



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Estudo da etiologia da doença associada às
perdas de planta de brócolo em condições de
campo: Os casos do Ribatejo e do Alentejo**

Maria Beatriz Rodrigues Grácio

Orientação:

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes
Félix

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Engenharia Agrónómica

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Estudo da etiologia da doença associada às perdas de planta de brócolo em condições de campo: Os casos do Ribatejo e do Alentejo

Maria Beatriz Rodrigues Grácio

Orientação:

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho que agradecer às minhas orientadoras Professora Doutora Rosário Félix e Doutora Carla Varanda pela orientação, conhecimento, disponibilidade, paciência (muita) e motivação ao longo do estudo permitindo assim chegar ao fim do mesmo com orgulho e com um sentimento de companheirismo e amizade. Acredito que não podia ter pedido melhores orientadoras para me levar até ao fim desta etapa importante.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório por terem sempre mostrado disponibilidade para ajudar a “caloira” e pela boa disposição que sempre transmitiram.

Á Eng^a. Rita Caixinha por se ter disponibilizado a andar comigo pelos diversos campos a retirar as diferentes amostras que serviram de alicerces para a realização deste trabalho.

Para os meus pais, Helena (PG) e Carlos (Tátá), namorado André e amigos Carolina, Magda e Milton, que durante as longas horas de trabalho, algumas angústias e dificuldades, estiveram sempre ao meu lado incentivando, apoiando e acreditando em mim.

RESUMO

Neste trabalho analisou-se a ocorrência de doenças na cultura do brócolo e a sua possível origem, em duas parcelas de cada região: Ribatejo (Praias e Álamos) e Alentejo (Quartijos e Herdade da Canada). Efetuou-se a colheita de couves-brócolo sintomáticas durante o seu ciclo vegetativo e delas se isolou e identificou molecularmente 27 fungos diferentes. Destes, apenas 3 géneros se encontravam associados a doenças descritas para a cultura, como foi o caso dos géneros *Alternaria* e *Fusarium* com 37% e 33% de isolados respetivamente e da espécie *Rhizoctonia solani* em ambas as formas, com um isolado de cada. A região do Ribatejo (Álamos), mostrou uma maior incidência de doença. Para perceber a sua origem e etiologia, analisou-se também a presença de microorganismos, nos solos, nas plantas de viveiro e na água de rega, tendo-se concluído que na sua origem poderia estar a água e as plântulas, pois ambas mostraram estar infetadas com os fungos causadores de doença.

PALAVRAS-CHAVE: Ribatejo, Alentejo, Doenças do brócolo, 'Damping-off', *Alternaria*

ABSTRACT - Evaluation of the etiology of the disease associated to the losses of broccoli plants in field conditions: The case studies of Ribatejo and Alentejo

In this work, the occurrence of disease in the broccoli culture and its possible origin was analysed in two plots of each region: Ribatejo (Praias and Álamos) and Alentejo (Quartijos and Herdade da Canada). Symptomatic broccoli plants were collected during their vegetative cycle and, from them, 27 different fungi were isolated and molecularly identified. Of these, only 3 genera are known to be associated with diseases described for the crop, as is the case of *Alternaria* and *Fusarium*, with 37% and 33% of isolates respectively, and *Rhizoctonia solani* in both forms, with one isolate of each. The region of Ribatejo (Álamos), showed a higher incidence of disease. To understand its origin and aetiology, soils, nursery plants and irrigation water were also tested for the presence of microorganisms, showing that the source of the disease might be either water or seedlings, as both were infected with disease-causing fungi.

KEYWORDS: Ribatejo, Alentejo, Broccoli diseases, 'Damping-off', *Alternaria*

ABREVIATURAS

APS – American Phytopathological Society

B – Boro

BLAST - Basic Local Alignment Search Tools

°C – Grau Centígrado

cm – Centímetros

CTAB - Cetyl trimethyl ammonium bromide

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

EUA – Estados Unidos da América

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division

g – Aceleração da gravidade

g – Gramas

ha – Hectare

HCl - Ácido clorídrico

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ITS - Internal Transcribed Spacer

K – Potássio

Kc – Coeficiente Cultural

KCl – Cloreto de potássio

kg – Quilos

L – Litros

M - Molar

Mb – Molibdênio

Mg - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min- Minutos

ml – Mililitros

mM - Milimolar

mm – Milímetros

mm h⁻¹ – Milímetro por hora

Mn – Manganês

N - Azoto

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OTU - Unidade taxonómica operacional

p/p – Peso/Peso

pb – Par de bases

PCR - Polimerase Chain Reaction

PVP - Polivinilpirrolidona

rDna – DNA ribossómico

S - Exonfre

s – Segundos

spp. - Espécies

V - Volt

v/v – Volume/Volume

TBE - Tris/Borate/EDTA

Ton - Toneladas

TRIS-HCL – Tris (hidroximetil) aminometano

U - Unidades

µl – Microlitro

% - Percentagem

Bases nucleótidas

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T - Timina

Índice

Agradecimentos	i
RESUMO	ii
ABSTRACT - Evaluation of the etiology of the disease associated to the losses of broccoli plants in field conditions: The case studies of Ribatejo and Alentejo	iii
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE QUADROS	xx
1.1 Apresentação e Relevância do Estudo	2
1.2 Problema e Questões do Estudo	3
1.3 Organização do Trabalho	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Família das Brássicas	6
2.1.1. A cultura da couve-brócolo no mundo e em Portugal	8
2.2. Condições climáticas do Ribatejo e do Alentejo	10
2.3. Cultura da couve-brócolo	13
2.3.1 Caracterização da couve-brócolo	13
2.3.2 Desenvolvimento e exigências ambientais	14
2.3.3 Exigências edafo-climáticas	14
2.3.4 Tecnologia de produção	15
2.3.5 Colheita e conservação	17
2.3.6 Inimigos da cultura	18
2.4 Principais Doenças da Família das Brássicas	19
2.4.1 Doenças provocadas por Bactérias	19
a) PONTUADO BACTERIANO (BACTERIAL LEAF SPOT)	19
b) PODRIDÃO NEGRA (BLACK ROT)	22
c) PODRIDÃO MOLE BACTERIANA (BACTERIAL SOFT ROT).....	24
2.4.2 Doenças que afetam as brássicas provocadas por Protistas, Fungos e Pseudo-fungos	28
a) ALTERNARIOSE (ALTERNARIA LEAF SPOT).....	31
b) ‘DAMPING-OFF’	34
c) PODRIDÃO DAS RAÍZES (PHYTOPHTORA ROOT ROT).....	36
d) MÍLDIO (DOWNY MILDEW)	39
e) ‘BOTTOM ROT’	42
f) FUSARIOSE e AMARELECIMENTO (YELLOW).....	44

g) VERTICILIOSE (VERTICILLIUM WILT).....	48
h) OÍDIO (POWDERY MILDEW)	51
MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. Apresentação e caracterização das parcelas da região do Ribatejo e do Alentejo.....	54
3.1.1. Parcelas do Ribatejo.....	54
3.1.1.1 Condições edafo-climáticas do Ribatejo	55
3.1.1.1.1 Clima	55
3.1.1.1.2. Solo	58
3.1.1.1.2.1 Parcela Praias e Álamos	58
3.1.2. Parcelas do Alentejo	60
3.1.2.1 Condições edafo-climáticas do Alentejo	61
3.1.2.1.1 Clima	61
3.1.2.1.2 Solo	64
3.1.2.1.2.1 Parcela Quartijos.....	64
3.1.2.1.2.2 Parcela Herdade da Canada.....	65
3.2. Operações culturais nas parcelas do Ribatejo e do Alentejo	68
3.2.1 Operações culturais nas parcelas do Ribatejo	68
3.2.1.1 Parcela Praias	68
3.2.1.2 Parcelas Álamos.....	69
3.2.2 Operações culturais nas parcelas do Alentejo.....	70
3.2.2.1 Parcela Quartijos	70
3.2.2.2 Parcela Herdade da Canada	70
3.3 Sistemas de regas nas diferentes parcelas no Ribatejo e no Alentejo	71
3.4 Recolha de material edáfico	75
3.5 Recolha de material vegetal	77
3.6 Colheita de água de rega.....	77
3.7 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material edáfico.....	78
3.8 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material vegetal.....	81
3.9 Isolamento e identificação de microorganismos da água de rega	85
3.10 Identificação molecular dos microorganismos isolados das plantas sintomáticas do campo.....	86
3.10.1 Preparação das amostras e extração do DNA total	86

3.10.2	Identificação molecular dos fungos	87
RESULTADOS	89
4.1	Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material edáfico.....	90
4.1.1	Região do Ribatejo.....	90
4.1.2	Região do Alentejo	91
4.2	Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material vegetal.....	93
4.2.1	Amostras de material vegetal proveniente de viveiro	93
4.2.1.1	Substrato	93
4.2.1.2	Raiz.....	97
4.1.1.1	Caule.....	99
4.1.1.2	Folhas.....	100
4.3	Isolamento e identificação de microorganismos obtidos de plantas da couve-brócolo sintomáticas	103
a.	Ribatejo	103
b.	Região do Alentejo	105
4.4	Isolamento e identificação de fungos provenientes do material de água de rega	110
a.	Ribatejo	110
b.	Alentejo	111
4.5	Identificação molecular dos fungos obtidos em plantas sintomáticas	114
a.	PCR 1	117
b.	PCR 2	117
c.	PCR 3	118
d.	PCR 4	118
a.	PCR do género <i>Alternaria</i>	122
b.	PCR do género <i>Fusarium</i>	122
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	127
5.1.	Identificação molecular dos patogénios associados às doenças da couve-brócolo.....	128
5.2.	Condições edafo-climáticas e sua relação com o aparecimento de doenças.....	131
5.3.	Relação dos microorganismos obtidos do material edáfico das diferentes parcelas com a presença de doença nas couves-brócolo...	133
5.4.	Relação dos microorganismos obtidos do material vegetal proveniente dos viveiros com a presença de doença nas couves-	

brócolo	134
5.5. Relação dos microorganismos obtidos do material proveniente da água de rega com a presença de doença nas couves-brócolo.....	135
5.6. Sequenciação de culturas, operações culturais e total de produção (ton/ha) em cada parcela.....	137
5.7. Conclusões gerais.....	138
5.8. Perspetivas futuras	139
REFERÊNCIAS.....	140
ANEXOS	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Principais culturas a nível Mundial (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

Figura 2 – Produção total da quantidade de couves e outras brássicas a nível Mundial (Fonte: FAOSTAT, 2017).

Figura 3 - Produção das couves e das outras brássicas por região a nível mundial (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

Figura 4 - TOP 10 de países na produção de couves e de outras brássicas (Fonte: FAOSTAT, 2017).

Figura 5 - Produção total de couve-flor e couve-brócolo em Portugal (Fonte: FAOSTAT, 2017).

Figura 6 - Superfície e produção da couve- brócolo em Portugal (Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2015).

Figura 7 – Sintomas gerais de algumas doenças provocadas por fungos e bactérias na cultura da couve-brócolo (Fonte: Conn, Rosenberger, Gabor, Kao & Krause, 2013).

Figura 8 - Clima de Portugal Continental, segundo a classificação de Köppen, com os distritos de Santarém (verde) e Beja (azul) assinalados (Fonte: IPMA, 2017).

Figura 9 - Triângulo da doença que integra os 3 fatores que em conjunto provocam doença em plantas (Fonte: Agrios, 2005).

Figura 10 - Folhas (A e B) e cabeça (C) com sintomas de Pontuado Bacteriano (Bacterial Leaf Spot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 11 – Ciclo da doença de Pontuado Bacteriano, causado por *Pseudomonas syringae* (Adaptado de <https://en.wikipedia.org>, 2017).

Figura 12 – Folhas (A e C) e caules (B) com sintomas de Podridão Negra (Black Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 13 – Cabeças com sintomas de Podridão Mole Bacteriana (Bacterial Soft Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 14 - Ciclo da doença de Podridão Mole Bacteriana, causado por *Pectobacterium* spp. e *Pseudomonas marginalis* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 15 - Folhas (A e B) e cabeça (C) com sintomas de Alternariose (Alternaria Leaf Spot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 16 – Ciclo da doença de Alternariose causado por *Alternaria* spp. (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 17 - Ciclo da doença de 'Damping-off' causado por *Pythium* spp. (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 18 – Sementes (A), raízes (B) e plantas (C) com sintomas de 'Damping-off' (Fonte: Agrios, 2005; <http://www.countygp.ab.ca>, 2012).

Figura 19 – Planta (A) e caule (B) com sintomas de Podridão das Raízes (Phytophthora Root Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 20 – Ciclo da doença de Podridão das Raízes causado por *Phytophthora megasperma* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 21 – Folhas (A e B) e caule (C) com sintomas de Míldio (Downy Mildew) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 22 - Plantas com sintomas de 'Bottom Rot' (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 23 - Ciclo da doença de 'Bottom Rot' causado por *Rhizoctonia solani* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 24 - Caules com sintomas de Fusariose (Fonte: Agrios, 2005).

Figura 25 – Folhas com sintomas de Amarelecimento (Yellows) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 26 - Ciclo da doença de Fusariose e de Amarelecimento causado por *Fusarium oxysporum* (Adaptado de Agrios, 2005).

Figura 27 – Folhas (A) e caule (B e C) com sintomas de Verticiliose (Verticillium Wilt) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 28 – Ciclo da doença de Verticiliose causado por *Verticillium dahliae* ou *Verticillium albo-atrum* (Fonte: APS- <http://www.apsnet.org>, 2017).

Figura 29 – Folhas com sintomas de Oídio (Powdery Mildew) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Figura 30 – Parcelas na região do Ribatejo, A- Praias e B- Álamos.

Figura 31 – Gráfico termopluviométrico do distrito de Santarém (Fonte: <https://pt.climate-data.org>).

Figura 32 – Carta de solo da parcela Praias e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Figura 33 – Carta de solo da parcela Álamos e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Figura 34 – Parcelas na região do Alentejo, A- Quartijos e B- Herdade da Canada.

Figura 35 – Gráfico termopluviométrico do distrito de Beja (Fonte: <https://pt.climate-data.org>).

Figura 36 - Carta de solo da parcela Quartijos e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Figura 37 - Carta de solo da parcela Herdade da Canada e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Figura 38 – Exemplo da rega por aspersão nas parcelas da região do Ribatejo (Fonte: <http://www.symbolevolution.pt>, 2017).

Figura 39 – Exemplo de rega por canhão com enrolador na parcela Quartijos (Fonte: <http://www.traxco.pt>, 2016).

Figura 40 – Exemplo de rega por ‘pivot’ na parcela Herdade da Canada (Fonte: <http://www.traxco.pt>, 2016).

Figura 41 - Taxas de aplicação de diferentes solos de acordo com as suas condições de infiltração e declive (Adaptado de Kelle & Bliesner, 1990).

Figura 42 – Esquema da recolha das amostras de terra das parcelas Praias e Álamos, respetivamente, recorrendo ao método de estrela.

Figura 43 - Esquema da recolha das amostras de terra das parcelas Quartijos e Herdade da Canada, respetivamente, recorrendo ao método de estrela.

Figura 44 - Suspensão de solo do Ribatejo com as suas respetivas subamostras.

Figura 45 - 1 ml de suspensão de solo nas placas de Petri (90 mm) das diferentes subamostras.

Figura 46 - Placas das subamostras das A- Praias e B- Álamos, com os microorganismos que cresceram provenientes da suspensão de solo.

Figura 47 - Placas das subamostras dos A- Quartijos 1, da B- Quartijos 2 e C- Herdade da Canada com os respectivos microorganismos que cresceram provenientes da suspensão de solo.

Figura 48 - Repicagens para as placas de Petri (60 mm) de duas subamostras do A- Ribatejo e B- Alentejo.

Figura 49 – Exemplo de amostra de plantas provenientes de viveiros utilizadas para testar.

Figura 50 – Suspensão do substrato (A) envolvente das raízes das respetivas plantas (B).

Figura 51 – Etapas da sequência de desinfeção superficial do material vegetal.

Figura 52 – Exemplo do fracionamento das amostras de raízes.

Figura 53 - Exemplo de placas de Petri com amostras de folhas (A), caules (B) e raízes (C) submetidos ao tratamento de desinfeção e a sua respetiva identificação.

Figura 54 – Exemplo de algumas amostras de plantas sintomáticas de couves-brócolo provenientes das diversas parcelas das duas regiões, em diferentes estados de desenvolvimentos e com sintomatologia visível.

Figura 55 – Exemplo dos copos utilizados na centrifugação das amostras da água de rega.

Figura 56 - Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos 'primers' ITS1 e ITS4.

Figura 57 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Praias.

Figura 58 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Álamos.

Figura 59 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Quartijos.

Figura 60 - 8 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Herdade da Canada.

Figura 61 - Número total de fungos por região provenientes do material edáfico.

Figura 62 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 1, provenientes do viveiro.

Figura 63 - 6 diferentes tipos de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 2, provenientes do viveiro.

Figura 64 – 9 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 3, provenientes do viveiro.

Figura 65 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 4, provenientes do viveiro.

Figura 66 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 5, provenientes do viveiro.

Figura 67 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 6, provenientes do viveiro.

Figura 68 – 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 7, provenientes do viveiro.

Figura 69 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 1, provenientes do viveiro.

Figura 70 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 2, provenientes do viveiro.

Figura 71 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 4, provenientes do viveiro.

Figura 72 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 5, provenientes do viveiro.

Figura 73 - um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de raiz da amostra 6, provenientes do viveiro.

Figura 74 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 7, provenientes do viveiro.

Figura 75 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules da amostra 7, provenientes do viveiro.

Figura 76 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 3, provenientes do viveiro.

Figura 77 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 4, provenientes do viveiro.

Figura 78 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 5, provenientes do viveiro.

Figura 79 - um tipo encontrado de isolado de fungos nas amostras de folhas da amostra 6, provenientes do viveiro.

Figura 80 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 7, provenientes do viveiro.

Figura 81 – Número total de isolados de fungos de cada parte analisada da plântula consoante as amostras provenientes dos viveiros.

Figura 82 - Número total de isolados de fungos em cada amostra proveniente dos viveiros.

Figura 83 – 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Praias. Os números nas fotografias correspondem à numeração que lhes foi atribuída para simplificar a sua localização.

Figura 84 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Praias.

Figura 85 – 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados em amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

Figura 86 – 10 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

Figura 87 – um tipo de isolado de fungo encontrado nas amostras de pedúnculos das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

Figura 88 – 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Quartijos.

Figura 89 – dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Quartijos.

Figura 90 – um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Herdade da Canada.

Figura 91 - um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Herdade da Canada.

Figura 92 - Número total de tipos de isolados de fungos associados a cada parcela consoante a parte da planta sintomática testada proveniente do campo.

Figura 93 - Número total de isolados de fungos provenientes das plantas da couve-brócolo sintomáticas do campo consoante a região.

Figura 94 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Praias.

Figura 95 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Álamos.

Figura 96 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Quartijos.

Figura 97 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Herdade da Canada.

Figura 98 - Número total de isolados de fungos por região provenientes das amostras do material de água de rega.

Figura 99 - Número total de isolados de fungos por região submetidos à extração de DNA.

Figura 100 - Número total de isolados de fungos por parcelas na região do Ribatejo submetidos à extração de DNA.

Figura 101 - Número total de isolados de fungos por parcelas na região do Alentejo submetidos à extração de DNA.

Figura 102 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 24, 69, 144, 250, 266; + - controlo positivo de DNA obtido de fungo purificado; - - controlo

negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

Figura 103 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 229, 93, 142, 213, 151, 150, 249, 143; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

Figura 104 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 35, 62, 63, 71, 183, 198, 215, 264, 308; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

Figura 105 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 26, 34, 64, 87, 149, 187, 191, 192, 218, 264, 266, 283, 298, 306, 308, 310; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

Figura 106 - Total de fungos isolados distribuídos por OTU, consoante o Quadro 20.

Figura 107 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 35, 62, 151, 187, 198, 218, 249, 264, 283, 298; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 778 pb e 835 pb.

Figura 108 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 87, 93, 183, 187, 191, 229, 250, 266; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 550 pb e 600 pb.

Figura 109 – Número total de espécies de *Alternaria* distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.

Figura 110 - Número total de espécies de *Fusarium* distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.

Figura 111 – Número total dos isolados de fungos distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Brassicáceas (Fonte: Almeida, 2013).

Quadro 2 – Comparação das duas regiões em estudo, Ribatejo e Alentejo, relativamente às temperaturas e precipitações durante todo o ano agrícola durante os anos de 1931 e 1960 (Adaptado de Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Quadro 3 – Comparação das duas regiões em estudo, Ribatejo e Alentejo, relativamente às temperaturas e precipitações durante todo o ciclo de cultura da couve-brócolo durante os anos de 2016 e 2017 (Adaptado do IPMA, Boletins Meteorológicos entre os anos de 2016 e 2017).

Quadro 4 – Cultivares de couve-brócolo utilizadas para o cultivo em fresco e industrial (Adaptado do Catálogo Nacional de Variedades, 2016).

Quadro 5 – Dados da temperatura do ar relativos à estação meteorológica de Santarém entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Quadro 6 – Dados da insolação, precipitação e evaporação relativos à estação meteorológica de Santarém entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Quadro 7 – Dados da temperatura do ar relativos à estação meteorológica de Beja entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Quadro 8 - Dados da insolação, precipitação e evaporação relativos à estação meteorológica de Beja entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Quadro 9 - Resumo das taxas de aplicação adequadas para cada tipo de solo presente nas nossas parcelas.

Quadro 10 – Plantas recolhidas das diferentes amostras provenientes de três viveiros totalizados para fornecer material vegetal para instalação no campo.

Quadro 11 – Resumo do número total e de tipos de isolados de fungos em cada parcela.

Quadro 12 – Número de diferentes tipos de fungos e total de isolados obtidos em cada amostra do substrato (S) testado, proveniente do viveiro.

Quadro 13 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra da raiz (R) testada, proveniente do viveiro.

Quadro 14 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra do caule (C) testado, proveniente do viveiro.

Quadro 15 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra da folha (F) testada, proveniente do viveiro.

Quadro 16 – Número total de isolados de fungos distribuídos pelas diversas partes das plantas sintomáticas testadas consoante a sua região e parcela.

Quadro 17 - Comparação do número total de isolados de fungos, provenientes das plantas sintomáticas, por parcela tendo como base os sistemas de rega utilizados.

Quadro 18 - Resumo do número total e dos tipos de isolados de fungos em cada parcela, provenientes das amostras de água de rega.

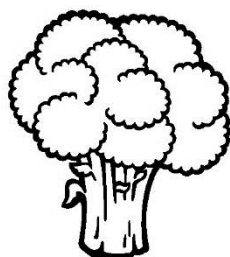
Quadro 19 - Número total de isolados de fungos e os seus respetivos números de identificação consoante a parte da planta sintomática analisada, associados a cada parcela e região.

Quadro 20 - Identificação molecular de isolados de fungos das plantas sintomáticas provenientes do campo.

Quadro 21 - Resultados das sequências nucleóticas do género da *Alternaria* quando submetidas ao BLAST.

Quadro 22 - Resultados das sequências nucleóticas do género do *Fusarium* quando submetidas ao BLAST.

Quadro 23 – Diversidade de fungos resultantes das sequências nucleóticas dos isolados de fungos quando submetidas ao BLAST.



1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação e Relevância do Estudo

Atualmente, a nossa sociedade está a mudar a sua mentalidade no que toca à sua alimentação, porque se encontra a optar por hábitos de vida e alimentação mais saudáveis, abdicando de alguns alimentos prejudiciais para a saúde, como por exemplo os refrigerantes, carne vermelha e sal.

Estas mudanças de mentalidade provocam também mudanças no papel desempenhado pelos agricultores, pondo à prova a sua capacidade de satisfazer em quantidade e em qualidade o consumidor final, levando-os assim a produzir mais hortaliças, legumes frescos e vegetais. À produção agrícola são cada vez impostos mais parâmetros de qualidade que têm como consequência uma menor utilização de produtos fitofarmacêuticos, beneficiando a saúde dos consumidores.

Uma das culturas que está a ganhar importância na alimentação é a couve-brócolo, que pertence à família das Brássicas, devido às suas propriedades nutricionais, entre elas as anticancerígenas. Esta cultura tem demonstrado um aumento significativo na agricultura nacional, com cada vez mais hectares a serem plantados (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

É com base neste contexto que este trabalho reporta à identificação de diversas doenças que possam prejudicar a qualidade e a produção da cultura da couve-brócolo.

Neste sentido, propôs-se com este trabalho, verificar quais as doenças prejudiciais a nível de produção em duas regiões diferentes do nosso País, Ribatejo e Alentejo. Sabia-se, como ponto de partida, que as perdas de produção eram bastante diferentes nestas duas regiões, destacando-se o Ribatejo, onde as perdas eram consideravelmente maiores. Sendo estas duas regiões distintas em termos de condições edafo-climáticas, esta distinção irá dar uma perspetiva de como é que as doenças se comportam em diferentes ambientes e se nestes iremos ter as mesmas doenças a afetar a cultura.

1.2 Problema e Questões do Estudo

O estudo das principais doenças que afetam a cultura da couve-brócolo e o relacionamento das mesmas com as condições edafo-climáticas das regiões do Ribatejo e do Alentejo representam o problema a estudar. Este será dirigido para as doenças presentes, o seu “grau” de incidência em condições edafo-climáticas diferentes e a que nível este afeta a cultura da couve-brócolo.

Entendemos por “grau” de incidência, a maior ou menor ocorrência de uma doença que esteja a prejudicar a cultura, consoante as condições favoráveis para o seu aparecimento e desenvolvimento.

Constitui o objetivo deste estudo, tentar compreender e interpretar como em condições edafo-climáticas diferentes, do Ribatejo (distrito de Santarém) e Alentejo (distrito de Beja), as doenças se comportam, ou seja, como surge o seu aparecimento e como se dá o seu desenvolvimento, permitindo assim controlar ou prevenir as mesmas e analisar se haverá ou não outros fatores que influenciem o aparecimento das doenças causadoras de perdas económicas na cultura da couve-brócolo.

Assim, definiram-se as seguintes questões deste estudo:

1. Quais os patogénios causadores de doença que se encontram presentes nas couve-brócolos, em cada região?
2. Terão esses patogénios relação com as condições edafo-climáticas das duas diferentes regiões deste estudo?
3. Será que outros fatores de produção poderão ter influência no aparecimento destas doenças?

No entanto, a questão orientadora de todo este trabalho é: Quais serão as doenças causadoras de perdas económicas da cultura da couve-brócolo em duas importantes regiões produtoras desta cultura, com características edafo-climáticas diferentes?

1.3 Organização do Trabalho

Este trabalho divide-se em 8 capítulos, sendo estes antecedidos pelo resumo do trabalho em Português e em Inglês, o índice geral do trabalho, o índice de Figuras e o índice de Quadros.

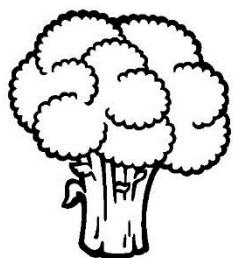
O primeiro capítulo será a introdução, estando dividido em três sub-capítulos: a apresentação e relevância do estudo, o problema e questões do estudo, e a organização do trabalho. No primeiro sub-capítulo, explicam-se as razões da escolha do tema, no segundo sub-capítulo o objetivo do estudo, bem como as questões que orientaram o mesmo e no terceiro sub-capítulo o modo como o trabalho se encontra organizado.

O segundo capítulo, a Revisão Bibliográfica, encontra-se dividido em 4 sub-capítulos. Nestes sub-capítulos abordam-se vários temas, tais como; a cultura das brássicas e da couve-brócolo a nível mundial e nacional, uma breve caracterização da cultura, neste caso, da couve-brócolo, as condições climáticas, do Ribatejo e do Alentejo, mais propriamente do distrito de Santarém e de Beja e a apresentação e descrição das principais doenças causadas por Bactérias, Fungos, Pseudo-Fungos e Protistas, associadas à família das Brássicas.

No capítulo três, os Materiais e Métodos, que se encontra dividido em 10 sub-capítulos descrevem-se; os diversos procedimentos realizados durante este trabalho, a apresentação das diversas parcelas donde se recolheu todo o material de estudo, as operações culturais que decorreram nas mesmas e os sistemas de rega utilizados e as técnicas laboratoriais utilizadas.

O quinto capítulo, Discussão e Conclusão, é dedicado à explanação dos resultados obtidos e à discussão dos mesmos.

As Referências bibliográficas e os Anexos finalizam esta dissertação.



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família das Brássicas

As brássicas pertencem, taxonomicamente à família *Brassicaceae* (= *Cruciferae*), ordem Cappareales (Quadro 1). Esta família é composta aproximadamente por 350 géneros e 3500 espécies onde se incluem muitas espécies com interesse agronómico, mas também muitas espécies consideradas infestantes (Almeida, 2013; Rimmer, Shattuck & Buchwaldt, 2007).

Quadro 1 - Enquadramento taxonómico da família das Brassicáceas (Fonte: Almeida, 2013).

Reino	<i>Plantae</i>
Sub-reino	<i>Tracheobionta</i> (Plantas Vasculares)
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i> (Plantas com sementes)
Divisão	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospérmicas)
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclasse	<i>Dilleniidae</i>
Ordem	<i>Capparales</i>
Família	<i>Brassicaceae</i> (sin. <i>Cruciferae</i>)

As brássicas são um grupo extraordinariamente diverso de tipos de plantas que são amplamente cultivadas em todo o mundo, como plantações de hortaliças ou de raízes, para a produção de óleo vegetal, como forragem para a alimentação animal e como condimentos e especiarias. Estas são espécies cosmopolitas, particularmente abundantes nas regiões do Mediterrâneo, sudoeste da Ásia, Ásia Central e Costa Ocidental da América do Norte (Almeida, 2013; Rimmer *et al.*, 2007).

Segundo Almeida (2013), as brássicas estão entre as principais culturas hortícolas a nível mundial, julgando pela área, volume de produção e pelo consumo. Esta afirmação é confirmada pela FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division) (Figura 1), que também demonstra que as brássicas aumentaram a sua produção e área, entre os anos de 2012 e 2014, como se pode observar na Figura 2.

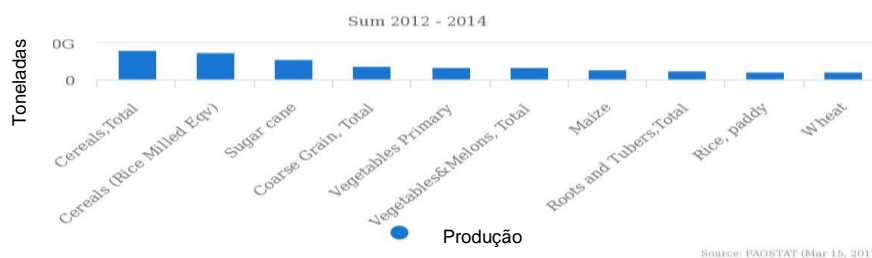


Figura 1 - Principais culturas a nível Mundial (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

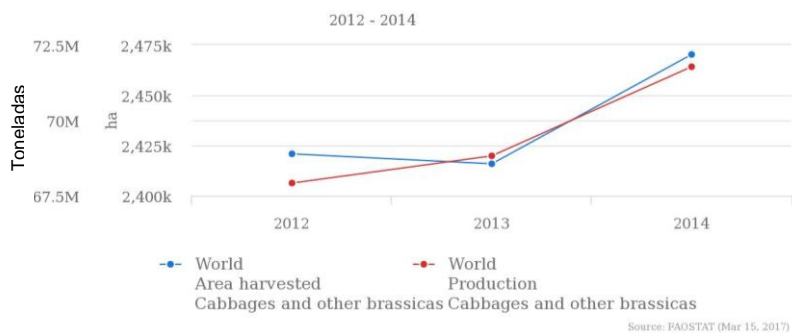


Figura 2 - Produção total da quantidade de couves e outras brássicas a nível Mundial (Fonte: FAOSTAT, 2017).

Nos gráficos das Figuras 3 e 4, podemos observar que na China e na Europa Ocidental, existe uma maior produção desta família de plantas, pois foram estes locais os seus centros de origem (Rimmer *et al.*, 2007).

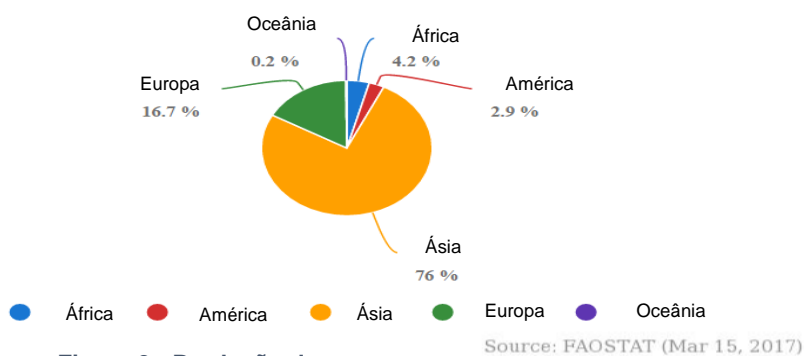


Figura 3 - Produção das couves e das outras brássicas por região a nível mundial (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

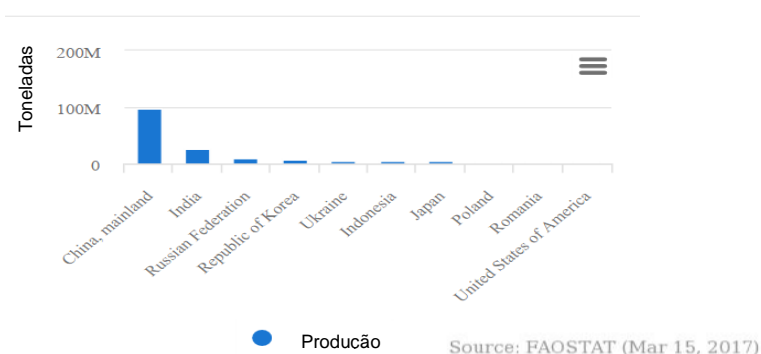


Figura 4 - TOP 10 de países na produção de couves e de outras brássicas (Fonte: FAOSTAT, 2017).

A maioria das brássicashortícolas são cultivadas para o aproveitamento de diversas zonas da planta, tais como, as folhas, inflorescências, algumas raízes comestíveis ou até mesmo das suas sementes (Almeida, 2013).

2.1.1. A cultura da couve-brócolo no mundo e em Portugal

No género das brássicas existem diversas hortícolas que começam a ganhar popularidade devido a certos componentes presentes nas próprias culturas, como é o caso da couve-brócolo (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) ou, alternativamente, também surge com a designação *B. oleracea* var. *botrytis* f. *cymosa* (Almeida, 2013).

No início do século XIX, a plantação da couve-brócolo teve início na Europa, mais propriamente em Itália. Mas, apenas na segunda metade do século XX estas se tornaram populares fora de Itália, expandindo-se para os EUA e só depois se estenderam para os restantes países Europeus (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

Segundo Schiavon *et al.*, (2015) o grande impulso que a cultura da couve-brócolo adquiriu nos últimos anos, quer pela sua importância económica, quer das suas propriedades nutricionais e quer pelo teor de compostos relacionados com a saúde, fez com que atualmente a superfície plantada mundialmente supere 1 milhão de hectares e a produção ultrapasse as 19 milhões de toneladas por ano.

Apesar da sua atual popularidade, a cultura da couve-brócolo é uma cultura relativamente recente em Portugal, tendo-se desenvolvido a partir da década de 70 do século XX, com alguma expressão no mercado nacional de hortícolas devido às duas principais vertentes, para o consumo em fresco e para o consumo em indústria (Almeida, 2013). No entanto, e apesar do que foi dito, pode verificar-se uma tendência decrescente tanto na área de cultura, como na produção total em Portugal (Figuras 5 e 6).

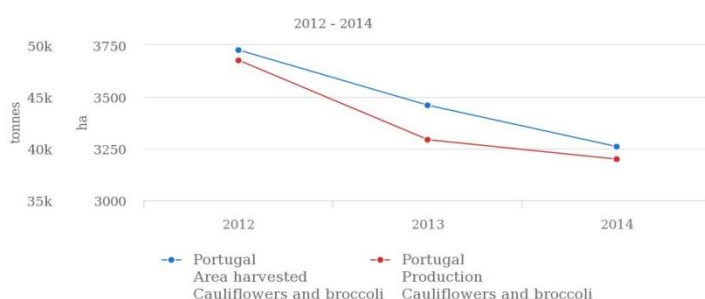


Figura 11 - Produção total de couve-flor e couve-brócolo em Portugal (Fonte: FAOSTAT, 2017).

Portugal		Superfície			Produção		
Culturas	Anos	2013	2014	2015	2013	2014	2015
		ha			t		
Culturas hortícolas							
Couve-brócolo		2 826	2 544	2 061	27 703	24 975	33 579

Figura 6 - Superfície e produção da couve-brócolo em Portugal (Adaptado de Estatísticas Agrícolas, 2015).

A cultura da couve-brócolo, tal como muitas outras é prejudicada com a elevada incidência de doenças e pragas, que por sua vez comprometem a qualidade, a quantidade e por consequência o rendimento final da cultura. Segundo Agrios (2005), as doenças das plantas são, por vezes, agrupadas de acordo com os sintomas que causam, tais como podridão das raízes, murchidões, manchas foliares, míldios, ferrugens e carvões e de acordo com quais os órgãos vegetais que afetam, ou seja, se são doenças das raízes, doenças dos troncos ou doenças da folhagem (Figura 7).

