por último, numa concentração mais baixa foi detetada a espécie de fungo *Pythium irregulare*. Após a colheita, foram detetadas elevadas concentrações de fungos das espécies *Fusarium* spp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Phytium ultimum*. Numa concentração média, foi detetada a espécie de fungo *Pythium* spp. grupo (I). Por último, em concentrações mais baixas foram detetados fungos das espécies *Pythium* spp. grupo (II) e *Phytium tracheiphilum*.

Resumindo e, comparando ambos os campos, observa-se que, antes da adubação de fundo, a *Alternaria* spp., está presente no campo BR1, numa concentração média. No entanto, no campo BR2 não foi realizada nenhuma análise para a sua detecção e, portanto, não é possível fazer uma comparação. Os gêneros *Sclerotinia* e *Verticillium* não estão presentes no solo do campo BR1 antes da adubação de fundo, no entanto, após a colheita não foram analisados e, por isso, não é possível nenhuma comparação. Estes, antes da adubação de fundo e após a colheita do campo BR2, não foram analisados e, deste modo, não é possível obter nenhuma conclusão.

Fungos do gênero *Fusarium* foram detetados nos solos dos campos BR1 e BR2. O *Fusarium* spp. está presente em ambos os solos, em elevadas concentrações, antes da adubação de fundo e após a colheita. Deste modo, conclui-se que o *Fusarium* spp. é predominante nos solos analisados tendo ocorrido um aumento da quantidade de inóculo após a colheita. A espécie *Fusarium equiseti* não foi analisada no campo BR1, antes da adubação de fundo, no entanto, após a colheita, foi detetado em elevadas concentrações. No campo BR2, antes da adubação de fundo e após a

colheita, este foi detetado em elevadas concentrações. No campo BR2, após a colheita ocorreu uma ligeira diminuição da quantidade de inóculo do fungo. A espécie *Fusarium oxysporum* foi detetada em ambos os campos, antes da adubação de fundo e após a colheita, em elevadas concentrações sendo que, a quantidade de inóculo aumentou após a colheita, podendo-se concluir que esta espécie é predominante nos solos analisados. A espécie *Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* foi detetada em concentrações médias, antes da adubação de fundo e em concentrações mais baixas, após a colheita no campo BR1 tendo ocorrido um aumento da quantidade de inóculo após a colheita. No campo BR2, este fungo não foi detetado. A espécie *Fusarium solani* está presente em elevadas concentrações, antes da adubação de fundo e após a colheita em ambos os campos tendo ocorrido um aumento da quantidade de inóculo após a colheita, podendo-se concluir que esta espécie é predominante nos solos analisados. As restantes espécies de fungos do género *Fusarium* que se encontram referidas no Quadro 11, não foram analisadas nas amostras “antes da adubação de fundo” no campo BR1 enquanto que, nas amostras “antes da adubação de fundo” no campo BR2 e “após a colheita” de ambos os campos, não foram detetadas. O efeito da temperatura na expressão dos sintomas causados por *Fusarium* foram demonstrados no estudo realizado por Brian (2016). Existem variedades comerciais de espinafre que têm alguma resistência à murchidão causada pelo agente fitopatogénico *Fusarium*, no entanto, esta resistência só suprime sob temperaturas mais baixas, em temperaturas elevadas, como é o caso deste estudo, não é tão resistente o que se torna uma limitação à produção de espinafre durante as estações com temperaturas elevadas. Para além disto, estudos demonstram também que o tratamento de sementes tem pouco efeito na murchidão causada por *Fusarium*, e, desta forma, na produção convencional, as sementes de espinafre devem ser tratadas para suprimir os agentes fitopatogénicos responsáveis pelo *damping-off* tal como demonstrado também em trabalhos realizados por Brian (2016).

A *Phytophthora* spp., não foi detetada em nenhuma das amostras de solo analisadas, antes da adubação de fundo e após a colheita, no entanto, este Oomiceta, tem sido também relacionado com perdas de produção por *damping-off* em pós-emergência de espinafre como demonstrado por Magnée (2022).

O *Pythium* spp. referente ao grupo (I) e (II) não foi analisado antes da adubação de fundo no campo BR1, no entanto, foi analisado antes da adubação de fundo no campo BR2 e detetado em concentrações médias. Após a colheita, no campo BR1, este género foi detetado em elevadas concentrações. No campo BR2, o *Pythium* spp. referente ao grupo (I) foi detetado em concentrações médias e o *Pythium* spp. referente ao grupo (II) foi detetado em baixas concentrações. Deste modo, no campo BR2, ocorreu uma ligeira diminuição da quantidade de inóculo do fungo referente ao grupo (I) e um aumento da quantidade de inóculo do fungo referente

ao grupo (II). Estudos relatam que a utilização de sementes tratadas com metalaxyl pode reduzir o impacto de *Pythium*, o que poderá justificar a diminuição da quantidade de inóculo do fungo após a colheita no campo BR2 (Hwang et al., 2001; Zagade et al., 2012).

A espécie *Pythium aphanidermatum* não foi detetada antes da adubação de fundo e após a colheita, em ambos os campos. Tekale et al., (2019), relata que fungicidas como o metalaxyl inibe (100 %) o crescimento de *Pythium aphanidermatum*, uma das espécies de *Pythium* responsáveis pelo *damping-off* em espinafre, o que poderá ser a razão pela qual esta espécie está ausente em ambos os solos.

A espécie *Pythium irregulare* não foi detetada antes da adubação de fundo no campo BR1 e após a colheita no campo BR2. No entanto, foi detetada em concentrações mais baixas após a colheita no campo BR1 e antes da adubação de fundo do campo BR2. Estudos demonstrados por Tesoriero & Lucas (2017) afirmam que *Pythium irregulare*, para além de ter sido detetado no solo também causou sintomas de podridão radicular no espinafre e, desta forma, esta espécie poderá ter causado alguns dos sintomas observados neste estudo.

A espécie *Pythium tracheiphilum* não foi detetada antes da colheita de ambos os campos. Após a colheita, foi detetada em médias concentrações no campo BR1 e em baixas concentrações no campo BR2. Kumar et al., (2007) detetaram a espécie *Pythium tracheiphilum* associada ao míldio, à murchidão vascular e à podridão do caule de alface (*Lactuca sativa*), no entanto, os meus resultados apontam para que esta espécie possa também estar presente ao nível das raízes do espinafre. Seria importante no futuro realizar análises às raízes para poder perceber se realmente esta espécie está a infetar as raízes do espinafre.

A espécie *Pythium ultimum* foi detetada, em ambas as análises e campos, em elevadas concentrações tendo ocorrido uma ligeira diminuição da quantidade de inóculo após a colheita, podendo-se concluir que esta espécie é predominante nos solos analisados. Uma vez que esta espécie é predominante no solo e é uma das espécies de *Pythium* que causa o *damping-off* no espinafre, esta espécie poderá ter causado o *damping-off* observado nas plantas em campo. Estudos demonstrados por Cummings et al., (2009) afirmam que *Pythium ultimum* causa o *damping-off* das plântulas, em pré e pós-emergência.

A espécie *Rhizoctonia solani* não foi detetada em ambas as análises antes da adubação de fundo e após a colheita no campo BR2. No entanto, no campo BR1, foi detetada em concentrações mais baixas, antes da adubação de fundo e após a colheita sendo que, ocorreu uma diminuição da quantidade de inóculo após a colheita. Estudos demonstrados por Cummings et al., (2009) afirmam que *Rhizoctonia solani* causou o *damping-off* e murchidão das plântulas de espinafre. A baixa emergência em campo no ensaio 2-vB T pode estar relacionado com a presença de *Rhizoctonia*

solani uma vez que esta pode infectar as sementes antes e durante a germinação (Cummings et al., 2009).

Concluindo, os fungos de solo predominantes em elevadas concentrações são o *Fusarium* spp., nomeadamente as espécies *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* sendo que, a espécie *Pythium ultimum* também predomina nestes solos. Estes foram desenvolvidos nas raízes ou na planta. É notório que após a colheita, a quantidade de inóculo seja mais elevada que antes da adubação de fundo o que sugere que ao longo do tempo, o *Fusarium* spp. hospedou-se e multiplicou-se nas raízes ou na planta de espinafre e ao multiplicar-se foi detetado em maior quantidade. Existem fungos de solo como a espécie *Pythium ultimum* que apesar de estarem em elevadas quantidades no solo, antes da adubação de fundo, foram detetados em menor quantidade após a colheita e, portanto, houve uma diminuição de quantidade de inóculo. O que leva a considerar que, por um lado, o espinafre pode não ser hospedeiro desta espécie de fungo e, portanto, o fungo não teve a oportunidade de se instalar e multiplicar-se na planta ou, por outro lado, esta espécie de fungo poderá ter estado em competição com outros fungos antagonistas que, por sua vez, podem ser inibidores de alguns fungos de solo uma vez que, estão em condições de ambiente descontrolado e que têm um papel fundamental na proteção das plantas contra fungos fitopatogénicos.

4.3.1. RELAÇÃO DA PRESENÇA DOS FUNGOS DE SOLO COM FATORES ABIÓTICOS

A propagação dos fungos fitopatogénicos habitantes do solo é influenciada por diversos fatores abióticos, como a temperatura do solo (°C), a temperatura do ar (°C), a humidade relativa do ar (°C), entre outros. De acordo com a Figura 26 (A e B) apresentada no capítulo 3.2.2.2. e, de acordo, com as condições mais favoráveis ao aparecimento dos fungos fitopatogénicos mais relevantes para a cultura do espinafre concluiu-se que quando a temperatura média é elevada, a percentagem de perdas causadas por fungos de solo é maior. Agrios (2005) refere que temperaturas acima de 18 °C favorecem a germinação de oósporos, estrutura reprodutiva sexuada e de resistência do fungo *Pythium* sp. Durante os dias em que ocorreram maiores perdas de plantas por m², a temperatura máxima foi superior a 25-27 °C, temperatura ótima no desenvolvimento rápido do fungo (Syngenta, 2023).

4.4. AVALIAÇÃO VISUAL DE PLANTAS DOENTES E OBSERVAÇÃO DE SINTOMAS DE DOENÇA

Selecionaram-se, ao longo do tempo, plantas ao acaso, com raiz, como se pode observar nas Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37, que apresentavam diferentes sintomatologias, quer em campo, quer após a colheita do produto final (Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37).



Figura 32 - Planta sintomática na fase cotiledonar.



Figura 33 - Plantas sintomáticas após o aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras.

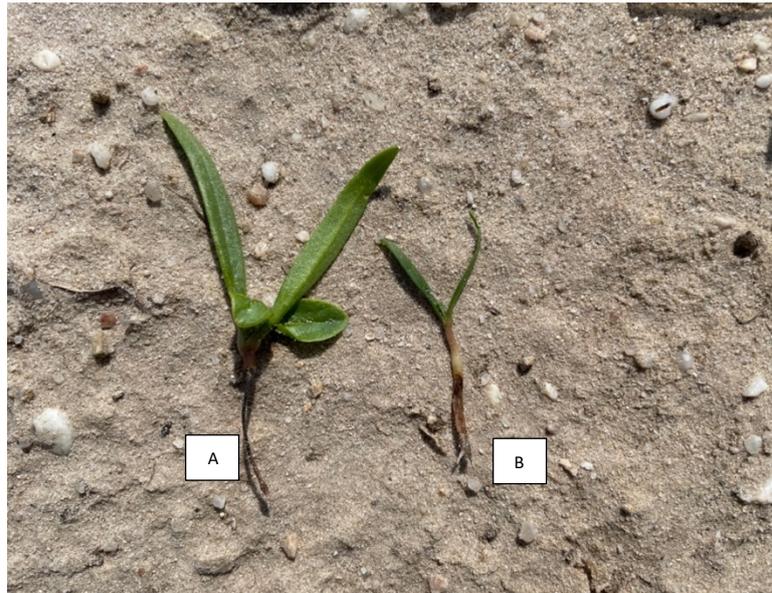


Figura 34 - Plantas sintomáticas (primeiro par de folhas - A e com cotilédones - B).

Após as folhas terem adquirido o estado de “baby leaf” foram colhidas várias amostras de plantas com a raiz para verificar a existência de sintomatologia sugestiva de infecção por fungos de solo.



Figura 35 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes (A, B, C e D).

No entanto, relativamente à segunda sementeira, nos 4 ensaios diferentes foram colhidas duas folhas por cada ensaio, como se pode observar nas Figuras 36 e 37 uma vez que há diferentes sintomatologias sugestivas de infecção com diferentes agentes fitopatogénicos.



Figura 36 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes do ensaio 1 variedade A não tratada (A) e do ensaio 1 variedade A tratada (B).



Figura 37 - Plantas com sintomas sugestivos de doença nas folhas e raízes do ensaio 2 variedade B não tratada (A) e do ensaio 2 variedade B tratada (B).

Através da observação de sintomas de doença nas plantas com raiz que foram colhidas nas várias fases de desenvolvimento da planta, em ambos os ensaios, é possível observar a mesma sintomatologia, podridão da raiz.