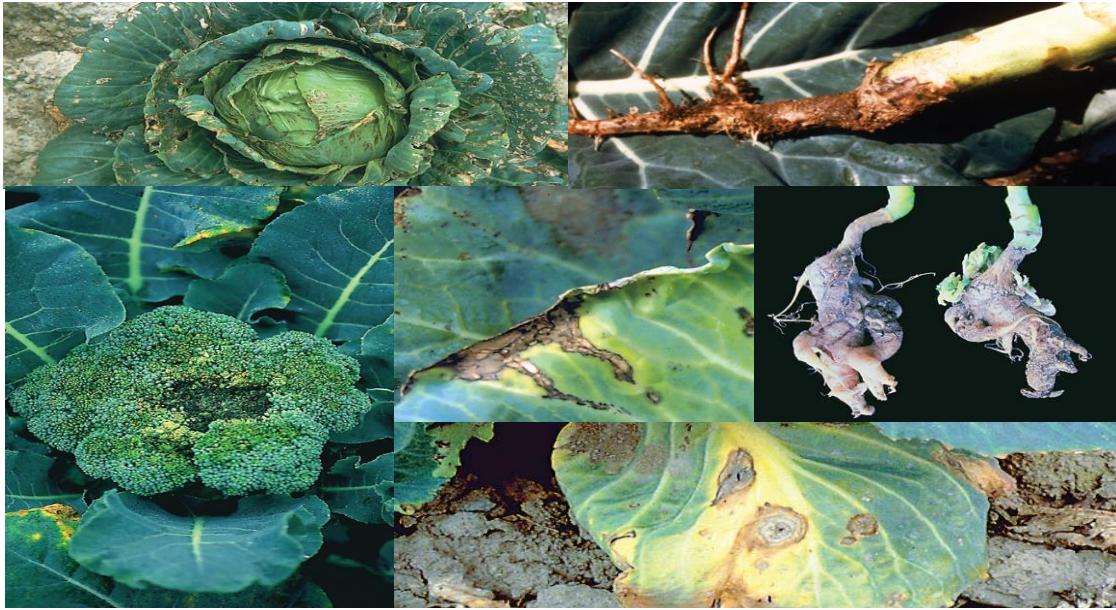


Figura 7 – Sintomas gerais de algumas doenças provocadas por Bactérias, Protistas, Fungos e Pseudo-fungos na cultura da couve-brócolo (Fonte: Conn, Rosenberger, Gabor, Kao & Krause, 2013).

2.2. Condições climáticas do Ribatejo e do Alentejo

Segundo Shahidian *et al.*, (2012) o clima de uma região ou local é o conjunto das condições meteorológicas predominantes na mesma durante um longo intervalo de tempo, com uma duração mínima de 3 décadas.

Para a caracterização do clima, seguiu-se a classificação de Köppen, por esta ser uma classificação empírica, amplamente difundida e conhecida mundialmente (Shahidian *et al.*, 2012).

A classificação de Köppen utiliza um sistema de letras (A-E, na sequência como se apresentam a partir do equador em direção aos pólos) para diferenciar as principais zonas ou tipos climáticos, recorrendo às iniciais de algumas palavras que descrevem a condição climática (em alemão) para definir os subtipos climáticos. Os cinco tipos climáticos principais são designados por uma letra maiúscula e são delimitados com base no ciclo anual das temperaturas médias mensais do ar (climas A, C, D e E) ou na importância relativa entre evapotranspiração e precipitação anuais (clima B); os 12 subtipos climáticos, subdivisões dos 5 tipos climáticos principais, designam-se por uma letra minúscula (correspondente ao tipo climático principal) e por uma letra minúscula que diferencia climas com base na sazonalidade da precipitação (climas A, C e D), no grau de secura (clima B) ou na temperatura do mês mais quente (clima E) (Shahidian *et al.*, 2012).

Neste ponto só nos interessa falar de um tipo de clima, o clima Cs, Clima de Portugal Continental, e que é caracterizado por ser um clima temperado com verão seco. O mês mais seco (de verão) apresenta uma precipitação inferior a 30 mm, que corresponde a 1/3 da precipitação do mês mais húmido (de inverno) (Shahidian *et al.*, 2012). Sendo o estudo deste trabalho realizado nas regiões do Ribatejo e Alentejo (Figura 8), o clima irá ser Csa (Mediterrânico ou subtropical seco).

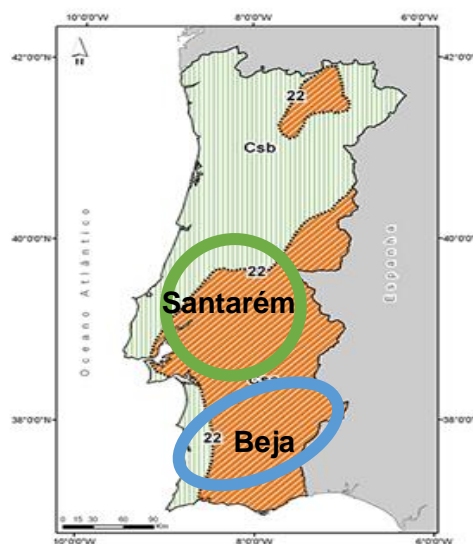


Figura 8 - Clima de Portugal Continental, segundo a classificação de Köppen, com os distritos de Santarém (verde) e Beja (azul) assinalados (Fonte: IPMA, 2017).

Este clima (Csa) é caracterizado por; a temperatura média do mês mais frio estar compreendida entre os -3°C e 18°C, a temperatura média do mês mais quente ser igual ou superior 22°C, as estações de verão e inverno encontrarem-se bem definidas e o mês mais seco do Verão ter uma precipitação inferior a 30 mm, o que corresponde a 1/3 da precipitação do mês mais húmido de Inverno (sem autor; Shahidian *et al.*, 2012).

No Quadro 2 apresenta-se o resumo das médias de temperaturas máximas e mínimas absolutas e da precipitação das duas regiões, Ribatejo e Alentejo, que posteriormente se irá utilizar para responder a algumas questões orientadoras deste trabalho.

Quadro 2 - Comparação das duas regiões em estudo, Ribatejo e Alentejo, relativamente às temperaturas e precipitações durante todo o ano agrícola durante os anos de 1931 e 1960 (Adaptado de Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Meses	Média da temperatura mínima absoluta nas regiões (°C)		Média da temperatura máxima absoluta nas regiões (°C)		Precipitação total (milímetros)	
	Santarém	Beja	Santarém	Beja	Santarém	Beja
janeiro	-4,5	-3,6	20,5	20,3	96,3	72,3
fevereiro	-4,5	-5,5	25,0	24,1	69,6	53,3
março	-1,0	-1,5	29,4	27,0	106,9	90,3
abril	2,2	0,5	33,0	33,2	57,2	50,5
maio	4,5	2,9	36,5	36,5	44,7	38,4
junho	5,4	6,2	41,0	39,9	23,7	15,4
julho	9,5	8,8	45,3	43,2	4,0	1,6
agosto	8,5	10,0	42,4	41,8	4,4	2,0
setembro	7,5	6,6	39,4	37,9	53,1	21,0
outubro	3,0	4,8	36,0	35,3	63,6	50,9
novembro	-1,0	-3,0	27,5	27,9	89,2	68,6
dezembro	-3,5	-2,1	21,8	21,5	97,4	85,4
				Total	710,1	549,7

Apesar de se comparar as condições climáticas destas duas regiões, entre os anos de 1931 e 1960, para as distinguirmos entre si, verificou-se ser da máxima relevância comparar as condições climáticas que ocorreram durante o ciclo de cultura da couve-brócolo, ou seja, entre os meses de agosto a fevereiro, para posterior comparação à maior ou menor incidência das doenças causadoras das perdas económicas da cultura da couve-brócolo (Quadro 3).

Quadro 3 - Comparação das duas regiões em estudo, Ribatejo e Alentejo, relativamente às temperaturas e precipitações durante todo o ciclo de cultura da couve-brócolo durante os anos de 2016 e 2017 (Adaptado do IPMA, Boletins Meteorológicos entre os anos de 2016 e 2017).

Meses	Ano	Média da temperatura mínima absoluta nas regiões (°C)		Média da temperatura máxima absoluta nas regiões (°C)		Precipitação total (milímetros)		
		Santarém	Beja	Santarém	Beja	Santarém	Beja	
agosto	2016	17,0	17,2	34,3	35,7	0,0	0,0	
setembro	2016	15,4	16,0	31,7	31,9	18,8	13,3	
outubro	2016	13,2	12,9	26,5	25,3	36,5	79,6	
novembro	2016	9,2	8,4	19,7	18,0	70,6	82,4	
dezembro	2016	7,4	7,1	17,1	16,0	93,7	81,1	
janeiro	2017	4,8	4,3	15,0	13,9	93,5	65,3	
fevereiro	2017	8,2	7,3	17,8	16,0	35,8	61,2	
						Total	348,9	382,9

2.3. Cultura da couve-brócolo

2.3.1 Caracterização da couve-brócolo

Tal como as restantes brássicas, as couves-brócolo são uma planta bienal e são uma hortaliça cultivada pela sua inflorescência, designada por “cabeça”, que se comercializa em fresco ou congelada (Almeida, 2013).

Segundo Schiavon *et al.*, (2015) a couve-brócolo é uma planta com elevada semelhança à couve-flor no que toca à sua constituição botânica. Assim, e comparativamente, a couve-brócolo possui; um caule relativamente mais longo, folhas de nervuras menos salientes, pedúnculos compridos e mais distanciados e tem a inflorescência central menos compacta, de colorações que variam do verde ao azulado, com emissão de numerosos rebentos nas axilas das folhas, que terminam em capítulos de flores imperfeitas. Os ápices florais são constituídos de botões com pétalas de coloração amarelada, separadas em 4. Os estames são organizados em 6 longos segmentos. O pistilo é comprido com um estigma esférico. O fruto é denominado síliqua, de formato alongado, que, no seu interior, possui um septo onde estão localizadas as sementes, de formato redondo e de coloração escura, em ambas as faces.

Quanto ao cultivo da couve-brócolo e tendo em conta a duração do seu ciclo cultural e a sua época de colheita podem-se considerar 3 ciclos distintos; a couve-brócolo de ciclo curto e colheita outonal (colhem-se cerca de 1,5 a 3 meses após a plantação), de ciclo médio e colheita de outono-inverno (colhem-se cerca de 3 a 4 meses após a plantação) e de ciclo longo e colheita entre meados do inverno e início da primavera (colhem-se cerca de 4 a 6 meses após a plantação) (Almeida, 2013).

Quando se referem as cultivares de couve-brócolo para o cultivo podemos estar na presença de 5 (Quadro 4).

Quadro 4 – Cultivares de couve-brócolo utilizadas para o cultivo em fresco e industrial (Adaptado do Catálogo Nacional de Variedades, 2016).

Couve-brócolo		
<i>Brassica oleracea</i> L.		
<u>Denominação</u>	<u>Tipo</u>	<u>Ano de inscrição</u>
Atacama	Híbrido	2013
Belverde	Híbrido	2010
Greenbow	Híbrido	2013
Hagen	Híbrido	2013
Sonora	Híbrido	2013

2.3.2 Desenvolvimento e exigências ambientais

Segundo Almeida (2013), o ciclo cultural da couve-brócolo passa por diferentes fases: 1) juvenil; 2) indução floral; 3) formação da cabeça; e fase 4) floração e frutificação. Durante a fase juvenil, o meristema apical apenas origina folhas, sendo a temperatura ótima para esta fase de 25°C e temperaturas superiores a 30°C podem retardar a indução floral. O número de folhas formado durante a fase juvenil é determinante para o calibre da cabeça. Quando a fase juvenil termina, começa a fase de indução floral, que irá ser relevante para a fase que se lhe segue, a formação da cabeça, adquirindo a capacidade de diferenciar flores em resposta às baixas temperaturas. A diferenciação floral depende exclusivamente da vernalização e não é influenciada pelo fotoperíodo. As temperaturas ótimas para vernalizar a couve-brócolo variam com a cultivar e vão de 6°C a 15°C. Temperaturas inferiores a estas prolongam a fase de indução floral (fase mais lenta).

A fase da formação da “cabeça” é a fase mais relevante da cultura, porque é a cabeça da couve-brócolo que atribui valor económico a esta.

Após a vernalização, o meristema apical do caule diferencia-se numa inflorescência de cor verde. Se a inflorescência principal for cortada, a planta produz inflorescências secundárias, de menor calibre na axila das folhas. Esta fase é caracterizada por um reduzido crescimento de folhas e as já diferenciadas crescem pouco e formam brácteas na inflorescência (Almeida, 2013).

2.3.3 Exigências edafo-climáticas

As couves-brócolo são uma cultura de estação fresca tolerante à geada embora seja tendencialmente mais tolerante a temperaturas extremas. Características como o tamanho e qualidade da inflorescência, produtividade e duração do ciclo são diretamente influenciadas por variações de temperaturas máximas e mínimas (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

A melhor qualidade é obtida quando o ciclo cultural decorre com temperaturas médias entre os 13°C e os 20°C (Almeida, 2013). Mas, Schiavon *et al.*, (2015) refere que as couves-brócolo podem iniciar o desenvolvimento dos seus primórdios florais sob temperaturas relativamente altas, contudo, estas temperaturas aumentam a possibilidade de ocorrerem desordens fisiológicas e suscetibilidade a doenças. Ambos os autores referenciam que temperaturas acima dos 25°C e durante períodos prolongados podem retardar a formação das inflorescências na fase de crescimento vegetativo e o grau de compactação da cabeça é mais reduzido.

Schiavon *et al.*, (2015) afirma que plantas com a sua inflorescência em formação ao passarem por estes períodos de temperaturas elevadas podem reverter a indução da fase reprodutiva para o crescimento vegetativo. Assim, o tamanho das inflorescências poderá ficar reduzido, formando botões florais com tamanhos desiguais e originando o desenvolvimento de folhas ou brácteas nos pedúnculos florais. Por outro lado, Almeida (2013) complementa que abaixo dos 5°C, o crescimento da inflorescência é muito lento.

Para concluir as exigências climáticas desta cultura, Schiavon *et al.*, (2015) refere que em condições de *stress*, tais como, uma exposição prolongada a temperaturas abaixo dos 10°C, défice hídrico e solos com baixa fertilidade na fase inicial do desenvolvimento da planta, podem conduzir a um florescimento precoce, designado de 'buttoning'.

Quanto às preferências edáficas desta cultura, esta prefere solos ricos em matéria orgânica, com uma boa capacidade de armazenamento de água e solos com uma textura ligeira que se adaptam melhor à cultura de inverno (Almeida, 2013).

A couve-brócolo é uma cultura moderadamente sensível à salinidade e à acidez do solo, por aumentar a sua suscetibilidade a *Plasmodiophora brassicae*, conhecida por causar a doença Clubroot, em solos ácidos do que propriamente por causa da sua fisiologia. O pH ótimo para o desenvolvimento desta cultura oscila entre os 6,5 e 7,0. Quando em presença de valores de pH inferiores, podem registarem-se carências de molibdênio (Mb). Por outro lado quando são valores de pH mais elevados, estes levam a um aumento as carências nutricionais, especialmente de elementos como manganês (Mn) e boro (B) (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

2.3.4 Tecnologia de produção

Segundo Almeida (2013) e Schiavon *et al.*, (2015) a cultura instala-se por transplantação, normalmente utilizando camalhões, como é o caso dos campos do Ribatejo, principalmente quando esta se destina à indústria. Em cada camalhão plantam-se duas linhas entre os 50 cm e os 55 cm na entrelinha e 50 cm de compasso. A armação em camalhões tem como principais objetivos; facilitar a colheita, melhorar o controlo das infestantes na entrelinha e principalmente reduzir algumas das doenças devido a uma menor concentração de humidade no caule e raízes das plantas.

As densidades de plantação da cultura horto-industrial variam entre as 27 000 plantas.ha⁻¹ e 33 000 plantas.ha⁻¹. Na cultura para o produto fresco, as entrelinhas são normalmente de 60 cm a 70 cm e o compasso entre os 40 cm e os 50 cm (Almeida,

2013), estando assim de acordo com Schiavon *et al.*, (2015), quando este refere que espaçamentos maiores fazem com que as plantas se desenvolvam mais facilmente.

Almeida (2013) refere que as couves-brócolo são uma cultura exigente em fertilidade do solo e por esta razão deve-se ter a máxima atenção neste componente. No entanto, o excesso de N (azoto) promove um desenvolvimento foliar excessivo e por sua vez, prejudica a qualidade das “cabeças”, porque apesar das folhas protegerem a “cabeça” numa fase inicial do seu desenvolvimento, se estas tiverem um desenvolvimento excessivo quando a “cabeça” aumenta de calibre esta não irá ficar exposta ou ficará com um calibre inferior e conseqüentemente não será comercializada. Por outro lado, quando há excesso de azoto podemos retardar a formação da “cabeça” e favorecer a ocorrência de caules ocos. Esta cultura é muito exigente em K (Potássio) e em S (Enxofre) mas é sensível às carências de B, provocando também a sintomatologia de caules ocos, e de Mg (Magnésio).

Almeida (2013) e Schiavon *et al.*, (2015) concordam que a cultura da couve-brócolo é exigente em água e requer humidade no solo para uma obtenção de maior produtividade e qualidade, principalmente na fase intermédia (formação da inflorescência) e na fase final do ciclo cultural.

Schiavon *et al.*, (2015) afirma que se houver *stress* hídrico durante o ciclo cultural, este irá afetar diversos processos fisiológicos. Por outro lado se houver humidade excessiva no solo pode causar; queda da inflorescência, a formação de caule oco e potenciar o aparecimento de doenças oriundas do solo. Para não haver *stress* hídrico, principalmente nos meses com maiores taxas de evaporação, a rega deve ser mais frequente, principalmente na fase de formação das inflorescências. Esta cultura tem como principais sistemas de rega a rega por aspersão, rega de superfície (sulcos), a microaspersão e a rega gota-a-gota ou localizada.

Para termos uma rega controlada e de alta eficiência temos de nos basear nas necessidades hídricas da cultura. Esta é dada pela evapotranspiração, ou seja, pela perda de água do solo (evaporação) e da planta (transpiração) para a atmosfera. Esta perda tem que ser repostada, de modo que não haja comprometimento da produção. A partir da medição direta da evapotranspiração da cultura em condições de campo, nas diversas fases de desenvolvimento, os coeficientes da cultura (K_c) deverão ser determinados (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

2.3.5 Colheita e conservação

As inflorescências terminais colhem-se quando atingem o diâmetro máximo e quando ainda se apresentam compactas. A forma e a compactidade das couves-brócolo são um importante critério para determinar o momento certo para a colheita. Esta faz-se manualmente, com 2 a 4 passagens pela parcela devido à irregularidade da maturação das cabeças, nos horários mais frescos do dia e quando estas apresentam um estágio de desenvolvimento adequado. As condições do produto nesse período determinam o seu comportamento e sua qualidade final. No momento da colheita são necessários certos cuidados como o uso de embalagens adequadas, normalmente contentores plásticos limpos, desinfetados e que permitam o empilhamento, a fim de reduzir o contato com o solo e facilitar o transporte (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015). Após a colheita das inflorescências, o resto da cultura é incorporado no solo. Por vezes, deixa-se a planta produzir inflorescências resultantes de ramificações laterais, de menor calibre, sendo esta prática muito frequente na região do Ribatejo e Oeste (Almeida, 2013).

Segundo Schiavon *et al.*, (2015) para o mercado das couves-brócolo em fresco tem-se dado preferência às inflorescências do tipo única, de coloração verde-escura, compactas, de boa granulometria, com tamanho médio, de 300 g a 400 g de peso e diâmetros entre os 12 cm e os 15 cm. As indústrias processadoras preferem essas características, porém também podem utilizar inflorescências de maior peso e diâmetro.

As couves-brócolo são inflorescências climatéricas, com as taxas respiratórias mais elevadas, entre as diferentes hortaliças e perecibilidade muito elevada, exigindo assim maiores cuidados para manter a sua qualidade. Estas produzem muito pouco etileno, mas são muito sensíveis ao etileno exógeno, o que acelera o amarelecimento e provoca abscisão dos floretes. A inibição da ação do etileno tem um efeito muito vantajoso na conservação da qualidade das couves-brócolo a temperaturas entre os 5°C e os 10°C (Almeida, 2013).

Se o produto for transportado por longas distâncias para comercialização ou para processamento, deve ser arrefecido rapidamente após a colheita e, posteriormente, armazenado a temperaturas entre os 0°C e os 5°C e com uma humidade relativa de cerca de 95%. Estes valores são conseguidos com sistemas de arrefecimento rápidos através de gelo, água e ar forçado (Almeida, 2013; Schiavon *et al.*, 2015).

2.3.6 Inimigos da cultura

A couve-brócolo, tal como todas as culturas tem como seus inimigos as pragas, as doenças e as infestantes, podendo estas últimas fazer competição nutricional com a cultura.

Segundo Schiavon *et al.*, (2015), o período mais crítico para o controle das infestantes na cultura da couve-brócolo incide nas primeiras semanas após a transplantação, porque durante este período a planta tem de permanecer livre de competição pelos nutrientes, água e luz, o que lhe permitirá um bom desenvolvimento.

Almeida (2013) afirma que as pragas e doenças que afetam a cultura da couve-brócolo são os mesmos que afetam a couve-repolho. Assim, podemos dizer que as pragas que causam mais estragos nesta cultura são a mosca branca da couve (*Aleyrodes proletella*), a áltica (*Phyllotreta atra*) com níveis populacionais elevados, a mosca da couve (*Delia radicum*) e as lagartas, principalmente as que atacam as folhas e as inflorescências. Estas quando são atacadas pelas lagartas ficam inutilizadas porque não se consegue retirar as lagartas dentro das inflorescências destinadas ao mercado.

De entre as doenças mais importantes para esta cultura destacam-se a Potra, conhecida como Clubroot causada por *Plasmodiophora brassicae*, o Míldio das crucíferas, causado por *Peronospora parasitica* f. sp. *brassicae*, a Alternariose, causada por *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola* e/ou *Alternaria raphani* e a Podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que é a principal doença de etiologia bacteriana (Almeida, 2013).

2.4 Principais Doenças da Família das Brássicas

Segundo Agrios (2005), as doenças das plantas ocorrem em todas as partes do mundo onde estas crescem. As doenças nas plantas podem ter origem biótica ou abiótica. No caso das doenças bióticas, para que a doença ocorra, devem estar conjugados um conjunto de 3 fatores, que são o hospedeiro suscetível, o agente patogénico e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. Este conjunto de fatores compõem o triângulo da doença representado na Figura 9.

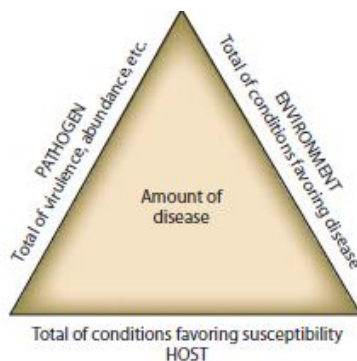


Figura 9 - Triângulo da doença que integra os 3 fatores que em conjunto provocam doença em plantas (Fonte: Agrios, 2005).

Este ponto irá focar as principais doenças da família das Brássicas, com duas divisões principais, uma em que se irá focar as doenças provocadas por Bactérias e outra as doenças provocadas por Pseudo-Fungos, Fungos e Protistas.

2.4.1 Doenças provocadas por Bactérias

a) PONTUADO BACTERIANO (BACTERIAL LEAF SPOT)

i. Sintomas

Os sintomas desta doença consistem em manchas foliares que começam como pequenas lesões circulares necróticas ou aguadas, na parte inferior das folhas externas, que são sempre mais seriamente afetadas que as internas. Cada lesão está associada a um estoma, que mais tarde constituem lesões que ficam com uma cor castanha escura ou roxa com halos cloróticos translúcidos (Figura 10. A). Muitas vezes, as lesões individuais coalescem para formar uma lesão angular irregular, dando uma aparência enrugada e irregular à folha. Quando as plantas são severamente

afetadas, as folhas podem tornar-se cloróticas e senescentes, podendo ocorrer a sua queda (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Em plantas dicotiledóneas as lesões bacterianas estão restringidas às nervuras principais, e têm um aspeto angular (Figura 10. B). Estas infeções limitam o crescimento, resultando numa folhagem enrugada. Pela mesma razão, as manchas bacterianas em plantas monocotiledóneas aparecem como estrias ou listras (Agrios,2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Na presença de condições de humidade, o tecido infetado muitas vezes liberta massas de bactérias que se espalham para novos tecidos ou para plantas para iniciar novas infeções. Inicialmente estes tecidos são firmes, mas podem tornar-se macios se invadidos por microorganismos secundários (Figura 10. C) (Agrios, 2005); Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).



Figura 10 – Folhas (A e B) e cabeça (C) com sintomas de Pontuado Bacteriano (Bacterial Leaf Spot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e ciclo de vida

O Pontuado Bacteriano é uma doença provocada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e que se encontra distribuída mundialmente. As perdas associadas a esta doença podem ser significativas em campos isolados, mas os surtos de doença ocorrem apenas ocasionalmente (Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Esta bactéria passa o inverno nas partes infetadas ou saudáveis, especialmente nos gomos, de plantas perenes, sobre ou em sementes (uma pequena percentagem de sementes afetadas é suficiente para originar uma epidemia no campo), em restos de plantas infetadas, em recipientes ou alfaias contaminadas, e sobre ou no solo, sobrevivendo neste pelo menos entre um a 3 anos (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Estas bactérias entram na folha através de estomas e/ou feridas (Figura 11). Uma vez dentro da folha, estas multiplicam-se intercelularmente a uma taxa rápida secretando toxinas, espalham-se radialmente a partir do ponto de infeção o que resulta na formação do halo clorótico, descrito nos sintomas (ponto i), consistindo numa zona de células livres de bactérias que rodeiam o local que contém as mesmas. A propagação desta doença dá-se principalmente devido aos salpicos de chuva, vento, à água de rega e durante o manuseamento das plantas. Os insetos, tais como besouros, pulgões e moscas brancas também podem disseminar esta doença (Agrios, 2005; Conn *et al*, 2013; Howard *et al*, 1994).

As condições favoráveis para o aparecimento e desenvolvimento da doença são as condições frescas e húmidas e a formação de um filme de humidade nas folhas durante longos períodos, devido à precipitação ou regas muitos frequentes combinado com a temperatura ótima de cerca de 24°C. Assim, as lesões são evidentes dentro de dois a 3 dias, podendo ser invadidas por bactérias saprófitas e fungos, que desintegram ainda mais os tecidos. Por outro lado, com uma temperatura superior a 30°C esta bactéria para o seu desenvolvimento (Agrios, 2005; Conn *et al*, 2013; Howard *et al*, 1994).

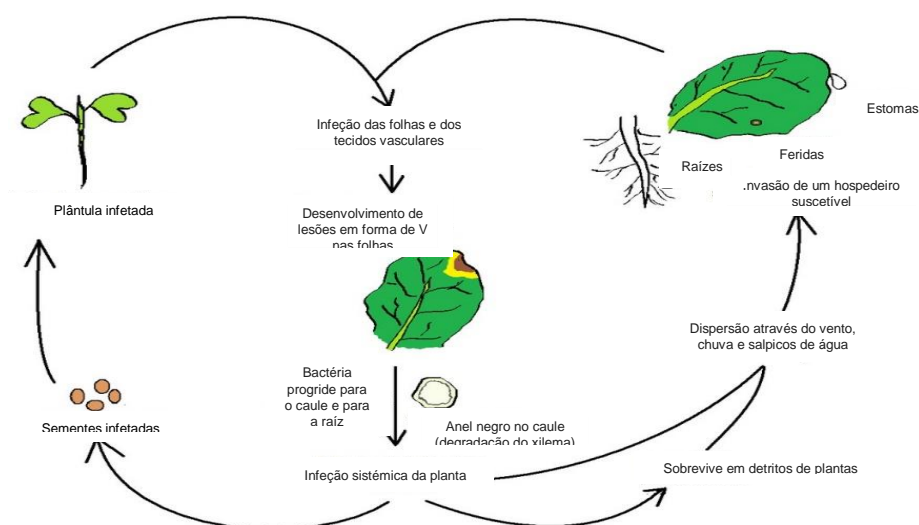


Figura 11 - Ciclo da doença de **Pontuado Bacteriano**, causado por *Pseudomonas syringae* (Adaptado de <https://en.wikipedia.org>, 2017).

iii. Controlo da doença

Para o controlo desta doença podemos recorrer a diferentes maneiras de a combater ou prevenir, as mais correntemente utilizadas são: a) utilizar sementes livres de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* que são tratadas com água quente; b) operações culturais como a rotação de culturas, só voltar a instalar brássicas

respeitando o período de recorrência de 3 anos no campo; c) incorporação dos resíduos das culturas no solo o mais cedo possível após a colheita, o que ajuda a destruir o patógeno e reduz a possibilidade do aparecimento da doença. Esta última prática é especialmente importante quando não se pratica a rotação de culturas; d) recorrer a produtos químicos homologados em proteção integrada (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

b) PODRIDÃO NEGRA (BLACK ROT)

Esta doença é causada por bactérias do género *Xanthomonas*. Howard *et al.*, (1994) e Tom Kucharek & Jim Strandberg (2000) referem que a doença se encontra distribuída mundialmente e geralmente ocorre, anualmente, na maioria das regiões produtoras de brássicas, sendo estas muito suscetíveis à doença. Relativamente às perdas de rendimento e qualidade estas podem ser elevadas.

i. Sintomas

Esta doença pode aparecer nas plantas em qualquer fase do seu crescimento. Quando nos referimos a plântulas, as margens dos cotilédones ficam pretas e podem acabar por cair. Ao passarem a ter folhas verdadeiras, os sintomas aparecem ao longo das margens destas como lesões cloróticas, em forma de V, tendo a sua base dirigida ao longo de uma nervura (Figura 12. A). À medida que a lesão se expande o tecido das próprias nervuras torna-se necrótico e seco, prejudicando assim o fluxo normal de água e nutrientes (Figura 12. B). Por vezes podemos não ter as formas em V evidentes na planta, mas está presente um amarelecimento difuso das folhas ou um escurecimento das mesmas, mas o escurecimento das nervuras está quase sempre presente (Figura 12. C). Quando nos deparamos com plantas severamente afetadas estas podem perder folhas (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Tom Kucharek & Jim Strandberg, 2000).



Figura 12 – Folhas (A e C) e caules (B) com sintomas de Podridão Negra (Black Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Esta bactéria como é um invasor vascular consegue mover-se sistemicamente por toda a planta, qualquer que seja o ponto inicial de infecção, originando lesões amarelas dispersas nas folhas ou em qualquer lugar da planta. As infecções por Podridão Negra podem servir como portas de entrada para outras podridões, como por exemplo podridões moles que reduzem ainda mais a qualidade e a vida de armazenamento do produto (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Tom Kucharek & Jim Strandberg, 2000).

ii. Agente causal e ciclo de vida

A Podridão Negra é uma doença causada pelo agente causal *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. A bactéria produz um polissacarídeo mucilaginoso extracelular, que é responsável por invadir o tecido do xilema e interromper o fluxo de água e nutrientes (Howard *et al.*, 1994).

Esta bactéria sobrevive em sementes, que é a fonte mais importante de inóculo para a infecção das plântulas, sendo que ao termos 3 sementes infetadas no solo podemos ter uma epidemia no campo. Esta também pode sobreviver em resíduos de culturas de brássicas no campo, que não foram completamente decompostos, durante dois anos e consegue também sobreviver no solo cerca de 40 a 60 dias (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Tom Kucharek & Jim Strandberg, 2000).

Nas plantas recém-emergidas, as bactérias de Podridão Negra entram nos estomas ao longo da margem dos cotilédones migrando intercelularmente até que alcançam os feixes do xilema e desse ponto disseminam-se pela planta. Nas folhas verdadeiras, as bactérias entram na planta através de hidátodos, estando estes localizados nas extremidades das nervuras ao longo das margens das folhas e de lá espalham-se por toda a planta. Por outro lado, as bactérias também infetam as folhas verdadeiras através dos estomas quando estas são submetidas a chuvas intensas ou à rega. Apesar do patogénio entrar nas plantas através de estomas, este também pode entrar através de feridas naturais no sistema radicular durante os períodos de saturação de água no solo e através de feridas causadas por ações mecânicas, como a ação das alfaias no campo (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Tom Kucharek & Jim Strandberg, 2000).

Estas bactérias têm um ótimo de temperatura entre os 27°C e os 30°C e sob estas condições os sintomas podem aparecer nas plantas 10 a 12 dias após a infecção. Com temperaturas mais baixas, os sintomas desenvolvem-se mais lentamente, ou

podem mesmo não aparecer (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Tom Kucharek & Jim Strandberg, 2000).

iii. Controlo da doença

Para o controlo e prevenção desta doença pode-se recorrer a várias medidas, que incluem: operações culturais, utilização de produtos químicos e obtenção de certificação dos viveiros que são destinados ao fornecimento das plantas.

É primordial utilizar sementes ou plantas de alta qualidade livre do agente causal associado a esta doença. Se não conseguirmos confirmar se as nossas sementes estão livres de inóculo, podemos realizar diversas operações culturais, tais como: a) implementação de uma rotação de 3 anos para culturas não brássicas, para permitir que os detritos da cultura de brássicas anteriores se decomponham totalmente; b) plantar em solos bem drenados; c) utilizar práticas de irrigação que minimizam a humidade foliar e evitar o trabalho nos campos quando a folhagem está molhada; d) eliminar as infestantes que pertençam à família das crucíferas e que se encontrem perto dos campos de produção das plantas; e) realizar mobilizações de solos imediatamente após a colheita para que a decomposição do tecido vegetal se inicie o mais cedo possível; f) inspeção das plantas jovens regularmente para detetar o aparecimento desta doença precocemente. Se houver a confirmação da mesma, remover e destruir imediatamente a planta assim como aquelas que a cercam por uma distância de 3 a 5 pés; e desinfetar as alfaias e equipamentos usados quando há sintomas no campo (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Tom Kucharek e Jim Strandberg, 2000).

c) PODRIDÃO MOLE BACTERIANA (BACTERIAL SOFT ROT)

i. Sintomas

Os sintomas aparecem inicialmente após períodos de chuva, estes surgem primeiro nas folhas como pequenas lesões com aspecto de aguado. Em complemento a estes sintomas surgem pequenas lesões negras associadas aos estomas, que se encontram dentro das áreas inicialmente colonizadas e iniciam-se nas células guarda acabando por se espalhar para os tecidos circundantes. O tecido afetado torna-se castanho, mole e com um odor intenso, enquanto a sua superfície fica descorada e

com áreas em depressão. A deterioração do tecido desenvolve-se nos floretes afetados ou em floretes novos que estão associados a áreas de meristema da couve-brócolo (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Períodos de humidade contínua na cabeça da couve-brócolo faz com que a deterioração se espalhe mais rapidamente e extensivamente ao longo desta, originando áreas em depressão (Figura 13). Mas, a superfície externa da cabeça pode permanecer intacta enquanto o seu conteúdo fica numa espécie de líquido turvo (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).



Figura 13 – Cabeças com sintomas de Podridão Mole Bacteriana (Bacterial Soft Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Eventualmente, as folhas, os caules e as raízes podem decair inteiramente. As brássicas quando afetadas por esta doença quase sempre emitem um odor repulsivo. Quando se realiza a colheita de raízes, as partes mais baixas do caule também se podem tornar infetadas e aguadas, podendo ficar necróticas e com sintomas de murchidão (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

ii. Agente causal e ciclo de vida

A Podridão Mole Bacteriana é causada pelas *Pectobacterium* spp. (sinónimo: *Erwinia* spp.) e *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. Este tipo de podridão ocorre mais comumente nos tecidos carnudos dos vegetais e de plantas ornamentais anuais, como batatas, cenouras, cebolas e frutos carnudos, como pepino e tomate, ou hastes suculentas, talos ou folhas, como couve, alface, aipo e espinafre. Quase todos os legumes frescos estão sujeitos a podridões moles bacterianas, que podem desenvolver-se em poucas horas no armazenamento ou durante a comercialização, chegando as perdas a ultrapassar os 30% e podendo mesmo chegar aos 100% (Conn *et al.*, 2013).

Estas bactérias ao sobreviverem no solo acabam por degradar o material vegetal, porque infetam as plantas através de feridas, dos estomas ou até mesmo dos hidátodos. Quando este patogénio entra em feridas, ele multiplica-se através dos conteúdos celulares libertados pelas células lisadas. Consequentemente, a bactéria produz quantidades crescentes de enzimas pectolíticas que acabam por lisar as substâncias pécnicas e provocam a maceração dos tecidos (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Devido à elevada pressão osmótica do tecido macerado, a água das células difunde para os espaços intercelulares, fazendo com que as células colapsem e morram (Figura 14). As bactérias continuam a multiplicar-se provocando a maceração e o amolecimento dos tecidos afetados. As células, em primeiro lugar perdem o seu conteúdo citoplasmático levando depois à sua rápida morte e necrose dos tecidos afetados (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

As fontes de disseminação da doença são a precipitação, a água de rega e os insetos. Esta última fonte de disseminação é uma das mais importantes, porque as bactérias causadoras da Podridão Mole Bacteriana podem viver em todos os instares do inseto. Por outro lado, quando o patogénio é salpicado para as “cabeças” da couve-brócolo e estas permanecem molhadas por vários dias, as bactérias multiplicam-se e libertam um biossurfactante que reduz a tensão superficial da água na folha, permitindo assim a entrada das bactérias nos estomas e nos tecidos circundantes (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

O desenvolvimento desta doença é geralmente favorecido por condições de tempo quente, com temperaturas entre os 25°C e os 30°C mas o crescimento destas bactérias pode ocorrer lentamente se as temperaturas se encontrarem entre 1°C e 2°C (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

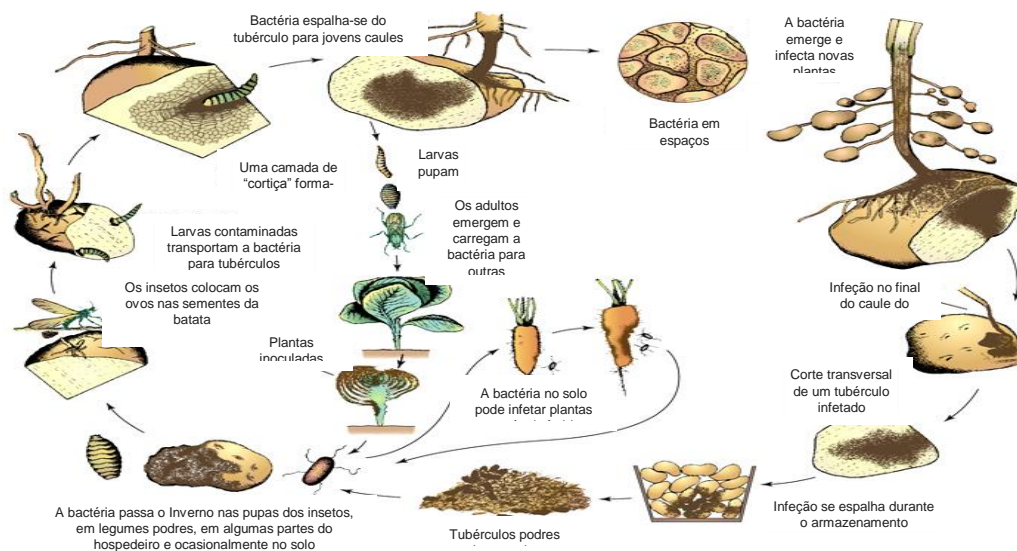


Figura 14 - Ciclo da doença de Podridão Mole Bacteriana, causado por *Pectobacterium* spp. e *Pseudomonas marginalis* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controlo da doença

A gestão desta doença baseia-se principalmente em práticas culturais, entre as quais; a) rotação de culturas com cereais ou outras culturas não suscetíveis; b) permitir que haja tempo suficiente para que os resíduos da cultura se decomponham antes da próxima plantação; c) drenagem dos solos para reduzir a humidade à superfície do mesmo; d) realizar a plantação respeitando o espaçamento para permitir uma ventilação e uma secagem mais rápida das folhas das plantas; e) evitar feridas nas plantas quando são realizadas as operações de colheita, embalagem e transporte e não embalar o produto quando molhado; f) controlo dos insetos que disseminam a doença e g) a utilização de cultivares que produzam cabeças acima da folhagem, porque secam mais rapidamente (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Nos cuidados de pós-colheita deve-se ter em especial atenção a temperatura de conservação, próxima dos 4°C, e manter os tecidos durante o armazenamento secos e frios (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

2.4.2 Doenças que afetam as brássicas provocadas por Protistas, Fungos e Pseudo-fungos

De entre todas as doenças que afetam as brássicas destacam-se o **Pé Negro** (**Black Leg**) que é causada pelo fungo *Leptosphaeria maculans*, tendo como forma anamorfa o *Phoma lingam*. Os primeiros sintomas desta doença são lesões de cor cinza nas folhas inferiores, estas aumentam gradualmente de tamanho acabando por secar e cair. Mas, o sintoma mais preocupante são as lesões no caule, na sua parte basal, que evoluem para cancrios. Estes ao ampliarem acabam por tornar o caule totalmente preto, causando o colapso da planta. Esta doença tem como forma de resistência as cleistotecas que contêm os ascos, onde são formados os esporos sexuados, os ascósporos. A sua fase assexuada é composta por conídios. Estes são responsáveis por infeções secundárias e os ascósporos são responsáveis pelas infeções primárias, sendo ambos disseminados pela água e pelo vento. Estas estruturas desenvolvem-se e germinam com temperaturas entre os 4°C e os 28°C (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

A **Podridão Negra** (**Black Root**) é causada pelo pseudo-fungo *Aphanomyces raphani*, este é caracterizado por ter zoósporos biflagelados, produzidos num zoosporângio e por ter os esporos sexuados que são os óosporos. Os sintomas desta doença manifestam-se nas raízes, nos caules, nos pecíolos e nos cotilédones, estes ficam negros e entram em senescência à medida que a doença se desenvolve. As lesões mais graves são as que se dão nas raízes, porque estas lesões negras ao crescerem juntas resultam em anéis apertados em torno da raiz diminuindo o seu crescimento, o que pode levar a deformidades. A podridão que se origina destas lesões é seca, mas à medida que a doença evolui os organismos responsáveis por podridões moles secundárias podem causar a desintegração da raiz. Dentro dos tecidos infetados, de plantas mais velhas ou mesmo em plantas sem sintomas, encontram-se os óosporos principalmente nos tecidos corticais das raízes. Ambos os constituintes das fases sexuadas ou assexuadas são disseminados principalmente pela água, desde salpicos de água ou água livre na superfície das plantas, e as temperaturas ótimas variam entre os 20°C e os 27°C (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

A **Ferrugem branca** (White Rust) ocorre em muitas plantas brássicas, mas as perdas correspondentes ao rendimento e à qualidade são pequenas. Esta doença é causada pelo fungo *Albugo candida* e este reproduz-se com o mesmo tipo de estruturas sexuadas e assexuadas que o pseudo-fungo causador de **Podridão Negra** (Black Root). Os sintomas que correspondem a infeções locais, manifestam-se como pontos cloróticos ou necróticos nas superfícies superiores das folhas. Posteriormente, formam-se pústulas sobre as superfícies abaxiais das folhas, nos caules e nas partes florais. Estas pústulas resultam de massas constituídas por esporângios, que se formam sob a epiderme das folhas e quando a rompem expõem uma espécie de pó branco. Os óosporos servem como o inóculo primário e os esporângios que são produzidos nas pústulas são disseminados pela chuva, vento e insetos para novos sítios de infeção. Esta doença é favorecida por condições de elevada humidade e temperaturas entre os 10°C e os 25°C (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

A **Mancha em anel** (Ring Spot) é uma doença causada pelo fungo *Mycosphaerella brassicicola*, tendo como fase anamorfa a *Astromella brassicae*. Os sintomas desta doença são evidentes em diversos órgãos da planta, tais como, as folhas, caules e frutos. As lesões presentes nos órgãos da planta manifestam-se como áreas húmidas, rodeadas por halos cloróticos, que são visíveis em ambas as superfícies foliares e nos caules. Quando estas se manifestam nas folhas, podem-se expandir até 2,5 cm de diâmetro, acabando por coalescer dando às folhas uma aparência amarelada. A principal fonte de inóculo desta doença são os restos de plantas infetadas, no entanto, a infeção durante o ciclo cultural faz-se por intermédio de ascósporos que penetram através dos estomas e são facilmente disseminados pelo vento. Este patógeno requer condições de elevada humidade e temperaturas entre os 15°C e os 21°C, para ter condições favoráveis ao seu desenvolvimento (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

A **Mancha Branca das Folhas** (White Leaf Spot) é uma doença causada pelo fungo *Pseudocercospora capsellae*, sendo a sua forma teleomórfica a *Mycosphaerella capsellae*. O sintoma principal desta doença e que lhe dá o nome são as lesões foliares com manchas de cor branca a escura com um diâmetro compreendido entre os 5 mm e os 10 mm. Quando estas lesões são numerosas, as folhas podem ficar amarelas, senescentes ou até mesmo causar-lhes a morte. Os ascósporos, quando a periteca se encontra com níveis elevados de humidade, são

libertados para o ar, espalhados pelo vento e pela chuva e são responsáveis pela disseminação da doença em longas distâncias. Por outro lado, os conídios são os meios mais importantes para uma disseminação local da doença, sendo disseminados através do vento e da água. Estes são libertados e germinam dependendo da humidade da folha. Este patogénio é geralmente favorecido quando as temperaturas do ar são frias, compreendidas entre os 13°C e os 18°C e a humidade elevada (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

O **Mofa Branco** (*'Sclerotinia stem rot'* e *'Watery soft rot'*) pode afetar centenas de espécies de plantas, incluindo muitas culturas importantes. Esta doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. O sintoma precoce e típico desta doença é o aparecimento de micélio branco, no qual, em seguida, se desenvolvem esclerotos localizados nas folhas. Quando a couve-brócolo é afetada o primeiro sintoma são áreas com “aguados”. Nestas áreas é possível observar um micélio branco e esclerotos pretos, que pode abranger toda a “cabeça”, tornando os tecidos macios e aquosos. À medida que as lesões se expandem, as folhas murcham e o fungo pode-se espalhar para o resto da planta. Esta doença também pode causar perdas durante o armazenamento e transporte. Os ascósporos são responsáveis pela disseminação da doença quando são libertados da apoteca. O desenvolvimento deste patogénio é geralmente favorecido pela humidade abundante do solo e por temperaturas entre os 10°C e os 25°C (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

A **Hérnia ou Potra da Couve** (*Clubroot*) é uma doença causada pelo Protista *Plasmodiophora brassicae* e pode progredir consideravelmente antes que os sintomas acima do solo sejam visíveis. O primeiro sintoma das plantas infetadas são folhas pálidas a amareladas. Este patogénio entra através da raiz e causa a hiperplasia e hipertrofia das células desta, provocando o seu aumento de volume e deformação. As raízes deformadas não funcionam normalmente, e não conseguem absorver eficientemente água e nutrientes ficando mais suscetíveis à podridão por organismos secundários do solo, sendo o crescimento da parte aérea afetado. Quando os campos ficam infetados com este patogénio, este fica impróprio para o cultivo de brássicas, porque este pode sobreviver no solo por várias décadas. Os plasmódios são a estrutura responsável pela infeção das raízes, porque estes se movimentam em água livre e penetram na superfície dos pelos radiculares. Esta doença é favorecida por

solos ácidos e temperaturas entre os 12°C e os 27°C (APS- <http://www.apsnet.org>; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Félix, 2014; Howard *et al.*, 1994).

As doenças mais relevantes das brássicas tais como, **Alternariose** (*Alternaria Leaf Spot*), **Damping-off**, **Podridão das raízes** (*Phytophthora root rot*), **Míldio** (*Downy mildew*), **Bottom rot**, **Amarelecimento** (Yellows), **Verticiliose** (*Verticillium wilt*) e **Oídio** (*Powdery mildew*), serão abordadas nos próximos pontos.

a) ALTERNARIOSE (ALTERNARIA LEAF SPOT)

A Alternariose (*Alternaria leaf spot*) é uma doença causada pelo patogénio *Alternaria* spp. Agrios (2005) refere que as doenças provocadas por este patogénio estão entre as mais comuns e que afetam mundialmente muitos tipos de plantas. Estas infetam os diversos órgãos da planta, desde as folhas, caules, flores e frutos de plantas anuais, mais frequentemente, mas também afetam árvores de fruto como os citrinos e macieiras. As perdas associadas, a este tipo de patogénio, em todos os seus hospedeiros, estão entre as mais altas.

i. Sintomas

Segundo Agrios (2005), Black (2001) e Conn *et al.*, (2013) as espécies de *Alternaria* causam manchas foliares que aparecem nos tecidos mais antigos, nas folhas mais baixas e senescentes, mas esta doença progride no sentido ascendente. As manchas das folhas começam como pequenas lesões circulares amarelas e evoluem geralmente para uma cor castanho-escuro a preto, muitas vezes as lesões são numerosas e ampliam o seu tamanho até 5 cm de diâmetro. Estas geralmente desenvolvem-se em anéis concêntricos com halos cloróticos, que dão às manchas uma aparência semelhante a um alvo (Figura 15. A e B). Os centros da lesão podem quebrar-se, causando um buraco à folha ou, se as condições forem favoráveis, estes ficam cobertos com uma massa negra de esporos. Esta massa negra é composta pelos conídios (esporos assexuados) e por os conidióforos (hifas reprodutivas assexuadas) (Kucharek, 2000). Mas, este crescimento difuso pode ser interrompido, formando anéis concêntricos dentro da mancha foliar, isto resulta devido às interrupções do clima favorável para o desenvolvimento dos esporos.

Alternaria spp. pode também infetar a base de “cabeças” de repolho e provocar o escurecimento das cabeças de couve-flor e da couve-brócolo, tornando-as não comercializáveis (Figura 15. C). As cabeças afetadas das couves-brócolo têm

uma descoloração castanha que começa nas margens das flores e dos conjuntos individuais da flor (Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

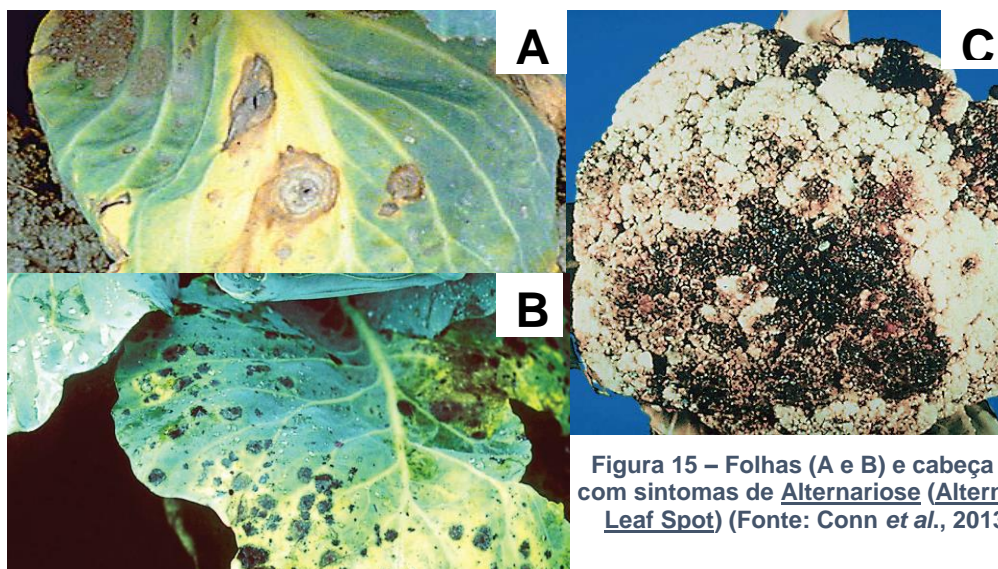


Figura 15 – Folhas (A e B) e cabeça (C) com sintomas de Alternariose (Alternaria Leaf Spot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e ciclo da doença

A Alternariose é causada por três diferentes agentes causais, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola* e *Alternaria raphani* (Conn *et al.*, 2013).

Agrios (2005) e Howard *et al.*, (1994) afirmam que em tecidos doentes mais velhos, o micélio assexuado é constituído por conidióforos curtos, simples e eretos, que suportam cadeias de conídios simples ou ramificadas. Os conídios são esporos assexuados que surgem em cadeias nos conidióforos. Estes são destacados facilmente e são transportados por correntes de ar. Estas espécies de *Alternaria* têm apenas a fase assexuada ou imperfeita.

Atualmente, muitas espécies de *Alternaria* são principalmente saprófitas, isto é, elas não conseguem infetar tecidos vegetais vivos, mas crescem apenas em tecidos mortos ou em decomposição e, no máximo, em tecidos senescentes ou velhos, tais como pétalas velhas, folhas velhas e frutos maduros. Portanto, muitas vezes é difícil decidir se a *Alternaria* encontrada num tecido doente é a causa da doença ou um contaminante secundário (Agrios, 2005).

Agrios (2005), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) referem que os resíduos das colheitas de brássicas são a principal fonte de inóculo desta doença, ou seja, a principal fonte de produção de esporos que irão contaminar outros tecidos. Mas, este fungo pode ser transferido para o campo a partir da contaminação de raízes das plantas provenientes dos viveiros. As espécies de *Alternaria* podem também ser

'seedborne', ou seja, se o fungo é transportado com a semente, este pode atacar a plântula, geralmente após a sua emergência e causar 'Damping-off' ou lesões na haste.

O desenvolvimento da doença é favorecido por dois importantes fatores, pela humidade livre nas superfícies das plantas e pelas temperaturas entre os 20°C e os 27°C. À medida que o tempo avança e as folhas se encontram molhadas, devido a períodos de orvalho prolongados ou chuvas intensas ou frequentes, o número de infeções aumenta exponencialmente assim como o tamanho da lesão (Conn *et al.*, 2013; Kucharek, 2000).

A *Alternaria* passa o inverno sob a forma de micélio ou conídios em detritos de plantas infetadas ou sobre sementes (Agrios, 2005).

Em cultura, as temperaturas ótimas para a produção de esporos estão entre os 24°C e os 28°C para as 3 espécies. A produção de conídios é baixa quando há temperaturas abaixo dos 16°C e acima dos 28°C. Estes são libertados pelo vento e pela água, durante o dia, à medida que a humidade relativa diminui. Quando libertados, os conídios penetram o tecido suscetível diretamente ou através de feridas (Figura 16) e logo produzem novos esporos que vão ser novamente disseminados (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Kucharek, 2000).

Kucharek (2000) refere que os sintomas da doença podem ocorrer dentro de um ou dois dias após a penetração do esporo, no entanto, o período de incubação pode demorar mais tempo, presume-se que um período de 7 a 10 dias é um período típico desde a penetração até à nova produção de esporos em manchas foliares a temperaturas favoráveis.

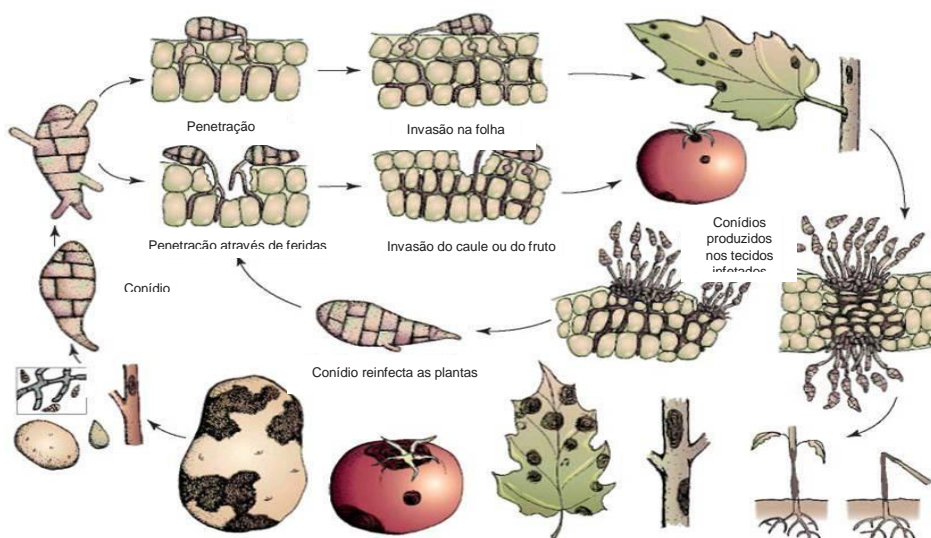


Figura 16 - Ciclo da doença de Alternariose causado por *Alternaria* spp. (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controle da doença

As Alternarioses são controladas principalmente através do uso de variedades resistentes ou tolerantes, sementes livres de doenças ou tratadas, e com fungicidas apropriados (Agrios, 2005).

Agrios (2005), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) afirmam que ao se realizarem as operações culturais pode haver uma menor incidência ou a eliminação total da doença. Também, a) incorporação dos resíduos das brássicas; b) praticar uma rotação de culturas sem plantas pertencentes à família das Brássicas; c) eliminar infestantes; d) evitar a rega nas “cabeças” durante o seu desenvolvimento e e) aplicar fungicidas para ajudar no controle da doença.

b) DAMPING-OFF

Esta doença ocorre tanto na pré como na pós-emergência das plantas e é causada por diversas espécies do pseudo-fungo *Pythium* spp.. Esta ocorre em todo o mundo, desde solos florestais, em climas tropicais e temperados e em estufas, afetando as sementes, as plântulas e as raízes das plantas. No entanto, o maior dano é causado nas raízes das sementes e das plântulas originando uma má germinação e emergência das mesmas. As perdas associadas a esta doença variam consideravelmente com a humidade do solo e com a temperatura (Agrios, 2005).

i. Sintomas e ciclo de vida da doença

O ciclo de vida desta doença inicia-se com os tubos germinativos dos esporos ou do micélio saprófito que entram em contacto com sementes ou tecidos de plântulas de plantas hospedeiras, dando-se assim uma penetração direta. O esporo germina e cresce entre e através das células, ao segregar enzimas pectinolíticas, que dissolvem as pectinas que mantêm as células unidas, resultando na maceração dos tecidos. Como resultado, as sementes infetadas e as plântulas jovens morrem e transformam-se numa massa necrótica (Figura 17). Por outro lado, os zoósporos entram pelas pontas das raízes e proliferam, causando um colapso e uma morte rápida das mesmas. Quando a invasão se limita ao córtex do caule subterrâneo da plântula, este último pode continuar a viver e a crescer por um curto período de tempo até que a lesão se estenda acima da linha do solo (Figura 18). Posteriormente, os tecidos invadidos não conseguem suportar a plântula acabando esta por cair e morrer. Se a infeção ocorre quando a plântula já está bem desenvolvida e esta ao ter células

bem engrossadas e linhificadas, o avanço do patógeno é interrompido no ponto de infecção, resultando pequenas lesões que se desenvolvem (Agrios, 2005).

As perdas associadas a esta doença são mais graves quando o solo, onde está implementada a cultura, se encontra demasiado húmido por longos períodos de tempo, quando a temperatura é demasiado baixa sendo desfavorável para a planta hospedeira, sempre que há excesso de azoto no solo e quando não se cumpre o período de recorrência (Agrios, 2005).

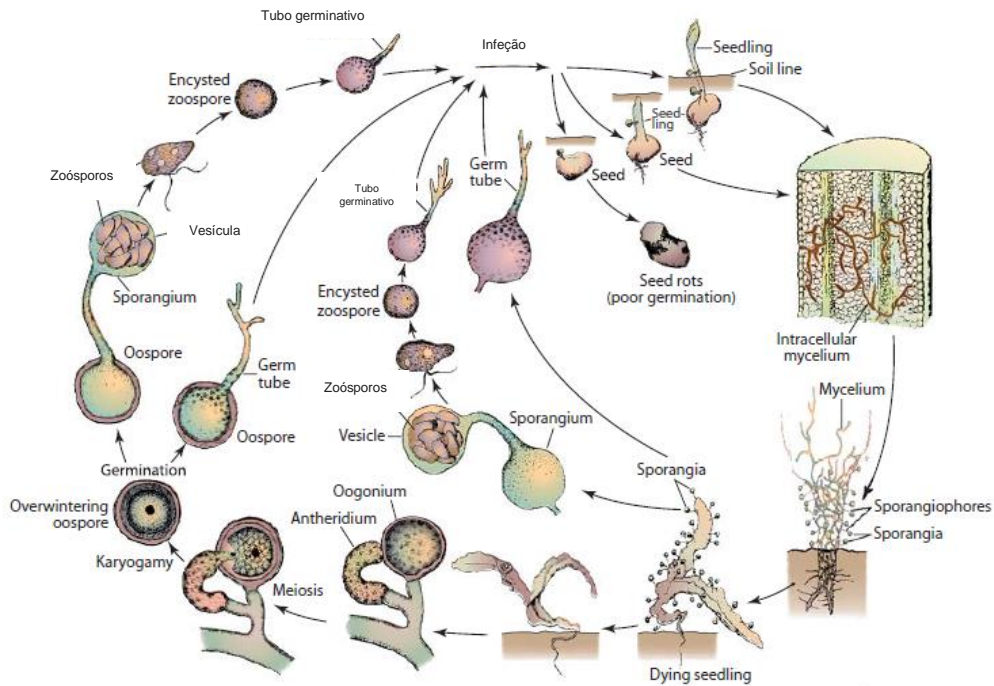


Figura 17 - Ciclo da doença de 'Damping-off' causado por *Pythium* spp. (Adaptado de Agrios, 2005).

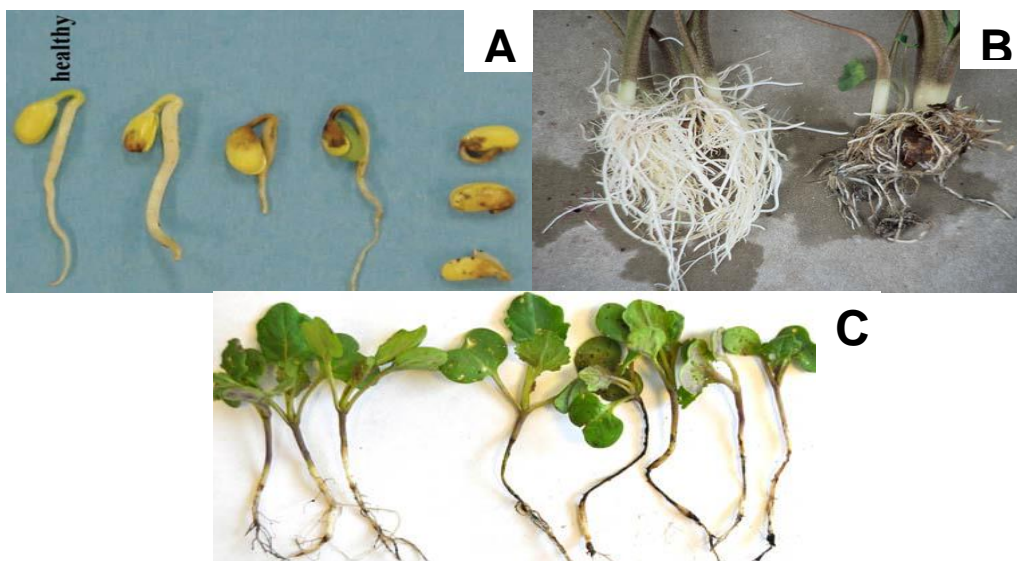


Figura 18 – Sementes (A), raízes (B) e plantas (C) com sintomas de 'Damping-off' (Fonte: Agrios, 2005; <http://www.countygp.ab.ca>, 2012).

ii. Agente causal

Relativamente à família das Brássicas, Agrios (2005) refere que a doença do 'Damping-off' causada pelo agente causal *Pythium* spp. produz um micélio branco com um rápido crescimento. Este dá origem a duas estruturas, uma são os esporângios que germinam diretamente pela produção de um ou vários tubos germinativos ou produzindo uma hifa curta no final do qual forma um esporângio secundário, neste são produzidos 100 ou mais zoósporos. A outra estrutura são esporos sexuados ou de resistência, os óosporos que são resistentes às condições adversas. A germinação destas duas estruturas é determinada principalmente pela temperatura, sendo que temperaturas acima dos 18°C favorecem a germinação por tubos germinativos, enquanto as temperaturas entre os 0°C e os 18°C induzem a germinação por meio de zoósporos. O patogénio precisa de água livre para que seus zoósporos se possam movimentar, devido aos dois cílios polares, e infetar.

iii. Controlo da doença

Para o controlo da doença não existem, até agora, variedades comerciais de plantas resistentes a *Pythium* spp. No entanto, o seu controlo pode ser conseguido se se seguirem algumas práticas culturais, tais como: a) boa drenagem do solo e boa circulação de ar entre as plantas; b) plantação quando as temperaturas são favoráveis para o rápido crescimento das plantas; c) evitar a aplicação de quantidades excessivas de fertilizantes azotados; d) praticar uma rotação de culturas. Mas, podemos optar por medidas preventivas diretas, tais como, o tratamento de sementes ou bolbos com um ou mais produtos químicos eficazes (Agrios, 2005).

c) PODRIDÃO DAS RAÍZES (PHYTOPHTORA ROOT ROT)

i. Sintomas

Nesta doença as raízes mais finas são infetadas tornando-se necróticas, levando à morte mais ou menos rápida do caule. Nas plantas infetadas o sistema radicular fica afetado, o que se vai traduzir na parte aérea por descoloração das margens das folhas, ficando com uma cor vermelha a roxa, começando por estas e progredindo para o caule, resultando na posterior perda de folhas (Figura 19. A) (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

Em muitas plantas, o patogénio infeta a planta na ou perto da linha do solo, onde causa uma mancha oleosa e escurecimento do caule (Figura 19. B). A área infetada aumenta, e se a planta é pequena e suculeta, pode circundar por todo o caule, dando seguimento às folhas mais baixas, acabando a planta por morrer (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

Em muitas destas doenças, no entanto, o patogénio muitas vezes passa despercebido ou não identificado. As plantas infetadas mostram sintomas de *stress* tanto hídrico como nutricional, mas logo se tornam enfraquecidas e suscetíveis ao ataque de outros patogénios (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

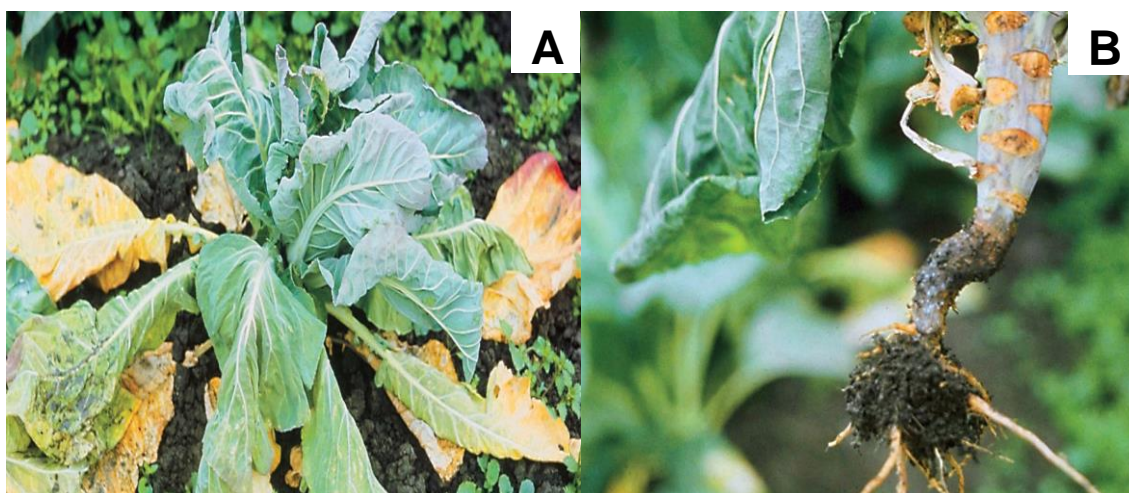


Figura 19 – Planta (A) e caule (B) com sintomas de Podridão das Raízes (Phytophthora Root Rot) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e ciclo de Vida

Agrios (2005) e Conn *et al.*, (2013) referem que a Podridão das Raízes é causada pelo Pseudo-fungo *Phytophthora megasperma*, sendo este caracterizado por ter zoósporos biflagelados, produzidos num zoosporângio e por ter os esporos sexuados que são os óosporos.

As *Phytophthora* spp. encontram-se nos solos e causam podridões na raiz e no caule, sobrevivendo nos invernos frios e nos verões quentes e secos sob a forma de oósporos e/ou clamidósporos (Figura 20). Estes, na primavera germinam e originam zoósporos, enquanto o micélio cresce e produz zoosporângios que por sua vez libertam mais zoósporos. Estes necessitam da água para se deslocar e infetar as raízes de hospedeiros suscetíveis, com os quais entram em contato. Os zoósporos e o micélio são produzidos durante o tempo húmido e frio disseminando a doença. Este patogénio necessita de solos molhados e mal drenados e de temperaturas entre os 13°C e os 25°C (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

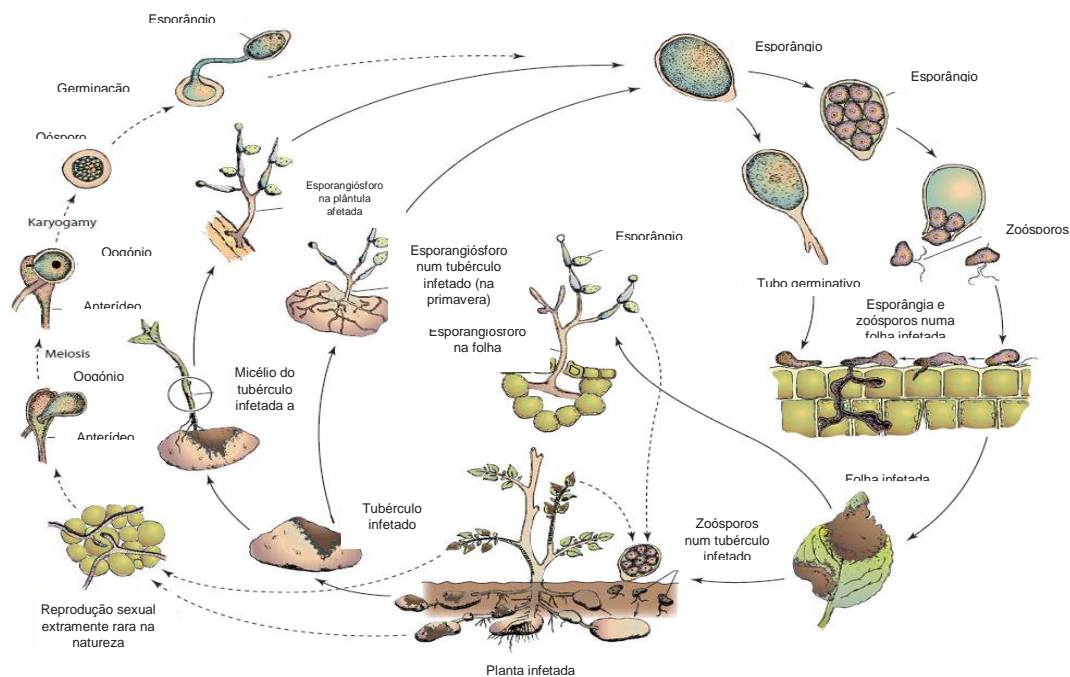


Figura 20 - Ciclo da doença de Podridão das Raízes causado por *Phytophthora megasperma* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controlo da doença

O controlo desta doença passa pela realização de boas práticas culturais, tais como: a) evitar plantar num campo com um historial da doença; b) implementar rotações da cultura de 3 anos, ou seja, respeitar o período de recorrência da doença; c) promover uma boa drenagem do solo e evitar a compactação do mesmo; d) quando possível plantar variedades resistentes a estes patogénios (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

Desde da década de 1990, que o uso de vários fungicidas sistémicos, aplicados em tratamentos de sementes, tratamentos de solo, pulverizações, ou com irrigação por rega gota-a-gota, tem demonstrado um excelente controlo desta doença. Conhecem-se diversos fungos e bactérias capazes de parasitar os óosporos de *Phytophthora* spp. ou até mesmo serem antagonistas da mesma, o que vem trazer uma esperança num futuro controlo biológico destes patogénios (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

d) MÍLDIO (DOWNY MILDEW)

A maioria das brássicas são suscetíveis ao míldio, ocorrendo frequentemente nas culturas da couve-brócolo, nas couves de Bruxelas, no repolho, no nabo, no repolho chinês, na couve-flor, na couve-rábano e no rabanete (Black, 2001; Howard *et al.*, 1994).

i. Sintomas

A infecção das plantas pode ocorrer em qualquer altura do ciclo de vida da planta, sendo particularmente prejudicial para as jovens plântulas e tecidos jovens. Após a infecção, estas apresentam manchas cloróticas nos cotilédones, acabando estes por morrer. A esporulação do agente patogénico pode ocorrer na superfície inferior do cotilédono e hipocótilo. Nesta fase, o pseudo-fungo é capaz de se tornar sistémico e quiescente. Esta doença manifesta-se com áreas irregulares cloróticas, roxas ou castanhas nas superfícies superiores das folhas (Figura 21. A), que correspondem ao micélio de cor branca a cinzenta nas superfícies abaxiais das folhas (Figura 21. B) (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Kucharek, 2000).

Sob forte pressão de doença, os esporângios desenvolvem-se nas superfícies superiores das folhas, o que pode levar à morte de plântulas. Quando este patogénio efetua infecções precoces o sistema vascular torna-se negro e surgem manchas pretas ou escuras na parte inferior das folhas jovens (Figura 21. C) (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Kucharek, 2000).

As “cabeças” da couve-brócolo ao serem infetadas podem mostrar áreas enegrecidas, na parte externa do tecido, variando de tamanho. A infecção pode tornar-se sistémica e necrosar a “cabeça” e o tecido do caule, perdendo esta o seu valor comercial (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994; Kucharek, 2000).