Esta podridão pode ser confundida com podridões das raízes e *damping-off* causadas por outros fungos de solo com *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Pegg & Manners, 2014) e como *Pythium* e *Phytophthora* (Agris, 2005; Pegg & Manners, 2014a). O escurecimento das pontas das raízes, são alguns sintomas de que a planta foi atacada pelo fungo *Fusarium* e que este causou a murchidão vascular, tal como observado por Volesky (2022) em plantas de espinafre.

Nas Figuras 32, 33 e 34, observam-se sintomas de podridão da raiz que originou o *damping-off* pós-emergência quando a planta obteve o primeiro par de folhas verdadeiras. No caso da Figura 32, isto acontece imediatamente a seguir à emergência, antes da planta adquirir o primeiro par de folhas verdadeiras. No caso da Figura 34 (A), observa-se que os cotilédones e o primeiro par de

folhas verdadeiras não foram atacadas o que se pode considerar que, por um lado, a planta estava a conseguir resistir ao ataque e/ou, por outro lado, o estado de infeção ainda era muito precoce.

Nas Figuras 35, 36 e 37, em que a maior parte das plantas já tinha adquirido as quatro folhas verdadeiras, observa-se uma podridão da raiz principal que evidencia que o ataque do agente (s) fitopatogénico (s) não foi tão intenso comparativamente ao ataque observado nas Figuras 32, 33 e 34.

Através da análise realizada pelo laboratório, antes da adubação de fundo e após a colheita do espinafre, em ambos os campos, observa-se, em elevadas concentrações, a presença do género *Fusarium* spp., nomeadamente a espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* que causa a sintomatologia no espinafre (Waheed et al., 2021). Na espécie *Fusarium oxysporum*, a quantidade de inóculo aumentou após a colheita. Na Figura 34 (B) observa-se uma descoloração do caule que poderá ser causada por este agente fitopatogénico. Desta forma, e analisando todos estes fatores, pode-se considerar que os sintomas sugestivos observados nas plantas podem ter sido causados pela espécie *Fusarium oxysporum*.

Por outro lado, a espécie *Pythium ultimum* também se observou em elevadas concentrações, no entanto, após a colheita encontram-se várias espécies do género *Pythium* que foram analisadas como *Pythium* spp. e que se encontram em elevada concentração (campo BR1) e em média e baixa concentração (campo BR2). Antes da adubação de fundo (campo BR1), o *Pythium* spp. não foi analisado, no entanto, no campo BR2, já foi detetado em médias concentrações. Desta forma e, analisando todos estes fatores, pode-se considerar que as espécies do género *Pythium* podem ter sido uma das causas dos sintomas que se observam nas raízes das plantas uma vez que mesmo não tendo sido analisado antes da adubação de fundo (campo BR1) foi observado após a colheita (campo BR1 e BR2), o que significa que está presente no solo. A espécie *Pythium ultimum* é uma das espécies causadoras do *damping-off* no espinafre (Larsson, 1994) e uma vez presente no solo, mesmo que o inóculo tenha diminuído após a colheita, pode-se considerar que os sintomas sugestivos observados nas plantas (Figuras 32, 33 e 34 (A)) podem ter sido causados por *Pythium*, mais propriamente pela espécie *Pythium ultimum*. Magnée (2022) relata que *Pythium ultimum* é altamente patogénico no espinafre, induzindo o *damping-off* em pré e pós-emergência, semelhante ao que foi observado através da avaliação visual de plantas doentes. A frequente produção de culturas vulneráveis promove o desenvolvimento de *Pythium ultimum* nos solos, o que torna a sua eliminação muito difícil (Magnée, 2022), o que poderá ser a razão pela qual este fungo está sempre presente no solo. Pánek et al., (2022), relata que de algumas espécies como *Pythium irregulare* (Huzar-Novakowski & Dorrance, 2018) e *Pythium aphanidermatum* (Titone M Mocioni et al., 2009) são resistentes à substância metalaxyl, razão pela qual a espécie *Pythium irregulare* está presente no solo, após a colheita (campo BR1) e antes da adubação de fundo (campo

BR2). Len Tesoriero (2013), relata que o tratamento de sementes com metalaxyl-M foi eficaz no controle de espécies de *Pythium*.

O género *Phytophthora* spp., não foi detetado em nenhuma das amostras de solo analisadas, quer antes da adubação de fundo, quer após a colheita, em ambos os campos. Desta forma e, analisando todos estes fatores, este género não pode ser o causador dos sintomas observados nas plantas.

O género *Alternaria* spp. também é um fungo que pode causar o *damping-off* das plântulas, no entanto, no espinafre o principal sintoma denomina-se de Mancha Foliar ou Mancha de *Alternaria* onde as folhas adquirem manchas cloróticas ou necróticas. Através da análise realizada pelo laboratório detetou-se a presença do género *Alternaria* spp., antes da adubação de fundo no campo BR1, numa concentração média e no campo BR2, não foi realizada nenhuma análise. O fungo está presente no solo antes da adubação de fundo (campo BR1), no entanto, não foi analisado após a colheita (campos BR1 e BR2) e antes da adubação de fundo (campo BR2) e como não se detetou nenhuma sintomatologia nas folhas, o único sintoma observado e que pode ser causado por este agente fitopatogénico é o *damping-off* das plântulas. Desta forma e, analisando todos estes fatores, não se pode tirar conclusões acerca da presença ou ausência deste fungo no solo e a consequente sintomatologia na planta.

O género *Verticillium* spp. pode causar a descoloração vascular dos caules e ralzes. Na Figura 34 (B), observa-se uma descoloração do caule que poderá ser causada por este agente fitopatogénico, tal como foi observado em estudos realizados por Maruthachalam et al., (2013). O género *Sclerotinia* spp., dependendo da espécie, é um fungo que pode atacar a raiz e o caule. Através da análise realizada pelo laboratório, o género *Sclerotinia* spp. e o género *Verticillium* spp. estavam ausentes no campo BR1, antes da adubação de fundo, no entanto, após a colheita no campo BR1 e, antes da adubação de fundo e após a colheita no campo BR2, não foram analisados. Desta forma e, analisando todos estes fatores, nada se pode concluir acerca da presença ou ausência destes dois géneros de fungos de solo e a consequente sintomatologia na planta.

No género *Rhizoctonia* spp., os sintomas mais comuns são o *damping-off* de plântulas, podridão da raiz, e a podridão do caule. Lamichhane et al., (2018), refere que a *Rhizoctonia* spp. causa *damping-off* no espinafre, sendo este o sintoma mais comum deles todos e que pode ocorrer antes ou após a emergência. Nas Figuras 32, 33 e 34, este género parece ser o causador dos sintomas observados uma vez que, se observa um ataque intenso à raiz que tem uma coloração preta. Através da análise realizada pelo laboratório, a espécie *Rhizoctonia Solani*, espécie mais importante, foi detetada em concentrações mais baixas antes da adubação de fundo e após a colheita, no campo BR1, no entanto, nas amostras retiradas no campo BR2, observou-se que este fungo está ausente. Desta forma, e analisando todos estes fatores, mesmo que a quantidade de

inóculo no campo BR1 tenha diminuído após a colheita, uma vez detetado, este fungo pode causar a sintomatologia observada nas plantas. Len Tesoriero (2013), relata que nenhum tratamento até ao momento, incluindo o tratamento de sementes com metalaxyl-M foi eficaz para reduzir doenças causadas por *Rhizoctonia*. Estes agentes fitopatogénicos também são observados nas Figuras 35, 36 e 37, no entanto, o ataque é menos intenso.

4.5. DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA FRESCA E DA MATÉRIA SECA

Relativamente às medições após a colheita das plantas obtiveram-se os resultados evidenciados nos Apêndices Z, AA, AB, AC, AD e AE. No Quadro 12, apresenta-se a matéria seca (MS), em gramas (g), obtida em cada ensaio, em ambas as sementeiras (Apêndices AB e AE).

Quadro 12 - Matéria seca (MS) (g) obtida em cada ensaio, em ambas as sementeiras.

Matéria seca (MS) (g)		
	1ª Sementeira	2ª Sementeira
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº1)	2,89	2,73
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº2)	2,88	2,74
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº1)	2,89	2,76
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº2)	2,89	3,76
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº1)	2,90	2,76
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº2)	2,89	2,75
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº1)	2,91	2,79
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº2)	2,90	2,80

Através dos resultados apresentados no Quadro 12, é possível afirmar que nas amostras obtidas a partir da primeira sementeira dificilmente houve diferenças importantes de MS entre as duas variedades e modalidades em estudo. Já na segunda sementeira a variedade A tratada apresentou um valor de MS de 3,76 g, superior a todos os outros, sendo observado que os valores das modalidades tratadas foram sempre superiores às modalidades não tratadas.

O teor de matéria seca das folhas e a relação com a massa fresca é cada vez mais utilizado como indicador do compromisso entre uma rápida assimilação dos nutrientes e crescimento, e uma conservação eficiente com tecidos bem protegidos (Garnier et al., 2001; Zarrinkamar et al., 2004).

4.6. ANÁLISE DO ESTADO NUTRICIONAL DE FOLHAS DE ESPINAFRE

De acordo com a escala pré-definida pelo laboratório obtiveram-se os resultados e posteriores avaliações evidenciadas no Apêndice AF. A partir destes resultados obteve-se o seguinte gráfico (Figura 38 (A e B)) que permitiu uma melhor observação de quais os macro e micronutrientes presentes nas folhas e qual a quantidade presente nos diferentes ensaios e modalidades, referentes à segunda sementeira. Os macronutrientes analisados (Figura 38 (A)) foram o Azoto (N), Fósforo (P), Potássio (K), Magnésio (Mg), Cálcio (Ca) e Enxofre (S) e os micronutrientes (Figura 38 (B)) foram o Boro (B), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn).

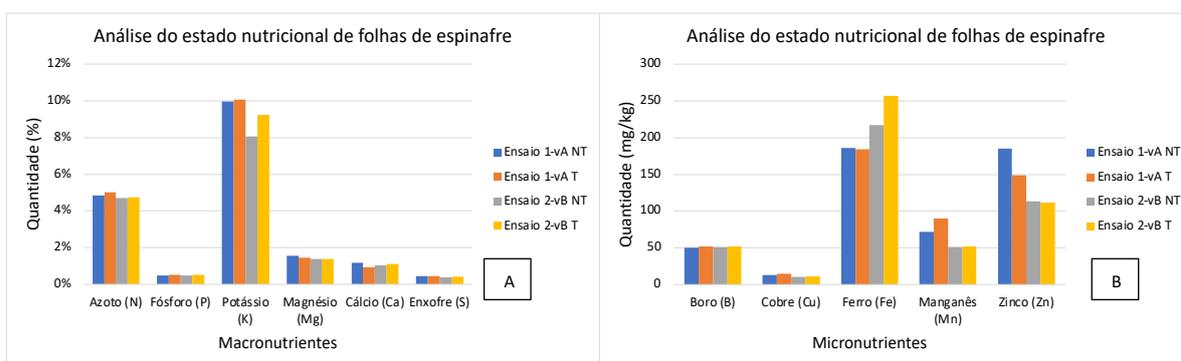


Figura 38 - Análise do estado nutricional das folhas de espinafre (2ª Sementeira).

A análise do estado nutricional das folhas de espinafre colhidas após a segunda sementeira, permitiu as seguintes considerações. Pode-se afirmar que a quantidade de N é mais elevada no Ensaio 1-VA T, considerada pelo laboratório como adequada. A elevada quantidade de azoto poderá estar relacionada com a percentagem de plantas perdidas uma vez que o azoto é o macronutriente que tem um maior impacto em doenças de plantas (Tripathi et al., 2022). A utilização de fertilização excessiva de N pode favorecer o crescimento de esporos patogénicos (Dordas, 2008; Neumann et al., 2004).

A quantidade de P é mais elevada no Ensaio 1-VA T e no Ensaio 2-vB T, tendo estes dois ensaios apresentado a mesma quantidade de P, considerada pelo laboratório como adequada. No ensaio 2-vB T, segunda sementeira, observou-se uma média de perda de plantas de 42,98 %. Tripathi et al., (2022), relata que apesar de não existir nenhuma evidência de que este nutriente esteja relacionado com a resistência da planta a doenças, uma elevada concentração de fósforo pode aumentar a suscetibilidade da planta ao agente fitopatogénico, o que pode estar relacionado com a percentagem de plantas perdidas.

A quantidade de K é mais elevada no Ensaio 1-VA T, considerada pelo laboratório como alta. Estudos demonstrados por Ju et al., (2020), afirmam que o potássio, em elevadas concentrações,

reduz a infecção por *Verticillium dahliae*. No entanto, este agente fitopatogénico está ausente no solo ou não foi analisado e, como não foi detetada nenhuma sintomatologia causada por este agente fitopatogénico, não existe nenhuma relação. Por outro lado, o potássio tem um efeito direto no crescimento da planta e na resistência a doenças. Estudos demonstrados por Cao et al., (2016), afirmam que há medida que a deficiência em potássio aumenta, o crescimento de *Fusarium oxysporum*, também aumenta. No entanto, o efeito tem sido pouco estudado comparativamente a outros nutrientes (Cao et al., 2016) e, por isso, pouco se pode refletir sobre esta relação.