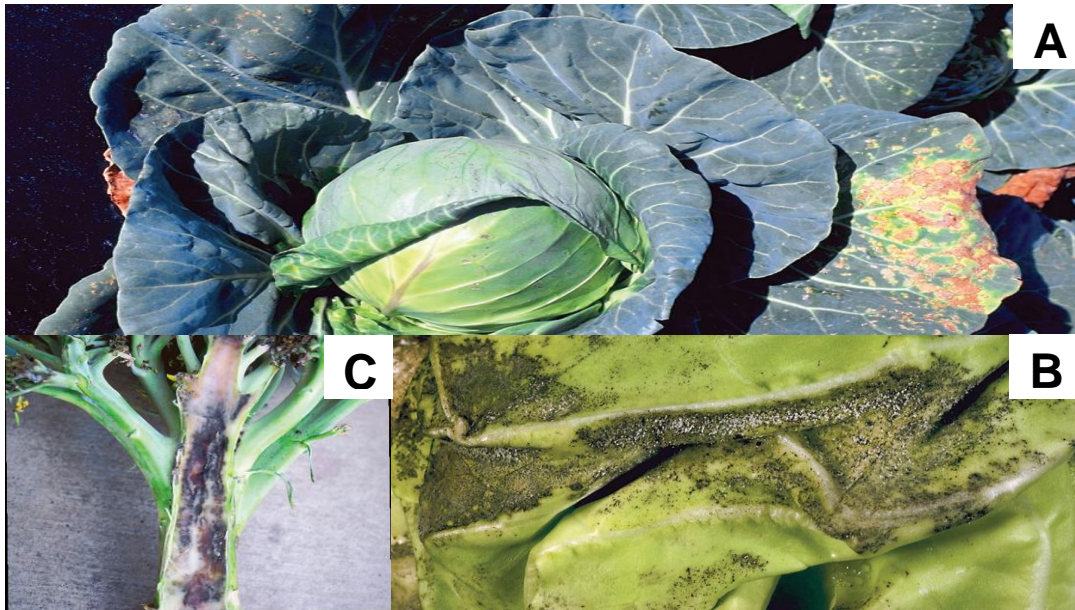


Figura 21 – Folhas (A e B) e caule (C) com sintomas de Míldio (Downy Mildew) (Fonte: Conn et al., 2013).

ii. Agente causal e ciclo de Vida

O Míldio das brássicas é causada pelo Pseudo-fungo *Hyaloperonospora parasitica*, (= *Peronospora parasítica*) (Agrios, 2005; Conn et al., 2013).

É um Oomicota, que produz esporângios em esporangiósforos que se ramificam de forma distinta para cada espécie. Os esporangiósforos emergem em grupos nos tecidos vegetais através dos estomas, formando micélio visível no lado inferior ou em ambos os lados das folhas e em outros tecidos afetados. Cada esporangiósforo cresce até atingir a maturação, produzindo os esporângios que contêm os zoósporos como esporos assexuados (Agrios, 2005; Conn et al., 2013).

Como esporos sexuados este patogénio produz óosporos que mantêm o inóculo da doença durante toda a época desfavorável dentro do tecido hospedeiro infetado, principalmente durante a senescência da cultura. Então, quando a próxima plantação brássica é plantada, ela pode servir como uma nova fonte de inóculo germinando, e desenvolvendo hifas vegetativas que mais tarde se diferenciam e produzem os esporos assexuados, os zoósporos. No final do seu ciclo de vida, ou quando as condições se tornam adversas, formam-se os óosporos. Estes passam o inverno em lesões e em tecidos mortos mas também estão presentes nas raízes e podem contaminar as sementes (Agrios, 2005; Conn et al., 2013).

Durante os períodos chuvosos, os óosporos germinam para produzir um esporângio. Este ou os seus zoósporos são transportados pelo vento ou pela água para os tecidos molhados perto do solo, indo infetá-los através dos estomas da

superfície inferior, produzindo posteriormente mais zoósporos que causam infecções secundárias, propagando rapidamente a doença. A sobrevivência dos esporângios é muito reduzida em solo seco e com baixas temperaturas (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

Há plantas que possuem uma barreira natural contra a penetração destes esporos nos seus tecidos, que são os tricomas das folhas. Quando as variedades não possuem estas estratégias de defesa adicionais, o patogénio entra e espalha-se rapidamente nos espaços intercelulares da planta. Este produz esporângios em abundância e são disseminados pelo vento e pelos salpicos de chuva (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

A esporulação, a germinação e a reinfeção podem ocorrer entre 4 a 5 dias. As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são as temperaturas noturnas entre os 8°C e os 16°C, as diurnas abaixo dos 24°C e quando há presença de chuvas fracas, orvalho ou humidade prolongada na folha. Mas, quando a temperatura da noite excede os 24°C o desenvolvimento da doença é bastante restrito (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

iii. Controlo da doença

Black (2001), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) afirmam que os sintomas desta doença podem ser minimizados se se seguirem algumas práticas culturais recomendadas, tais como: a) eliminar as infestantes que pertençam à família das Brássicas; b) realizar rotações com culturas não brássicas, respeitando o período de recorrência da doença; c) promover a drenagem do solo; d) evitar o excesso de rega, mantendo a superfície das folhas secas o mais tempo possível; e) incorporação dos resíduos após a colheita da cultura porque os óosporos podem sobreviver em folhas; f) optar pela rega gota-a-gota para obter uma humidade baixa na planta; g) utilizar cultivares resistentes ao míldio; h) aplicação de fungicidas sistémicos e preventivos.

e) 'BOTTOM ROT'

Esta doença encontra-se distribuída mundialmente e pode causar doenças diferentes, tais como 'Damping-off', podridão do caule, da cabeça e da raiz, causando perdas em quase todos os vegetais, flores, relva e mesmo em plantas ornamentais perenes, arbustos e árvores (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

i. Sintomas

Segundo os autores, Black (2001), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) o patógeno pode atacar a maioria das brássicas em qualquer estágio de desenvolvimento.

A infecção geralmente ocorre após a formação da “cabeça” quando o fungo entra nas folhas e nos caules que estão em contato com o solo infestado. Os primeiros sintomas são lesões com áreas em depressão, elípticas com uma cor de bronzeamento acastanhada que se encontram na parte inferior e na parte basal das zonas afetadas (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Quando as condições são húmidas e quentes, o micélio cresce sobre as superfícies foliares matando-as e causando grandes lesões de forma irregular que depois secam e caem (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

Frequentemente, a infecção das folhas mais baixas progride para a cabeça da couve-brócolo que faz com que decaia (Figura 22), esta fase da doença é conhecida como podridão da cabeça. As folhas podem murchar e entrar em senescência depois de a “cabeça” ser colonizada (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).



Figura 22 – Plantas com sintomas de 'Bottom Rot' (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e Ciclo de Vida

Agrios (2005) e Conn *et al.*, (2013) referem que a doença 'Bottom Rot' é causada pelo agente causal *Rhizoctonia solani*. Os fungos do género *Rhizoctonia* não produzem esporos e o seu micélio é incolor quando jovem, mas torna-se amarelado ou castanho claro com a idade. Este é constituído por células longas e produz ramificações que crescem em ângulos aproximadamente perpendiculares à hifa principal.

Sob certas condições, este fungo produz esclerotos que funcionam como clamidósporos originando uma cor castanha a preta. Como referido, as espécies do género *Rhizoctonia* raramente produzem uma forma perfeita, mas quando esta existe, o fungo passa a ser *Thanatephorus cucumeris* (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

O patógeno passa o inverno geralmente como micélio ou escleroto no solo, em ou sobre plantas perenes infetadas e em detritos da cultura após a colheita (Figura 23). O fungo está presente na maioria dos solos e, uma vez estabelecido num campo, permanece indefinidamente. Este dissemina-se através da chuva, da rega e através de alfaias agrícolas. A doença é mais grave em solos moderadamente húmidos do que em solos encharcados. A infeção de plantas jovens é mais grave quando o crescimento destas é lento devido a condições ambientais adversas. O desenvolvimento desta doença é favorecido pela humidade no solo e temperaturas variando entre os 20°C e os 28°C (Agrios, 2005; Black, 2001; Conn *et al.*, 2013).

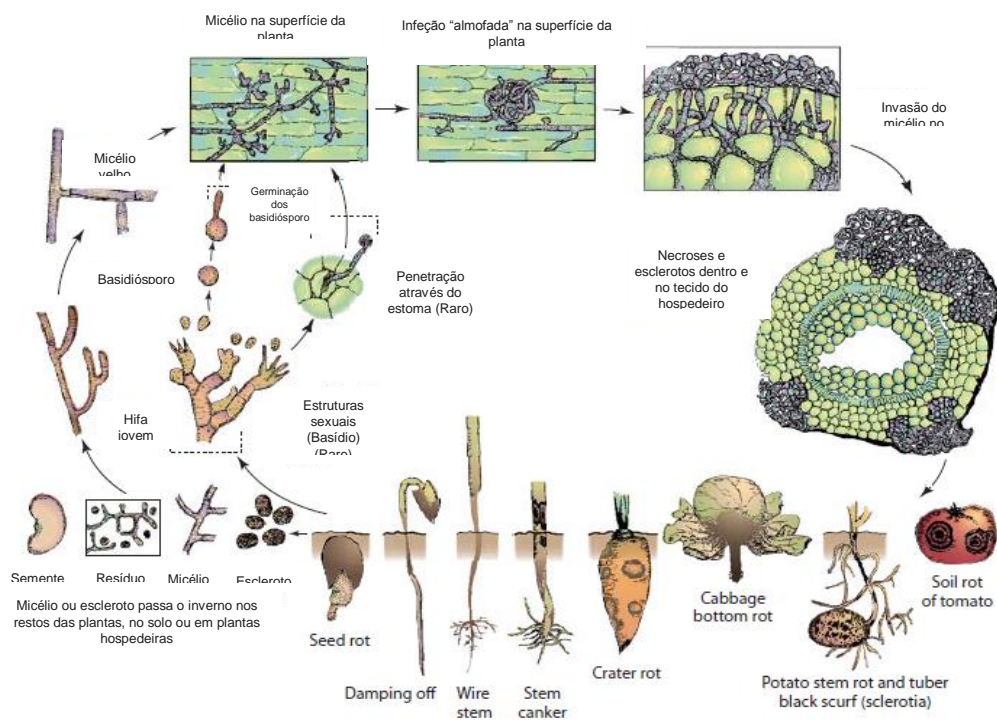


Figura 23 - Ciclo da doença de 'Bottom Rot' causado por *Rhizoctonia solani* (Adaptado de Agrios, 2005).

iii. Controlo da doença

Agrios (2005) e Conn *et al.*, (2013) referem que o controlo das doenças de *Rhizoctonia solani*, quando esta já se encontra instalada no solo é difícil, no entanto os níveis de infeção podem ser minimizados se se realizarem algumas boas práticas culturais, como; a) fornecer o nível de fertilização adequado; b) evitar a humidade excessiva do solo promovendo a drenagem do mesmo, realizando a plantação em camalhões para ajudar a garantir uma drenagem adequada; c) cumprir o espaçamento entre as plantas para promover o arejamento da superfície do solo e das plantas; d) realizar uma rotação com culturas não brássicas.

Para a maioria das plantas, não há fungicidas eficazes disponíveis contra as doenças causadas por *Rhizoctonia* spp.. Desde meados da década de 1980, grandes esforços têm sido desenvolvidos em meios alternativos, mais eficazes no controlo das doenças deste patogénio, com o 'mulching' dos campos com certos materiais vegetais ou a aplicação de plástico fotodegradável (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).

f) FUSARIOSE e AMARELECIMENTO (YELLOW)

i. Sintomas

O sintoma primário de Fusariose é uma descoloração do sistema vascular (xilema), que pode ser observada prontamente em corte longitudinal ou transversal de raízes ou caules (Figura 24), por esta razão, as folhas de plantas infetadas ou de partes de plantas infetadas perdem turgidez, tornam-se flácidas e mais claras, com uma cor verde a amarelo esverdeado, enrolam-se e, finalmente, murcham, ficam necróticas e morrem (Agrios, 2005; APS - <http://www.apsnet.org>).

Relativamente ao Amarelecimento (Yellow) os autores Black (2001) e Conn *et al.*, (2013) referem que as folhas que são afetadas ficam cloróticas mas com uma maior incidência na nervura principal.

A murchidão começa nas folhas mais velhas e progride para a folhagem mais jovem. Estes sintomas iniciais muitas vezes ocorrem apenas num dos feixes do xilema deixando o resto da planta aparentemente não afetada. As plantas afetadas que não morrem são frequentemente atrofiadas e têm rendimentos consideravelmente reduzidos (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>).

O Amarelecimento progride igualmente das folhas inferiores até abranger a planta totalmente, resultando estas numa cor acastanhada ou amarela levando à queda prematura das mesmas (Figura 25) (Black, 2001; Conn *et al.*, 2013).



Figura 24 – Caules com sintomas de Fusariose (Fonte: Agrios, 2005).



Figura 25 – Folhas com sintomas de Amarelecimento (Yellows) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Uma vez que estas doenças estão associadas ao solo, as plantas sintomáticas frequentemente ocorrem em grupos que correspondem à distribuição de altas densidades de inóculo no solo. Sob condições de densidade de inóculo suficientemente elevada ou num hospedeiro muito suscetível, a planta inteira pode murchar e morrer num curto espaço de tempo. Os vasos do xilema podem ser obstruídos com micélio, esporos ou polissacarídeos produzidos pelo fungo. As toxinas segregadas nos vasos vasculares, pelo fungo, são transportadas para as folhas, levando à redução da síntese de clorofila ao longo das nervuras. Assim, resulta em murchidão, necrose internervuras e morte das folhas (Agrios, 2005; APS - <http://www.apsnet.org>).

ii. Agente causal e ciclo de vida

Agrios (2005) e APS (<http://www.apsnet.org>) referem que as brássicas são afetadas por várias doenças de flacidez vascular causadas por diferentes formas especiais do fungo *Fusarium oxysporum*, que são morfologicamente semelhantes, mas geralmente específicas do hospedeiro que infetam. Howard *et al.*, (1994) refere que o Amarelecimento é causado pelos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*.

Ambos os micélios são incolores no início, mas com a idade tornam-se de cor creme, amarelo pálido, rosa pálido, ou um pouco violáceo. O fungo não apresenta fase sexuada, mas produz 3 tipos de esporos assexuados, os microconídios, os macroconídios e os clamidósporos. Os microconídios têm duas células e são os mais frequentemente e abundantemente produzidos em todas as condições, estes crescem na extremidade de conidióforos curtos, e são capazes infetar as raízes. Os macroconídios são fusiformes e são constituídos por 3 a 5 células e aparecem em grupos na superfície de plantas mortas pelo patogénio. Os clamidósporos são arredondados e normalmente bicelulares, são esporos de resistência, que asseguram a continuidade do patogénio em condições adversas. Os três tipos de esporos são produzidos no solo, embora somente os clamidósporos possam sobreviver no solo por muito tempo (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>).

Este patogénio sobrevive no solo, mas também pode sobreviver nos restos de plantas infetadas como micélio ou esporos. A infeção inicial das plântulas geralmente ocorre a partir de clamidósporos, que germinam e produzem hifas vegetativas que penetram o córtex da raiz, fazendo com que o fungo invada o xilema, produzindo micélio e microconídios (Figura 26). Consequentemente, o fungo torna-se sistémico e muitas vezes pode ser isolado de um tecido bem afastado das raízes (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>).

Em resposta ao avanço do fungo dentro do xilema, a planta hospedeira produz tiloses, numa tentativa de restringir o movimento do patogénio. Estes crescem nos feixes vasculares e impedem o fluxo de água, em comparação com os de plantas saudáveis. A colonização do tecido resulta em necroses e gomases celulares que aceleram a morte da planta e produz a descoloração castanha característica do tecido vascular. Esta infeção pode ser aumentada por feridas ou danos causados às raízes (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>).

O patogénio espalha-se por curtas e longas distâncias, nas curtas distâncias este é disseminado através de água e equipamentos agrícolas contaminados e nas

longas distâncias é disseminado principalmente através de plantas infetadas. Normalmente, quando um solo fica infestado com *Fusarium* spp., ele permanece indefinidamente, ficando assim impossibilitada a cultura de plantas suscetíveis (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>).

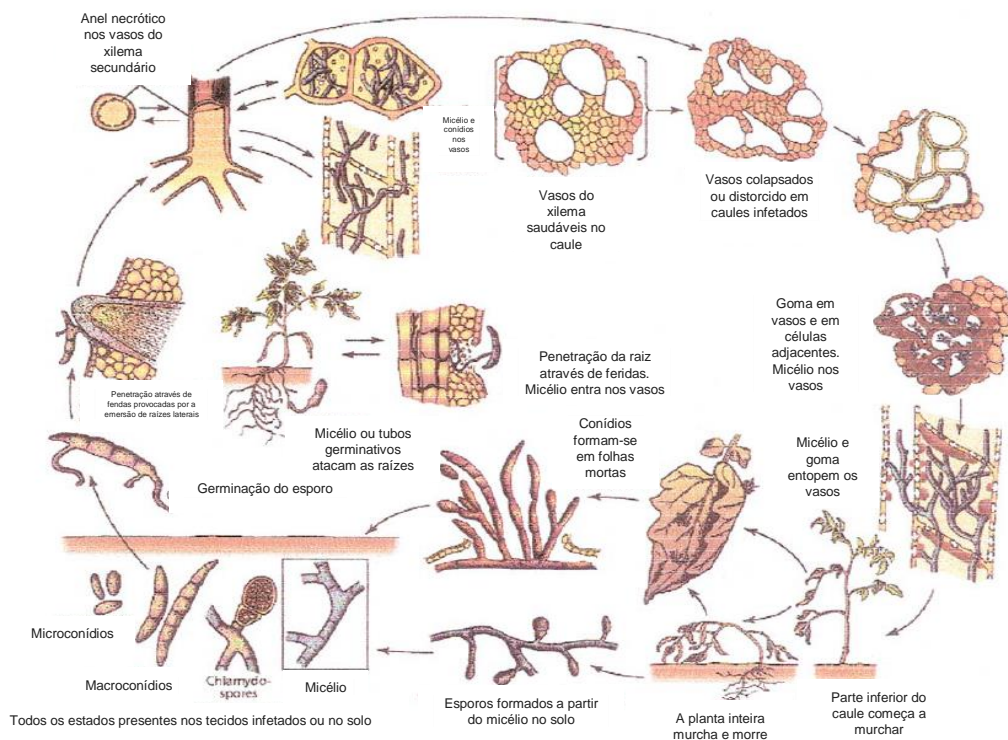


Figura 26 – Ciclo da doença de Fusariose e de Amarelecimento causado por *Fusarium oxysporum* (Adaptado de Agrios, 2005).

Esta doença é geralmente mais severa em solos leves, arenosos e ligeiramente ácidos, quando as temperaturas estão entre os 25°C e os 27°C, se estas forem mais elevadas parecem limitar a infecção, resultando em plantas amareladas e atrofiadas, mas não murchas (APS- <http://www.apsnet.org>; Agrios, 2005). Com temperaturas abaixo dos 20°C, o desenvolvimento de Amarelecimento é severamente reduzido (Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

iii. Controlo da doença

Segundo, Agrios (2005) e APS (<http://www.apsnet.org>) estas doenças são difíceis de controlar, sem recorrer a cultivares resistentes, no entanto, há uma série de opções que, embora não sejam inteiramente eficazes sozinhas, podem ajudar a diminuir a gravidade destas doenças, tais como; a) utilização de plântulas e sementes livres de doença, a exclusão do patógeno é um dos melhores meios de controlo da doença; b) resistência genética do hospedeiro, sendo esta a melhor e mais económica forma de

controle; c) solarização do solo; d) realização de mobilizações no solo; e) rotação com culturas não-sensíveis; f) assegurando uma boa drenagem do solo e) realização uma fertilização correta com azoto.

g) VERTICILIOSE (VERTICILLIUM WILT)

Esta doença ataca mais de 200 espécies de plantas, incluindo a maioria dos vegetais, flores, árvores frutíferas, morangos e árvores de sombra e floresta, sendo assim uma doença problemática em áreas temperadas do mundo inteiro, especialmente em regiões irrigadas (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

i. Sintomas

Os sintomas variam entre os hospedeiros, mas, a clorose e a necrose foliar prematura, a descoloração vascular nos caules e raízes são característicos em todas as plantas infetadas e a murchidão da planta é também característica desta doença mas é mais evidente em dias quentes e ensolarados (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

Algumas das infeções iniciam-se logo nas plântulas, que geralmente morrem logo após a infeção, sendo as mais comuns as tardias, que fazem com que as folhas superiores caiam e outras desenvolvam manchas cloróticas irregulares. Estas infeções tardias formam-se ao longo das margens foliares das folhas inferiores e que levam à sua morte (Figura 27. A) (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

As plantas mais velhas doentes ficam geralmente atrofiadas e os seus tecidos vasculares apresentam uma característica descoloração acastanhada escura que pode prolongar-se das raízes para o caule (Figura 27. B e C) (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

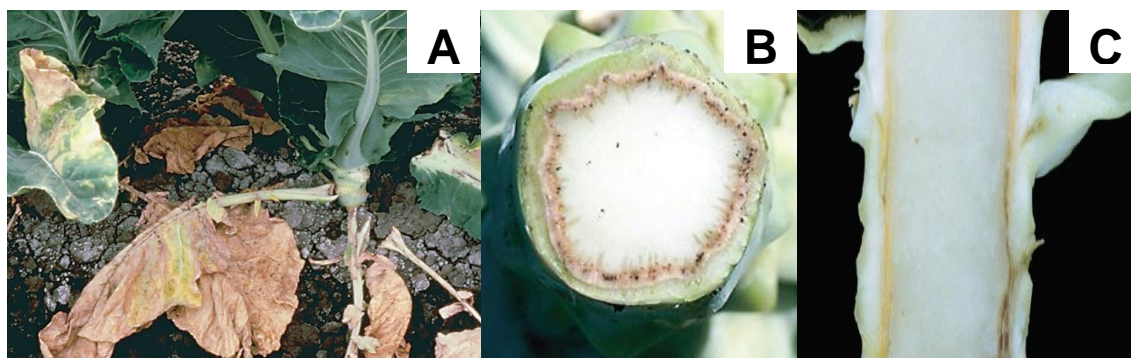


Figura 27 – Folhas (A) e caule (B e C) com sintomas de Verticiliose (Verticillium Wilt) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

Os sintomas podem ser facilmente confundidos com os de Podridão Negra e desenvolvem-se lentamente. Quando a Verticiliose aparece pela primeira vez no campo, é leve e local, mas nos anos subsequentes, à medida que o inóculo se acumula e à medida que surgem novas raças mais virulentas, os ataques tornam-se sucessivamente mais severos e generalizados até que a cultura tenha de ser substituída por outra ou pela utilização de variedades resistentes (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e ciclo de vida

APS (<http://www.apsnet.org>) e Conn *et al.*, (2013) referem que a Verticiliose é causada pelas espécies *Verticillium dahliae* ou *Verticillium albo-atrum*. Estes patógenos são fungos imperfeitos, pois não se conhece a sua fase sexuada e produz conidióforos como hifas reprodutivas donde são originados esporos assexuados do tipo conídios.

À medida que a planta entra em senescência o fungo torna-se saprófita e coloniza os tecidos mortos. Durante o seu desenvolvimento, este produz microesclerotos, que são estruturas de resistência, sendo estes os responsáveis pela manutenção da doença e pelo processo de infeção (APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

Este fungo pode ficar no solo durante várias décadas através dos microesclerotos que são estimulados a germinar por exsudados radiculares de plantas hospedeiras e não hospedeiras. As hifas produzidas pela sua germinação penetram nas raízes jovens de plantas hospedeiras, colonizando-a. As hifas invadem posteriormente os vasos do xilema onde se formam conídios, que tal como no caso da Fusariose, ficam obstruídos devido à produção, por parte da planta hospedeira, de tiloses, que vão impedir que a água alcance as partes superiores desta. Assim, as folhas e os caules privados de água começam a apresentar sintomas de flacidez e clorose foliar (Figura 28) (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

Verticillium spp. prefere temperaturas entre os 25°C e os 28°C, estes patógenos são pouco comuns em regiões mais quentes, sendo o seu desenvolvimento mais favorecido em climas frios e em solos húmidos (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

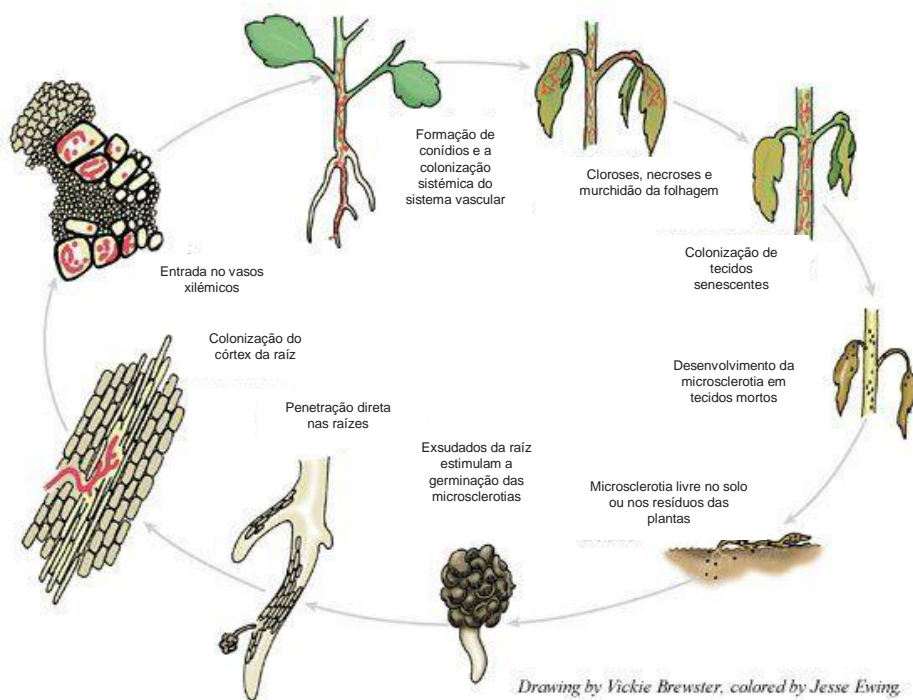


Figura 28 - Ciclo da doença de Verticilliose causado por *Verticillium dahliae* ou *Verticillium albo-atrum* (Fonte: APS- <http://www.apsnet.org>, 2017).

iii. Controlo da doença

O controlo desta doença depende da plantação de plantas livres de doenças em solo livre das mesmas, usando variedades resistentes e evitando a plantação de culturas suscetíveis onde brássicas foram cultivadas repetidamente (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

Quando a planta é infetada não existem medidas curativas, no entanto, podem realizar-se diversas ações de modo a controlar e a reduzir a incidência da doença, tais como; a) plantação de uma nova cultura em solo livre do patógeno; b) realizar uma fumigação ao solo pode ser efetiva quando usada para proteger culturas de alto valor, mas é muito dispendiosa; c) efetuar rotação com culturas não suscetíveis antes que o inóculo se acumule até níveis altos no solo; d) praticar uma boa fertilidade do solo; e e) limitar a quantidade de água aplicada ao campo, porque o excesso de rega no início da fase de crescimento, resulta num aumento da infeção e por consequência num aumento da gravidade da doença (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013).

h) OÍDIO (POWDERY MILDEW)

Agrios (2005), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) referem que os oídios são muito comuns e facilmente reconhecíveis em termos de doenças de plantas, encontrando-se distribuída mundialmente. Estas afetam todo o tipo de plantas, exceto gimnospermas e as perdas associadas a estas doenças superam as perdas causadas por qualquer outro tipo de doença, uma vez que afetam o crescimento e o rendimento das plantas na fase de colheita.

i. Sintomas

Os sintomas associados a esta doença começam com lesões superficiais pequenas, em forma de estrela, progredindo para uma cor amarela a castanha. A superfície superior da folhagem torna-se pulverulenta devido ao crescimento micelial (Figura 29). Por fim, aparecem pontuações pretas, que correspondem às cleistotecas que se podem apresentar isoladamente ou em grupos. Estes sintomas são mais comuns no lado superior das folhas, mas também afeta a parte inferior das mesmas, nos estádios tardios do desenvolvimento da doença e em outros órgãos da planta (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

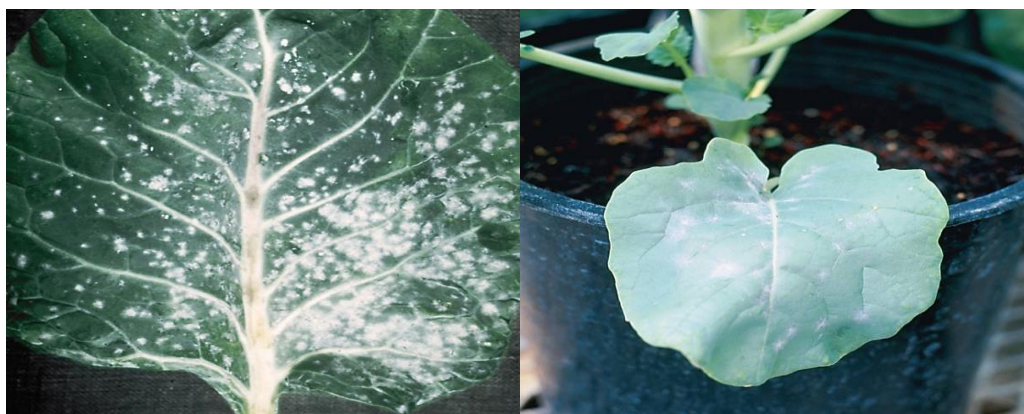


Figura 29 – Folhas com sintomas de Oídio (Powdery Mildew) (Fonte: Conn *et al.*, 2013).

ii. Agente causal e ciclo de vida

Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) referem que o Oídio é causado pelo fungo *Erysiphe cruciferarum*, este patógeno forma um micélio que produz numerosos haustórios, é branco e superficial nos tecidos vegetais e tem uma aparência pulverulenta devido à produção de numerosos conídios unicelulares. O estado teleomorfo, ou sexuado consiste numa cleistoteca escura, completamente

fechada contendo 4 a 10 ascos, e que é também a sua forma de hibernação durante a época desfavorável.

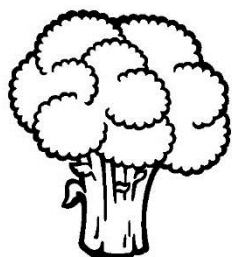
Os tecidos epidérmicos jovens, quando em presença de inóculo, ascósporos ou conídios, vão ser infetados pela germinação destes, e as suas células exploradas pela emissão de haustórios. Através deles o fungo obtém nutrientes da planta enviando-os para todos os seus constituintes. Cada conidióforo produz cadeias de conídios e estes são transportados por correntes de ar. Quando a temperatura e a humidade relativa são suficientemente altas, os esporos germinam e infetam novos tecidos, provocando as infeções secundárias. A fotossíntese nas áreas afetadas é muito reduzida e a infeção dos tecidos jovens também provoca crescimento irregular das células afetadas e das circundantes, resultando em áreas ligeiramente distorcidas (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

As infestantes servem como hospedeiros alternativos durante a época em que a cultura não se encontra no solo e normalmente servem como uma fonte de inóculo para os ciclos de doença subsequentes (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da doença é geralmente favorecido pelo orvalho e temperaturas moderadas entre os 15°C e os 20°C e humidade relativa elevada (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994).

iii. Controlo da doença

O controlo do Oídio em algumas plantas é feito recorrendo à utilização de enxofre ou através de aplicações de fungicidas preventivos ou curativos. A eliminação das infestantes crucíferas e voluntárias que possam albergar estruturas do patógeno também podem ajudar no controlo da doença. Experimentalmente, o controlo biológico do Oídio também foi conseguido através de pulverizações com o fungo antagonista *Ampelomyces quisqualis* e com compostos ativadores do metabolismo das plantas, como o ácido jasmónico e o ácido salicílico (Agrios, 2005; Conn *et al.*, 2013).



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Apresentação e caracterização das parcelas da região do Ribatejo e do Alentejo

O estudo dos problemas fitossanitários da cultura da couve-brócolo realizou-se em duas regiões distintas, na região do Ribatejo e na região do Alentejo. Em cada uma destas escolheram-se duas parcelas de terreno onde tradicionalmente se produz esta cultura.

3.1.1. Parcelas do Ribatejo

Na região do Ribatejo escolheram-se duas parcelas, uma situada na vila da Golegã, parcela Praias (Figura 30. A) e a outra na aldeia do Reguengo do Alviela, parcela Álamos (Figura 30. B), ambas no distrito de Santarém. Como informação adicional fornecida pelos agricultores, a parcela Praias possui 7,5 hectares e a parcela Álamos 1,8 hectares e tiveram como culturas antecedentes a batata e o milho, respetivamente.



Figura 30 - Parcelas na região do Ribatejo, A- Praias e B- Álamos.

3.1.1.1 Condições edafo-climáticas do Ribatejo

3.1.1.1.1 Clima

Os dados climáticos do Ribatejo de 30 anos (1931 a 1960), do distrito de Santarém, obtiveram-se através da informação retirada do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica publicado no ano de 1991 (Quadros 5 e 6).

Quadro 5 - Dados da temperatura do ar relativos à estação meteorológica de Santarém entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Santarém entre 1931 e 1960						
Temperatura do ar						Mês
T(°C)						
9h	15h	18h	Mensal	Max	Min	
7,7	-	11,6	9,8	20,5	-4,5	janeiro
8,9	-	12,0	10,8	25,0	-4,5	fevereiro
12,0	-	14,7	13,3	29,4	-1,0	março
14,9	-	17,3	15,3	33,0	2,2	abril
17,5	-	20,1	17,3	36,5	4,5	maio
21,0	-	23,5	20,7	41,0	5,4	junho
22,1	-	26,8	23,0	45,3	9,5	julho
22,7	-	26,1	23,4	42,4	8,5	agosto
20,6	-	23,5	21,6	39,4	7,5	setembro
16,4	-	18,9	17,8	36,0	3,0	outubro
11,7	-	14,2	13,4	27,5	-1,0	novembro
8,5	-	11,3	10,4	21,8	-3,5	dezembro

Quadro 6 - Dados da insolação, precipitação e evaporação relativos à estação meteorológica de Santarém entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica,1991).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Santarém entre 1931 e 1960					
Insolação I		Precipitação R (mm)		Evaporação E (mm)	Mês
Total (h)	Percentagem (%)	Total	Max (diária)		
143,4	48	96,3	51,0	33,3	janeiro
172,6	57	69,6	33,3	41,3	fevereiro
184,0	50	106,9	47,5	52,8	março
245,6	62	57,2	45,8	67,9	abril
281,3	63	44,7	48,2	76,0	maio
294,8	66	23,7	55,4	136,8	junho
359,1	79	4,0	24,5	132,2	julho
341,5	80	4,4	18,5	135,7	agosto
251,2	67	53,1	85,0	103,6	setembro
209,7	60	63,6	45,8	68,9	outubro
153,2	51	89,2	93,5	39,1	novembro
137,0	46	97,4	43,4	32,4	dezembro

Os valores mensais das temperaturas registadas pela estação meteorológica de Santarém (Quadro 5) mostraram que estas estão compreendidas entre os 9,8°C e os 23,4°C. A temperatura mais baixa registou-se no mês de janeiro e a mais elevada no mês de agosto, respetivamente.

As temperaturas mínimas e máximas diárias (Quadro 5) registaram-se no mês de janeiro com -4,5°C e no mês de julho com 45,3°C, respetivamente.

Relativamente à precipitação, o maior valor total encontra-se no mês de março, com 106,9 mm e o menor valor registou-se no mês de julho, com 4,0 mm. Em termos de valores de precipitação máxima diária, o mais elevado foi no mês de novembro com 93,5 mm e os valores mínimos de precipitação diários registaram-se no mês de julho com 24,5 mm (Quadro 6).

Ao agrupar os valores da temperatura e da precipitação num só gráfico obteve-se um gráfico termopluiométrico para o distrito de Santarém (Figura 31).

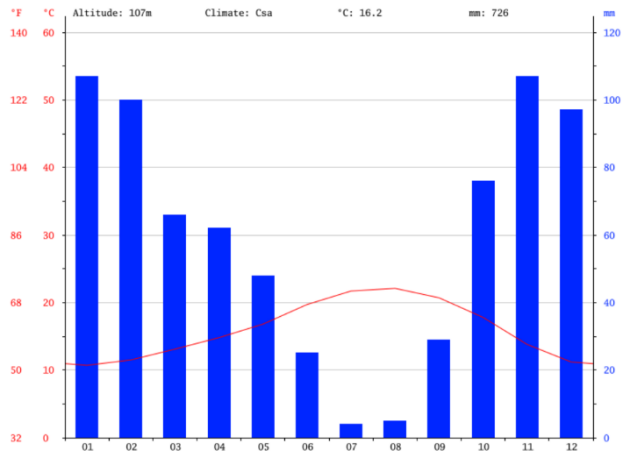


Figura 31 - Gráfico termopluiométrico do distrito de Santarém (Fonte: <https://pt.climate-data.org>).

3.1.1.1.2. Solo

3.1.1.1.2.1 Parcela Praias e Álamos

Para a identificação dos solos, que se encontram nas parcelas em estudo, recorreu-se às cartas de solos associadas à zona onde se localiza cada parcela. Para a parcela **Praias** utilizou-se a Carta de Solos de Portugal N° 27 – D e para a parcela **Álamos** utilizou-se a Carta de Solos N° 27 – C, ambas as cartas encontram-se numa escala de 1:50 000 (Figuras 32 e 33).

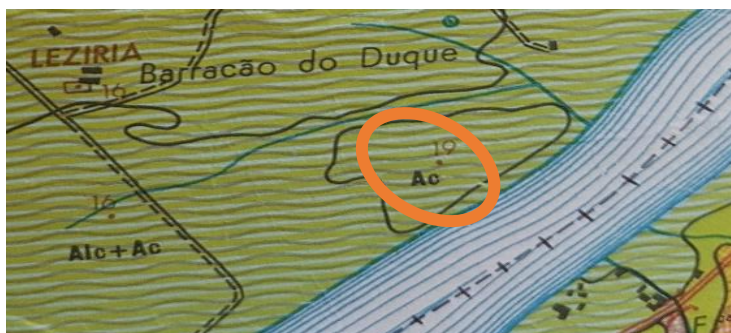


Figura 32 - Carta de solo da parcela Praias e a assinalização da localização aproximada da parcela.