A quantidade de Mg é mais elevada no Ensaio 1-vA NT, considerada pelo laboratório como alta. Huber & Jones (2012), afirma que os agentes patogénicos causadores da murchidão de *Fusarium* tendem a ser menos graves quando existe disponibilidade de Mg sendo que este nutriente aumenta a resistência dos tecidos à degradação por enzimas pectolíticas de agentes patogénicos. Uma vez que o valor obtido em todos os ensaios foi elevado, este nutriente poderá não ter tido impacto sobre a percentagem de plantas perdidas.

A quantidade de Ca é mais elevada no Ensaio 1-vA NT, considerada pelo laboratório como adequada. O cálcio é um dos constituintes da parede e membrana celular contribuindo para a estrutura celular e mantendo as barreiras físicas contra agentes fitopatogénicos (White & Broadley, 2003). Plantas com baixo teor de Ca, como é o caso do ensaio 1-vA T, evidenciam um aumento da suscetibilidade da planta aos fungos que levam à murchidão da planta (Hirschi, 2004), o que pode estar relacionado com a percentagem de plantas perdidas, de 13,10 %, na segunda sementeira.

A quantidade de S é mais elevada no Ensaio 1-vA NT e no Ensaio 1-vA T, apresentando a mesma quantidade (%), no entanto, de acordo com o laboratório, esta é demasiado baixa, não tendo nenhum resultado qualitativo. O enxofre tem um papel fundamental na resistência da planta a doenças (Tripathi et al., 2022). Estudos demonstrados por Bloem et al., (2004), afirmam que o enxofre pode aumentar a resistência da planta a agentes fitopatogénicos, o que poderá estar relacionado com o facto de a percentagem de plantas perdidas no Ensaio 1-vA T ter sido menor comparativamente à que foi observada no Ensaio 2-vB T.

A quantidade de B é mais elevada no Ensaio 1-vA T e no Ensaio 2-vB T, tendo estes dois ensaios apresentado a mesma quantidade (%) de Boro considerada pelo laboratório como adequada. O Boro reduz a gravidade de muitas doenças devido à sua função na estrutura da parede celular, nas membranas das plantas e no seu metabolismo (Dordas, 2008) o que poderá estar relacionado com o facto de a percentagem de plantas perdidas no Ensaio 1-vA T ter sido menor, comparativamente à que foi observada no Ensaio 1-vA NT.

A quantidade de Cu é mais elevada no Ensaio 1-vA T, considerada pelo laboratório como adequada. Plantas com baixo teor de Cu como é o caso do ensaio 2-vB NT, evidenciam um aumento

de incidência de doenças (Marschner, 1955) o que pode estar relacionado com a percentagem de plantas perdidas, de 22,75 %, na segunda sementeira.

A quantidade de Fe é mais elevada no Ensaio 2-vB T, considerada pelo laboratório como alta. O Ferro ajuda no crescimento das plantas e na absorção de outros nutrientes que numa quantidade adequada induz uma melhoria destas funções (Şimşek & Çelik, 2021). Desta forma, a planta estará mais resistente a ataques por agentes fitopatogénicos. A sua presença poderá ter ajudado a aumentar a resistência da planta que, por sua vez, poderá estar relacionado com a menor percentagem de plantas perdidas, por exemplo, no Ensaio 1-vA T.

A quantidade de Mn é mais elevada no Ensaio 1-vA T, considerada pelo laboratório como adequada. O Manganês é um elemento essencial no metabolismo da planta, no entanto, em quantidades excessivas pode induzir a fitotoxicidade (Millaleo et al., 2010), diminuindo a produtividade da cultura. Por outro lado, não existem estudos sobre a relação entre o Manganês e a resistência ou suscetibilidade a agentes fitopatogénicos e, por isso, nada se pode concluir sobre esta relação.

A quantidade de Zn é mais elevada no Ensaio 1-vA NT, considerada pelo laboratório como alta. Plantas com baixo teor de Zn, são mais propensas ao ataque de agentes fitopatogénicos (Streeter et al., 2001). Uma vez que o valor obtido em todos os ensaios foi elevado, este nutriente poderá não ter tido impacto sobre a percentagem de perdas.

4.7. PRODUTIVIDADE NOS ENSAIOS

Após a colheita do espinafre, obtiveram-se parâmetros como a quantidade por kg, o número de caixas utilizadas (1 caixa = 5 kg) e a produtividade (kg/m²), para cada ensaio como se pode observar no Quadro 13. Na segunda colheita, não foi possível obter valores para cada modalidade isoladamente. No Quadro 13, o sinal “-” significa que não existem dados.

Quadro 13 - Produtividade nos ensaios de espinafre.

Produtividade dos ensaios de espinafre											
1ª Sementeira						2ª Sementeira					
Designação do ensaio	Sementeira	Quantidade		Metros de colheita	Produtividade (kg/m ²)	Designação do ensaio	Sementeira	Quantidade		Metros de colheita	Produtividade (kg/m ²)
		kg	Cx					kg	Cx		
Ensaio 1-vA NT	BV22EXP1BR1	1150	242	673	1,71	Ensaio 1-vA NT, Ensaio 1-vA T, Ensaio 2-vB NT, Ensaio 2-vB T	BV26EXPBR2	3437	440	1750	1,96
Ensaio 1-vA T	BV22EXP2BR1	621	140	446	1,39						
Ensaio 2-vB NT	BV22EXP3	1301	245	665	1,96						
Ensaio 2-vB T	BV22EXP4	-	-	-	-						
Total		3072	627	1784	1,72	Total		3437	440	1750	1,96

Os ensaios nos quais se utilizou semente não tratada, a produtividade foi maior. Uma boa homogeneidade em campo, implica uma boa produtividade, o que foi comprovado. Neste caso, a quantidade (kg) colhida não corresponde a uma maior produtividade (kg/m^2) devido às diferentes áreas de cada ensaio.

Relativamente à primeira sementeira, o Ensaio 1-vA NT e o Ensaio 2-vB NT apresentaram mais perdas de plantas (%) comparativamente ao Ensaio 1-vA T, no entanto, tiveram maior produtividade, $1,71 \text{ kg}/\text{m}^2$ e $1,96 \text{ kg}/\text{m}^2$, respetivamente. Comparando a produtividade dos ensaios das duas variedades não tratadas, 1-vA NT e 2-vB NT, verificou-se maior produtividade no Ensaio 2-vB NT. O ensaio 2-vB NT teve menos perdas de plantas (%) que o ensaio 1-vA NT, o que pode implicar uma maior produtividade, facto comprovado neste estudo. Não existe informação sobre a quantidade colhida no Ensaio 2-vB T e, por isso, não é possível obter a sua produtividade, de modo, a comparar com os restantes ensaios e modalidades. Estas produtividades eram expectáveis tendo em conta as que foram obtidas em anos anteriores, em épocas de temperaturas elevadas.

Também não existe informação detalhada quanto à produtividade de cada ensaio da segunda sementeira e, por isso, não é possível fazer comparações. No entanto, comparando a produtividade total obtida na primeira e na segunda colheita verificou-se maior produtividade na segunda colheita, de $1,96 \text{ kg}/\text{m}^2$ e, na generalidade da segunda sementeira, observou-se menos perdas de plantas (%) em campo.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este estudo serviu para avaliar a eficácia do tratamento da semente com a substância metalaxyl-M, e comprovou que o tratamento à semente é uma solução eficaz e viável. Comparando variedades, nas condições deste ensaio, em termos de performance agronómica e de plantas perdidas devido ao ataque de agentes fitopatogénicos, a melhor variedade foi a variedade A, contudo a produtividade da variedade B, apresenta valores mais elevados.

Nas condições nas quais decorreu este estudo, verificaram-se menos perdas de plantas quando a semente foi tratada com o fungicida, no entanto, o tratamento, em termos de performance agronómica do espinafre, parece funcionar de igual forma nas duas variedades. Verificaram-se menos perdas de plantas na variedade A tratada, registando-se uma média de 21,28 % na primeira sementeira e 13,10 % na segunda sementeira. Observou-se uma exceção na variedade B tratada em que se verificaram mais perdas de plantas, registando-se uma média de 75,00 % na primeira sementeira e 42,98 % na segunda sementeira, o que não se deveu ao elevado número de plantas perdidas, mas provavelmente à má germinação da variedade em campo. De uma forma geral é possível afirmar que o tratamento, apesar de não ter resolvido o *damping-off*, minimizou as perdas em campo.

Em termos de matéria seca (MS) obtida nas plantas recolhidas em campo, a variedade A apresenta valores de MS inferiores à variedade B. Ambas as variedades quando tratadas apresentam valores de MS superiores às modalidades não tratadas. Esta avaliação da matéria seca apresenta um interesse prático imediato, já que é um importante parâmetro morfológico para a avaliação do crescimento dos vegetais e da produtividade.

Relativamente à parte nutricional do espinafre, observou-se principalmente que nas modalidades tratadas, os valores de macro e micronutrientes foram mais elevados. Por um lado, a presença de azoto na folha, em elevadas concentrações, pode favorecer o crescimento de esporos patogénicos e a presença de fósforo na folha, também em elevadas concentrações, pode aumentar a suscetibilidade da planta ao agente fitopatogénico. Por outro lado, nutrientes como o Magnésio, Cálcio, Cobre e Zinco têm um impacto maior quando as concentrações são mais baixas.

Quanto à produtividade, observou-se que nos ensaios com semente não tratada, a produtividade foi maior, sendo os valores de produtividade no primeiro ensaio de 1,71 kg/m² para a variedade A e no segundo ensaio de 1,96 kg/m² para a B, o que corrobora os valores encontrados na MS. Não é possível comparar as variedades com tratamento, uma vez que por causas imponderáveis, não se obteve a produtividade da variedade B T.

Este estudo, para além de permitir concluir que de facto o tratamento da semente com metalaxyl-M é eficaz, também permitiu identificar, através de análises qPCR ao solo e da

observação de sintomas sugestivos de infecção nas plantas, diversas espécies de fungos de solo que podem ter infetado o espinafre, como o *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* e a *Rhizoctonia solani*, que causam sintomas como podridão da raiz e *damping-off*.

Estas conclusões foram baseadas na análise visual das plantas sintomáticas e, por isso, existe a necessidade de, em trabalhos futuros se realizarem análises de microrganismos às plantas.

Assim como trabalho futuro e, uma vez que, o uso desta substância tal como outras não voltará a ser permitido, terá de se investigar outras formas alternativas de controlar os fungos de solo. Para isso, seria de grande interesse a utilização de produtos “resíduo zero” como extratos de plantas ou de biopesticidas como *Trichoderma* spp. e *Pseudomonas* spp., entre outras, que se têm vindo a demonstrar eficazes no controlo destes microrganismos fitopatogénicos (Agrios, 2005; Antoszewski et al., 2022). Para além disso, a análise das plantas sintomáticas de espinafre torna-se uma forma de entender qual ou quais os fungos presentes no solo que efetivamente se encontram a causar sintomas nas plantas uma vez que o facto de estes fungos estarem presentes no solo não significa que também estejam na planta. Também o microbioma do solo tem vindo a ser cada vez mais estudado de forma a perceber que microrganismos existem no solo, se são benéficos ou patogénicos e qual a relação entre si.

Refira-se ainda o uso de práticas culturais adequadas que poderão contribuir para o controlo dos fungos, tais como: a imposição de rotações de culturas que permitam alternar culturas de modo a diminuir a incidência de fungos no solo, utilização de variedades resistentes, melhorar a distribuição de água nas regas evitando regas excessivas que permitam que a superfície foliar permaneça molhada durante um longo período de tempo o que proporciona um aumento da infecção por agentes fitopatogénicos e promover uma nutrição da planta equilibrada, com especial atenção ao azoto excessivo.

Este é ainda um longo caminho a percorrer, que visa minimizar as perdas de espinafre “baby leaf” em campo por efeito nefasto de fungos e aumentar a sua produtividade, procurando encontrar alternativas mais sustentáveis e eficazes, aos quais dever-se-ão associar práticas culturais apropriadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, Z. G., Burgess, T., Redford, A. J., Bienapfl, J. C., Mathew, R., Srivastava, S. K., & Jennings, K. C. (2022). What is Phytophthora? *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0448-FE>
- Abubaker, S., Abu-Zahra, T., Ammari, T. G., & Tahboub, A. B. (2010). Nitrate accumulation in spinach (*Spinacia oleracea* L.) tissues under different fertilization regimes. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 778–780. www.world-food.net
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier.
- Aires, A., Carvalho, R., Rosa, E. A. S., & Saavedra, M. J. (2013). Effects of agriculture production systems on nitrate and nitrite accumulation on baby-leaf salads. *Food Science & Nutrition*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1>
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/PPA.12733>
- Almeida, D. (2015). ESPINAFRE. In *Manual de Culturas Hortícolas* (3rd ed., Vol. 1, pp. 218–229). Editorial Presença. <https://www.wook.pt/livro/manual-de-culturas-hortícolas-vol-i-domingos-almeida/180184>
- Alves Barboza, E. (2014). *Ocorrência e diversidade de Pythium e Phytophthora em fontes de água utilizada para irrigação na região do distrito federal*. Universidade de Brasília.
- Amirkhani, M., Netravali, A. N., Huang, W., & Taylor, A. G. (2016). Investigation of Soy Protein–based Biostimulant Seed Coating for Broccoli Seedling and Plant Growth Enhancement. *HortScience*, 51(9), 1121–1126. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI10913-16>
- Amorim, L., Rezende, J. A. M., & Bergamin Filho, A. (2011). Manual de Fitopatologia. In *Manual de fitopatologia* (4th ed., Vol. 1). <https://livraria.funep.org.br/product/manual-de-fitopatologia-principios-e-conceitos-vol-1-4-edic-o/>
- Antoszewski, M., Mierek-Adamska, A., & Dąbrowska, G. B. (2022). The Importance of Microorganisms for Sustainable Agriculture—A Review. *Metabolites*, 12(11), 1100. <https://doi.org/10.3390/metabo12111100>
- Ashok Kumar C.K*, M. S. Divya Sree, A. Joshna, S. Mohana Lakshmi, & D. Satheesh Kumar. (2013). A review on South Indian edible leafy vegetables. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 1248–1256.
- Aslam, S., Aslam, H. M. U., Abbas, A., Ali, M. A., Alam, M. W., Amrao, L., & Gleason, M. L. (2019). First report of leaf spot of spinach caused by *Alternaria alternata* in Pakistan. *Plant Disease*, 103(6), 1430. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2211-PDN>

- Atallah, Z. K., Maruthachalam, K., Toit, L. du, Koike, S. T., Michael Davis, R., Klosterman, S. J., Hayes, R. J., & Subbarao, K. V. (2010). Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genetics and Biology*, 47(5), 416–422. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2010.02.003>
- Avsar, B. (2011). *Genetic Diversity of Turkish Spinach Cultivars (Spinacia oleracea L.)* [Graduate School of Engineering and Sciences of _zmir Institute of Technology]. https://www.researchgate.net/publication/308962293_Genetic_Diversity_of_Turkish_Spinach_CultivarsSpinacia_oleracea_L
- Ayesha, M. S., Suryanarayanan, T. S., Nataraja, K. N., Prasad, S. R., & Shaanker, R. U. (2021). Seed Treatment With Systemic Fungicides: Time for Review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.654512>
- Bahadur, A. (2021). Current Status of Fusarium and Their Management Strategies. In S. Mahyar Mirmajlessi (Ed.), *Fusarium - An Overview of the Genus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.100608>
- Barcelos, C., Machado, R. M. A., Alves-Pereira, I., Ferreira, R., & Bryla, D. R. (2016). Effects of substrate type on plant growth and nitrogen and nitrate concentration in spinach. *International Journal of Plant Biology*, 7(1), 44–47. <https://doi.org/10.4081/pb.2016.6325>
- BASSI, A., & MJ, G. (1978). *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* seedborne in spinach. *Plant Disease Reporter*, 62(3), 203–205.
- Beakes, G. W., Honda, D., & Thines, M. (2014). Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *Systematics and Evolution*, 39–97. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_3
- Bejo Portugal*. (2022). Bejo Portugal. <https://www.bejo.pt/magazine/bejo-apresenta-um-novo-revestimento>
- Bergquist, S. (2006). *Bioactive compounds in baby spinach (Spinacia oleracea L.): effects of pre- and postharvest factors*. Dept. of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Berlanger, I., & Powelson, M. L. (2000). *Verticillium wilt*. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0801-01>
- Bhat, R. G., & Subbarao, K. V. (1999). Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 89(12), 1218–1225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.12.1218>
- Breimer, T. (1982). Environmental factors and cultural measures affecting the nitrate content in spinach. *Fertilizer Research*, 3(3), 191–292. <https://doi.org/10.1007/BF01063766>
- Brian, D. C. (2016). *Management of Fusarium wilt in bunching spinach production in Ontario, Canada*. University of Guelph.
- Cantliffe, D. J. (1973). Nitrate Accumulation in Table Beets and Spinach as Affected by Nitrogen,

- Phosphorus, and Potassium Nutrition and Light Intensity. *Agronomy Journal*, 65(4), 563–565. <https://doi.org/10.2134/AGRONJ1973.00021962006500040012X>
- Cao, Z.-Q., Fan, T.-F., Bi, Y.-M., Tian, G.-L., & Zhang, L.-S. (2016). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science Potassium deficiency and root exudates reduce root growth and increase *Fusarium oxysporum* growth and disease incidence in continuously cultivated strawberry. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 58–68. <https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1146306>
- Castro, E., Mañas, M. P., & De Las Heras, J. (2009). Nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) after fertilization with sewage sludge and irrigation with treated wastewater. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(2), 172–179. <https://doi.org/10.1080/02652030802425334>
- Chakrapani, K., Sinha, B., Chanu, W. T., Chakma, T., Siram, T., & Author, C. (2020). Assessing in vitro antifungal activity of plant extracts against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 1497–1501. <https://www.phytojournal.com/archives/2020.v9.i1.10674/assessing-in-vitro-antifungal-activity-of-plant-extracts-against-rhizoctonia-solani-causing-sheath-blight-of-rice-oryza-sativa-l>
- Chun, Y. S., Kim, S. Y., Kim, M., Lim, J. Y., Shin, B. K., Kim, Y. S., Lee, D. Y., Seo, J. A., & Choi, H. K. (2021). Mycobiome analysis for distinguishing the geographical origins of sesame seeds. *Food Research International*, 143, 110271. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110271>
- Clima, condições meteorológicas e temperatura média por mês de Odemira (Portugal). (2022). Weather Spark. <https://pt.weatherspark.com/y/32172/Clima-característico-em-Odemira-Portugal-durante-o-ano#Sections-BestTime>
- Cohen, Y. (1979). The Systemic Antifungal Activity of Ridomil against *Phytophthora infestans* on Tomato Plants. *Phytopathology*, 69(6), 645. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-69-645>
- Conte, A., Conversa, G., Scrocco, C., Brescia, I., Laverse, J., Elia, A., & Del Nobile, M. A. (2008). Influence of growing periods on the quality of baby spinach leaves at harvest and during storage as minimally processed produce. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2–3), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.04.003>
- Correia, M. (2009). Avaliação de Nitratos e nitritos em vegetais. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 7, 14–16. <https://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-Sequali-07/Page 14-16.pdf>
- Correia, M., Barroso, Â., Barroso, M. F., Soares, D., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C. (2010). Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry*, 120(4), 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.030>
- Correll, J. C., Morelock, T. E., Black, M. C., Koike, S. T., Brandenberger, L. P., & Dainello, F. J. (1994). Economically Important Diseases of Spinach. *Plant Disease*, 78(7), 653–660.

- https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n07_653.pdf
- Cummings, J. A., Miles, C. A., & Du Toit, L. J. D. (2009). Greenhouse evaluation of seed and drench treatments for organic management of soilborne pathogens of spinach. *Plant Disease*, *93*(12), 1281–1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1281>
- Cunningham, E. (2013). Dietary Nitrates and Nitrites—Harmful? Helpful? Or Paradox? *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *113*(9), 1268. <https://doi.org/10.1016/J.JAND.2013.07.014>
- Czajka, A., Czubatka, A., Sobolewski, J., & Robak, J. (2015). First report of alternaria leaf spot caused by *Alternaria alternata* on spinach in Poland. *Plant Disease*, *99*(5), 729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1090-PDN>
- DGADR-Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento rural. (2008). *Circular-DSPFSV-2-2008*.
- DGADR-Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento rural. (2018, January 31). *Ofício Circular n.o 2/2018 Assunto: Produtos fitofarmacêuticos autorizados para alface e alface baby leaf*. https://www.drapc.gov.pt/servicos/fitossanidade/files/oficio_circular_02_2018_dgav.pdf
- Dias, J. S. (2019). Nutritional Quality and Effect on Disease Prevention of Vegetables. *Food and Nutrition Sciences*, *10*(4), 369–402. <https://doi.org/10.4236/FNS.2019.104029>
- Dictionary of the Fungi*. (2022). <http://www.speciesfungorum.org/Names/Fundic.asp>
- Dordas, C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *28*(1), 33–46. <https://doi.org/10.1051/AGRO:2007051/METRICS>
- Du Toit, L. J., Derie, M. L., & Hernandez-Perez, P. (2005). Verticillium wilt in spinach seed production. *Plant Disease*, *89*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0004>
- Farih, A. (1981). In Vitro Effects of Metalaxyl on Growth, Sporulation, and Germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. *Plant Disease*, *65*(8), 651. <https://doi.org/10.1094/PD-65-651>
- Feng, C., Mansouri, S., Bluhm, B. H., du Toit, L. J., & Correll, J. C. (2014). Multiplex real-time PCR assays for detection of four seedborne spinach pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(2), 472–484. <https://doi.org/10.1111/JAM.12541>
- Foss, C. R., & Jones, L. J. (2005). *Crop Profile for Spinach Seed in Washington*.
- Gabor, B., Kao, J., & Krause, D. (2013). *Crucifer Disease Guide*.
- Ganesha Naik, R., Jayalakshmi, K., & Naik, T. B. (2017). Efficacy of Fungicides on the Management of Sheath Blight of Rice. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, *6*(9), 611–614. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.075>
- Garcia, P. T. (2022). Composición y aporte de sustancias bioactivas de subproductos hortícolas. *Foro*

- de *La Alimentación, La Nutricion y La Salud (FANUS)*, 1–21.
- Garnier, E., Shipley, B., Roumet, C., & Laurent, G. (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology*, *15*(5), 688–695. <https://doi.org/10.1046/J.0269-8463.2001.00563.X>
- Gatch, E. (2013). *Management of Fusarium wilt in spinach seed crops in the maritime Pacific Northwest USA* [WASHINGTON STATE UNIVERSITY]. <https://www.mtvernon.wsu.edu/VSP/Gatch-dissertation-8-2013.pdf>
- Gatch, E. W., & du Toit, L. J. (2017). Limestone-mediated suppression of Fusarium wilt in spinach seed crops. *Plant Disease*, *101*(1), 81–94. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0423-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-04-16-0423-RE_F7.JPEG
- González García, V., Portal Onco, M. A., & Rubio Susan, V. (2006). Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *4*(1), 55–79.
- Gordon, T. R., & Okamoto, D. (1990). Colonization of Crop Residue by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and Other Species of *Fusarium*. *Phytopathology*, *80*(4), 381–386. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1990Articles/Phyto80n04_381.PDF
- Gordon, T. R., Okamoto, D., & Jacobson, D. J. (1989). Colonization of Muskmelon and Nonsusceptible Crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and Other Species of *Fusarium*. *Phytopathology*, *79*(10), 1095–1100.
- Habermeyer, M., Roth, A., Guth, S., Diel, P., Engel, K. H., Epe, B., Fürst, P., Heinz, V., Humpf, H. U., Joost, H. G., Knorr, D., de Kok, T., Kulling, S., Lampen, A., Marko, D., Rechkemmer, G., Rietjens, I., Stadler, R. H., Vieths, S., ... Eisenbrand, G. (2015). Nitrate and nitrite in the diet: How to assess their benefit and risk for human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(1), 106–128. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201400286>
- Hallavant, C., & Ruas, M. P. (2014). The first archaeobotanical evidence of *Spinacia oleracea* L. (spinach) in late 12th-mid 13th century a.d. France. *Vegetation History and Archaeobotany*, *23*(2), 153–165. <https://doi.org/10.1007/S00334-013-0400-8/METRICS>
- Hassan, M. A., Chindo, P. S., Marley, P. S., & Alegbejo, M. D. (2010). Management of Root Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) on Tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) Using Organic Wastes in Zaria, Nigeria. *Plant Protection Science*, *46*(1), 34–38.
- Hirayamai, Y., & Tojo, M. (1999). Threshold level of oospore density of *Pythium aphanidermatum* and *P. spinosum* causing damping-off in spinach seedlings. *Soil Microorganisms*, *53*(1), 53–56. https://doi.org/10.18946/JSSM.53.1_53
- Hirschi, K. D. (2004). The Calcium Conundrum. Both Versatile Nutrient and Specific Signal. *Plant Physiology*, *136*(1), 2438–2442. <https://doi.org/10.1104/PP.104.046490>

- Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(1), 1–10. <https://doi.org/10.3945/AJCN.2008.27131>
- Huzar-Novakowiski, J., & Dorrance, A. E. (2018). Genetic Diversity and Population Structure of *Pythium irregulare* from Soybean and Corn Production Fields in Ohio. *Plant Disease*, *102*(10), 1989–2000. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1725-RE>
- Hwang, S. F., Gossen, B. D., Chang, K. F., Turnbull, G. D., & Howard, R. J. (2001). *Effect of seed damage and metalaxyl seed treatment on pythium seedling blight and seed yield of field pea*. 509–517.
- Incotec. (2022). *Peletização de semente | eficiência no processo de semeadura | Incotec*. <https://www.incotec.com/pt-br/seed-technologies/seed-pelleting>
- IndexBox. (2021). The Global Spinach Market Hit a Record \$39.6B and Continues Up. *World - Spinach - Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights*. <https://www.indexbox.io/blog/global-spinach-market-2021-key-insights/>
- InfoAgro. (2022). *Agricultura. El cultivo de la espinaca*. <https://www.infoagro.com/hortalizas/espinaca.htm>
- Instituto Nacional de Estatística, I. P. (2021). *Balança Alimentar Portuguesa 2016-2020*.
- International Seed Testing Association. (2010). *Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2011 Edition*.
- Isemann, E., Ambrosio, G., Joseph, J. F., Mazzarino, M., de la Torre, X., Zimmer, P., Kazlauskas, R., Goebel, C., Botrè, F., Diel, P., & Parr, M. K. (2019). Ecdysteroids as non-conventional anabolic agent: performance enhancement by ecdysterone supplementation in humans. *Archives of Toxicology*, *93*(7), 1807–1816. <https://doi.org/10.1007/S00204-019-02490-X>
- Joshi, V., Joshi, M., & Penalosa, A. (2020). Comparative analysis of tissue-specific transcriptomic responses to nitrogen stress in spinach (*Spinacia oleracea*). *PLOS ONE*, *15*(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0232011>
- Jyoti, B., & Bhandari, S. (2016). *Seed pelleting-A key for enhancing the seed quality Seed pelleting*. *11*(11), 76–77. www.researchjournal.co.in
- Kangsopa, J., Hynes, R. K., & Siri, B. (2018). Lettuce seeds pelleting: A new bilayer matrix for lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Seed Science and Technology*, *46*(3), 521–531. <https://doi.org/10.15258/SST.2018.46.3.09>
- Karwowska, M., & Kononiuk, A. (2020). Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants*, *9*(3), 241. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030241>
- Katzman, L. S., Taylor, A. G., & Langhans, R. W. (2001). Seed Enhancements to Improve Spinach Germination. *HortScience*, *36*(5), 979–981.