Figura 33 - Carta de solo da parcela Álamos e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Pela análise das cartas de solos representadas anteriormente, afirmou-se que em ambas as parcelas possuem solo Ac. Cardoso (1965) refere que este solo pertence à família dos Aluviossolos Modernos de textura mediana, com carbonatos. Esta textura mediana inclui diversas texturas desde das texturas francas, as franco-arenosas (com menos de 60% de areia), as franco-argilo-arenosa (mais de 20% de limo e menos de 30% de argila), as franco-argilosas (menos de 30% de argila) e as franco-limosas (menos de 60% de limo e mais de 20% de areia).

Os Aluviossolos e os Solos de Baixa são solos incipientes, mas estes podem ter uma pequena acumulação da matéria orgânica à superfície, apesar de haver um bom arejamento dessa camada superior. Todos eles possuem uma toalha freática

mais ou menos profunda (mais profunda nos Aluviosolos Antigos) sujeita a oscilações acentuadas no decurso do ano. Porém, encontram-se geralmente humedecidos e influenciados fortemente na sua economia de água, vegetação e biologia pela presença dessa toalha freática. Os fenómenos de redução da toalha freática não se manifestam com intensidade porque esta oscila bastante e renova-se constantemente, mesmo nas alturas das inundações, o que permite permanentemente um elevado teor de oxigénio dissolvido na água. Mas, na época seca a toalha freática atinge níveis mais baixos podendo dar-se uma forte dessecação das camadas superficiais e o conseqüente aumento da sua compactidade, o que prejudica a vegetação ou cultura que os cobre (Cardoso, 1965).

3.1.2. Parcelas do Alentejo

Na região do Alentejo, foram marcadas igualmente duas parcelas, uma situada em Santa Vitória, parcela Quartijos (Figura 34. A), e a outra em Trigaches, parcela Herdade da Canada (Figura 34. B), ambas no distrito de Beja. Através da informação fornecida pelos agricultores, a parcela Quartijos tem 13 hectares e a parcela Herdade da Canada tem 10 hectares e tiveram como culturas antecedentes a cevada dística e a soja, respetivamente.



Figura 34 - Parcelas na região do Alentejo, A- Quartijos e B- Herdade da Canada.

3.1.2.1 Condições edafo-climáticas do Alentejo

3.1.2.1.1 Clima

Os dados climáticos do Alentejo de 30 anos (1931 a 1960), do distrito de Beja, obtiveram-se através da informação retirada do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica publicado no ano de 1991 (Quadros 7 e 8).

Quadro 7 - Dados da temperatura do ar relativos à estação meteorológica de Beja entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Beja entre 1931 e 1960						
Temperatura do ar T(°C)						Mês
9h	15h	21h	Mensal	Max	Min	
7,4	11,9	9,4	9,2	20,3	-3,6	janeiro
7,9	13,5	11,0	10,2	24,1	-5,5	fevereiro
10,6	15,9	12,9	12,4	27,0	-1,5	março
13,4	18,8	15,0	14,6	33,2	0,5	abril
15,6	21,7	17,4	17,0	36,5	2,9	maio
19,3	26,4	22,1	21,0	39,9	6,2	junho
21,3	30,5	25,2	23,8	43,2	8,8	julho
21,1	30,4	25,4	24,0	41,8	10,0	agosto
17,9	27,2	22,8	21,7	37,9	6,6	setembro
15,8	21,8	17,9	17,8	35,3	4,8	outubro
11,4	16,3	12,8	13,1	27,9	-3,0	novembro
8,2	12,6	9,9	9,8	21,5	-2,1	dezembro

Quadro 8 - Dados da insolação, precipitação e evaporação relativos à estação meteorológica de Beja entre os anos de 1931 e 1960 (Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 1991).

Informação sobre a Estação Meteorológica de Beja entre 1931 e 1960					
Insolação I		Precipitação R (mm)		Evaporação	Mês
Total (h)	Percentagem (%)	Total	Max (diária)		
156,5	51	72,3	55,0	50,3	janeiro
177,9	58	53,3	37,0	74,7	fevereiro
201,1	54	90,3	51,5	85,3	março
253,4	64	50,5	44,5	121,1	abril
291,0	66	38,4	34,6	161,3	maio
338,0	70	15,4	35,5	213,6	junho
378,8	84	1,6	9,0	297,1	julho
350,5	83	2,0	10,1	282,0	agosto
271,7	73	21,0	39,7	218,1	setembro
218,1	63	50,9	50,0	138,1	outubro
173,4	57	68,6	56,0	72,1	novembro
167,6	57	85,4	56,6	53,4	dezembro

As temperaturas mensais estão compreendidas entre os 9,2°C e os 24,0°C, sendo a temperatura mais baixa no mês de janeiro e a mais elevada no mês de agosto, respetivamente (Quadro 7).

As temperaturas mínimas e máximas diárias entre os anos de 1931 a 1960 encontram-se no mês de fevereiro com -5,5°C e no mês de julho com 43,2°C, respetivamente (Quadro 7).

Relativamente à precipitação, o maior valor da precipitação total encontra-se no mês de março, com 90,3 mm e o menor valor no mês de julho com 1,6 mm. Em termos de valores de precipitação máxima diária registou-se no mês de dezembro com 56,6 mm e com os valores mínimos no mês de julho com 9,0 mm (Quadro 8).

Ao agrupar os valores da temperatura e da precipitação obteve-se o gráfico termopluviométrico para o distrito de Beja (Figura 35).

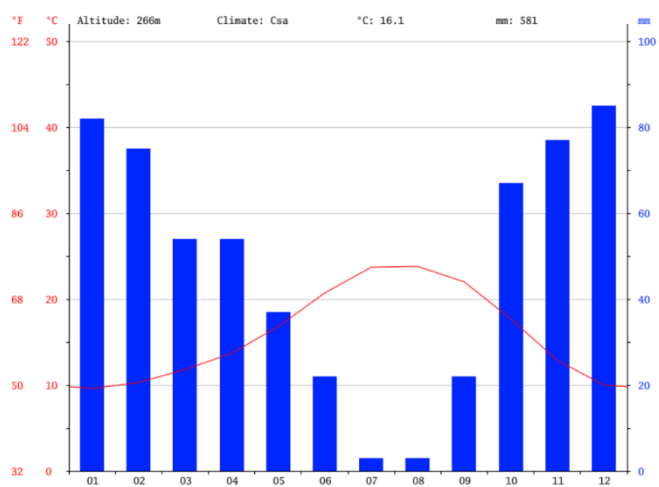


Figura 35 - Gráfico termopluviométrico do distrito de Beja (Fonte: <https://pt.climate-data.org>).

3.1.2.1.2 Solo

Para a identificação dos solos, que se encontram nas parcelas da região do Alentejo, recorreu-se às cartas de solos associadas à zona onde se localizavam as parcelas em estudo.

3.1.2.1.2.1 Parcela Quartijos

Para a identificação dos solos na parcela **Quartijos** utilizou-se a Carta de Solos de Portugal N° 43 – C com uma escala de 1: 50 000 (Figura 36), sendo o solo desta um Vc.

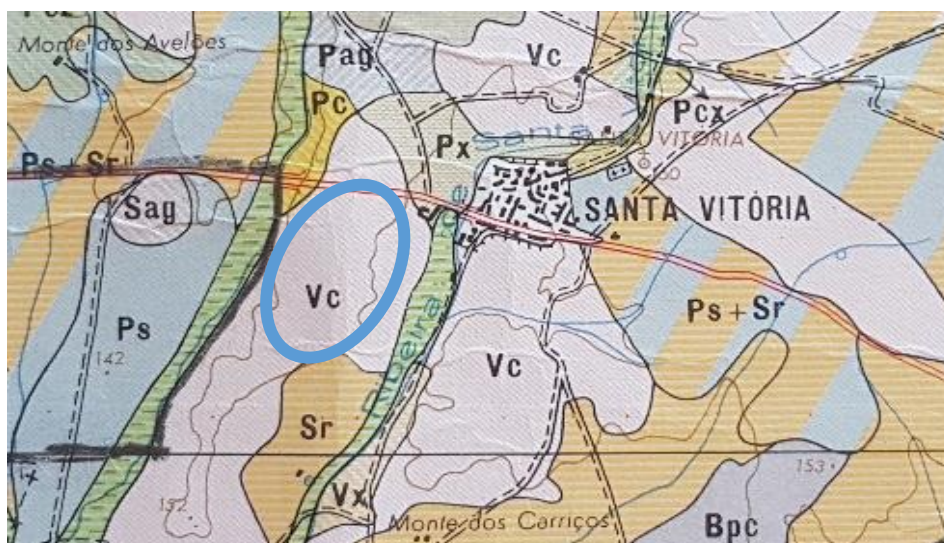


Figura 36 - Carta de solos da parcela Quartijos e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Cardoso (1965) refere que este solo pertence à família dos Solos Calcários Vermelhos de Calcários.

Insolação	Precipitação		Evaporação	Mês
	I	R (mm)		
Total	Percentagem	Total		
156,5	51	72,3	55,0	Janeiro
177,9	58	53,3	74,7	Fevereiro
201,1	54	90,3	85,3	Março
253,4	64	50,5	121,1	Abril
291,0	66	38,4	161,3	Maio
338,0	70	15,4	213,6	Junho
378,8	84	1,6	297,1	Julho
350,5	83	2,0	282,0	Agosto
271,7	73	21,0	218,1	Setembro
218,1	63	50,9	138,1	Outubro

Solos Calcários Vermelhos de Calcários

Horizonte Ap (h) 25 a 40 cm; pa (diária) avermelhado ou vermelho; franco, franco-argiloso-arenoso ou franco-argiloso calcário, por vezes com fragmentos de calcário compacto; textura grossa a muito grossa; moderadamente friável; Transição gradual para **Horizonte C** – Material original: calcário friável ou noduloso, em geral vermelho-amarelado, constituindo transição calcário compacto ou não

compacto, por vezes friável. Na sua parte superior existe, por vezes, um horizonte Cca, na maioria dos casos não endurecido.

Nestes solos diferencia-se, às vezes, um horizonte B do tipo “cambic”.

3.1.2.1.2.2 Parcela Herdade da Canada

Para identificarmos os solos na parcela **Álamos** utilizou-se a Carta de Solos N° 43 – A com uma escala de 1:50 000 (Figura 37). Através de uma análise da Carta de Solos pode-se afirmar que o solo nesta parcela é o solo Pv e Pm + Bvc.



Figura 37 - Carta de solo da parcela Herdade da Canada e a assinalização da localização aproximada da parcela.

Como nesta parcela existem dois tipos de solos diferentes, estes foram descritos separadamente.

Iniciando pelo solo Pv, Cardoso (1965) refere que este solo pertence à família dos Solos Mediterrâneos Vermelhos ou Amarelos de rochas cristalofílicas básicas. Segue-se uma descrição do perfil correspondente a este solo.

Solos Mediterrâneos Vermelhos ou Amarelos de rochas cristalofílicas básicas

Horizonte A1 – 15 a 30 cm; pardo-avermelhado, castanho-avermelhado ou vermelho; franco-argiloso ou, por vezes, franco; estrutura granulosa fina a média moderada a forte; friável; pH 5,5 a 7,0.

Transição nítida para

Horizonte B – 10 a 40 cm; vermelho, vermelho-escuro ou castanho-avermelhado; argiloso; estrutura subangulosa fina ou média moderada a forte; há algumas películas de argila nas faces dos agregados; firme; pH 5,5 a 7,0.

Transição gradual para

Horizonte C – Material originário: mistura de material semelhante ao do horizonte anterior com fragmentos de rocha, fazendo transição para a rocha-mãe (rochas cristalofílicas básicas).

O outro solo existente nesta parcela, Pm + Bvc, separa-se em dois tipos de solo. Cardoso (1965) afirma que o solo Pm pertence à família dos Solos Mediterrâneos Pardos de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins. Segue-se uma descrição do perfil correspondente a este solo.

Solos Mediterrâneos Pardos de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins

Horizonte A1 – 15 a 30 cm; pardo, pardo-pálido, cinzento-pardacento-claro ou pardo-acinzentado (s) e castanho, pardo-acinzentado-escuro ou cinzento-escuro (h); franco-argiloso-arenoso, em muitos casos com alguns calhaus e pedras de rocha-mãe e/ou de pórfiros; estrutura granulosa muito fina a média moderada; friável; ph 6,0 a 7,0.

Transição nítida para

Horizonte B – 20 a 70 cm; pardo-acinzentado muito escuro ou castanho (h), passando por vezes, com a profundidade, a cinzento-escuro e oliváceo, cores da rocha-mãe; argiloso, às vezes franco-argiloso ou franco-argiloso-arenoso, notando-se películas de argila na superfície dos agregados, cuja abundancia diminui com a profundidade; estrutura prismática grosseira forte composta de anisoforme angulosa grosseira forte; muito aderente, muito plástico, muito ou extremamente firme, extremamente rijo; pH 6,5 a 7,5.

Transição abrupta ou nítida para

Horizonte C – Material originário proveniente da desagregação de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins.

Por fim, Cardoso (1965) afirma que o solo Bvc pertence à família dos Barros Castanho-Avermelhados Calcários Muito Descarboxados de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas. Posteriormente foi feita uma descrição do perfil correspondente a este solo.

Barros Castanho-Avermelhados Calcários Muito Descarboxados de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas

Horizonte Ap – 20 a 40 cm; castanho-avermelhado; argiloso, estrutura anisoforme angulosa média a grosseira forte composta de granulosa média moderada; firme e rijo ou extremamente rijo; fendilha quando seca; pH 6,5 a 7,5.

Transição nítida para

Horizonte B – 10 a 60 cm; idêntico ao anterior mas de estrutura prismática média ou grosseira forte e apresentando muitas vezes oelículas de argila nas faces dos agregados; com superfícies polidas (“slickensides”); pH 6,5 a 7,5.

Transição gradual para

Horizonte B Cca - 10 a 15 cm; mistura de material idêntico ao dos horizontes anteriores com calcário friável; argiloso; estrutura prismática média ou grosseira forte; a percentagem de carbonatos aumenta com a profundidade; pH 7,0 a 8,0.

Transição gradual para

Horizonte C e CCa – Material originário: mistura de calcário friável com dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas muito meteorizadas.

3.2. Operações culturais nas parcelas do Ribatejo e do Alentejo

As operações culturais em todas as parcelas para a cultura da couve-brócolo do Ribatejo e do Alentejo foram realizadas dentro do ano agrícola, entre 1 de setembro e 31 de agosto, estando estas apresentadas no calendário de operações culturais geral no Anexo I.

Nos Anexos II e III encontram-se descritas as informações gerais de cada uma das regiões divididas por parcelas.

Seguidamente, fez-se a descrição mais detalhada das operações culturais realizadas por parcelas.

3.2.1 Operações culturais nas parcelas do Ribatejo

3.2.1.1 Parcela Praias

A área de regadio desta parcela é de 7,5 hectares e é composta por uma só folha. Destina-se a culturas de primavera/verão e outono/inverno, numa sequência de: Milho (2015) → Batata (2016) → Couve-brócolo (2016/2017). A rega foi realizada por aspersores estacionários que conseguem dar uma cobertura total da área da parcela.

As operações culturais adjacentes à cultura da couve-brócolo iniciaram-se no final do ano agrícola de 2016, na 2ª quinzena de agosto, com a realização de uma gradagem e a incorporação do adubo de fundo 13-10-20 (N-P-K) (300 kg/ha) com a ajuda de um rototerra. No final destas operações efetuou-se a instalação da cultura através de um plantador.

Na 1ª quinzena de setembro realizou-se o controlo químico de infestantes em pós-plantação, com o principal objetivo de anular e reduzir a competição das infestantes perenes e vivazes com a cultura na fase precoce do seu ciclo. Segundo Barros & Freixial (2011) os herbicidas devem ser sistémicos porque quando aplicados na parte aérea das plantas, estes irão ser translocados no sistema vascular juntamente com a seiva, indo atingir os órgãos reprodutivos subterrâneos (rizomas, estolhos, bolbos, tubérculos, etc.). Neste caso, foram utilizados os herbicidas Goal (Suspensão concentrada (SC) com 480 g/L ou 41% (p/p) de oxifluorfena) (0,2L/ha) e Butisan (Suspensão concentrada (SC) com 500 g/L ou 43% (p/p) de metazaclo) (1,5L/ha), aplicados com um pulverizador.

Na 1ª quinzena de outubro efetuaram-se diversas aplicações; uma aplicação do inseticida Judo (Suspensão de cápsulas com 100 g/L ou 9,7% (p/p) de lambda-

cialotrina) (0,75 ml/ha) para a lagarta-da-couve; uma aplicação do fungicida EKYP MZ (Pó molhável com 64% (p/p) de mancozebe e 8% (p/p) metalaxil) (2,5 kg/ha) para a Alternariose e a aplicação do adubo de cobertura Rhizovit 31: 31-0-0 (N-P-K) (300 kg/ha). Na 1ª quinzena de novembro também se realizou a aplicação dos inseticida e fungicida; Altacor (Grânulos dispersíveis em água (WG) com 35% (p/p) de clorantraniliprol) (200 ml/ha) e SIGNUM (Grânulos dispersíveis em água com 26,7 % (p/p) de boscalide e 6.7 % (p/p) de piraclostrobina) (1,2 kg/ha), respetivamente, para os mesmos problemas fitossanitários apresentados na 1ª quinzena de outubro. Todas as operações efetuadas nesta parcela foram realizadas por máquinas presentes na exploração do agricultor.

A colheita manual da couve-brócolo tem início na 2ª quinzena de novembro e termina na 1ª quinzena de janeiro. Para finalizar, a produção obtida nesta parcela foi de 7 ton/ha, estimando-se assim um total de 53 toneladas.

3.2.1.2 Parcelas Álamos

A área de regadio desta parcela é uma só folha de 1,8 hectares. Destina-se a culturas de primavera/verão e outono/inverno, numa sequência de culturas: Milho (2015) → Tomate (2016) → Couve-brócolo (2016/2017). O sistema de rega utilizado nesta parcela foi o mesmo utilizado na parcela Praias.

As operações culturais iniciaram-se na 1ª quinzena de setembro, com a realização de uma gradagem e a incorporação do adubo de fundo 10-12-6 (N-P-K) (600 kg/ha) com a ajuda de um rototerra. No final destas operações efetuou-se a instalação da cultura através de um plantador.

Como na parcela Praias houve um controlo químico de infestantes em pós-plantação na 2ª quinzena de setembro com os mesmos herbicidas e concentrações utilizados anteriormente.

Na 2ª quinzena de outubro há a aplicação de o adubo de cobertura, Nitromagnésio 27-3,5-3,5 (N-P-K). Todas as operações efetuadas nesta parcela foram realizadas por máquinas pertencentes na exploração do agricultor.

Entre a 2ª quinzena de dezembro e a 1ª de janeiro foi realizada a colheita manual da couve-brócolo. A produção nesta parcela foi de 7,8 ton/ha, estimando-se assim um total de 14 toneladas.

3.2.2 Operações culturais nas parcelas do Alentejo

3.2.2.1 Parcela Quartijos

A área de regadio desta parcela é composta por uma só folha de 13 hectares. Destina-se a culturas de primavera/verão e outono/inverno, numa sequência de culturas: Trigo (2015) → Girassol (2016) → Couve-brócolo (2016/2017). A rega foi realizada por um canhão com enrolador que consegue dar uma cobertura total da área da parcela.

As operações culturais iniciaram-se na mesma quinzena que a parcela Praias, na 2ª quinzena de agosto, com a realização de uma gradagem e a incorporação do adubo de fundo 10-10-22 (N-P-K) (500 kg/ha) com a ajuda de um rototerra. No final destas operações efetuou-se a instalação da cultura através de um plantador.

Como nas parcelas do Ribatejo houve um controlo químico de infestantes em pós-plantação na 1ª quinzena de setembro, com os mesmos herbicidas e concentrações utilizados anteriormente.

Na 2ª quinzena de outubro e 1ª quinzena de Novembro efetuou-se o controlo químico para a lagarta-da-couve e da Alternariose, tal como referido anteriormente na parcela Praias. Na 2ª quinzena de outubro houve uma aplicação do adubo de cobertura, Nitromagnésio. Todas as operações efetuadas nesta parcela foram realizadas por máquinas pertencentes à exploração do agricultor.

Na 2ª quinzena de novembro houve a aplicação de um inseticida para a lagarta-da-couve em que se utilizou o Altacor (100 g/ha) e iniciou-se a colheita manual, tendo esta terminado na 1ª quinzena de dezembro. A produção nesta parcela foi de 12,2 ton/ha, estimando-se assim um total de 159 toneladas.

3.2.2.2 Parcela Herdade da Canada

A área de regadio desta parcela é composta por uma só folha de 10 hectares. Destina-se a culturas de primavera/verão e outono/inverno, numa sequência de culturas: Couve-brócolo (2015) → Soja (2016) → Couve-brócolo (2016/2017). A rega foi realizada por 'pivot' que consegue dar uma cobertura total da área da parcela.

As operações culturais iniciaram-se na 2ª quinzena de setembro com uma adubação de fundo 10-10-22 (N-P-K) (400kg/ha). Na 1ª quinzena de outubro realizou-se uma gradagem e um rototerra. No final destas operações efetuou-se a instalação

da cultura através de um plantador e o controlo químico de infestantes pós-plantação, com os herbicidas e concentrações utilizados nas parcelas anteriores.

Na 1ª quinzena de novembro, como na parcela Quartijos, houve uma aplicação de fungicida, EKYP MZ (2,5 kg/ha) para a Alternariose. Na 1ª quinzena de dezembro houve a aplicação de inseticida para a lagarta-da-couve e fungicida para a Alternariose, tendo sido utilizados o Steward (Grânulos dispersíveis em água contendo 30% (p/p) de indoxacarbe) (85 g/ha) e o SIGNUM (1,2 kg/ha), respetivamente. Estas operações foram realizadas com máquinas pertencentes na exploração do agricultor.

A colheita manual da couve-brócolo teve início na 2ª quinzena de janeiro e terminou na 2ª quinzena de fevereiro. Tendo-se registado a produção final de 6,3 ton/ha, estimando-se assim um total de 63 toneladas.

3.3 Sistemas de regas nas diferentes parcelas no Ribatejo e no Alentejo

Os sistemas de rega utilizados nas diversas parcelas foram; na região do Ribatejo em ambas as parcelas foram aspersores estacionários e na região do Alentejo, utilizou-se a aspersão por canhão na parcela Quartijos e 'pivot' na parcela Herdade da Canada.

Segundo Pereira (2004) e Oliveira (2011), os aspersores são equipamentos que aplicam a água sobre o solo e a cultura em pequenas gotas, imitando a chuva (Figura 38). Este sistema de rega é apropriado para a maioria das culturas e é adaptável a quase todos os solos regáveis, porque os aspersores possuem uma larga gama de características e capacidades, tais como a aplicação de qualquer pluviometria horária respeitando os espaçamentos e o seu uso em solos de textura fina e com baixas taxas de infiltração, por outro lado este sistema não se adapta a solos com uma taxa de infiltração muito baixa, $\leq 3 \text{ mm h}^{-1}$.

Algumas das desvantagens associadas a este tipo de sistema de rega são; a baixa eficiência de aplicação, grandes perdas de água por evaporação quando estamos na presença de



Figura 38 - Exemplo da rega por aspersão nas parcelas da região do Ribatejo (Fonte: <http://www.symbolution.pt>, 2017).

temperaturas elevadas e pode criar condições favoráveis ao desenvolvimento de determinados tipos de doenças, devido ao seu modo de aplicação, podendo originar um gasto suplementar com os tratamentos para o seu combate.

Os mesmos autores referem que os canhões são grandes aspersores rotativos que funcionam com alta ou muito alta pressão para regar grandes áreas debitando grandes quantidades de água. Este sistema pode ser utilizado como os aspersores em sistemas de aspersão estacionários, deslocáveis ou de cobertura total, mas o seu uso mais comum é quando montado num carrinho ou num trenó, que se move continuamente ao longo do terreno enquanto se efetua a rega (Figura 39). No entanto, este sistema tem um consumo elevado de energia e de funcionamento.



Figura 39 - Exemplo de rega por canhão com enrolador na parcela Quartijos (Fonte: <http://www.traxco.pt>, 2016).

Algumas desvantagens deste sistema, tal como no sistema de aspersores, é o de criar condições favoráveis ao desenvolvimento de determinados tipos de doenças e o grande tamanho da gota formada, que pode causar erosão no solo e/ou danificar a planta.

Este sistema de rega não é aconselhado para a utilização em culturas sensíveis, em culturas que façam uma deficiente cobertura do solo, durante as fases críticas do desenvolvimento vegetativo, como por exemplo a germinação, ou a floração e em solos que apresentem uma taxa de infiltração baixa.

Também para o sistema de aspersão por 'pivot' (Figura 40), Pereira (2004) e Oliveira (2011) referem que este sistema foi concebido para aplicar



Figura 40 - Exemplo de rega por 'pivot' na parcela Herdade da Canada (Fonte: <http://www.traxco.pt>, 2016).

regas pequenas e frequentes. Assim, estes estão principalmente adaptados a terrenos arenosos, os quais podem absorver facilmente as altas pluviometrias, além de apresentarem pequenos problemas no que se refere à possibilidade de atascamento das rodas. Por outro lado, estes sistemas estão normalmente bem adaptados a uma gama bastante grande de solos, culturas e declives de terreno, já que a flexibilidade das uniões das diversas torres permite acompanhar as variações de cota do terreno.

Segundo Pereira (2004) a dotação deverá ser sempre menor que a taxa de infiltração do solo de forma a evitar a acumulação de água à superfície, as perdas por escorrimento e a erosão do solo. Na Figura 41 estão representadas as dotações máximas que devem ser aplicadas no solo de acordo com as condições de infiltração e o declive do próprio solo.

Declive	0-5 %	5-8 %	8-12 %	12-16 %
Textura e perfil do solo	ip máx (mm/h)			
Arenosos até 1,8 m	50	38	25	13
Arenosos sobre horiz. mais compactados	38	25	19	10
Franco arenosos até 1,8 m	25	20	15	10
Franco arenosos sobre horizontes mais compactados	19	13	10	8
Franco limosos até 1,8 m	13	10	8	5
Franco limosos sobre horizontes mais compactados	8	6	4	2,5
Argilosos ou Franco argilosos	4	2,5	2	1,5

Figura 41 – Taxas de aplicação de diferentes solos de acordo com as suas condições de infiltração e declive (Adaptado de Keller & Bliesner, 1990).

Após a análise da figura anterior, sabendo que o declive de todas as parcelas não ultrapassa os 5%, consegue-se atribuir aos solos de cada uma das parcelas as suas respectivas intensidades de precipitação (Quadro 9), dando-nos uma perceção se os sistemas de rega utilizados estão em consonância com as exigências do solo e da cultura.

Quadro 9 - Resumo das taxas de aplicação adequadas para cada tipo de solo presente nas nossas parcelas.

Parcela/ sistema de rega	Solo	Intensidade de Precipitação (mm/h) (Taxa máxima de aplicação)	Sistemas de rega de cada parcela (mm/h)
<u>Praias/ aspersores</u>	<i>Ac</i>	13	3 mm/h - 15 mm/h
<u>Álamos/ aspersores</u>			
<u>Herdade da Canada/ 'pivot'</u>	<i>Pv</i>	4	5 mm/h - 30 mm/h
	<i>Pm</i>	19	
	<i>Bvc</i>	4	
<u>Quartijos/ canhão</u>	<i>Vc</i>	19	10 mm/h - 20 mm/h

Ao interligarmos as informações referidas anteriormente (Figura 41) com as informações fornecidas pelo Quadro 9, concluiu-se que os sistemas de rega utilizados em cada parcela estão adequados ao tipo de solo que lá se encontra, indo assim ao encontro à exigência referida por Pereira (2004).

3.4 Recolha de material edáfico

De cada uma das quatro parcelas em estudo, foram retiradas amostras de solo, antes da instalação da cultura, de modo a avaliar quais os microorganismos presentes nesses solos. A amostragem foi realizada no mês de julho de 2016 segundo o método de estrela (Figuras 42 e 43) com recurso a uma sonda, que permitiu retirar as amostras dos primeiros 40 cm de solo. Entre as recolhas das amostras de cada parcela, a sonda foi devidamente lavada para evitar contaminações de solo para solo.

Ribatejo

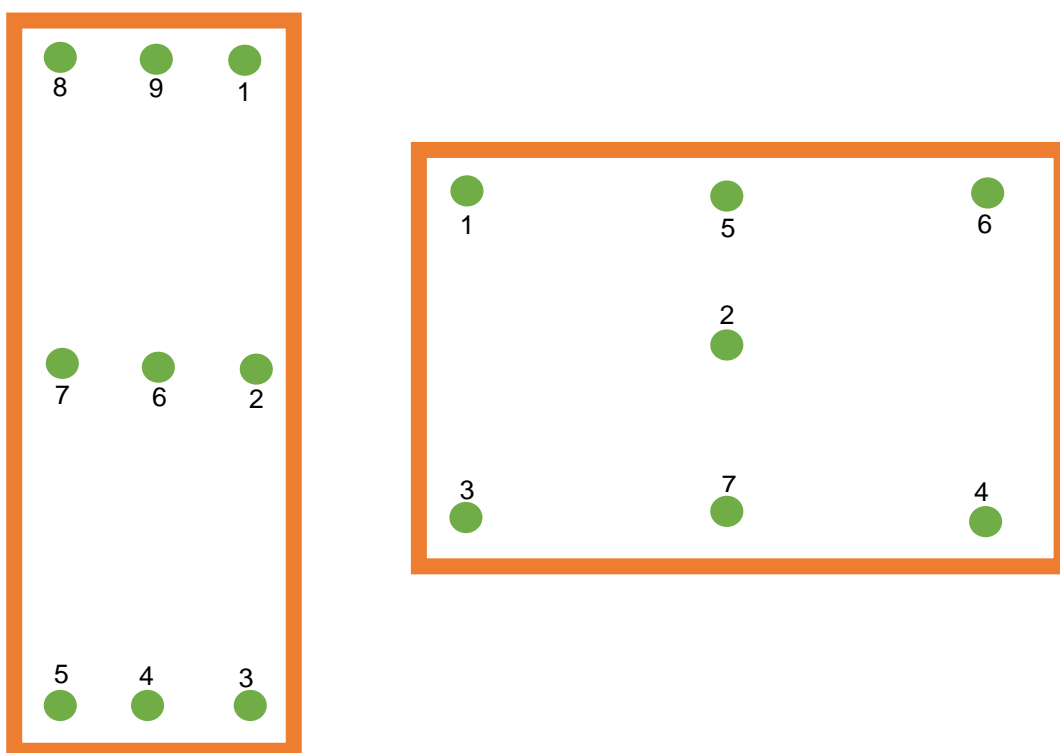


Figura 42 – Esquema da recolha das amostras de terra das parcelas Praias e Álamos, respetivamente, recorrendo ao método de estrela.

Nas parcelas do Ribatejo retiraram-se mais duas amostras do que aquelas que o método de estrela exige, neste caso o método exige cinco amostras, devido às grandes dimensões das parcelas.

Alentejo

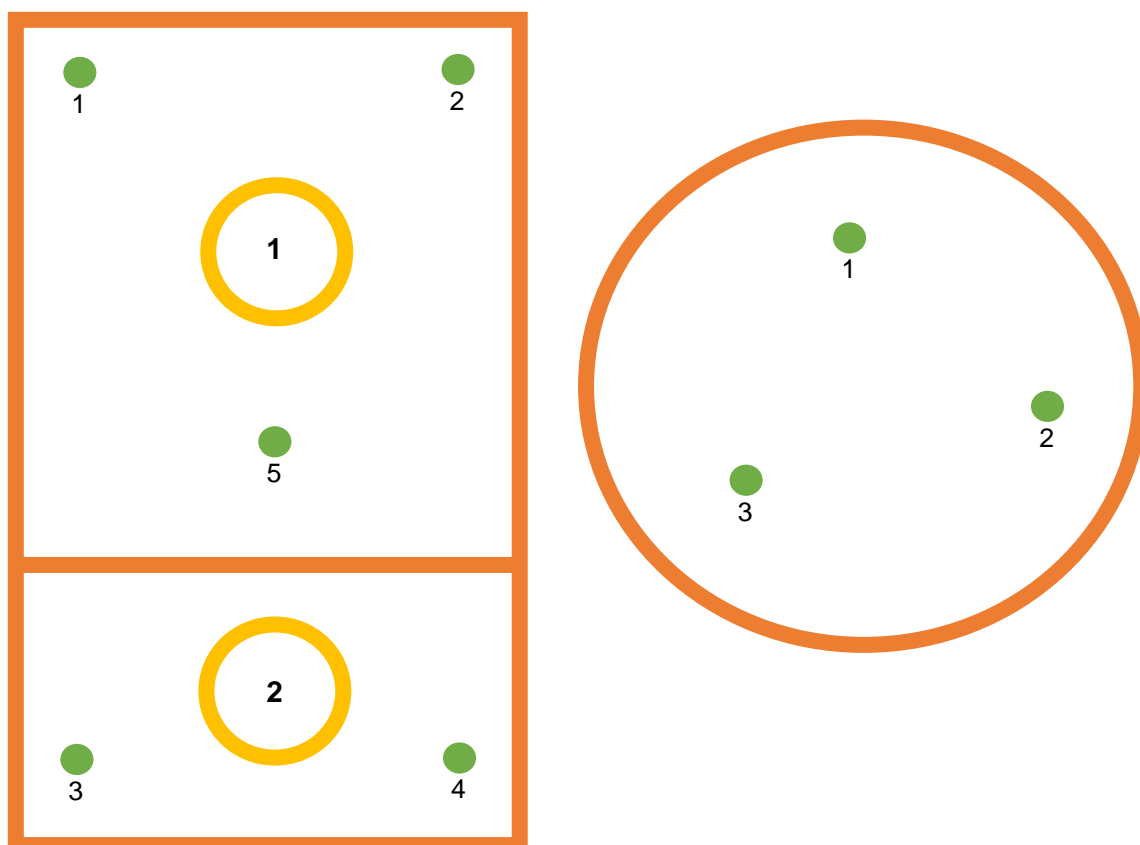


Figura 43 – Esquema da recolha das amostras de terra das parcelas Quartijos e Herdade da Canada, respetivamente, recorrendo ao método de estrela.

Na parcela Quartijos, no Alentejo, retiraram-se amostras de duas zonas distintas, zona 1 e da zona 2 (Figura 43), porque segundo o agricultor eram zonas com solos totalmente diferentes. Já na parcela Herdade da Canada retiraram-se só três amostras porque nesta parcela se encontrava um 'pivot' e o método de estrela não iria ser realizado corretamente. Mas, retiraram-se 3 amostras que abrangiam a área total que iria ser ocupada pela cultura.

3.5 Recolha de material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi constituído por dois tipos de amostras: 1) amostras de plantas jovens de couve-brócolo, provenientes dos viveiros que forneceram plantas, para cada uma das parcelas em estudo, e 2) couves-brócolo com sintomatologias sugestivas de doença, que foram surgindo durante o ciclo de vida da cultura, no campo.

As amostras das plantas de viveiro foram recolhidas aleatoriamente no mês de agosto de 2016, quando já se encontravam com um desenvolvimento vegetativo considerado normal para a sua instalação no campo e sem sintomas visíveis de doença. Depois de selecionadas, as plantas foram colocadas em sacos e identificadas, tendo a sua conservação sido efetuada a 4°C até ao seu processamento. O material vegetal constituído por couves-brócolo sintomáticas, provenientes do campo, foi recolhido entre os meses de setembro e dezembro de 2016. Depois de colhidas e identificadas foram conservadas como referido para as amostras de plantas jovens.

3.6 Colheita de água de rega

Durante o mês de outubro de 2016, já com a cultura em desenvolvimento em cada uma das parcelas, foram recolhidas amostras de água de rega, de modo a poder avaliar o estado sanitário deste elemento fundamental para a cultura. As amostras foram colhidas diretamente das fontes de fornecimento de água, tendo variado entre parcelas. Assim, foram recolhidas de furos (parcelas Praias e Herdade da Canada), de barragem (parcela Quartijos) e de tanque (parcela Álamos), colocadas em garrafas com a identificação da parcela e deixadas a 4°C até à sua análise em laboratório.

3.7 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material edáfico

As operações laboratoriais realizadas para o isolamento de microorganismos foram sempre realizadas em bancadas, previamente desinfetadas com álcool a 96% e junto da área de influência de chama, proveniente de bicos de Bunsen, com o objetivo de cumprir as condições de assepsia e diminuição do risco de contaminação por outros microorganismos.

Todo o material utilizado neste trabalho, vidro, plástico, porcelana e meios de cultura, foram sujeitos a um ciclo de esterilização em autoclave (Uniclave 88, A.J. Costa), a uma temperatura de 120°C e à pressão de 1 atmosfera, durante 20 minutos.

Para o isolamento dos microrganismos do solo, realizou-se uma suspensão de 250 g de cada um dos solos em análise em 400 mL de água ultra-pura sendo sido feitas duas sub-amostras (Figura 44). Para estas suspensões utilizaram-se Erlenmeyers de 500 mL, sendo estas agitadas com uma vareta de vidro durante alguns minutos, de modo a libertar os possíveis microorganismos que estivessem nos agregados de solo. Posteriormente deixou-se sedimentar durante 10 min, de modo a que a maioria das partículas de solo fossem depositadas no fundo e ficando com os possíveis microorganismos em suspensão. Com uma pipeta Pasteur de plástico, foram retiradas de cada uma das suspensões, duas amostras do sobrenadante de 1mL e colocadas, cada uma delas, em diferentes placas de Petri (90 mm) com meio de cultura 'potato dextrose agar' (PDA) (2,9 g de PDA num litro de água) (Figura 45). Ficando depois as placas a 24°C durante 4 a 8 dias de modo a que os microorganismos presentes pudessem crescer visivelmente (Figuras 46 e 47).