- Kmecl, V., Žnidarčič, D., Franić, M., & Ban, S. G. (2019). Nitrate and nitrite contamination of vegetables in the Slovenian market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12(3), 216–223. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1600589>
- Kobayashi, J., Ohtake, K., & Uchida, H. (2015). NO-Rich Diet for Lifestyle-Related Diseases. *Nutrients* 2015, Vol. 7, Pages 4911-4937, 7(6), 4911–4937. <https://doi.org/10.3390/NU7064911>
- Koike, S. T., Cahn, M., Cantwell, M., Fennimore, S., Lestrage, M., Natwick, E., Smith, R. F., & Takele, E. (2011). Spinach Production in California. *Spinach Production in California*, 1–6. <https://doi.org/10.3733/UCANR.7212>
- Koike, S. T., Subbarao, K. V, Davis, R. M., & Turini, T. A. (2003). Vegetable Diseases Caused by Soilborne Pathogens. *Vegetable Diseases Caused by Soilborne Pathogens*, 1–13. <https://doi.org/10.3733/UCANR.8099>
- L'Hirondel, J., & L'Hirondel, J.-L. (2002). *Nitrate and Man Toxic, Harmless or Beneficial?* CABI Publishing.
- Laboratório Nutrição e Metabolismo Animal. (2022). *Determinação da matéria seca residual-MS*.
- Laemmlen, F. (2002). Sclerotinia Diseases. *Sclerotinia Diseases*, 1–5. <https://doi.org/10.3733/UCANR.8042>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms* 2022, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10030596>
- Lamichhane, J. R., Debaeke, P., Steinberg, C., You, M. P., Barbetti, M. J., & Aubertot, J. N. (2018). Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. *Plant and Soil*, 432(1–2). <https://doi.org/10.1007/S11104-018-3780-9>
- Lamichhane, J. R., You, M. P., Laudinot, V., Barbetti, M. J., & Aubertot, J. N. (2020). Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. *Plant Disease*, 104(3), 610–623. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1157-FE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-06-19-1157-FE_BIO4.JPEG
- Larsson, M. (1994). Prevalence and pathogenicity of spinach root pathogens of the genus *Pythium* in Sweden. *Plant Pathology*, 43(2), 261–268. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.1994.TB02684.X>
- Larsson, M., & Gerhardson, B. (1992). Disease progression and yield losses from root diseases caused by soilborne pathogens of spinach. *Phytopathology*, 82(4), 403–406. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n04_403.PDF
- LeBlanc, N., Essarioui, A., Kinkel, L., & Kistler, H. C. (2017). Phylogeny, plant species, and plant diversity influence carbon use phenotypes among *Fusarium* populations in the rhizosphere

- microbiome. *Phytobiomes Journal*, 1(3), 150–157. https://doi.org/10.1094/PBIOMES-06-17-0028-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PBIOMES-06-17-0028-R_T2.JPEG
- Lucier, G., Allshouse, J. E., & Lin, B.-H. (2004). *Factors Affecting Spinach Consumption in the United States*. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=39496>
- Ma, X., Yu, L., Fatima, M., Wadlington, W. H., Hulse-Kemp, A. M., Zhang, X., Zhang, S., Xu, X., Wang, J., Huang, H., Lin, J., Deng, B., Liao, Z., Yang, Z., Ma, Y., Tang, H., Van Deynze, A., & Ming, R. (2022). The spinach YY genome reveals sex chromosome evolution, domestication, and introgression history of the species. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-022-02633-X>
- Mace, M. E., Bell, A. A., & Beckman, C. H. (1981). *Fungal Wilt Diseases of Plants*. https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=S0Djy-X2GTcC&oi=fnd&pg=PP1&ots=LP3O-zBo6i&sig=pHJ7mmCznGG0OtnksdmEi3qyu-8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Machado, R. M. A., Alves-Pereira, I., & Ferreira, R. M. A. (2018). Plant growth, phytochemical accumulation and antioxidant activity of substrate-grown spinach. *Heliyon*, 4, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- Maeda, N., Yoshida, H., & Mizushima, Y. (2010). Spinach and Health: Anticancer Effect. In *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 393–405). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00026-8>
- Magnée, K. J. H. (2022). *From seed to seedling-damping-off tolerance in Spinacia oleracea L.* [Wageningen University & Research]. <https://edepot.wur.nl/563317>
- Mahr, S. (2022). *Spinach, Spinacia oleracea*. Wisconsin Horticulture. <https://hort.extension.wisc.edu/articles/spinach-spinacia-oleracea/>
- Marques, M. A. M. (2012). *A Influência das práticas culturais nos níveis de nitratos em vegetais*. Universidade Técnica de Lisboa-Faculdade de Medicina Veterinária .
- Marraiki, N., Siddiqui, I., Rizwana, H., & Javaid, A. (2012). First report of *Alternaria alternata* leaf spots on spinach in Saudi Arabia. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(1), 247–248.
- Marschner, H. (1955). *Mineral Nutrition of Higher Plants* (2nd ed.). Academic Press.
- Martín León, V., & Luzardo, O. P. (2020). Evaluation of nitrate contents in regulated and non-regulated leafy vegetables of high consumption in the Canary Islands, Spain: Risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111812>
- Maruthachalam, K., Klosterman, S. J., Anchieta, A., Mou, B., & Subbarao, K. V. (2013). Colonization of spinach by *Verticillium dahliae* and effects of pathogen localization on the efficacy of seed treatments. *Phytopathology*, 103(3), 268–280. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0104-R>
- Matheron, M. E., & Porchas, M. (2000). Impact of Azoxystrobin, Dimethomorph, Fluazinam, Fosetyl-

- Al, and Metalaxyl on Growth, Sporulation, and Zoospore Cyst Germination of Three Phytophthora spp. *Plant Disease*, 84(4), 454–458. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.454>
- Maynard, D. N., Barker, A. V., Minotti, P. L., & Peck, N. H. (1976). Nitrate Accumulation in Vegetables. *Advances in Agronomy*, 28(C), 71–118. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60553-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60553-2)
- Milivojević, M., Ripka, Z., & Petrović, T. (2018). ISTA rules changes in seed germination testing at the beginning of the 21st century. In *40 Journal on Processing and Energy in Agriculture* (Vol. 22). www.seedtest.org
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., & Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance and mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 470–481. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
- Ministério da Agricultura, P. e A. (2009). *Regras para análise de sementes* (P. e A. Ministério da Agricultura (Ed.); 1st ed.). Brasília.
- Morelock, T. E., & Correll, J. C. (2008). Spinach. In *Vegetables I* (pp. 189–218). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_6
- Murcia, M. A., Jiménez-Monreal, A. M., Gonzalez, J., & Martínez-Tomé, M. (2020). Spinach. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, 181–195. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00011-8>
- Naik, P. (2022). Edible vaccines: Current scenario and future prospects. In *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges* (pp. 305–313). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00034-7>
- Naiki, T., Gonda, Y., & Kageyama, K. (1986). Pythium Species Causing Damping-Off of Spinach Seedlings under Plastic-House Cropping. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52(5), 772–778. <https://doi.org/10.3186/JPHYTOPATH.52.772>
- Naito, S. (1996). Basidiospore Dispersal and Survival. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, 197–205. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2901-7_17
- Naito, S. (2006). Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in Rhizoctonia fungi. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6), 400–403. <https://doi.org/10.1007/S10327-006-0295-7/METRICS>
- Nalin, G. (2010). *IL SEME, LA GERMINAZIONE E LA SEMINA*.
- Navarrete, A. J. V. (2006). *Evaluación agronómica de once cultivares de Spinacia oleracea L. para cultivo industrial en la zona de Valdivia*. UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD DE

CIENCIAS AGRARIAS ESCUELA DE AGRONOMIA.

- Nešković, M., & Čulafić, L. (1988). Spinach (*Spinacia oleracea* L.). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol. 6, pp. 370–385). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73520-2_18
- Neumann, S., Paveley, N. D., Beed, F. D., & Sylvester-Bradley, R. (2004). Nitrogen per unit leaf area affects the upper asymptote of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* epidemics in winter wheat. *Plant Pathology*, 53(6), 725–732. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2004.01107.X>
- Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M., & Takebe, M. (2008). Differences in the Metabolite Profiles of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaf in Different Concentrations of Nitrate in the Culture Solution. *Plant and Cell Physiology*, 49(2), 170–177. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCM173>
- Ott, K., Koenig, R., & Miles, C. (2008). Influence of Plant Part on Nitrate Concentration in Lettuce and Spinach. *International Journal of Vegetable Science*, 14(4), 351–361. <https://doi.org/10.1080/19315260802271304>
- Pánek, M., Ali, A., & Helmer, Š. (2022). Use of metalaxyl against some soil plant pathogens of the class Peronosporomycetes – A review and two. *Plant Protection Science*, 58(2), 92–109. <https://doi.org/10.17221/42/2021-PPS>
- Panth, M., Hassler, S. C., & Baysal-Gurel, F. (2020). Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production. *Agriculture* 2020, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10010016>
- Paulitz, T. C., & Baker, R. (1987). Biological Control of Pythium Damping-Off of Cucumbers with *Pythium nunn*: Population Dynamics and Disease Suppression. *Ecology and Epidemiology*.
- Pedrini, S., Merritt, D. J., Stevens, J., & Dixon, K. (2017). Seed Coating: Science or Marketing Spin? *Trends in Plant Science*, 22(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002>
- Pegg, K., & Manners, A. (2014a). *Pythium species A constant threat to nursery production*.
- Pegg, K., & Manners, A. (2014b). *Rhizoctonia A variable and versatile nursery pathogen*. <https://www.horticulture.com.au/globalassets/hort-innovation/resource-assets/ny11001-rhizoctonia.pdf>
- Pereira Peixoto, C., Trindade Almeida, A., Maria da Silva dos Santos, J., Guzzo de Carli Poelking, V., & Rayssa Oliveira, E. (2020). *Curso de Fisiologia Vegetal*.
- Purquerio, L. F. V., Calori, A. H., & S. de Moraes, L. A. (2013). Pequenas e Promissoras. *Cultivar - Hortaliças e Frutas*, 16–18. https://issuu.com/grupocultivar/docs/hf_80
- Quijano, L., Yusà, V., Font, G., McAllister, C., Torres, C., & Pardo, O. (2017). Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 100, 42–49. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.12.010>

- Rai Mahendra, Abd-Elsalam Kamel Ahmed, & Ingle, A. P. (2020). Host plants and specificity of the genus *Pythium*. In *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management* (pp. 162–175). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429296406/PYTHIUM-MAHENDRA-RAI-KAMEL-AHMED-ABD-ELSALAM-AVINASH-INGLE>
- Rajeswari, E., Padmodaya, B., Viswanath, K., & Sumathi, P. (2020). Evaluation of plant extracts on mycelial growth and viability of the sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kuhn In vitro and in soil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 255–259. <https://www.phytojournal.com/archives/2020.v9.i1.10432/evaluation-of-plant-extracts-on-mycelial-growth-and-viability-of-the-sclerotia-of-Itemgtrhizoctonia-solanitemgt-kuhn-Itemgtin-vitroltemgt-and-in-soil>
- Rifna, E. J., Ratish Ramanan, K., & Mahendran, R. (2019). Emerging technology applications for improving seed germination. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.029>
- Robalo, M. T. B. (2021). *Influência da aplicação de composto orgânico municipal nas características do solo, na produção e na qualidade do espinafre* [Universidade de Évora]. https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/29294/1/Mestrado-Engenharia_Agronomica-Miguel_Taborda_Bras_Robalo.pdf
- Romero, F., Cazzato, S., Walder, F., Vogelgsang, S., Bender, S. F., & van der Heijden, M. G. A. (2022). Humidity and high temperature are important for predicting fungal disease outbreaks worldwide. *New Phytologist*, 234(5), 1553–1556. <https://doi.org/10.1111/NPH.17340>
- Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS Press, American Phytopathological Society.
- Rudolph, R., Leonberger, K., Gauthier, N., & Pandey, S. (2022). Sclerotinia Diseases of Vegetable Crops. In *Plant pathology* (p. 5). University of Kentucky-College of Agriculture, Food and Environment. <https://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-gen-17>.
- Salehzadeh, H., Maleki, A., Rezaee, R., Shahmoradi, B., & Ponnet, K. (2020). The nitrate content of fresh and cooked vegetables and their health-related risks. *Food and Chemical Toxicology*, 15(1), e0227551. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227551>
- Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 10–17. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2351>
- Schmitthenner, A. F. (1970). Significance of Populations of *Pythium* and *Phytophthora* in Soil. In *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens* (pp. 25–27). University of California Press. <https://doi.org/10.1525/9780520339941-008/HTML>
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., de Cock, A. W. A. M., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A., & Paulitz, T. C. (2013). Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving

- Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease*, 97(1), 4–20.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0243-FE>
- Senapati, M., Tiwari, A., Sharma, N., Chandra, P., Bashyal, B. M., Ellur, R. K., Bhowmick, P. K., Bollinedi, H., Vinod, K. K., Singh, A. K., & Krishnan, S. G. (2022). Rhizoctonia solani Kühn Pathophysiology: Status and Prospects of Sheath Blight Disease Management in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.881116>
- Sharififar, A., Nazari, M., & Asghari, H. R. (2015). Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Atriplex lentiformis*, *Cuminum cyminum*, and *Zygophyllum eurypterum*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(3), 102–104.
<https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2015.05.003>
- Simko, I., Hayes, R. J., Mou, B., & McCreight, J. D. (2014). Lettuce and Spinach. *Yield Gains in Major U.S. Field Crops*, 53–85. <https://doi.org/10.2135/CSSASPECPUB33.C4>
- Şimşek, O., & Çelik, H. (2021). Effects of iron fortification on growth and nutrient amounts of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 44(18), 2770–2782.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1927083>
- Singh V, Shrivastava A, Jadon S, Wahi N, Singh A, & Sharma N. (2015). Alternaria Diseases of Vegetable Crops and its Management Control to Reduce the Low Production. *International Journal of Agriculture Sciences*, 7(13), 834–840.
- Skwarek, M., Wala, M., Kołodziejek, J., Sieczyńska, K., Lasoń-Rydel, M., Ławińska, K., & Obraniak, A. (2021). Seed coating with biowaste materials and biocides— environment-friendly biostimulation or threat? *Agronomy*, 11(6), 1034.
<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11061034/S1>
- Slavov, S., Mayama, S., & Atanassov, A. (2014). Some Aspects of Epidemiology of Alternaria Alternata Tobacco Pathotype. <http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq>, 18(2), 28–33.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2004.10817083>
- Steinberg, G., & Gurr, S. J. (2020). Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 103476. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2020.103476>
- Streeter, T. C., Rengel, Z., Neate, S. M., & Graham, R. D. (2001). Zinc fertilisation increases tolerance to Rhizoctonia solani (AG 8) in *Medicago truncatula*. *Plant and Soil*, 228(2), 233–242.
<https://doi.org/10.1023/A:1004874027331/METRICS>
- Sukul, P., & Spiteller, M. (2000). *Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods* - PubMed. Rev Environ Contam Toxicol.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12587832/>
- Sumner, Kays, S., & Johnson, A. W. (1976). Etiology and control of root diseases of spinach. *Phytopathology*, 66, 1267–1273.

- https://www.researchgate.net/publication/303484579_Etiology_and_control_of_root_diseases_of_spinach
- Syngenta. (2019). *Metalaxyl-M & Resistance Possible effects on intensively grown vegetable crops (leafy)*.
- Syngenta. (2023). *Fusarium spp.* | Syngenta Seedcare. Syngenta. <https://www.syngentaseedcare.com/fusarium-spp>
- Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., & Kiis, A. (2006). Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Additives and Contaminants*, 23(4), 355–361. <https://doi.org/10.1080/02652030500482363>
- Titone M Mocioni, P., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2009). Fungicide failure to control Pythium blight on turf grass in Italy. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(2), 55–59. <https://doi.org/10.1007/BF03356286/METRICS>
- Töfoli, J. G., Domingues, R. J., & Ferrari, J. T. (2015). *Alternaria spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas*. 77, 21–34. https://www.researchgate.net/publication/281294712_ALTERNARIA_SPP_EM_OLERACEAS_SINTOMAS_ETIOLOGIA_MANEJO_E_FUNGICIDAS
- Tr, K., Ed, C., Valverde A, Nyaga M, & Gryzenhout M. (2019). *Endophytic seed mycobiome of six sorghum (Sorghum bicolor) cultivars from commercial seedlots using an Illumina sequencing approach*. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/16>
- Tripathi, R., Tewari, R., Singh, K. P., Keswani, C., Minkina, T., Srivastava, A. K., De Corato, U., & Sansinenea, E. (2022). Plant mineral nutrition and disease resistance: A significant linkage for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 13, 3116. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.883970/BIBTEX>
- União Europeia. (2011). Regulamento (UE) N.º 1258/2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 8(12), 1–3. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>
- Valero, P. D. C. (2020). *Efecto de dos abonos foliares orgánicos en la caracterización agronómica del cultivo de espinaca (Spinacea oleracea L.) en el centro experimental de cota cota*. Universidad Mayor de San Andrés Facultad de Agronomía.
- van der Plaats-Niterink, J. (1981). Monograph of the genus Pythium. *Studies in Mycology*, 21, 244. <https://www.studiesinmycology.org/index.php/issue/23-studies-in-mycology-no-21>
- Vieira, I. S., Vasconcelos, E. P., & Monteiro, A. A. (1998). Nitrate accumulation, yield and leaf quality of turnip greens in response to nitrogen fertilisation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51(3), 249–258. <https://doi.org/10.1023/A:1009797527061>
- Vitacress. (2019). *Política Ambiental*. <https://www.vitacress.pt/content-files/uploads/2019/08/Política-Ambiental-2019-PT.pdf>

- Vitacress – *Naturalmente*. (2023). Vitacress. <https://www.vitacress.pt/>
- Volesky, N., Murray, M., & Nischwitz, C. (2022). Fusarium and Verticillium Wilts of Vegetables. In *Utah Pests Extension* (pp. 1–5). Utah State University-Utah Pests Extension. <https://extension.usu.edu/pests/research/fusarium-verticillium-wilts>
- Wadlington, W. H., & Ming, R. (2018). Development of an X-specific marker and identification of YY individuals in spinach. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9), 1987–1994. <https://doi.org/10.1007/S00122-018-3127-1/METRICS>
- Waheed, A., Ali, S., Kaleem, M., Malik Sanaullah, M., Faisal, Ijaz, A., Mehvish, & Hameed, H. (2021). Detection of Fungi from Seed and Seedlings Associated with Wilt Problems in Spinach and its Management. *Journal of Phytobiology*, 2(1), 1–10. <http://www.jpbbio.com>
- Welbaum, G. E. (2015). Vegetable History, Nomenclature, and Classification. In *Vegetable Production and Practices*. CABI.
- White, K. E., & Hoppin, J. A. (2004). Seed treatment and its implication for fungicide exposure assessment. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 2004 14:3, 14(3), 195–203. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500312>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCG164>
- Wills, R. H. H., Lee, T. H., Graham, D., McGlasson, W. B., & Hall, E. G. (1998). *Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables*. Granada. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19820304400?freeview=true>
- Xiong, W., & Zhan, A. (2018). Testing clustering strategies for metabarcoding-based investigation of community–environment interactions. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1326–1338. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12922>
- Xu, J., Zhang, N., Wang, K., Xian, Q., Dong, J., & Chen, X. (2022). Exploring new strategies in diseases resistance of horticultural crops. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 520. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.1021350/BIBTEX>
- You, M. P., Lamichhane, J. R., Aubertot, J. N., & Barbetti, M. J. (2020). Understanding why effective fungicides against individual soilborne pathogens are ineffective with soilborne pathogen complexes. *Plant Disease*, 104(3), 904–920. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1252-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-06-19-1252-RE_F6.JPEG
- Zagade, S. N., Deshpande, G. D., Gawade, D. B., Atnoorkar, A. A., & Pawar, S. V. (2012). Biocontrol Agents and Fungicides for Management of Damping off in Chilli. *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(6), 590–597. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2012.8.6.1689>
- Zarrinkamar, J. P., Asri, F., Band, Y., Basconcelo, S. R., Castro-Diez, S., Funes, P., Hamzehee, G., Khoshnevi, B., Perez-Harguindeguy, M., Perez-Rontome, N., Shirvany, M. C., Zak, . . , & Zuloaga,

- M. R. (2004). The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science*, 15(3), 295–304. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x>
- Zeun, R., Scalliet, G., & Oostendorp, M. (2013). Biological activity of sedaxane – a novel broad-spectrum fungicide for seed treatment. *Pest Management Science*, 69(4), 527–534. <https://doi.org/10.1002/PS.3405>

Apêndices

7. APÊNDICES

Apêndice A: Protocolo laboratorial PL9-MS definido pelo Laboratório de Nutrição e Metabolismo Animal da Universidade de Évora.

Para determinar a matéria fresca e a matéria seca de uma amostra existem vários procedimentos a ter em consideração.

Um dos procedimentos é a pré-secagem⁹ que é realizada a baixas temperaturas, por volta dos 50 a 70 °C, de modo a evitar a perda de nutrientes, em estufa ventilada em média durante 24 a 48 horas, tempo suficiente para que o material apresente uma consistência quebradiça, permitindo uma moagem perfeita. O produto deve ser colocado em tabuleiros, que são previamente tarados e pesados. Após o período de pré-secagem, retira-se o material da estufa, deixa-se equilibrar com a temperatura ambiente durante cerca de uma hora e, posteriormente, pesa-se. De seguida, procede-se à moagem da amostra.

Outro procedimento é a secagem definitiva que é realizada através de uma pesagem precisa de 3 g de amostra moída em cada cadinho que é colocada, posteriormente, numa estufa a 105 °C durante 24 horas. Este procedimento é feito com o recurso a cadinhos que são previamente pesados e secos numa estufa a 105 °C, durante pelo menos 4 horas antes de se colocar o produto moído. Após este tempo retira-se a amostra moída da estufa e coloca-se num exsiccador até a temperatura da amostra se equilibrar com a temperatura ambiente. Por último, pesam-se as amostras e repete-se o procedimento, ou seja, coloca-se novamente na estufa durante uma hora e, posteriormente, pesa-se de modo a se obter o peso de matéria seca residual. Este último passo não foi realizado uma vez que não foi necessário obter a matéria seca residual.

Para proceder à secagem definitiva, a amostra deve estar finamente moída, de forma a passar por um crivo com malha de 1 mm, e bem homogeneizada.

Os materiais e equipamentos necessários foram os seguintes:

- Tabuleiro;
- Balança analítica;
- Estufa de secagem a 105°C;
- Cadinhos de alumínio;
- Exsiccador.

⁹ A perda de água durante a pré-secagem tem que ser anexa ao cálculo da matéria seca total.

Apêndice B: Dados fornecidos pela Estação Meteorológica da Boavista dos Pinheiros (Temperatura do ar (°C) e Humidade relativa do ar (%) ao longo do tempo (1ª Sementeira).

Data	Temperatura do ar (°C)			Humidade relativa do ar (%)
	T. média	T. mínima	T. máxima	
01/06/2021	16,78	12,07	20,14	83,21
02/06/2021	15,86	9,59	21,19	84,88
03/06/2021	15,81	12,06	20,35	71,52
04/06/2021	15,75	9,1	21,36	74,41
05/06/2021	16,64	9,81	23	77,46
06/06/2021	17,38	10,15	24,06	78,11
07/06/2021	17,9	10,81	24,56	77,89
08/06/2021	18,25	11,54	24,87	73,89
09/06/2021	19,58	12,8	27,61	69,45
10/06/2021	18,23	12,59	25,31	83,03
11/06/2021	16,66	14,89	20,22	93,4
12/06/2021	18,82	14,76	27	86,04
13/06/2021	18,51	13,71	23,32	84,16
14/06/2021	17,67	13,07	22,74	90,72
15/06/2021	15,63	14,94	16,29	99,98
16/06/2021	19,4	17,22	21,84	82,88
17/06/2021	17,4	16,77	18,58	98,16
18/06/2021	16,16	14,75	19,22	89,66
19/06/2021	15,99	13,48	18,82	87,72
20/06/2021	16,55	13,42	20,06	92,15
21/06/2021	16,87	13,11	19,87	88,09
22/06/2021	17,08	13,12	21,15	86,11

Apêndice C: Dados fornecidos pela Estação Meteorológica da Boavista dos Pinheiros (Temperatura do ar (°C) e Humidade relativa do ar (%) ao longo do tempo (2ª Sementeira).