Figura 44 - Suspensão de solo do Ribatejo com as suas respetivas subamostras.

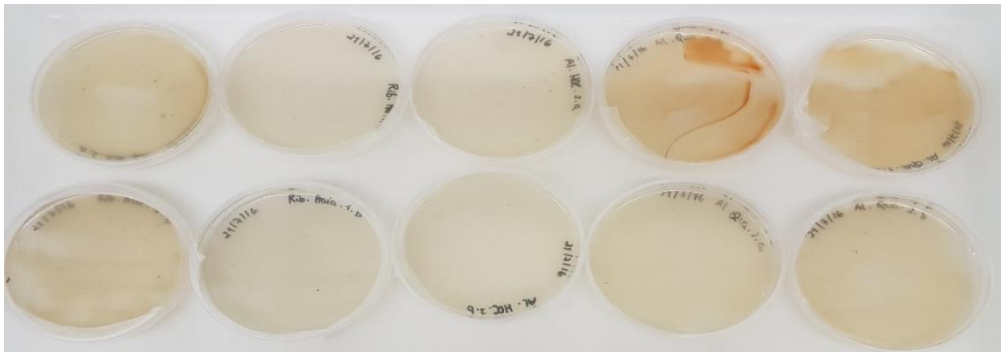


Figura 45 - 1 ml de suspensão de solo nas placas de Petri (90 mm) das diferentes subamostras.

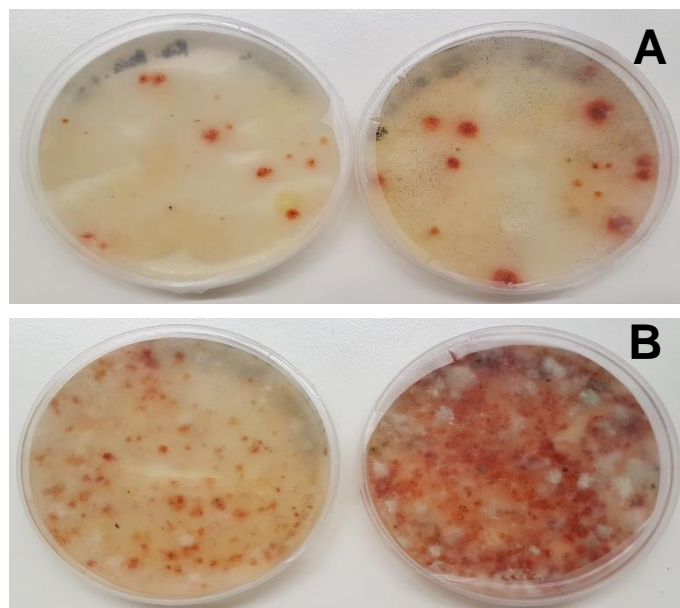


Figura 46 - Placas das subamostras das A) Praias e B) Álamos, com os microorganismos que cresceram provenientes da suspensão de solo

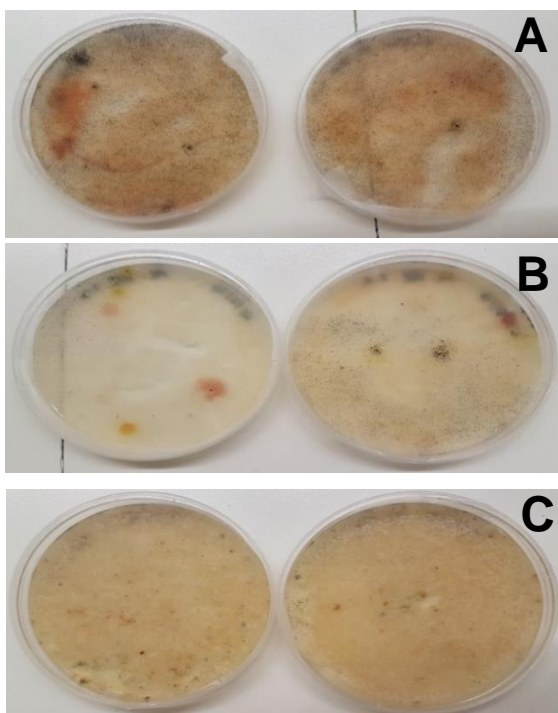


Figura 47 - Placas das subamostras dos A- Quartijos 1, da B- Quartijos 2 e C- Herdade da Canada com os respectivos microorganismos que cresceram provenientes da suspensão de

Após o período de crescimento dos microorganismos, estes foram repicados para placas de Petri (60 mm) com meio de cultura PDA, de modo a obter a cultura pura dos diferentes microorganismos (Figura 48).

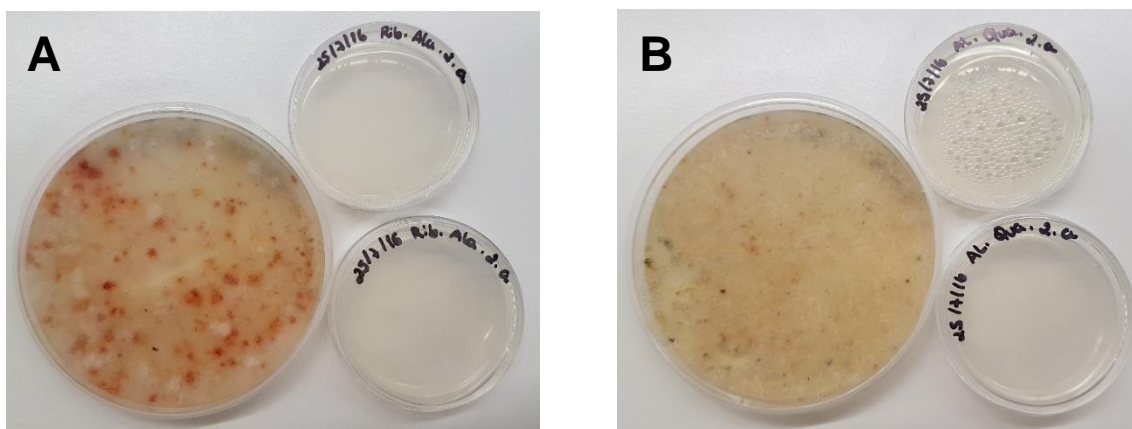


Figura 48 - Repicagens para as placas de Petri (60 mm) de duas subamostras do A- Ribatejo e B- Alentejo.

Os isolados obtidos em cultura pura foram assim mantidos até ao preenchimento completo das placas, tendo sido depois efetuadas preparações em lâmina na presença do corante azul de lact-fenol e observadas no microscópio U-TV1X-2 (Olympus). Depois dos microorganismos terem sido caracterizados morfológicamente foram agrupados e as placas de Petri seladas com parafilm e colocadas a 4°C.

3.8 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material vegetal

Utilizaram-se 7 amostras aleatórias de plantas provenientes de 3 viveiros distintos, que foram os mesmos que forneceram as plantas que se instalaram nas parcelas deste estudo (Figura 49). No Quadro 10 apresentam-se; as amostras utilizadas, consoante a região/parcela em que foram instaladas, o número de plantas retiradas para cada amostra, a semana de plantação e qual o viveiro correspondente.

Quadro 2 - Plantas recolhidas das diferentes amostras provenientes de 3 viveiros para fornecer material vegetal para instalação no campo.

	<u>Região</u>	<u>Parcela(s)</u>	<u>Semana de plantação</u>	<u>Número de plantas</u>	<u>Viveiro</u>
Amostra 1	Ribatejo	Praias/Álamos	35	8 plantas	1
Amostra 2	Alentejo	Quartijos	36	4 plantas	2
Amostra 3	Ribatejo	Álamos	34	6 plantas	3
Amostra 4	Alentejo	Quartijos	37	4 plantas	1
Amostra 5	Alentejo	Quartijos	35	4 plantas	3
Amostra 6	Alentejo	Herdade da Canada	37	4 plantas	3
Amostra 7	Alentejo	Herdade da Canada	38	4 plantas	2



Figura 49 – Exemplo de amostra de plantas provenientes de viveiros utilizadas para testar a presença de microorganismos.

As plântulas, juntamente com o substrato que envolve a sua raiz, foram testadas da seguinte forma: no laboratório, as raízes foram separadas do substrato de modo a que este pudesse também ser analisado separadamente, para a presença de microorganismos. Este, depois de libertado das raízes foi colocado numa suspensão

de 50 mL de água pura, ao que se seguiu um procedimento idêntico ao descrito para as amostras de solo das parcelas (ponto 3.7) (Figura 50).

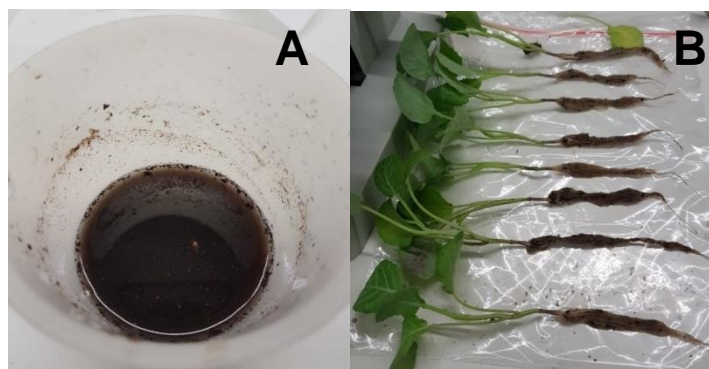


Figura 50 – Suspensão do substrato (A) envolvente das raízes das respectivas plantas (B).

As jovens plantas foram divididas em 3 partes, raízes, caule e folhas. Cada uma dessas partes da planta foi sujeita a uma lavagem prévia, seguida de um ciclo de desinfecções, segundo o protocolo de Verma *et al.*, (2007), iniciando com uma solução de álcool a 96% (v/v), durante três minutos, seguida de uma lavagem com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v), durante três minutos e outra lavagem com uma solução de etanol a 70% (v/v), durante três minutos. Após esta desinfecção, o material vegetal foi lavado com água pura durante um minuto, tendo esta etapa sido repetida três vezes, de modo a remover o excesso de desinfetante (Figura 51). Posteriormente a estas últimas lavagens as amostras foram secas em papel de filtro.

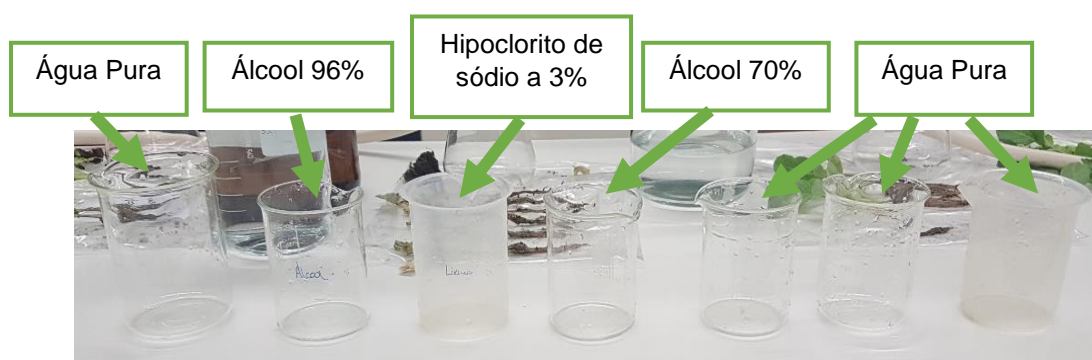


Figura 51 – Etapas da sequência de desinfecção superficial do material vegetal.

O material vegetal desinfetado foi fracionado com um bisturi (Figura 52), sempre junto ao bico de Bunsen.



Figura 52 - Exemplo do fracionamento das amostras de raízes.

O material vegetal desinfetado e fracionado foi colocado em placas de Petri (90 mm) contendo o meio de cultura PDA. Cada placa foi identificada com o número de amostra e parte da planta correspondente e por fim colocada a 24°C, durante 2 a 8 dias, até ao aparecimento dos crescimentos dos microrganismos (Figura 53).

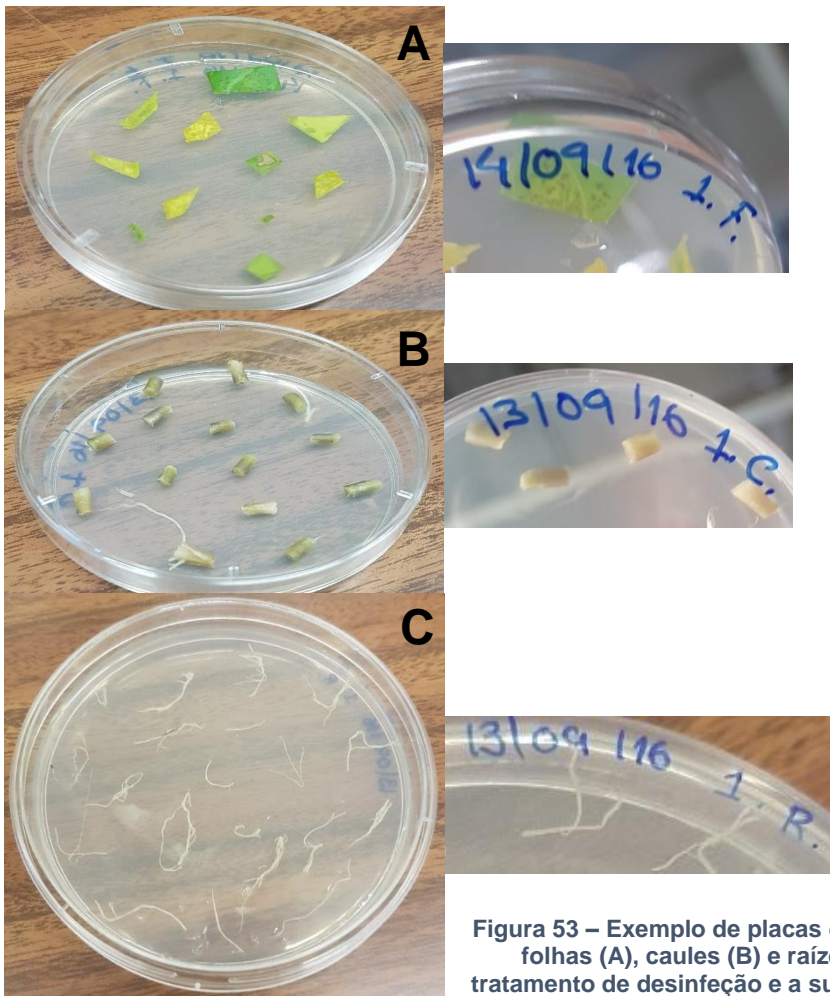


Figura 53 - Exemplo de placas de Petri com amostras de folhas (A), caules (B) e raízes (C) submetidos ao tratamento de desinfecção e a sua respectiva identificação.

Após esse período de crescimento os diferentes microorganismos foram repicados individualmente para placas de Petri (60 mm), contendo meio de cultura PDA, de modo a se obterem culturas puras.

O material vegetal colhido, correspondente às couves-brócolo que apresentavam sintomatologia sugestiva de infecção durante o seu ciclo vegetativo, foi também submetido a um fracionamento e desinfecção das zonas que apresentavam algum tipo de lesão ou sintoma, seguindo o procedimento referido anteriormente (Figura 54). Cada um dos fragmentos obtidos foram colocados em placas de Petri (90 mm) com meio de cultura PDA e deixados a 24°C, durante 4 a 8 dias. Também neste caso os microorganismos obtidos foram colocados em cultura pura em placas de Petri (60 mm) com meio PDA.



Figura 54 – Exemplo de algumas amostras de plantas sintomáticas de couves-brócolo provenientes das diversas parcelas das duas regiões, em diferentes estados de desenvolvimentos e com sintomatologia visível.

3.9 Isolamento e identificação de microorganismos da água de rega

Para a pesquisa de microorganismos causadores das doenças nas couves-brócolo, na água de rega, uma amostra desta, foi submetida a uma centrifugação à velocidade de 3857 g durante 10 min e à temperatura de 10°C, utilizando uma centrífuga de alta velocidade (Sorvall LYNX 4000 Fisher Scientific). Esta operação teve como objetivo a precipitação e concentração de eventuais microorganismos presentes na água (Figura 55).



Figura 55- Exemplo dos copos utilizados na centrifugação das amostras da água de rega.

No final da centrifugação, o sobrenadante foi quase todo descartado, deixando apenas cerca de 2 mL, volume em que se ressuspendeu o precipitado. Este foi depois retirado do copo de centrifugação com uma pipeta Paster e plaqueado em placas de Petri (90 mm), com meio de cultura PDA. Tal como para as restantes culturas estas foram mantidas a cerca de 24°C durante 2 a 8 dias, até se verificar o crescimento de microorganismos, que foram posteriormente repicados para cultura pura em placas de Petri (60 mm).

3.10 Identificação molecular dos microorganismos isolados das plantas sintomáticas do campo

Com o objetivo de identificar molecularmente cada um dos microorganismos isolados das couve-brócolo sintomáticas, procedeu-se da seguinte forma:

3.10.1 Preparação das amostras e extração do DNA total

A partir dos fungos isolados em cultura pura procedeu-se à extração do DNA total. Para isso, o micélio do fungo de cultura pura, foi retirado da placa de Petri com a ajuda de um bisturi desinfetado (álcool a 96% e à chama do bico de Bunsen) para um almofariz de porcelana, onde é macerado em presença de azoto líquido. A amostra foi rapidamente colocada em microtubos de 2 mL, e congelada a -20°C até à sua posterior utilização.

O DNA total das culturas foi extraído usando o método CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio), descrito por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações. Assim, retiraram-se dos -20°C, cada um dos microtubos contendo as estruturas dos microorganismos maceradas e transformadas em pó e adicionou-se a cada um, 600 µL de tampão de extração CTAB 2% (20 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH8,0, 1,4 M NaCl, 2 % CTAB, mais 4 % de PVP, e 0,1 % de β-mercaptoetanol adicionados imediatamente antes da sua utilização) e 0,5 % de Proteinase K. A suspensão foi incubada a 60°C durante 90 min, e agitada por inversão a cada 15 min. Após esta incubação, foram adicionados a cada tubo 600 µL de clorofórmio-alcóol isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados durante 10 min. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 5000 g durante 10 min (Centrifuga 5415R, Eppendorf) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo tendo-se adicionado depois 2,5 volumes de etanol absoluto frio. As amostras foram suavemente homogeneizadas por inversão e novamente centrifugadas a 10000 g (Centrifuga 5415R, Eppendorf) durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o 'pellet' resultante foi lavado com 500 µL de etanol a 70% de modo a eliminar todos os resíduos de sais aderentes ao DNA. Os tubos foram novamente centrifugados a 10000 g (Centrifuga 5415R, Eppendorf) durante 10 min e o sobrenadante descartado. O 'pellet' final foi seco na centrifuga 'speed vacuum' (CentriVap micro IR, Labconco) durante 10 min a 55°C e por fim este foi ressuspensão em 30 µL de água ultra pura e o DNA conservado a -20°C até à sua posterior utilização.

3.10.2 Identificação molecular dos fungos

O DNA total extraído no ponto 3.10.1. foi sujeito a PCR ('Polimerase Chain Reaction' – Reação da polimerase em cadeia), para amplificação da região ITS ('Internal Transcribed Spacer') (Figura 56) a partir do DNA genómico usando 'primers' específicos, o 'primer' direto ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CC TGC GG 3') e o 'primer' reverso ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990).



Figura 56 - Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos 'primers' ITS1 e ITS4.

Para os fungos dos géneros *Alternaria* e *Fusarium*, utilizaram-se para além dos 'primers' ITS outros que amplificavam uma região do gene da β -tubulina. Assim, para *Alternaria* spp. utilizou-se o 'primer' direto TEF1 (5' AGC CGC CGA ACT CGG TAA GG 3') e o 'primer' reverso TEF2 (5' TCT TGG AGT CAC CGG CAA CG 3') (Lawrence, Gannibal, Peever & Pryor, 2013) e para *Fusarium* spp. utilizou-se o 'primer' direto Fa +7 (5' AAC GTC GTC GTC ATC GGC CAC GTC GAC TCT 3'), o 'primer' reverso Ra +6 (5' ACA TAC CAA TGA CGG TGA CAT AGT AGC G 3') para o primeiro PCR. O 'primer' direto Fa (5' TCG TCA TCG GCC ACG TCG ACT CT 3') e o 'primer' reverso Ra (5' CAA TGA CGG TGA CAT AGT AGC G 3') foram utilizados para o segundo PCR (Karlsson, Edel-Hermann, Gautheron, Durlind, Kolseth, Steinberg, Persson & Friberg, 2015).

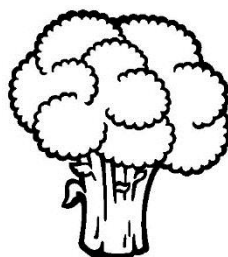
As reações de amplificação para todos os pares de 'primers' realizaram-se nas seguintes condições: para 1 μ L e um volume final de 50 μ L juntou-se; 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Thermo), 1 mM de cada 'primer' e 2,5 U de Dream-Taq DNA polimerase (Thermo), utilizando um termociclador MyCycler (Bio-Rad) a 95°C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, e 72°C durante 60 s e a extensão final a 72°C durante 10 min. Para as amplificações do gene da β -tubulina, houve necessidade de ajustar a temperatura de hibridação dos 'primers' para 60°C (Laurence *et al.*, 2013).

Os produtos amplificados foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,5X: 1,1M Tris; 900mM Borate; 25mM EDTA; pH 8,3)

com uma voltagem constante de 80V, durante aproximadamente 1 hora. Como referência, para posterior análise, utilizou-se o marcador 1 kb DNA Ladder (Thermo).

Após a análise do gel, os produtos de amplificação foram purificados utilizando o Kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação as amostras foram novamente analisadas em gel de agarose, como descrito anteriormente, para avaliação da qualidade do DNA e sua quantificação, tendo depois sido enviadas para sequenciar para a empresa MacroGen-Europa (Holanda).

Os resultados da sequenciação foram analisados com o programa “BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3.” (Hall, 1999) e a procura de seqüências homólogas foi realizada com recurso à base de dados “Basic Local Alignment Search Tools” (BLAST) do “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”. Nesta base de dados as seqüências resultantes ou seqüências finais foram determinadas em ambas as direções, ou seja, desde o ITS1 até ao ITS4 e vice-versa e com os restantes ‘primers’ (Anexos VI, VII e VIII). Sempre que possível as seqüências foram identificadas até à espécie e com um grau de semelhança entre os 95% e os 100%.



4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material edáfico

Os microorganismos isolados nos solos das várias parcelas apresentavam, todos eles, quando observados ao microscópio ótico, características típicas de fungos.

Nos solos das 4 parcelas em estudo foram isolados 64 fungos no total, distribuídos por 27 tipos diferentes. Destes 64 isolados 29 fungos foram isolados da região do Ribatejo, em que se encontraram 11 diferentes tipos de fungos e 35 fungos foram isolados da região do Alentejo, distribuídos por 16 tipos de fungos (Quadro 11). A seleção dos diferentes tipos de fungos foi feita com base na observação das suas características morfológicas, permitindo assim agrupar os organismos com características semelhantes (Figuras 57, 58, 59 e 60).

4.1.1 Região do Ribatejo

Dos 29 fungos isolados do material edáfico das duas parcelas da região do Ribatejo, 17 fungos foram isolados da parcela Praias com um total de 7 tipos de diferentes fungos e 12 fungos foram isolados da parcela Álamos com um total de 4 tipos de diferentes fungos (Quadro 11).

Na parcela Praias encontram-se fungos com diferentes características entre eles, o que nos permitiu agrupá-los em 7 tipos diferentes, como mostra a Figura 57.

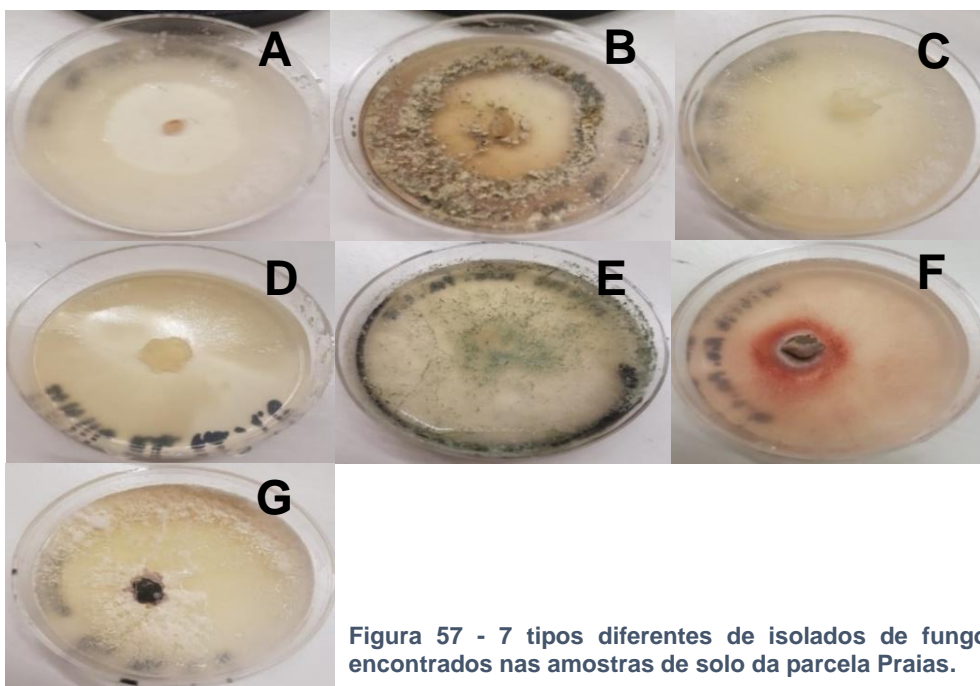


Figura 57 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Praias.

Na parcela Álamos encontraram-se fungos com diferentes características entre eles, o que permitiu agrupá-los em 4 tipos diferentes, como mostra a Figura 58.

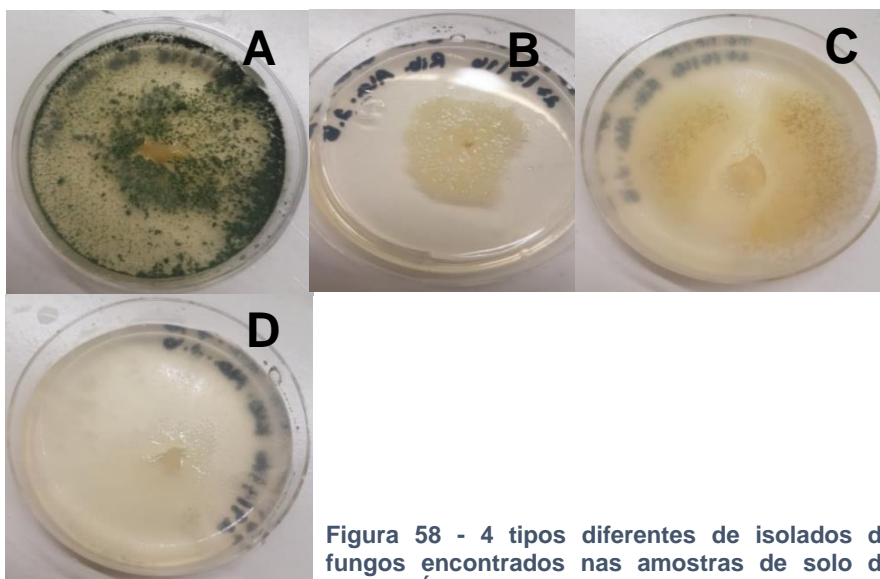


Figura 58 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Álamos.

4.1.2 Região do Alentejo

Dos 35 fungos isolados do material edáfico das duas parcelas da região do Alentejo, 18 fungos foram isolados da parcela Quartijos com um total de 8 tipos diferentes e 17 fungos foram isolados da parcela Herdade da Canada com um total de 8 tipos diferentes (Quadro 11).

Na Figura 59 encontram-se os 7 tipos de fungos isolados da parcela Quartijos com diferentes características entre eles, o que permitiu dividi-los em grupos diferentes.

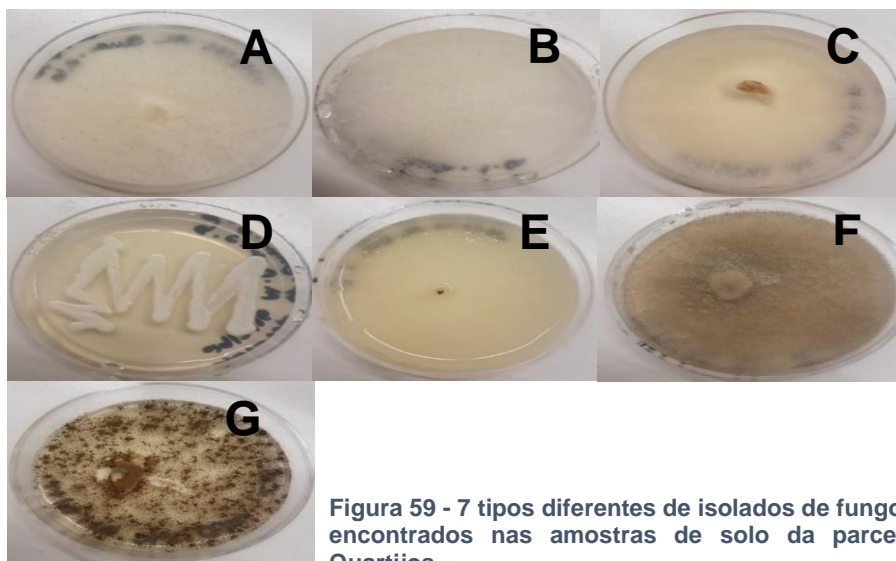


Figura 59 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Quartijos.

Na Figura 60 encontram-se os 8 tipos de fungos isolados da parcela Herdade da Canada com diferentes características entre eles, o que nos permitiu dividi-los em grupos diferentes.

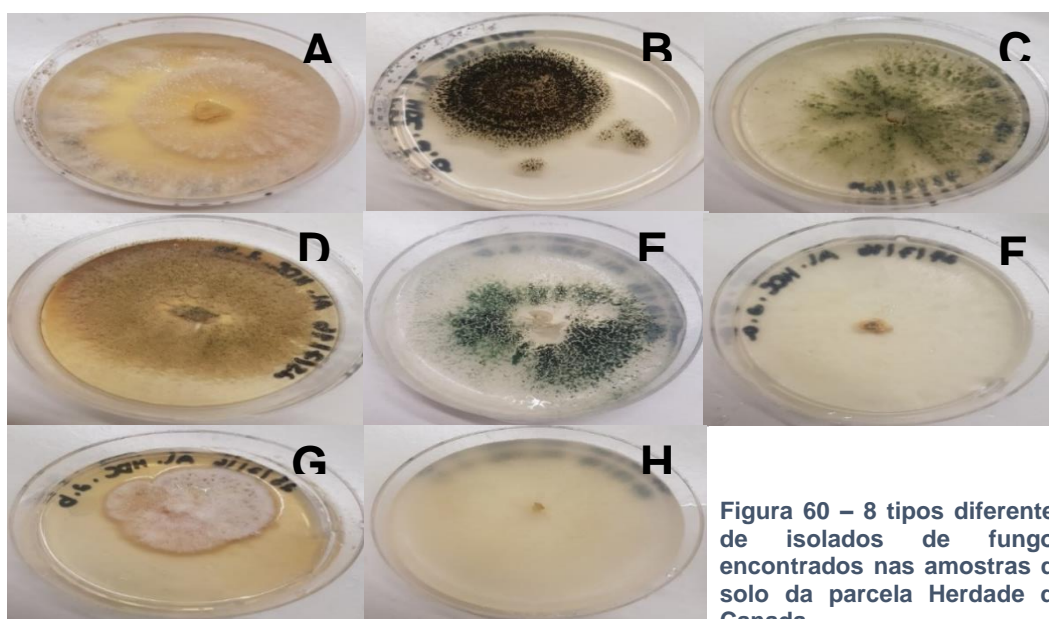


Figura 60 – 8 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de solo da parcela Herdade da Canada.

Os fungos isolados e apresentados nas Figuras 57, 58, 59 e 60 foram posteriormente associados com os fungos que foram isolados das couves-brócolo e que foram considerados causadores de perdas económicas na cultura. No Quadro 11 encontra-se um resumo da informação referida, dando uma visão geral da distribuição destes microorganismos e da totalidade dos mesmos nas 4 parcelas do estudo.

Quadro 3 – Resumo do número total e de tipos isolados de fungos em cada parcela.

	Ribatejo		Alentejo	
	<u>Praias</u>	<u>Álamos</u>	<u>Quartijos</u>	<u>Herdade da Canada</u>
	7 tipos diferentes de fungos	4 tipos diferentes de fungos	8 tipos diferentes de fungos	8 tipos diferentes de fungos
Total de fungos isolados	17 fungos	12 fungos	18 fungos	17 fungos
Total de fungos obtidos	64			

Ao analisar a informação obtida acerca do número de isolados de fungos provenientes do material edáfico nas diferentes parcelas, obteve-se o gráfico da Figura 61. Esta Figura apresenta o número total de fungos isolados do material edáfico das duas regiões em estudo, tendo-se assim obtido no Ribatejo 29 isolados e no Alentejo 35.

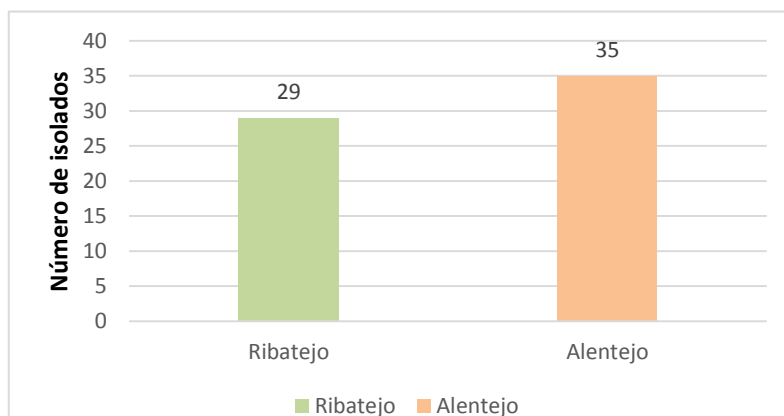


Figura 61 - Número total de fungos por região provenientes do material edáfico.

4.2 Isolamento e identificação de microorganismos provenientes do material vegetal

Os microorganismos isolados do material vegetal, tanto do material proveniente de viveiro, como das plantas sintomáticas recolhidas no campo apresentavam, tanto no aspeto em placa, como por observação ao microscópio ótico, características típicas de fungos.

4.2.1 Amostras de material vegetal proveniente de viveiro

4.2.1.1 Substrato

Ao analisar os substratos das 7 amostras, obtiveram-se 41 isolados de fungos, no total, distribuídos por 31 tipos diferentes (Quadro 12). Destes 41 isolados do substrato, 5 fungos encontravam-se na amostra 1, em que se observaram 2 tipos diferentes de fungos. Na amostra 2 foram isolados 7 fungos, de 6 tipos distintos, na amostra 3 foram isolados 11 fungos de 9 tipos distintos, na amostra 4 foram isolados 4 fungos de 3 tipos distintos, na amostra 5 foram isolados 2 fungos de 2 tipos distintos, na amostra 6 foram isolados 5 fungos de 4 tipos distintos, e por fim, na amostra 7 foram isolados 7 de 5 tipos distintos (Quadro 12). A seleção dos diferentes tipos de fungos foi feita com base nas características visuais e microscópicas dos fungos (Figuras 62, 63, 64, 65, 66, 67 e 68).

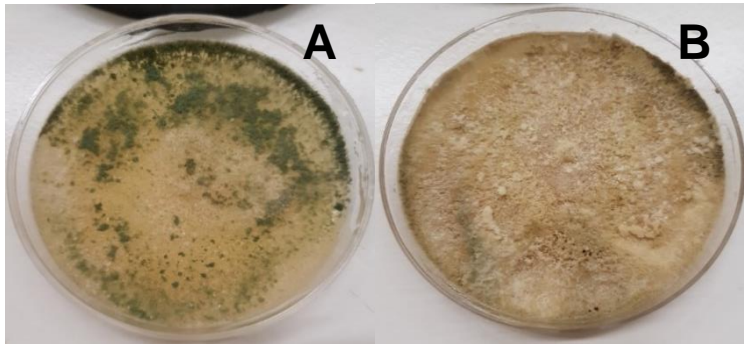


Figura 62 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 1, provenientes do viveiro.

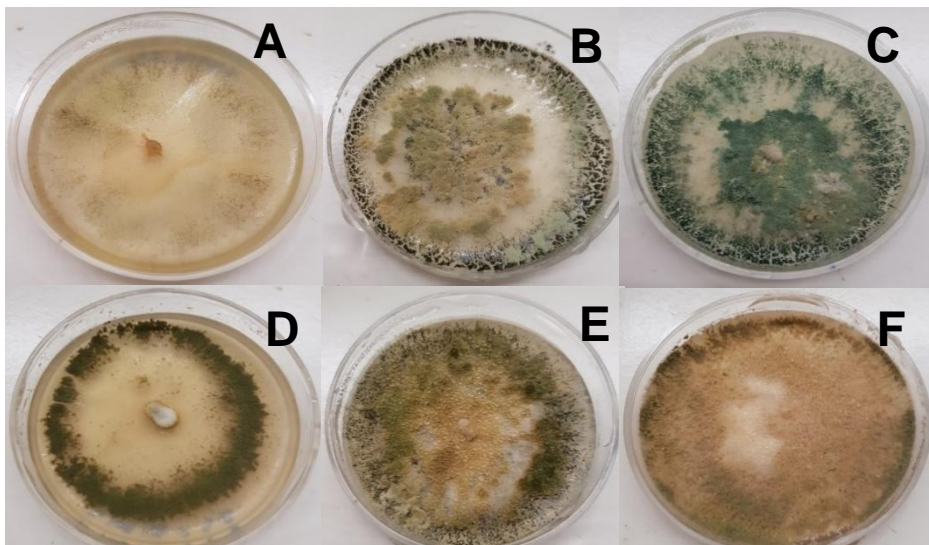


Figura 63 - 6 diferentes tipos de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 2, provenientes do viveiro.

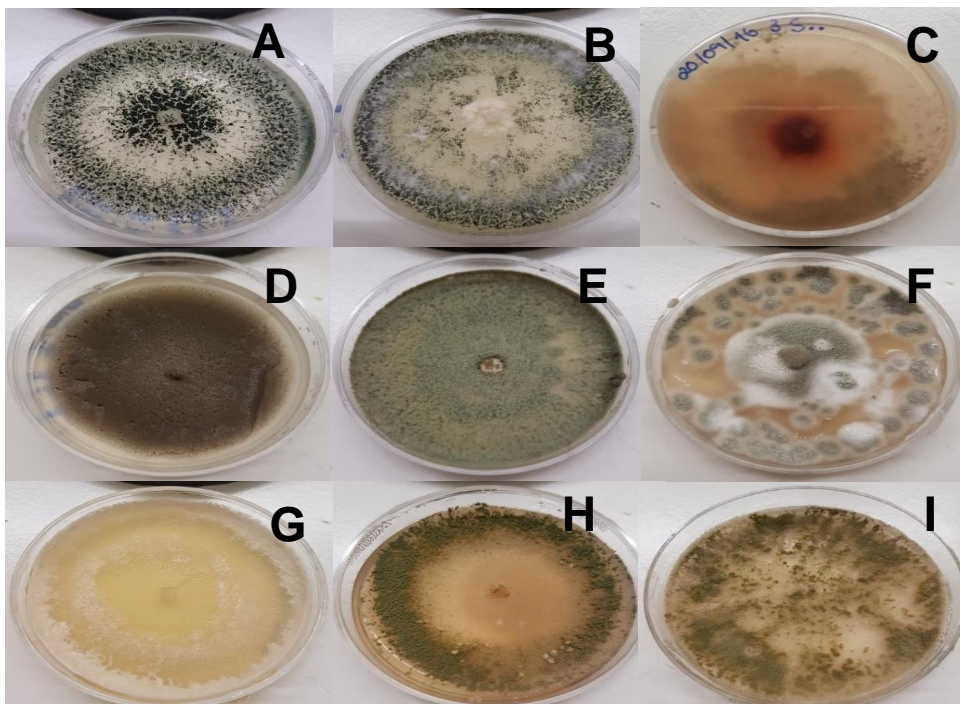


Figura 64 - 9 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 3, provenientes do viveiro.

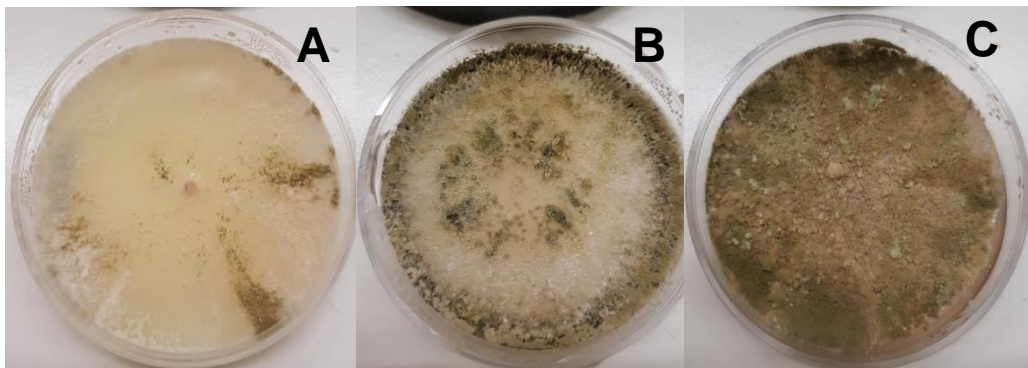


Figura 65 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 4, provenientes do viveiro.

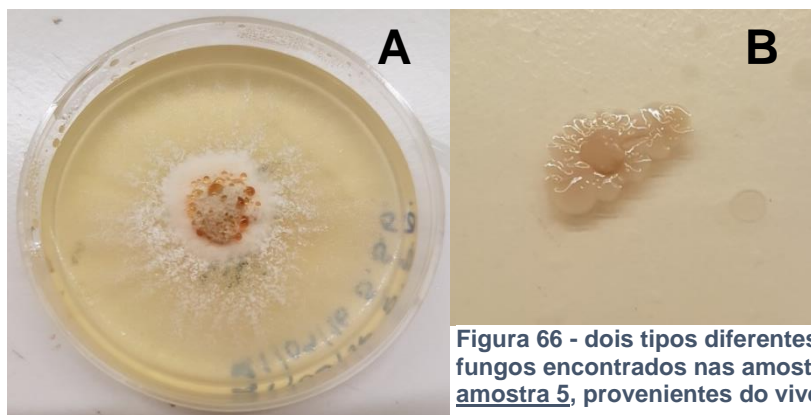


Figura 66 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato de amostra 5, provenientes do viveiro.

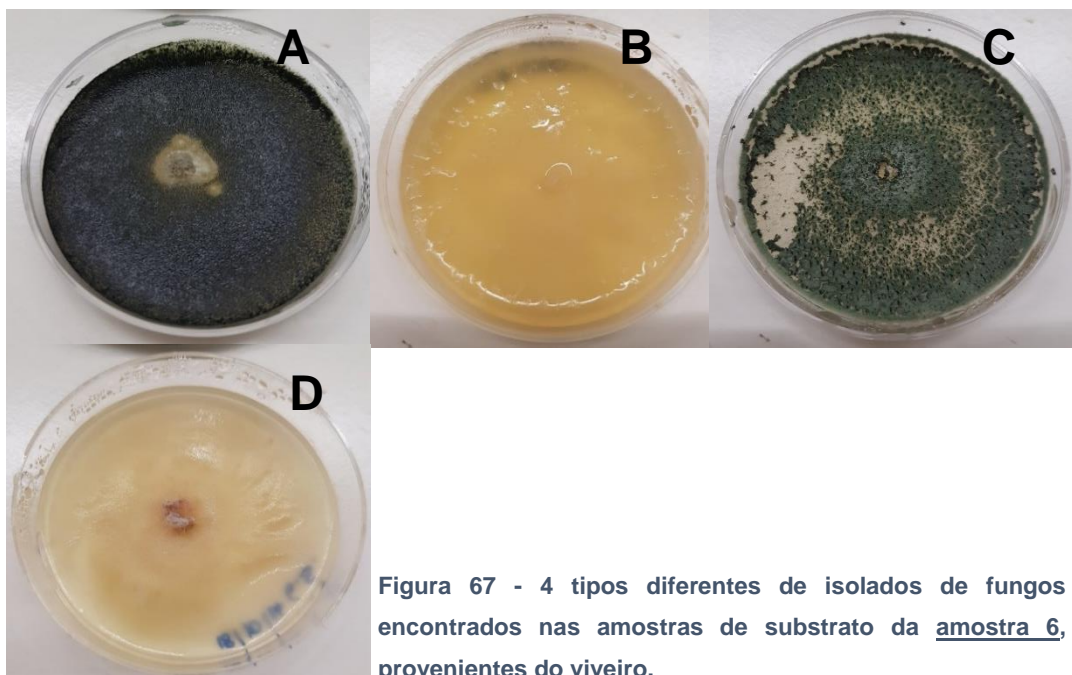


Figura 67 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 6, provenientes do viveiro.

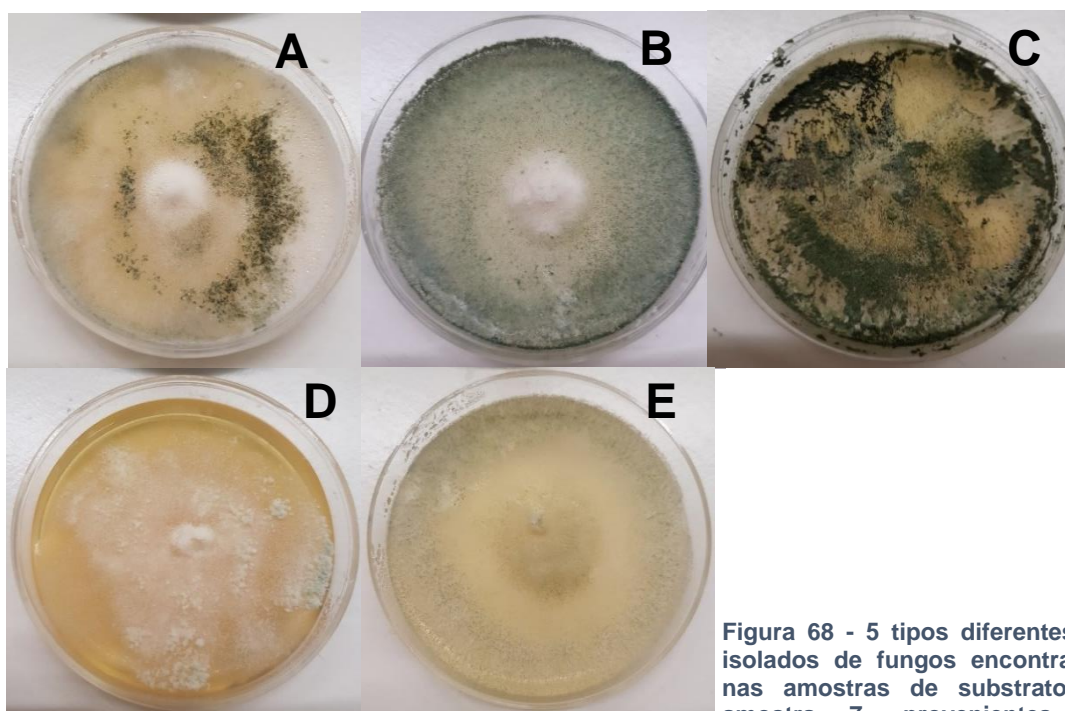


Figura 68 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de substrato da amostra 7, provenientes do viveiro.

Com base nas características visuais e morfológicas apresentadas nas Figuras 62, 63, 64, 65, 66, 67 e 68, estes fungos irão ser comparados com os obtidos das couves-brócolo sintomáticas provenientes do campo.

No Quadro 12, resume-se toda a informação descrita anteriormente, dando uma visão geral da distribuição dos fungos e da totalidade dos mesmos, apresentando quantos tipos diferentes e o seu número total de cada amostra.

Quadro 12 – Número de diferentes tipos de fungos e total de isolados obtidos em cada amostra do substrato (S) testado, proveniente do viveiro.

	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S
	2 tipos de fungos	6 tipos de fungos	9 tipos de fungos	3 tipos de fungos	2 tipos de fungos	4 tipos de fungos	5 tipos de fungos
Total de fungos por tipo	5 fungos	7 fungos	11 fungos	4 fungos	2 fungos	5 fungos	7 fungos
Total de isolados de fungos	41						

4.2.1.2 Raiz

Ao analisar as raízes das jovens plantas provenientes de cada um das 7 amostras dos 3 viveiros, obteve-se um total de 20 isolados de fungos, distribuídos por 17 tipos diferentes (Quadro 13). Dos 20 fungos isolados, 3 foram isolados na amostra 1, em que se encontraram 3 tipos com aspeto e morfologia diferente, na amostra 2 foram isolados 5 fungos, de 3 tipos diferentes, na amostra 4 foram isolados 4 fungos, de 3 tipos distintos, na amostra 5 foram isolados 5 fungos, de 5 tipos diferentes, na amostra 6 foi isolado apenas 1 fungo, e na amostra 7 foram isolados 2 fungos, sendo estes distribuídos um por cada tipo (Figuras 69, 70, 71, 72, 73 e 74).

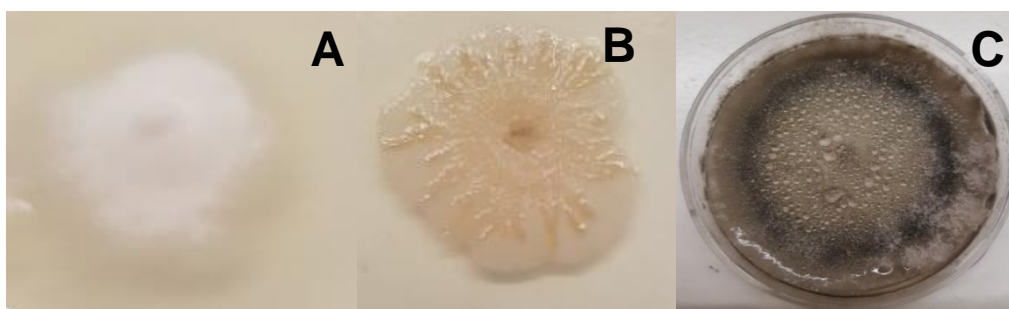


Figura 69 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 1, provenientes do viveiro.

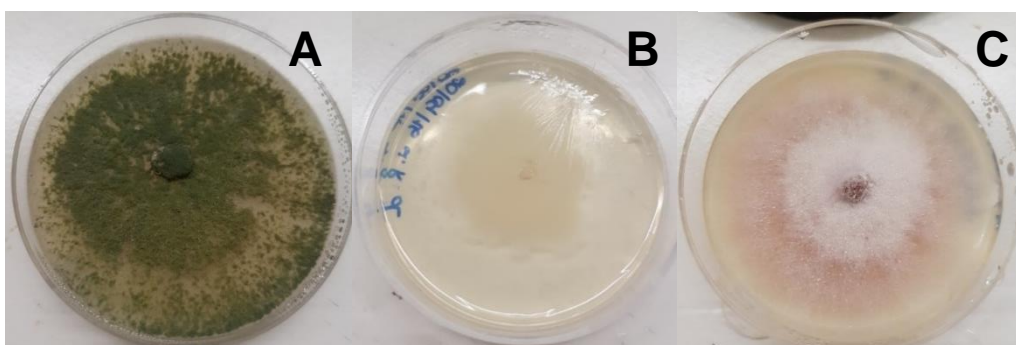


Figura 70 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 2, provenientes do viveiro.

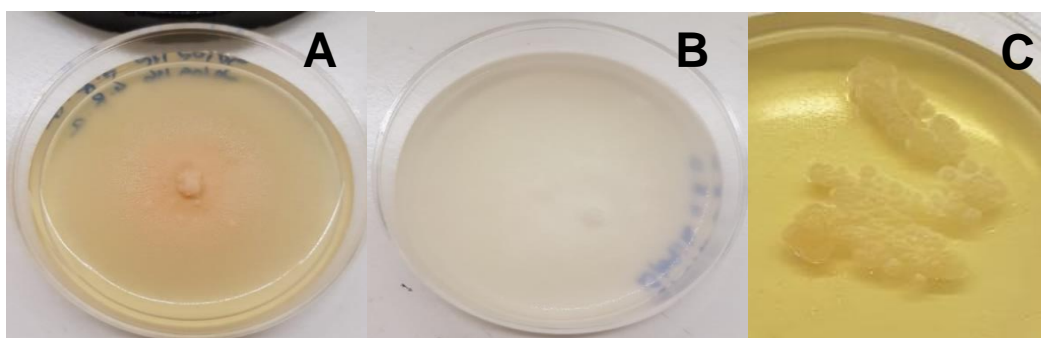


Figura 71 - 3 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 4, provenientes do viveiro.

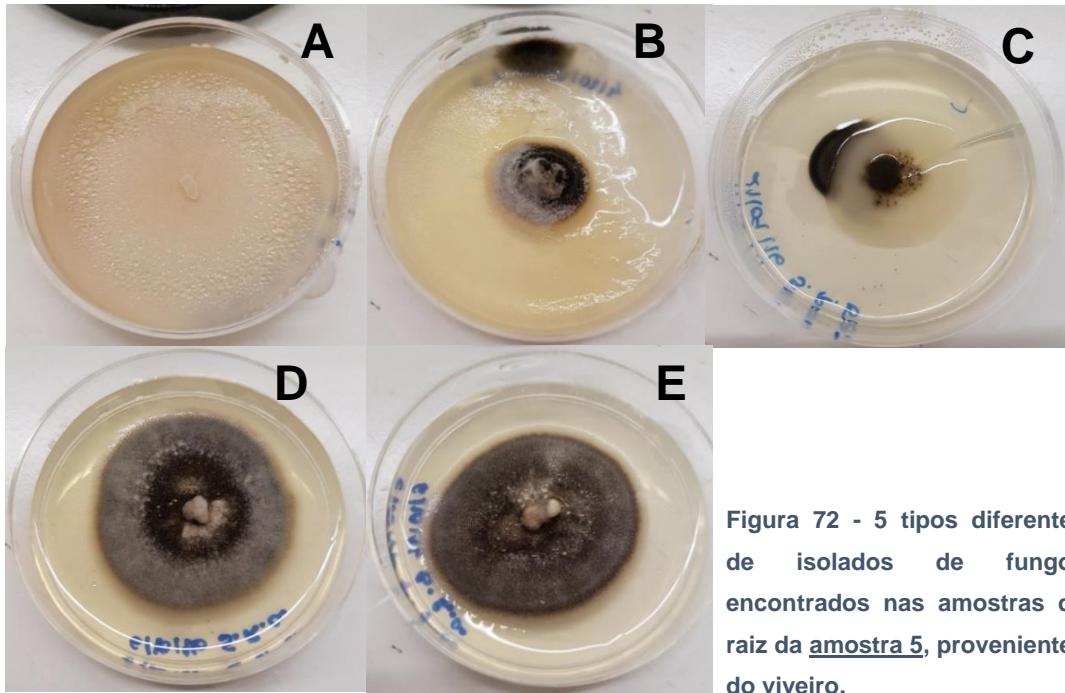


Figura 72 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 5, provenientes do viveiro.



Figura 73 - um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de raiz da amostra 6, provenientes do viveiro.

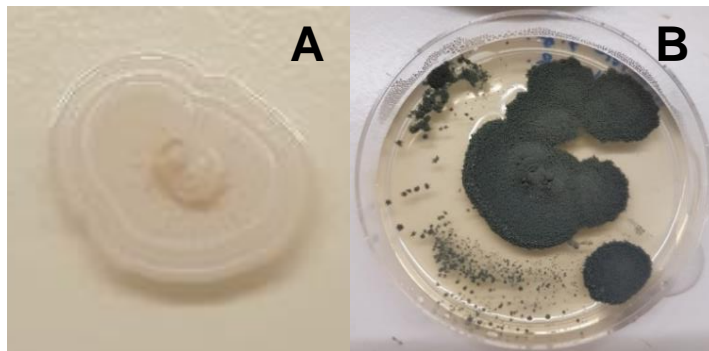


Figura 74 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de raiz da amostra 7, provenientes do viveiro.

No Quadro 13, resume-se a informação descrita anteriormente apresentando quantos tipos de fungos e o seu número total em cada amostra. Com essa informação disposta no Quadro consegue-se ter uma visão geral da distribuição dos microorganismos e da totalidade dos mesmos por amostra.

Quadro 13 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra da raiz (R) testada, proveniente do viveiro.

	1R	2R	4R	5R	6R	7R
	3 tipos de fungos	3 tipos de fungos	3 tipos de fungos	5 tipos de fungos	1 tipo de fungo	2 tipos de fungos
Total de fungos por tipo	3 fungos	5 fungos	4 fungos	5 fungos	1 fungo	2 fungos
Total de isolados de fungos	20					

4.1.1.1 Caule

Os caules das plantas jovens, provenientes das 7 amostras foram analisados, tendo-se obtido microorganismos, que por observação visual e microscópica, apresentavam características típicas de fungos. Das amostras analisadas, apenas as referentes aos caules das plantas da amostra 7, mostraram a presença destes microorganismos, tendo-se isolado um total de 4 fungos de 3 diferentes tipos (Quadro 14) (Figura 75).

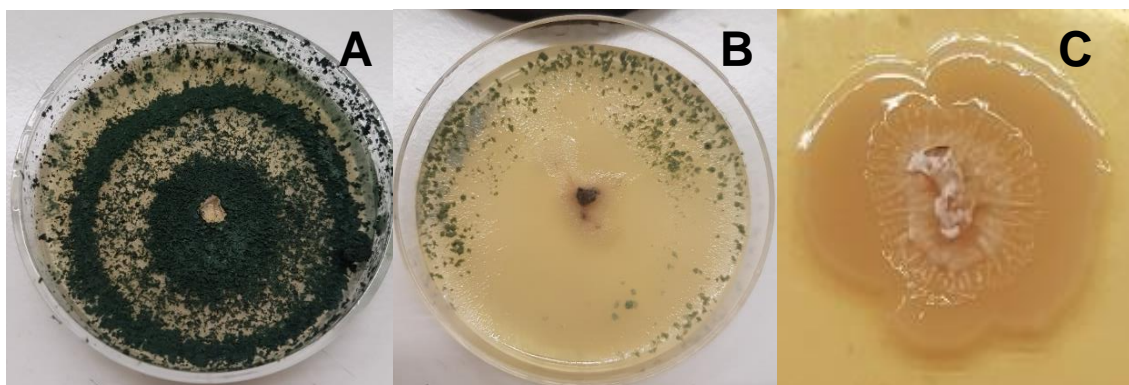


Figura 75 - 3 tipos diferentes encontrados nas amostras de folhas da amostra 7, provenientes do viveiro.

Quadro 14 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra do caule (C) testado, proveniente do viveiro.

	7C
	3 tipos de fungos
Total de fungos por tipo	4 fungos

4.1.1.2 Folhas

As folhas das plantas jovens de cada uma das 7 amostras foram analisadas, e destas isolaram-se um total de 17 fungos, em que 11 apresentavam diferentes características morfológicas entre si (Quadro 15). Destes, 17 fungos isolados, 3 obtiveram-se na amostra 3, em que 2 apresentavam características diferentes, na amostra 4 foram isolados 2 fungos de 2 tipos distintos, na amostra 5 foram isolados 2 fungos de 2 tipos, na amostra 6 foi isolado apenas um fungo e na amostra 7 foram isolados 9 fungos de 4 tipos diferentes (Quadro 15) e (Figuras 76, 77, 78, 79 e 80). Nas amostras 1 e 2 correspondentes a dois viveiros diferentes, não se isolou nenhum microorganismo.

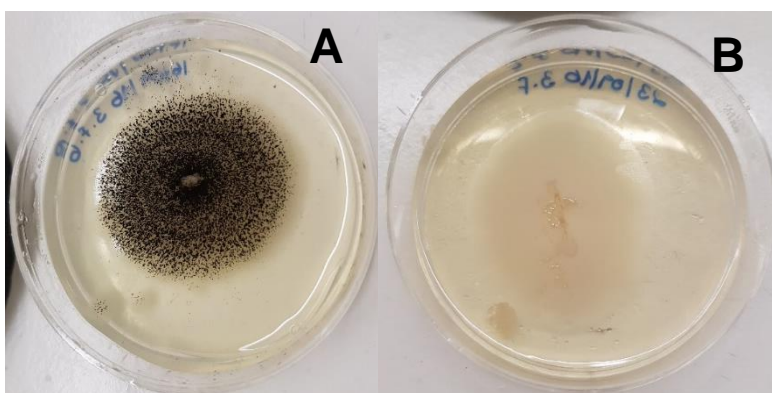


Figura 76 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 3, provenientes do

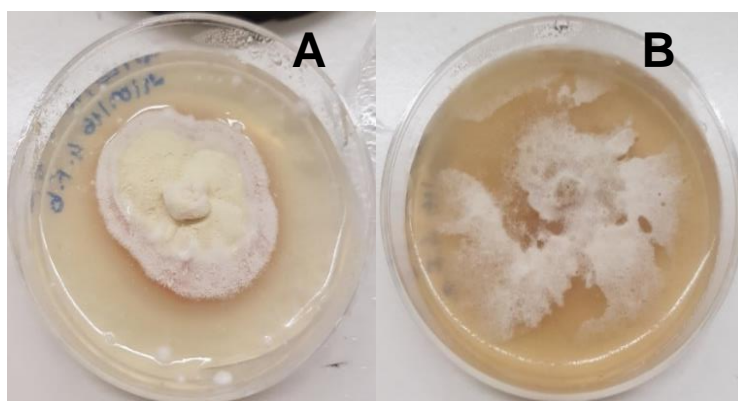


Figura 77 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 4, provenientes do viveiro.

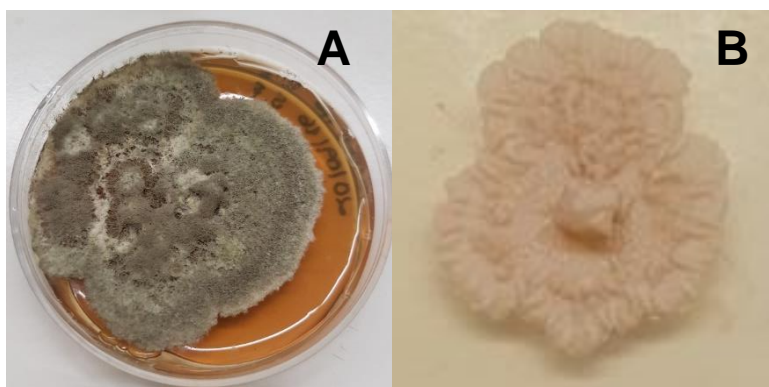


Figura 78 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 5, provenientes do viveiro.



Figura 79 - um tipo encontrado de isolado de fungos nas amostras de folhas da amostra 6, provenientes do viveiro.

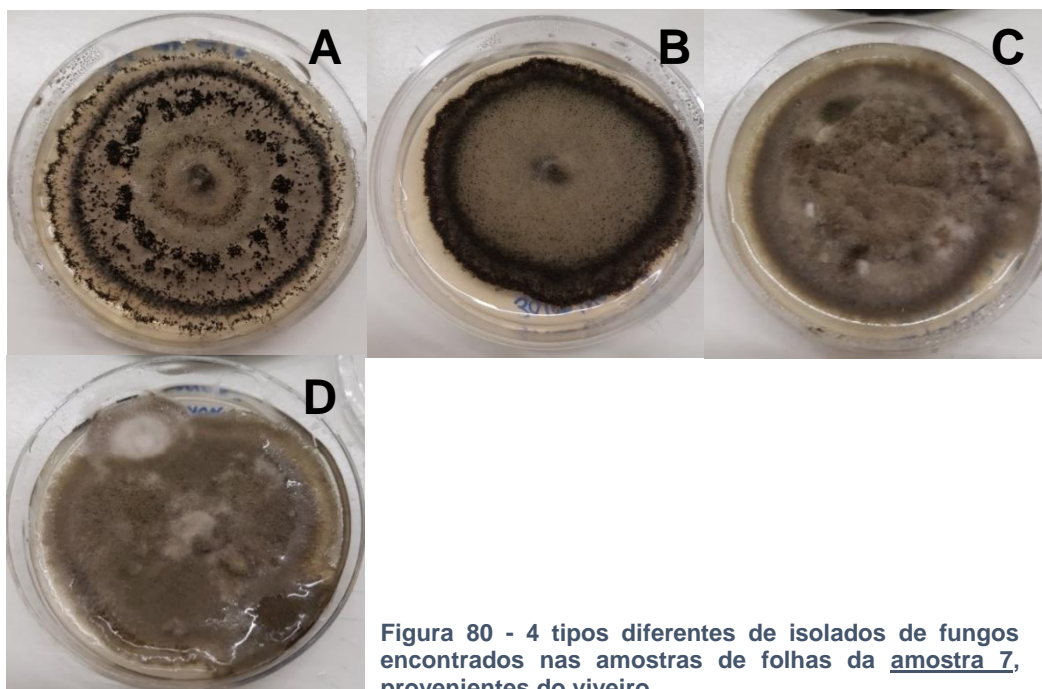


Figura 80 - 4 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas da amostra 7, provenientes do viveiro.

No Quadro 15, resume-se a informação descrita anteriormente apresentando quantos tipos de fungos e o seu número total em cada amostra. Com esta informação disposta no Quadro conseguimos ter uma visão geral da distribuição dos fungos e da totalidade dos mesmos.

Quadro 15 - Número de diferentes tipos de fungos e número total de isolados obtidos em cada amostra da folha (F) testada, proveniente do viveiro.

	3F	4F	5F	6F	7F
	2 tipos de fungos	2 tipos de fungos	2 tipos de fungos	1 tipo de fungo	4 tipos de fungos
Total de fungos por tipo	3 fungos	2 fungos	2 fungos	1 fungo	9 fungos
Total de isolados de fungos	17				

Através da utilização da informação fornecida pelos Quadros 12, 13, 14 e 15, relativamente aos fungos obtidos a partir do material vegetal das diferentes amostras provenientes dos viveiros e tendo em conta os substratos e as diferentes partes das plantas analisadas, obtiveram-se os gráficos das Figuras 81 e 82.

Na Figura 81 apresenta-se a distribuição dos fungos obtidos em cada uma das partes das plantas testadas, raiz, caule e folhas e também do substrato utilizado para o enraizamento, associados a cada amostra.

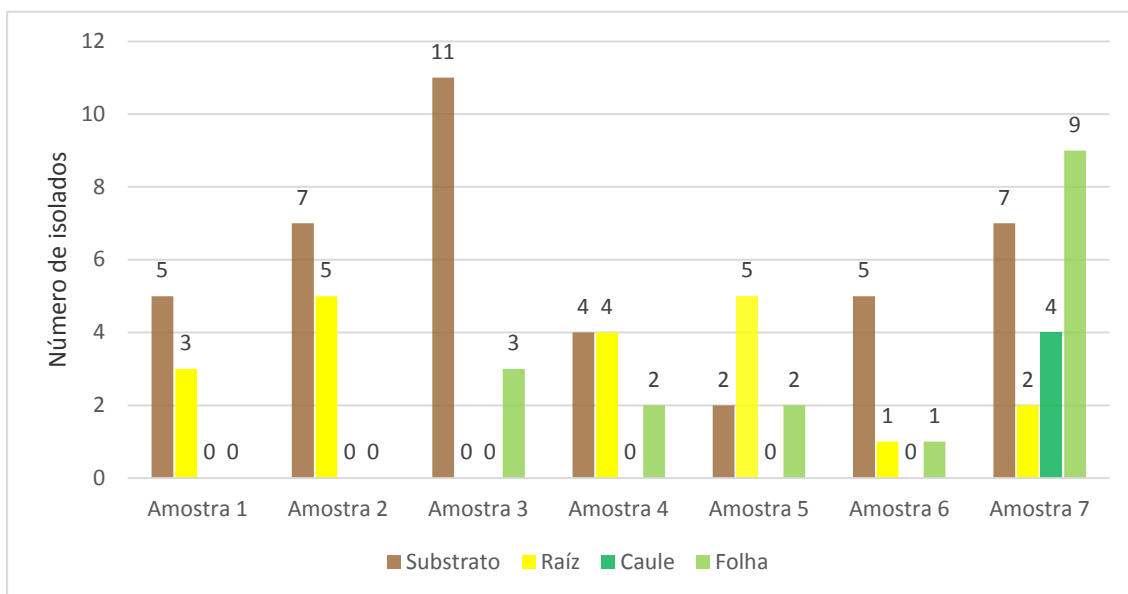


Figura 81 - Número total de isolados de fungos de cada parte analisada da plântula consoante as amostras provenientes dos viveiros.

A Figura 82 apresenta o número total de fungos em cada uma das 7 amostras, provenientes dos 3 viveiros diferentes.

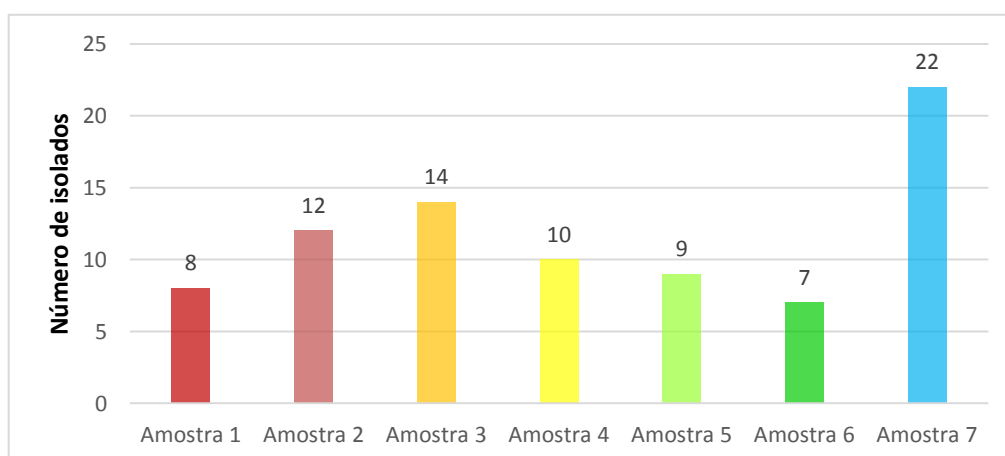


Figura 82 - Número total de isolados de fungos em cada amostra proveniente dos viveiros.

4.3 Isolamento e identificação de microorganismos obtidos de plantas da couve-brócolo sintomáticas

Todos os microorganismos isolados das couves-brócolo sintomáticas revelaram-se, por observação macro e microscópica, como características que permitiam identificá-los como fungos.

Assim, isolaram-se um total de 190 fungos (Anexos IV e V) pertencentes a 34 diferentes tipos. Os 190 fungos isolados das plantas sintomáticas encontradas nas quatro parcelas em estudo distribuem-se da seguinte forma: 145 foram isolados de plantas pertencentes às parcelas do Ribatejo, em que se encontraram 27 tipos de fungos com características morfológicas diferentes entre si (Figuras 83, 84, 85, 86 e 87), e 45 foram isolados de plantas pertencentes às parcelas da região do Alentejo, e distribuem-se em 7 tipos diferentes (Figuras 88, 89, 90 e 91).

a. Ribatejo

Nas plantas sintomáticas provenientes dos campos da região do Ribatejo e da parcela Praias, verificaram-se sintomas de necroses e cloroses, quer nas folhas, quer nos caules. Das folhas testadas, isolaram-se 23 fungos distribuídos por 7 tipos diferentes (Figura 83) e dos caules isolaram-se 6 fungos distribuídos por 2 tipos diferentes (Figura 84).

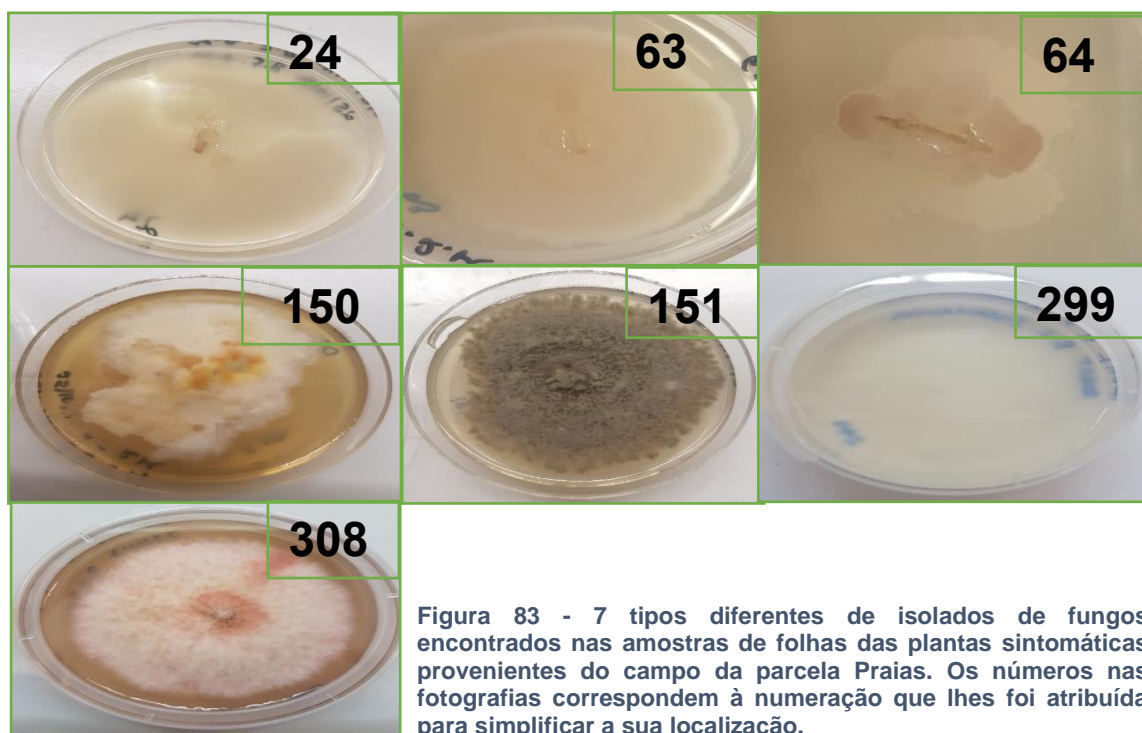


Figura 83 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Praias. Os números nas fotografias correspondem à numeração que lhes foi atribuída para simplificar a sua localização.