Data	Temperatura do ar (°C)			Humidade relativa do ar (%)
	T. média	T. mínima	T. máxima	
29/06/2021	16,9	11,5	22,3	-
30/06/2021	17	11,5	23	-
01/07/2021	17,1	9,8	25,1	-
02/07/2021	18,9	9,7	27,1	-
03/07/2021	25	16,1	26,8	-
04/07/2021	19,4	13,5	25,5	-
05/07/2021	20	16	25	-
06/07/2021	20,1	15,9	24,8	-
07/07/2021	17,6	12,8	23,5	-
08/07/2021	19,2	13,5	25,2	-
09/07/2021	18,9	10,1	27,8	-
10/07/2021	23,4	13,5	35,9	-
11/07/2021	21,1	16,4	30,6	-
12/07/2021	18	13	23	-
13/07/2021	18	13,7	24	-
14/07/2021	19,8	11,1	28,4	-
15/07/2021	21,4	12,5	29	-
16/07/2021	21,6	13,5	29,3	-
17/07/2021	20	17	25,5	-
18/07/2021	19	16	24,5	-
19/07/2021	18,2	13,1	23,2	-
20/07/2021	19	14	24	-
21/07/2021	18,46	15,15	22,19	84,23
22/07/2021	17,63	12,51	24,51	87,38
23/07/2021	18,95	14,02	24,18	84,37

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice D: Valores obtidos no ensaio de germinação à semente vA não tratada.

Teste de germinação à semente vA não tratada									
Tempo (dias)	Placa de petri nº1	Frequência acumulada	Placa de petri nº2	Frequência acumulada	Placa de petri nº3	Frequência acumulada	Placa de petri nº4	Frequência acumulada	Média
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	25	25	48	48	29	29	12	12	29
7	7	32	5	53	6	35	5	17	6
10	4	36	5	58	3	38	3	20	4
23	0	36	0	58	0	38	0	20	0
26	4	40	0	58	7	45	10	30	5
30	7	47	34	92	41	86	50	80	33
Total de sementes germinadas	47		92		86		80		
Porcentagem de germinação/Faculdade germinativa (%)	47%		92%		86%		80%		

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice E: Valores obtidos no ensaio de germinação à semente vA tratada.

Teste de germinação à semente vA tratada									
Tempo (dias)	Placa de petri nº1	Frequência acumulada	Placa de petri nº2	Frequência acumulada	Placa de petri nº3	Frequência acumulada	Placa de petri nº4	Frequência acumulada	Média
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	12	12	13	13	11	11	7	7	11
7	7	19	0	13	8	19	11	18	7
10	3	22	28	41	4	23	14	32	12
23	0	22	0	41	2	25	1	33	1
26	3	25	2	43	3	28	1	34	2
30	2	27	4	47	9	37	3	37	5
Total de sementes germinadas	27		47		37		37		
Porcentagem de germinação/Faculdade germinativa (%)	27%		47%		37%		37%		

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice F: Valores obtidos no ensaio de germinação à semente vB não tratada.

Teste de germinação à semente vB não tratada									
Tempo (dias)	Placa de petri nº1	Frequência acumulada	Placa de petri nº2	Frequência acumulada	Placa de petri nº3	Frequência acumulada	Placa de petri nº4	Frequência acumulada	Média
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	7	3	3	12	12	5	5	7
7	8	15	0	3	8	20	4	9	5
10	1	16	2	5	7	27	2	11	3
23	0	16	0	5	0	27	0	11	0
26	54	70	82	87	13	40	64	75	53
30	13	83	6	93	4	44	11	86	9
Total de sementes germinadas	83		93		44		86		
Porcentagem de germinação/Faculdade germinativa (%)	83%		93%		44%		86%		

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice G: Valores obtidos no ensaio de germinação à semente vB tratada.

Teste de germinação à semente vB tratada									
Tempo (dias)	Placa de petri nº1	Frequência acumulada	Placa de petri nº2	Frequência acumulada	Placa de petri nº3	Frequência acumulada	Placa de petri nº4	Frequência acumulada	Média
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	13	13	8	8	28	28	7	7	14
7	2	15	1	9	2	30	21	28	7
10	1	16	11	20	2	32	2	30	4
23	0	16	3	23	0	32	1	31	1
26	9	25	11	34	7	39	16	47	11
30	38	63	41	75	56	95	9	56	36
Total de sementes germinadas	63		75		95		56		
Porcentagem de germinação/Faculdade germinativa (%)	63%		75%		95%		56%		

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice H: Plano de observações do 1º Ensaio (Variedade A (vA) não tratada) no campo BR1 (1ª Sementeira-Ensaio 1-vA NT).

Plano de observações em campo do 1º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR1)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade A não tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
01/06/2021	Sementeira	Sem observações.
08/06/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
10/06/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
12/06/2021	Pós-emergência	Fase em que se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, ainda se conseguiu concluir que algumas zonas ainda estavam com lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
14/06/2021	2/4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras sendo que, em algumas zonas observou-se que as plantas já apresentavam as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
16/06/2021	4 folhas verdadeiras	Nesta fase de desenvolvimento, observou-se que, em algumas zonas, por um lado, as plantas tinham um desenvolvimento lento e, por outro lado, em algumas zonas continuava a não haver germinação da semente. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homogeneamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
18/06/2021	4 folhas verdadeiras	A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
20/06/2021	4 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
22/06/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice I: Plano de observações do 1º Ensaio (Variedade A (vA) tratada) no campo BR1 (1ª Sementeira-Ensaio 1-vA T).

Plano de observações em campo do 1º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR1)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade A tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
01/06/2021	Sementeira	Sem observações.
08/06/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
10/06/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
12/06/2021	Pós-emergência	Fase em que se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, concluiu-se que as plantas em algumas zonas tinham uma lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
14/06/2021	2/4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, se observou que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras sendo que, em algumas zonas se observou que as plantas já apresentavam as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
16/06/2021	4 folhas verdadeiras	Nesta fase de desenvolvimento, observou-se que, em algumas zonas, por um lado, as plantas tinham lento desenvolvimento e, por outro, em algumas zonas continuava a não haver germinação da semente. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homogeneamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
18/06/2021	4 folhas verdadeiras	A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
20/06/2021	4 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
22/06/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice J: Plano de observações do 2º Ensaio (Variedade B (vB) não tratada) no campo BR1 (1ª Sementeira-Ensaio 2-vB NT).

Plano de observações em campo do 2º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR1)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade B não tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
01/06/2021	Sementeira	Sem observações.
08/06/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea, sendo que existem algumas zonas com falhas de germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
10/06/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
12/06/2021	Pós-emergência	Fase em que se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras sendo que, algumas plantas já se apresentavam mais desenvolvidas que outras. Em termos de germinação, concluiu-se que algumas zonas ainda estavam com uma lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
14/06/2021	2/4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas com quatro folhas verdadeiras, no entanto, algumas das plantas ainda apresentavam apenas duas folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
16/06/2021	4 folhas verdadeiras	Nesta fase de desenvolvimento, observou-se que, em algumas zonas, por um lado, as plantas tinham um lento desenvolvimento e, por outro, em algumas zonas continuava a não haver germinação da semente. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homoganeamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
18/06/2021	4 folhas verdadeiras	A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e uma boa coloração. Relativamente à variedade A tratada, a variedade B não tratada teve um desempenho e desenvolvimento igual. Relativamente à variedade B tratada, a variedade B não tratada teve um desempenho melhor. Mais homogêneo que os restantes ensaios. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
20/06/2021	4 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
22/06/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice K: Plano de observações do 2º Ensaio (Variedade B (vB) tratada) no campo BR1 (1ª Sementeira-Ensaio 2-vB T).

Plano de observações em campo do 2º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR1)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade B tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
01/06/2021	Sementeira	Sem observações.
08/06/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Velocidade de germinação lenta. Pouco homogênea, sendo que existem muitas zonas com falhas de germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
10/06/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
12/06/2021	Pós-emergência	Fase em que se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras sendo que, algumas plantas apresentavam-se menos desenvolvidas que outras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
14/06/2021	2/4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas com quatro folhas verdadeiras, no entanto, algumas das plantas ainda apresentavam apenas duas folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
16/06/2021	4 folhas verdadeiras	No geral, concluiu-se que, em termos de desenvolvimento, este ensaio teve desenvolvimento igual ao da variedade B não tratada. Pouco homogêneo devido à má germinação. Apesar da má germinação, a variedade desenvolveu-se bem e homogeneamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
18/06/2021	4 folhas verdadeiras	A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
20/06/2021	4 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
22/06/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice L: Plano de observações do 1º Ensaio (Variedade A (vA) não tratada) no campo BR2 (2ª Sementeira-Ensaio 1-vA NT).

Plano de observações em campo do 1º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR2)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade A não tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
29/06/2021	Sementeira	Sem observações.
05/07/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea, sendo que existiam algumas zonas com falhas de germinação. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
07/07/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
09/07/2021	Pós-emergência	Fase em que já se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, ainda se conseguiu concluir que algumas zonas ainda estavam com uma lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
11/07/2021	2 folhas verdadeiras	Ensaio com desenvolvimento mais rápido. Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
13/07/2021	2 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
15/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das quatro folhas verdadeiras. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homoganeamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
17/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
19/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das seis folhas verdadeiras. A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
21/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as seis folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
23/07/2021	6 folhas verdadeiras	Este ensaio apresentava-se mais bem desenvolvido. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice M: Plano de observações do 1º Ensaio (Variedade A (vA) tratada) no campo BR2 (2ª Sementeira-Ensaio 1-vA T).

Plano de observações em campo do 1º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR2)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade A tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
29/06/2021	Sementeira	Sem observações.
05/07/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea, sendo que existiam algumas zonas com falhas de germinação. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
07/07/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
09/07/2021	Pós-emergência	Fase em que já se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, ainda se conseguiu concluir que algumas zonas ainda estavam com uma lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
11/07/2021	2 folhas verdadeiras	Ensaio com rápido desenvolvimento. Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
13/07/2021	2 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
15/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das quatro folhas verdadeiras. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homoganeamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
17/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
19/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das seis folhas verdadeiras. A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
21/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as seis folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
23/07/2021	6 folhas verdadeiras	Bom desenvolvimento, boa nutrição e boa cor. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice N: Plano de observações do 2º Ensaio (Variedade B (vB) não tratada) no campo BR2 (2ª Sementeira-Ensaio 2-vB NT).

Plano de observações em campo do 2º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR2)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade B não tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
29/06/2021	Sementeira	Sem observações.
05/07/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogénea, sendo que existiam algumas zonas com falhas de germinação. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
07/07/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
09/07/2021	Pós-emergência	Fase em que já se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, ainda se conseguiu concluir que algumas zonas ainda estavam com uma lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
11/07/2021	2 folhas verdadeiras	Ensaio com rápido desenvolvimento. Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
13/07/2021	2 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
15/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das quatro folhas verdadeiras. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homogeneamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
17/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
19/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das seis folhas verdadeiras. A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
21/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as seis folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
23/07/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice O: Plano de observações do 2º Ensaio (Variedade B (vB) tratada) no campo BR2 (2ª Sementeira-Ensaio 2-vB T).

Plano de observações em campo do 2º Ensaio		
Quinta: Quinta dos Cativos, Boavista dos Pinheiros (BR2)		
Cultura/Variedade: Espinafre "baby leaf"/Variedade B tratada		
Dia	Fase de crescimento da cultura	Observações
29/06/2021	Sementeira	Sem observações.
05/07/2021	Emergência	Em estado de desenvolvimento cotiledonar. Rápida velocidade de germinação. Homogênea, sendo que existiam algumas zonas com falhas de germinação. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
07/07/2021	Emergência	Continuação da emergência das plântulas. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
09/07/2021	Pós-emergência	Fase em que já se observou o aparecimento das primeiras duas folhas verdadeiras. Em termos de germinação, observaram-se algumas zonas com lenta germinação. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
11/07/2021	2 folhas verdadeiras	Ensaio com rápido desenvolvimento. Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
13/07/2021	2 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as primeiras duas folhas verdadeiras. Observaram-se perdas por <i>damping-off</i> .
15/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das quatro folhas verdadeiras. No geral, concluiu-se que a variedade se estava a desenvolver bem e homoganeamente. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
17/07/2021	4 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as quatro folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
19/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que já se observou o aparecimento das seis folhas verdadeiras. A variedade apresentou um bom desenvolvimento, sem problemas de nutrição e com uma boa coloração. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
21/07/2021	6 folhas verdadeiras	Fase em que, na generalidade da sementeira, observou-se que as plantas se encontravam com as seis folhas verdadeiras. Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .
23/07/2021	6 folhas verdadeiras	Não se observaram perdas por <i>damping-off</i> .

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice P: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT).

Data de sementeira		01/06/21									Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		01/06/21	08/06/21	10/06/21	12/06/21	14/06/21	16/06/21	18/06/21	20/06/21	22/06/21		
Ensaio 1-vA NT	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1º dia)	Emergência (2º dia)	Emergência (4º dia)	6º dia	8º dia	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia		
A	752	0	48	48	16	0	0	0	0	0	112	14,89%
B	752	0	80	176	16	0	0	0	0	0	272	36,17%
C	752	0	80	192	0	0	0	0	0	0	272	36,17%
Média total de plantas emergidas num m ²	752										Média de perdas	29,08%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice Q: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 1-vA T).

Data de sementeira		01/06/21										Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		01/06/21	08/06/21	10/06/21	12/06/21	14/06/21	16/06/21	18/06/21	20/06/21	22/06/21			
Ensaio 1-vA T	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1º dia)	Emergência (2º dia)	Emergência (4º dia)	6º dia	8º dia	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia			
A	752	0	48	112	32	0	0	0	0	0	192	25,53%	
B	752	0	16	48	32	0	0	0	0	0	96	12,77%	
C	752	0	48	128	16	0	0	0	0	0	192	25,53%	
Média total de plantas emergidas num m ²	752											Média de perdas	21,28%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice R: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 2-vB NT).

Data de sementeira		01/06/21										Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações	Total de plantas emergidas num m ²	01/06/21	08/06/21	10/06/21	12/06/21	14/06/21	16/06/21	18/06/21	20/06/21	22/06/21			
Ensaio 2-vB NT	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1º dia)	Emergência (2º dia)	Emergência (4º dia)	6º dia	8º dia	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia			
A	752	0	64	176	0	0	0	0	0	0	240	31,91%	
B	752	0	48	144	16	0	0	0	0	0	208	27,66%	
C	752	0	64	96	0	0	0	0	0	0	160	21,28%	
Média total de plantas emergidas num m ²	752											Média de perdas	26,95%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice S: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (1ª Sementeira – Ensaio 2-vB T).

Data de sementeira		01/06/21										Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		01/06/21	08/06/21	10/06/21	12/06/21	14/06/21	16/06/21	18/06/21	20/06/21	22/06/21			
Ensaio 2-vB T	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1º dia)	Emergência (2º dia)	Emergência (4º dia)	6º dia	8º dia	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia			
A	128	0	16	32	0	0	0	0	0	0	48	37,50%	
B	128	0	32	16	0	0	0	0	0	0	48	37,50%	
C	128	0	96	96	0	0	0	0	0	0	192	150,00%	
Média total de plantas emergidas num m ²	128										Média de perdas	75,00%	

Apêndice T: Média de perdas totais (%) nos ensaios realizados no campo BR1 (1ª Sementeira).

	Ensaio 1-vA NT	Ensaio 1-vA T	Ensaio 2-vB NT	Ensaio 2-vB T
Média de perdas totais	29,08%	21,28%	26,95%	75,00%

Avaliação do efeito de fungicida sistémico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice U: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 1-vA NT).

Data de sementeira		29/06/21											Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		29/06/21	05/07/21	07/07/21	09/07/21	11/07/21	13/07/21	15/07/21	17/07/21	19/07/21	21/07/21	23/07/21		
Ensaio 1-vA NT	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1ª dia)	Emergência (2ª dia)	Emergência (4ª dia)	6ª dia	8ª dia	10ª dia	12ª dia	14ª dia	16ª dia	18ª dia	20ª dia		
A	880	0	0	0	64	32	0	0	0	0	0	0	96	10,91%
B	416	0	0	64	0	32	0	0	0	0	0	0	96	23,08%
C	576	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	32	5,56%
D	432	0	0	32	112	0	0	0	0	0	16	0	160	37,04%
E	720	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	0	48	6,67%
Média total de plantas emergidas num m ²													Média de perdas	16,65%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice V: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 1-vA T).

Data de sementeira		29/06/21											Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		29/06/21	05/07/21	07/07/21	09/07/21	11/07/21	13/07/21	15/07/21	17/07/21	19/07/21	21/07/21	23/07/21		
Ensaio 1-vA T	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1ª dia)	Emergência (2ª dia)	Emergência (4ª dia)	6ª dia	8ª dia	10ª dia	12ª dia	14ª dia	16ª dia	18ª dia	20ª dia		
A	448	0	0	32	64	16	16	0	0	0	0	0	128	28,57%
B	416	0	0	16	0	0	32	0	0	0	0	0	48	11,54%
C	752	0	0	32	32	16	32	0	0	0	0	0	112	14,89%
D	640	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	16	2,50%
E	400	0	0	0	16	0	16	0	0	0	0	0	32	8,00%
Média total de plantas emergidas num m ²		531											Média de perdas	13,10%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice W: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 2-vB NT).

Data de sementeira		29/06/21												
Data de observações		29/06/21	05/07/21	07/07/21	09/07/21	11/07/21	13/07/21	15/07/21	17/07/21	19/07/21	21/07/21	23/07/21	Total de plantas perdidas	Perdas
Ensaio 2-vB NT	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1ª dia)	Emergência (2ª dia)	Emergência (4ª dia)	6ª dia	8ª dia	10ª dia	12ª dia	14ª dia	16ª dia	18ª dia	20ª dia		
A	272	0	0	32	0	0	0	0	0	0	16	0	48	17,65%
B	352	0	0	0	80	16	0	0	0	0	0	0	96	27,27%
C	384	0	0	0	16	48	0	0	0	0	0	0	64	16,67%
D	448	0	0	128	0	0	16	0	0	0	0	0	144	32,14%
E	160	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	32	20,00%
Média total de plantas emergidas num m ²	323												Média de perdas	22,75%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice X: Número de plantas perdidas num m² durante o desenvolvimento do espinafre (2ª Sementeira – Ensaio 2-vB T).

Data de sementeira		29/06/21											Total de plantas perdidas	Perdas
Data de observações		29/06/21	05/07/21	07/07/21	09/07/21	11/07/21	13/07/21	15/07/21	17/07/21	19/07/21	21/07/21	23/07/21		
Ensaio 2-vB T	Total de plantas emergidas num m ²	Sementeira (1º dia)	Emergência (2º dia)	Emergência (4º dia)	6º dia	8º dia	10º dia	12º dia	14º dia	16º dia	18º dia	20º dia		
A	176	0	0	96	0	0	0	0	0	0	32	0	128	72,73%
B	220	0	0	22	0	0	16	0	0	0	0	0	48	15,00%
C	176	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	16	9,09%
D	256	0	16	32	48	16	32	0	0	48	16	0	208	81,25%
E	304	0	0	48	16	0	0	0	0	32	16	0	112	36,84%
Média total de plantas emergidas num m ²	246												Média de perdas	42,98%

Apêndice Y: Média de perdas totais (%) nos ensaios realizados no campo BR2 (2ª Sementeira).

	Ensaio 1-vA NT	Ensaio 1-vA T	Ensaio 2-vB NT	Ensaio 2-vB T
Média de perdas totais	16,65%	13,10%	22,75%	42,98%

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice Z: Medições após a colheita das plantas, da massa total e número de folhas (1ª Sementeira).

Medições pós-colheita (1ª Sementeira)					
Código da amostra	Peso total retirado do campo (kg)	Peso (kg)	Média do peso (kg)	Número de folhas	Média do número de folhas
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº1)	1,32	0,100	0,100	147	124
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº2)		0,100		120	
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº3)		0,100		105	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº1)	1,18	0,100	0,100	83	91
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº2)		0,100		100	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº3)		0,100		90	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº1)	1,42	0,100	0,100	82	90
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº2)		0,100		85	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº3)		0,100		102	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº1)	1,30	0,100	0,100	82	82
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº2)		0,100		87	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº3)		0,100		76	

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AA: Medições da massa total na fase de secagem (1ª Sementeira).

Medições secagem (1ª Sementeira)						
Código da amostra	Tara do tabuleiro (kg)	Tabuleiro + amostra inicial (kg)	Amostra fresca (kg)	Tabuleiro + amostra seca final (kg)	Amostra seca (kg)	% de água perdida
1º Ensaio Variedade A não tratada	0,397	1,723	1,326	0,492	0,095	7,16
1º Ensaio Variedade A tratada	0,445	1,716	1,271	0,531	0,086	6,77
2º Ensaio Variedade B não tratada	0,443	1,819	1,376	0,537	0,094	6,83
2º Ensaio Variedade B tratada	0,445	1,676	1,231	0,549	0,104	8,45

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AB: Medições da massa total na pós-secagem (1ª Sementeira).

Medições pós-secagem (1ª Sementeira)				
Código da amostra	Tara do cadinho (g)	Peso da amostra (g)	Cadinho+MS (g)	MS (g)
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº1)	13,570	3,010	16,465	2,89
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº2)	12,890	3,008	15,772	2,88
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº1)	11,442	3,008	14,330	2,89
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº2)	13,309	3,009	16,204	2,89
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº1)	13,522	3,006	16,420	2,90
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº2)	13,380	3,007	16,265	2,89
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº1)	12,918	3,009	15,827	2,91
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº2)	13,341	3,003	16,241	2,90

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AC: Medições após a colheita das plantas, da massa total e número de folhas (2ª Sementeira).

Medições pós-colheita (2ª Sementeira)					
Código da amostra	Peso total retirado do campo (kg)	Peso (kg)	Média do peso (kg)	Número de folhas	Média do número de folhas
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº1)	1,280	0,104	0,102	92	101
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº2)		0,102		118	
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº3)		0,101		102	
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº4)		0,102		103	
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº5)		0,100		89	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº1)	1,500	0,101	0,101	112	108
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº2)		0,100		95	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº3)		0,100		118	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº4)		0,101		108	
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº5)		0,101		109	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº1)	1,220	0,101	0,102	101	98
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº2)		0,103		100	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº3)		0,102		103	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº4)		0,103		81	
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº5)		0,101		104	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº1)	1,580	0,103	0,102	89	98
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº2)		0,101		93	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº3)		0,102		104	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº4)		0,101		97	
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº5)		0,102		105	

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AD: Medições da massa total na fase de secagem (2ª Sementeira).

Medições secagem (2ª Sementeira)						
Código da amostra	Tara do tabuleiro (kg)	Tabuleiro + amostra inicial (kg)	Amostra fresca (kg)	Tabuleiro + amostra seca final (kg)	Amostra seca (kg)	% de água perdida
1º Ensaio Variedade A não tratada	0,805	2,032	1,227	0,899	0,094	7,66
1º Ensaio Variedade A tratada	0,798	2,246	1,448	0,914	0,116	8,01
2º Ensaio Variedade B não tratada	0,798	1,980	1,182	0,906	0,108	9,14
2º Ensaio Variedade B tratada	0,802	2,348	1,546	0,985	0,183	11,84

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea* L.), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AE: Medições da massa total na pós-secagem (2ª Sementeira).

Medições pós-secagem (2ª Sementeira)				
Código da amostra	Tara do cadinho (g)	Peso da amostra (g)	Cadinho+MS (g)	MS (g)
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº1)	13,437	3,003	16,166	2,729
1º Ensaio Variedade A não tratada (amostra nº2)	13,014	3,003	15,750	2,736
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº1)	13,435	3,005	16,192	2,757
1º Ensaio Variedade A tratada (amostra nº2)	13,165	3,007	16,929	3,764
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº1)	13,557	3,006	16,312	2,756
2º Ensaio Variedade B não tratada (amostra nº2)	13,218	3,002	15,971	2,752
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº1)	13,575	3,003	16,364	2,790
2º Ensaio Variedade B tratada (amostra nº2)	13,503	3,010	16,303	2,801

Avaliação do efeito de fungicida sistêmico no tratamento prévio de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea L.*), para controlar as perdas de plantas na instalação da cultura durante a época quente

Apêndice AF: Resultado e avaliação obtida através da análise nutritiva às folhas de espinafre dos ensaios realizados no campo BR2 (2ª Sementeira).

Data de emissão do relatório		09/08/21							
Designação do ensaio		Ensaio 1-vA NT		Ensaio 1-vA T		Ensaio 2-vB NT		Ensaio 2-vB T	
Parâmetro		Resultado	Avaliação	Resultado	Avaliação	Resultado	Avaliação	Resultado	Avaliação
Macronutrientes	Azoto (N)	4,85%	Adequado	5,03%	Adequado	4,71%	Adequado	4,73%	Adequado
	Fósforo (P)	0,47%	Adequado	0,53%	Adequado	0,48%	Adequado	0,53%	Adequado
	Potássio (K)	9,97%	Alto	10,07%	Alto	8,08%	Alto	9,24%	Alto
	Magnésio (Mg)	1,55%	Alto	1,44%	Alto	1,39%	Alto	1,40%	Alto
	Cálcio (Ca)	1,19%	Adequado	0,94%	Adequado	1,03%	Adequado	1,12%	Adequado
	Enxofre (S)	0,45%	-	0,45%	-	0,39%	-	0,41%	-
Micronutrientes	Boro (B)	50 mg/kg	Adequado	52 mg/kg	Adequado	51 mg/kg	Adequado	52 mg/kg	Adequado
	Cobre (Cu)	13 mg/kg	Adequado	15 mg/kg	Adequado	10 mg/kg	Adequado	11 mg/kg	Adequado
	Ferro (Fe)	186 mg/kg	Adequado	184 mg/kg	Adequado	217 mg/kg	Alto	257 mg/kg	Alto
	Manganês (Mn)	72 mg/kg	Adequado	90 mg/kg	Adequado	51 mg/kg	Adequado	52 mg/kg	Adequado
	Zinco (Zn)	185 mg/kg	Alto	149 mg/kg	Alto	113 mg/kg	Alto	112 mg/kg	Alto