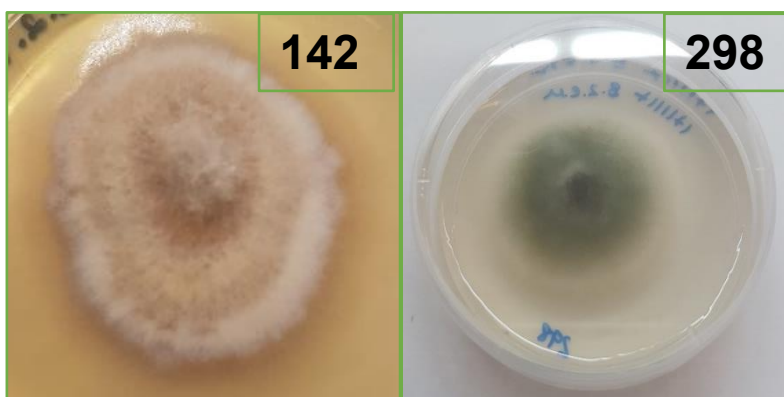


Figura 84 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Praias.

Na outra parcela associada à região do Ribatejo, parcela Álamos, as plantas sintomáticas provenientes do campo apresentaram igualmente sintomas de necroses e cloroses, quer nas folhas, quer nos caules, quer no pedúnculos. Das folhas testadas isolaram-se 56 fungos distribuídos por 7 tipos diferentes (Figura 85), dos caules isolaram-se 52 fungos distribuídos por 10 tipos diferentes (Figura 86) e dos pedúnculos isolaram-se 7 fungos unicamente de 1 tipo (Figura 87).

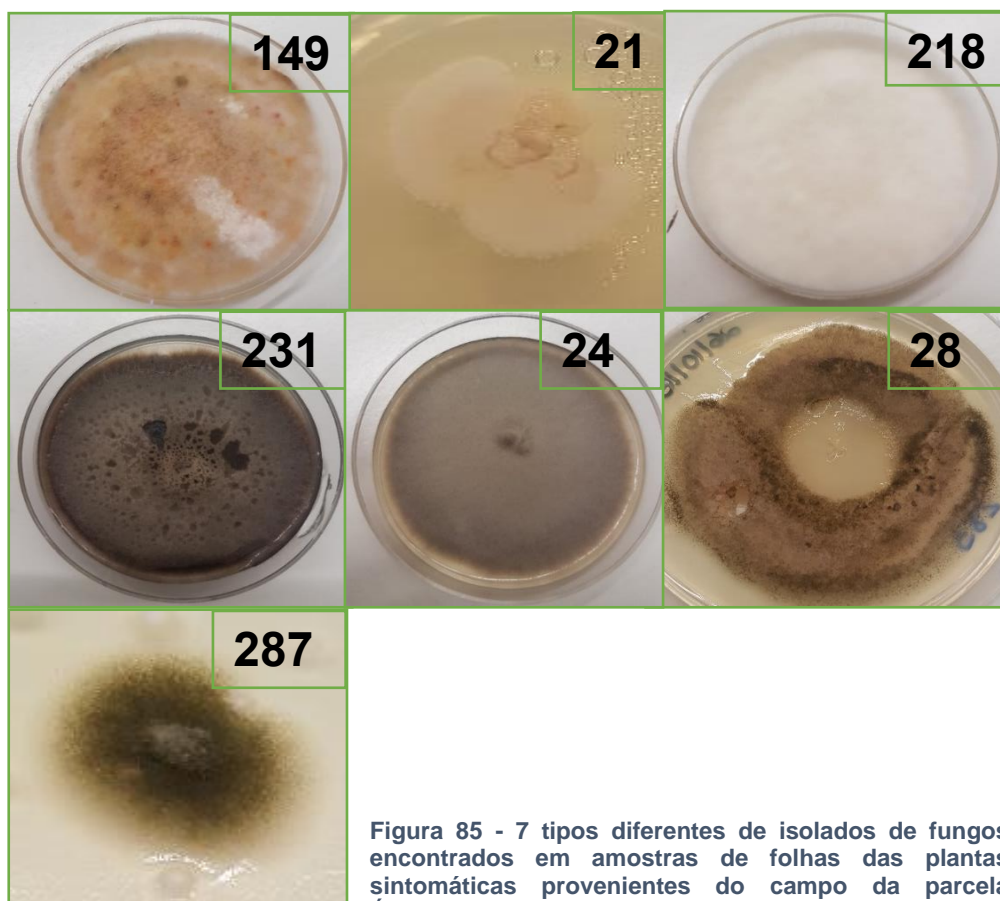


Figura 85 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados em amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

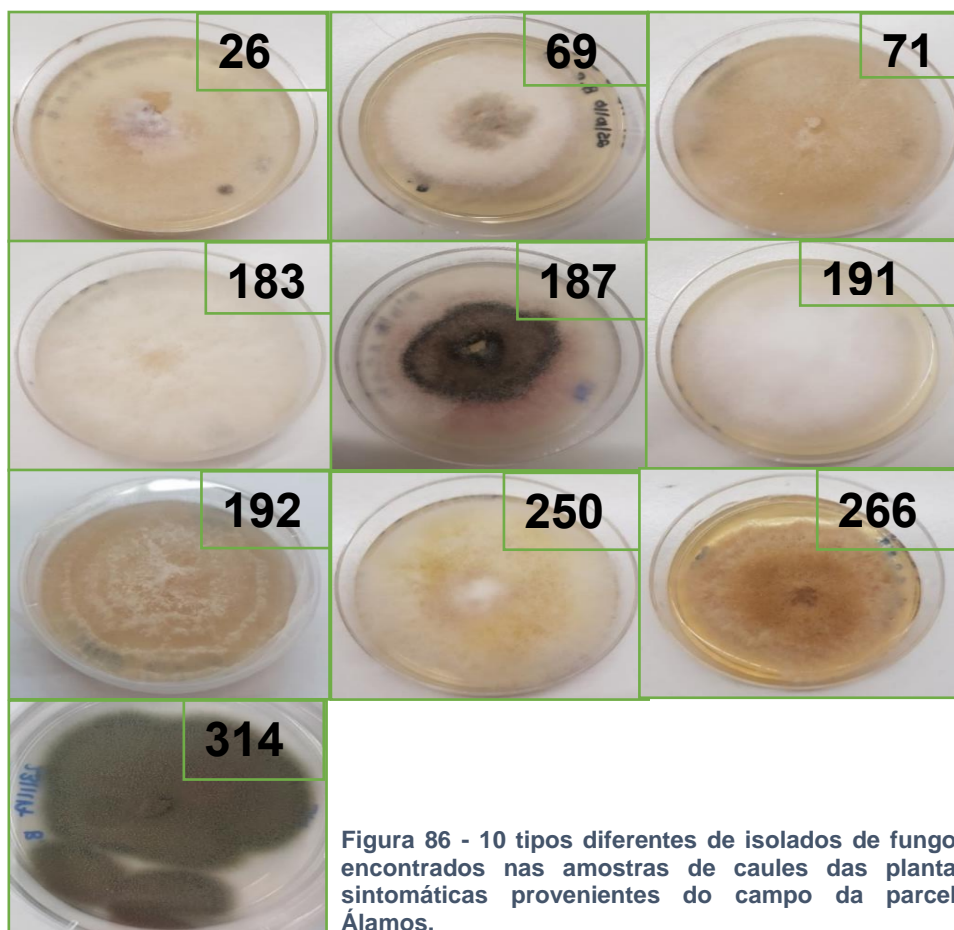


Figura 86 - 10 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

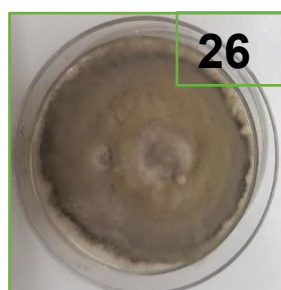


Figura 87 - um tipo de isolado de fungo encontrado nas amostras de pedúnculos das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Álamos.

b. Região do Alentejo

Nas plantas sintomáticas provenientes dos campos da região do Alentejo e da parcela Quartijos, verificaram-se sintomas de necroses e cloroses, quer nas folhas, quer nos caules. Das folhas testadas isolaram-se 19 fungos distribuídos por 3 tipos diferentes (Figura 88) e dos caules isolaram-se 14 fungos distribuídos por dois tipos diferentes (Figura 89).

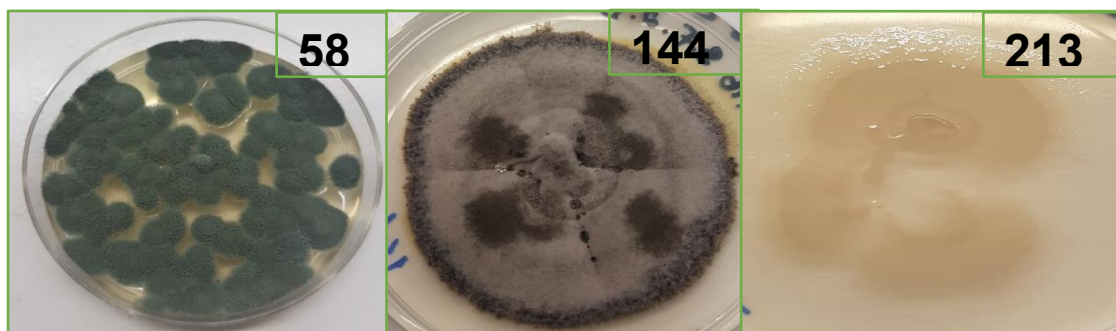


Figura 88 - 3 tipos diferentes encontrados nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Quartijos.

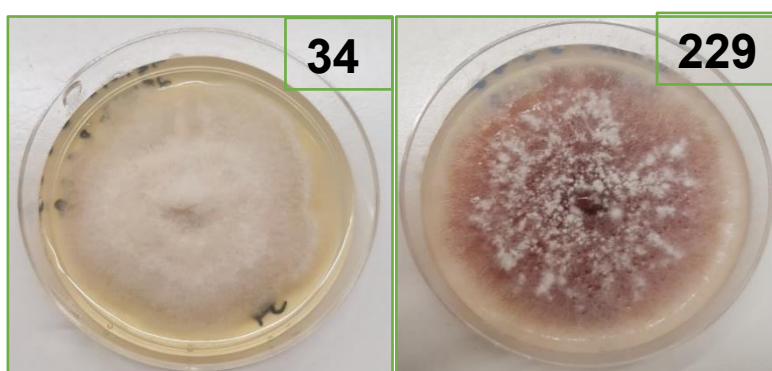


Figura 89 - dois tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Quartijos.

Na outra parcela associada à região do Alentejo, parcela Herdade da Canada, as plantas sintomáticas provenientes do campo apresentaram igualmente sintomas de necroses e cloroses, quer nas folhas, quer nos caules. Das folhas testadas isolaram-se 8 fungos unicamente de 1 tipo (Figura 90) e dos caules isolaram-se 4 fungos unicamente de 1 tipo (Figura 91).

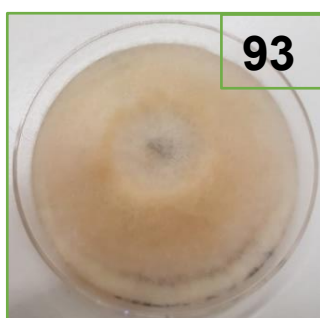


Figura 90 – um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de folhas das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Herdade da Canada.



Figura 91 - um tipo de isolado de fungos encontrado nas amostras de caules das plantas sintomáticas provenientes do campo da parcela Herdade da Canada.

Através da utilização da informação fornecida pelas Figuras 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 e 91, relativamente aos fungos obtidos a partir das plantas sintomáticas provenientes das diversas parcelas e tendo em conta as diferentes partes das plantas analisadas, obtiveram-se os gráficos das Figuras 92, 93 e os Quadros 16 e 17.

Na Figura 92 apresenta-se a distribuição dos fungos obtidos em cada uma das partes das plantas testadas, caules, folhas e pedúnculos.

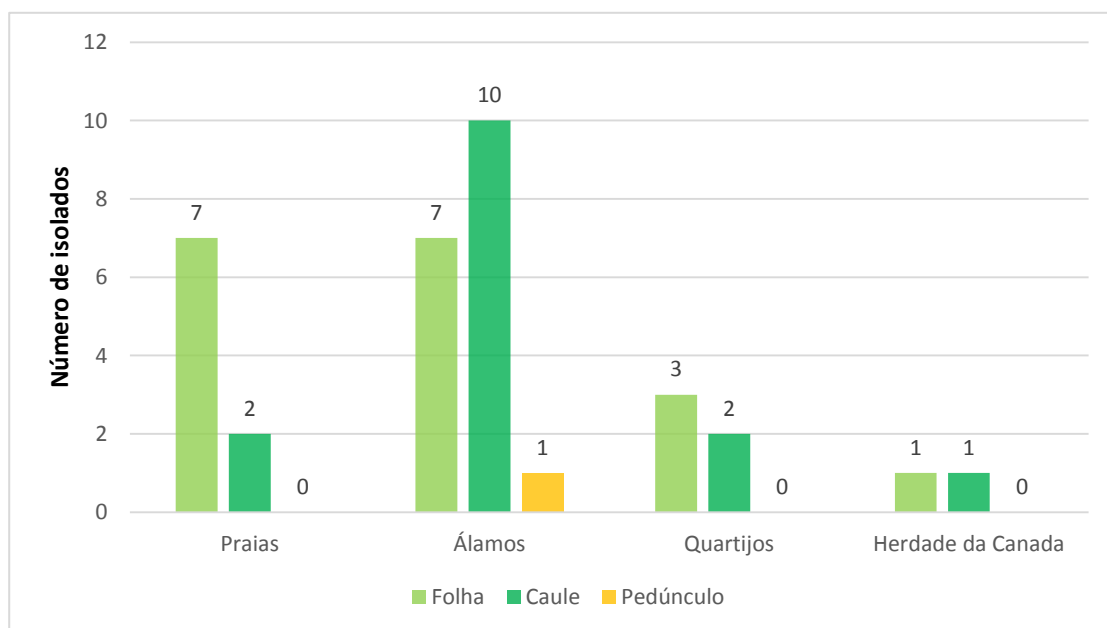


Figura 92 - Número total de tipos de isolados de fungos associados a cada parcela consoante a parte da planta sintomática testada proveniente do campo.

No Quadro 16 apresenta-se o número total de tipos de fungos distribuídos pelas diversas partes das plantas e pelas diversas parcelas das duas regiões. Com essa informação disposta no Quadro conseguimos ter uma visão geral da distribuição dos microorganismos e da totalidade dos mesmos.

Quadro 16 - Número total de isolados de fungos distribuídos pelas diversas partes das plantas sintomáticas testadas consoante a sua região e parcela.

<u>Regiões</u>	<u>Parcelas</u>	<u>Partes da planta analisadas</u>	<u>Nº total de fungos por parte da planta analisada</u>	<u>Nº total de fungos por parcela</u>
Ribatejo	Praias	Raiz	0	30
		Caule	6	
		Pedúnculo	1	
		Folha	23	
	Álamos	Raiz	0	115
		Caule	52	
		Pedúnculo	7	
		Folha	56	
Alentejo	Quartijos	Raiz	0	33
		Caule	14	
		Pedúnculo	0	
		Folha	19	
	Herdade da Canada	Raiz	0	12
		Caule	4	
		Pedúnculo	0	
		Folha	8	

Ao compararmos a Figura 92 e o Quadro 16 deparamos com algumas diferenças relativamente aos isolados obtidos de pedúnculos. Na Figura 92 só há a presença de um tipo de isolado a partir de tecidos de pedúnculo na parcela Álamos, mas no Quadro 16 observa-se a presença de um fungo isolado dos tecidos de pedúnculo na parcela Praias, não contabilizamos esse isolado nas fotografias anteriores porque este é de um tipo idêntico ao de outros isolados obtidos.

No Quadro 17 relaciona-se o número total de fungos em cada parcela com o sistema de rega utilizado na mesma. Este Quadro vai dar a relação entre os sistemas de rega utilizados em cada parcela e um maior ou menor aparecimento de fungos nestas mesmas parcelas.

Quadro 17 – Comparação do número total de isolados de fungos, provenientes das plantas sintomáticas, por parcela tendo como base os sistemas de rega utilizados.

	Ribatejo		Alentejo	
	<u>Praias</u>	<u>Álamos</u>	<u>Quartijos</u>	<u>Herdade da Canada</u>
Total de fungos por parcela	30 fungos	115 fungos	33 fungos	12 fungos
Sistema de rega utilizado	Aspersores estáticos	Aspersores estáticos	Canhão	Pivot

A Figura 93 apresenta o número total de fungos isolados das plantas sintomáticas que estão distribuídos pelas duas regiões, Ribatejo e Alentejo. Com essa informação disposta na figura conseguimos ter uma visão geral da distribuição dos fungos e da totalidade dos mesmos.

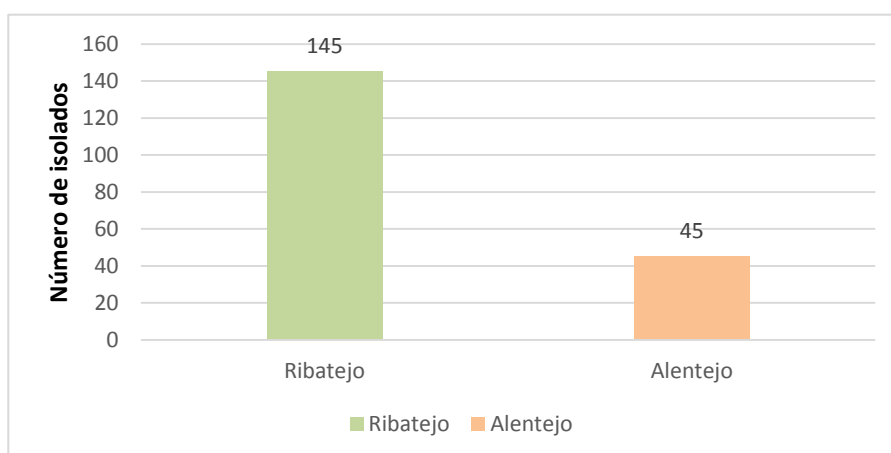


Figura 93 - Número total de isolados de fungos provenientes das plantas da couve-brócolo sintomáticas do campo consoante a região.

4.4 Isolamento e identificação de fungos provenientes do material de água de rega

Os fungos isolados provenientes do material de água de rega das diversas parcelas, das duas regiões, foram isolados no final do verão e retirados de diversas fontes de água como referido no ponto 3.6, do capítulo 3. Retiraram-se amostras da água de rega, porque esta podia ser uma das principais fontes de inóculo dos fungos causadores de perdas económicas da cultura da couve-brócolo.

Desta análise foram isolados 25 fungos no total, distribuídos por 20 tipos diferentes. Destes isolados do material de água de rega das 4 parcelas, 14 foram isolados da região do Ribatejo, distribuídos por 12 tipos de fungos e 11 foram isolados da região do Alentejo, distribuídos por 8 tipos de fungos (Figuras 94, 95, 96 e 97).

a. Ribatejo

Das amostras de água de rega provenientes das diversas fontes de abastecimento das parcelas da região do Ribatejo, nomeadamente na parcela Praias, verificaram-se alguns microorganismos, que por observação visual e microscópica apresentavam características típicas de fungos. Destas isolaram-se 6 fungos distribuídos por 5 tipos diferentes (Figura 94).

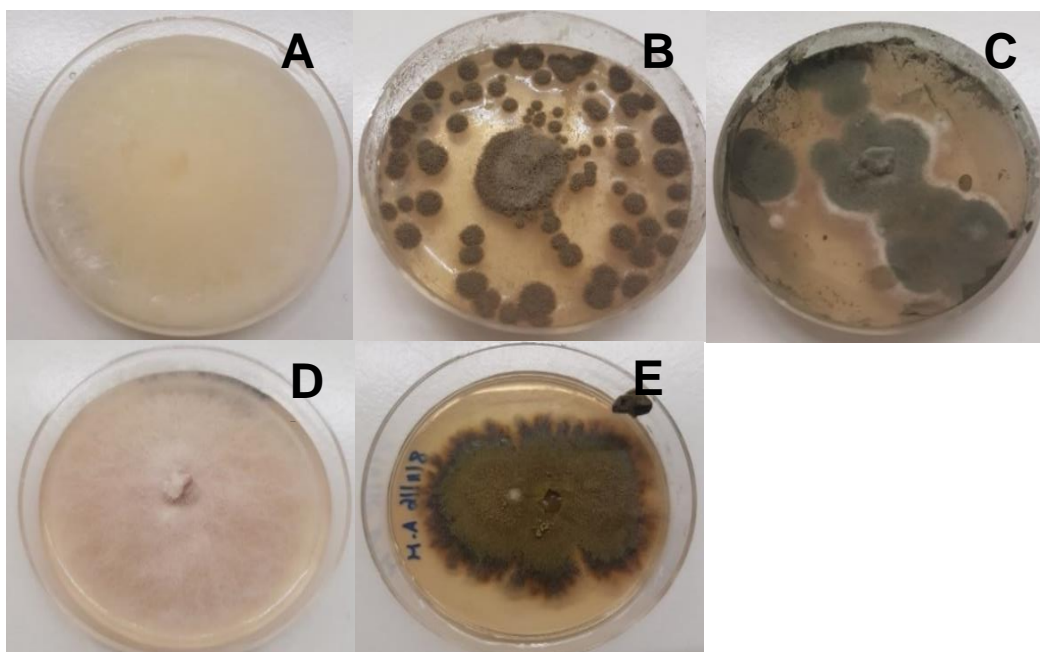


Figura 94 - 5 tipos diferentes encontrados nas amostras de água de rega da parcela Praias.

Na outra parcela do Ribatejo, parcela Álamos, as amostras de água de rega apresentaram igualmente microorganismos com características típicas de fungos. Destas isolaram-se 8 fungos distribuídos por 7 tipos diferentes (Figura 95).

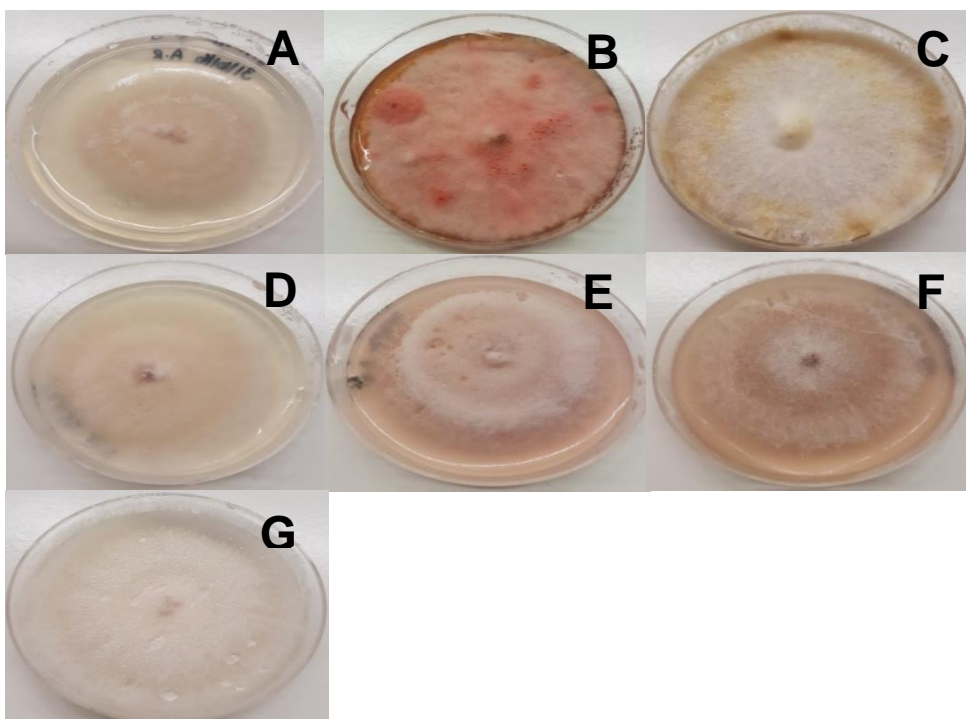


Figura 95 - 7 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Álamos.

b. Alentejo

Das amostras de água de rega provenientes das fontes de abastecimento dos campos da parcela Quartijos, verificou-se a presença de microorganismos com características típicas de fungos. Destas isolaram-se 4 fungos distribuídos por 3 tipos diferentes (Figura 96).

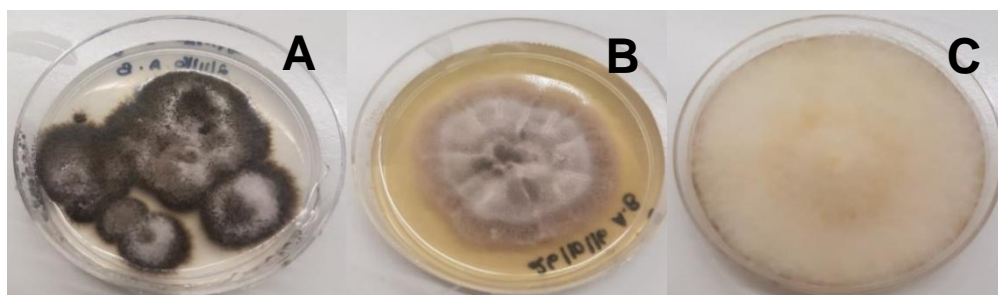


Figura 96 - três tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Quartijos.

Na outra parcela da região do Alentejo, parcela Herdade da Canada, as amostras apresentaram igualmente microorganismos com características típicas de fungos. Dessas isolaram-se 7 distribuídos por 5 tipos diferentes (Figura 97).

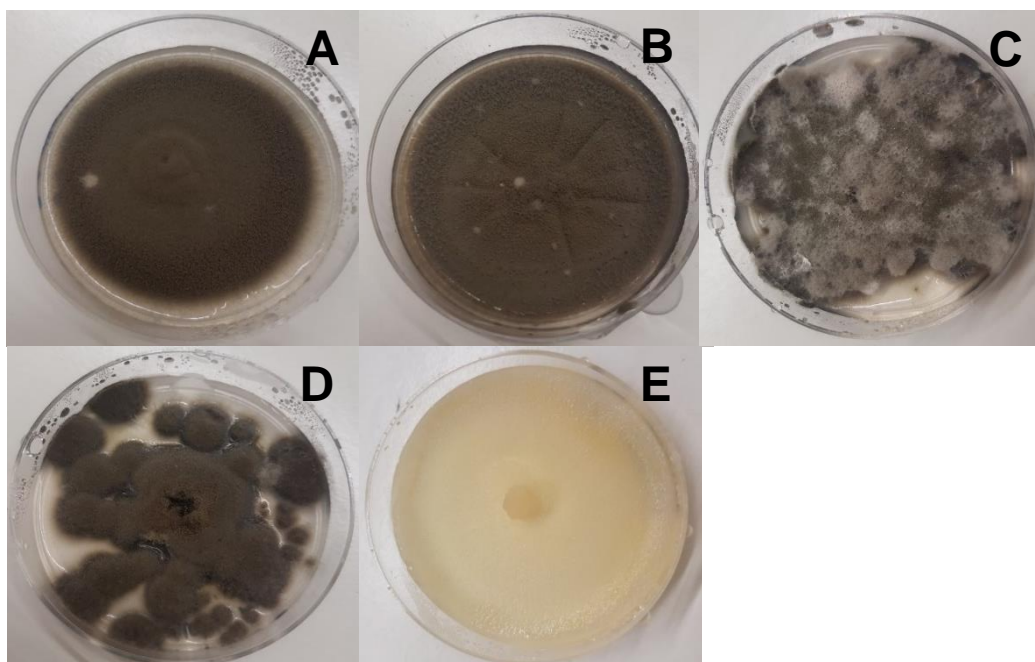


Figura 97 - 5 tipos diferentes de isolados de fungos encontrados nas amostras de água de rega da parcela Herdade da Canada.

Através da utilização da informação fornecida pelas Figuras 94, 95, 96 e 97, relativamente aos fungos obtidos a partir das amostras da água de provenientes das diversas parcelas, elaboraram-se o Quadro 18 e o gráfico da Figura 98.

Através das fotografias apresentadas nas Figuras 94, 95, 96 e 97 iremos associar os fungos apresentados com outros fungos que sejam causadores de perdas económicas da couve-brócolo.

No Quadro 18 são apresentados o total de fungos e quantos tipos de fungos estão presentes em cada parcela. Apresenta-se também o número total de fungos e de isolados. Com essa informação disposta no Quadro conseguimos ter uma visão geral da distribuição dos fungos e da totalidade dos mesmos.

Quadro 18 - Resumo do número total e dos tipos de isolados de fungos em cada parcela, provenientes das amostras de água de rega.

	Ribatejo		Alentejo	
	<u>Praias</u>	<u>Álamos</u>	<u>Quartijos</u>	<u>Herdade da Canada</u>
	5 tipos de fungos	7 tipos de fungos	3 tipos de fungos	5 tipos de fungos
Total de fungos por tipo	6 fungos	8 fungos	4 fungos	7 fungos
Total de fungos isolados	25			

A Figura 98 apresenta o número total de fungos isolados das duas regiões, obtendo um total de 14 e 11 fungos isolados.

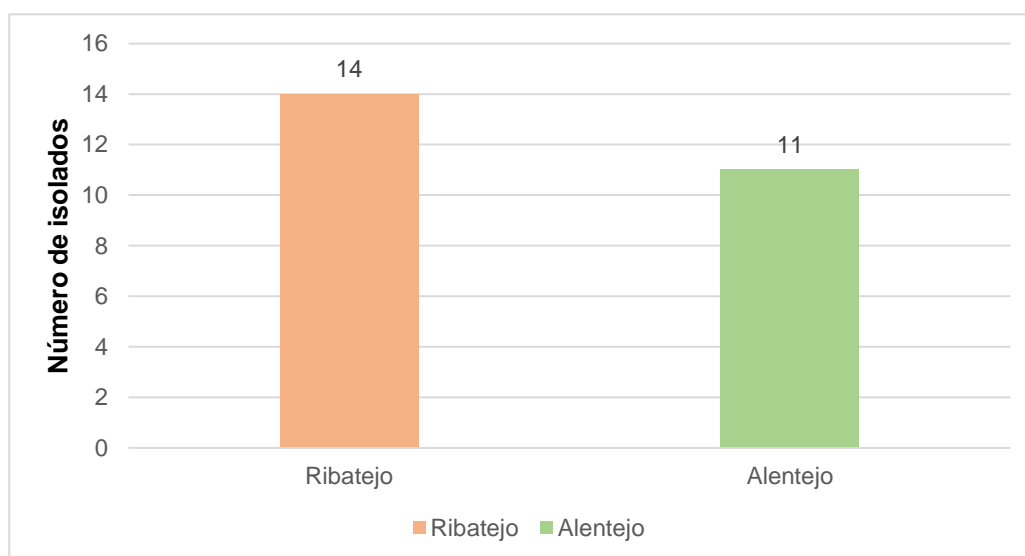


Figura 98 - Número total de isolados de fungos por região provenientes das amostras do material de água de rega.

4.5 Identificação molecular dos fungos obtidos em plantas sintomáticas

Os fungos isolados das couves-brócolo sintomáticas foram sujeitos a identificação molecular, de modo a podermos conhecer quais as espécies que se encontravam associadas às sintomatologias apresentadas nas plantas do campo.

Assim, para esta análise utilizaram-se os 35 fungos que apresentavam características morfológicas diferentes entre si. Estes 35 diferentes isolados de fungos, correspondem à totalidade dos fungos que estão distribuídos pelas diversas parcelas das duas regiões estudadas (Quadro 19). Tal como se pode observar no Quadro 19 e na Figura 99, 28 fungos foram isolados das parcelas da região do Ribatejo e 7 foram isolados da região do Alentejo.

Quadro 19 - Número total de isolados de fungos e os seus respetivos números de identificação consoante a parte da planta sintomática analisada, associados a cada parcela e região.

<u>Regiões</u>	<u>Parcelas</u>	<u>Partes da planta analisadas</u>	<u>Identificação dos fungos</u>	<u>Nº total de fungos por parte da planta</u>
Ribatejo	<u>Praias</u>	Raiz	X	0 fungos
		Caule	142 / 298	2 fungos
		Pedúnculo	306	1 fungos
		Folha	24 / 62 / 63 / 64 / 150 / 151 / 218 / 308	8 fungos
	<u>Álamos</u>	Raiz	X	0 fungos
		Caule	26 / 69 / 71 / 183 / 187 / 191 / 192 / 250 / 266	9 fungos
		Pedúnculo	264	1 fungos
		Folha	87 / 149 / 198 / 215 / 249 / 283 / 310	7 fungos
Alentejo	<u>Quartijos</u>	Raiz	X	0 fungos
		Caule	34 / 229	2 fungos
		Pedúnculo	X	0 fungos
		Folha	144 / 213	2 fungos
	<u>Herdade da Canada</u>	Raiz	X	0 fungos
		Caule	35 / 143	2 fungos
		Pedúnculo	X	0 fungos
		Folha	93	1 fungos

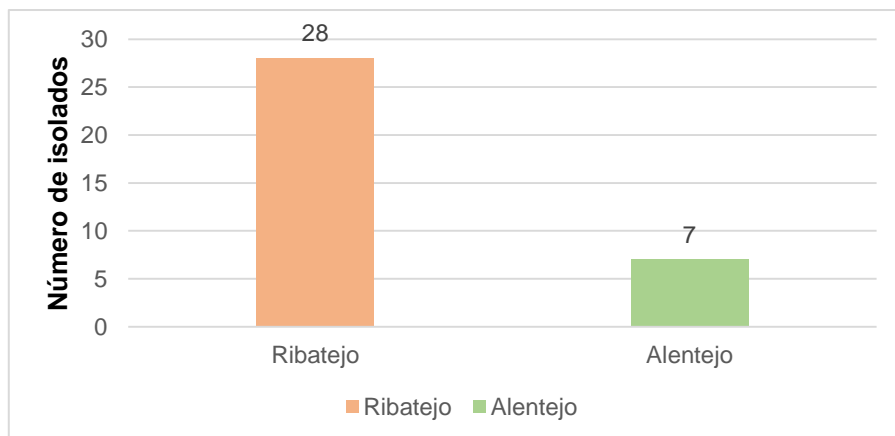


Figura 99 - Número total de isolados de fungos por região submetidos à extração de DNA.

Nos gráficos das Figuras 100 e 101 pode observar-se o número total de fungos extraídos de cada parcela das duas regiões.

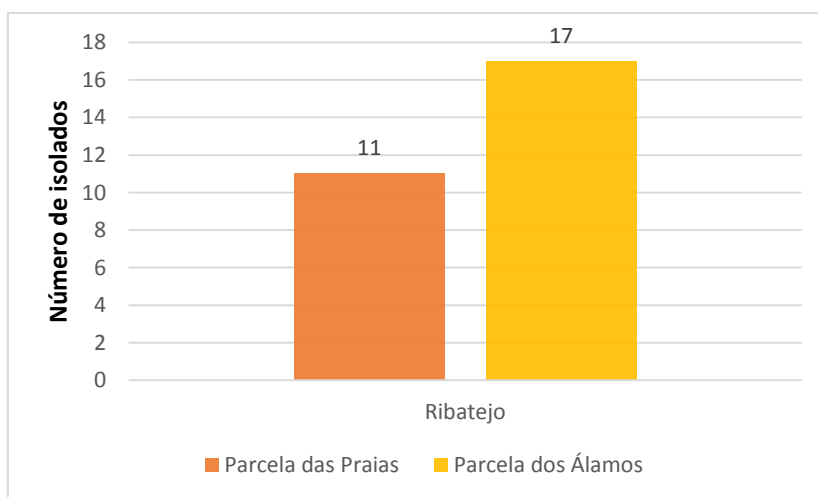


Figura 100 - Número total de isolados de fungos por parcelas na região do Ribatejo submetidos à extração de DNA.

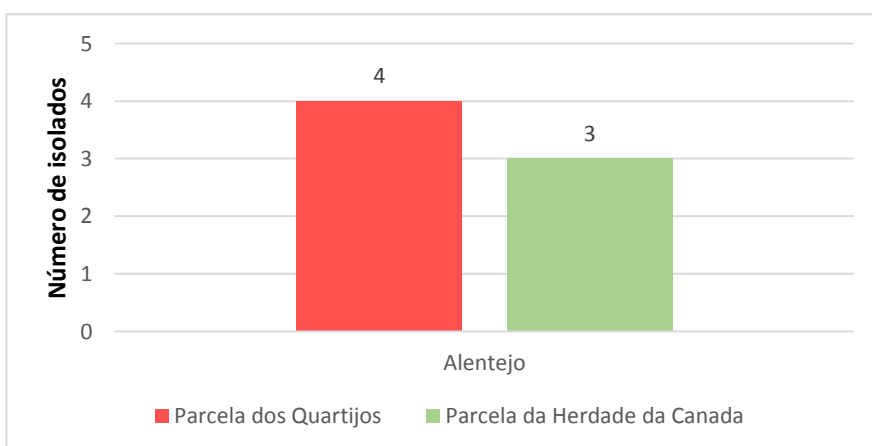


Figura 101 - Número total de isolados de fungos por parcelas na região do Alentejo submetidos à extração de DNA.

O DNA total destes 35 isolados, foi extraído e amplificado por PCR com os 'primers' universais ITS 1 e ITS 4, tendo-se obtido os produtos de amplificação esperados com um tamanho variável entre os 600 e os 900 pb como mostram as Figuras 102, 103, 104 e 105. Algumas amostras não apresentaram amplificação num primeiro PCR, como foi o caso das amostras 24 e 69 (Figura 102), da amostra 213 (Figura 103), das amostras 63 e 215 (Figura 104) e das amostras 26 e 64 (Figura 105) tendo posteriormente sido repetidas..

a. PCR 1

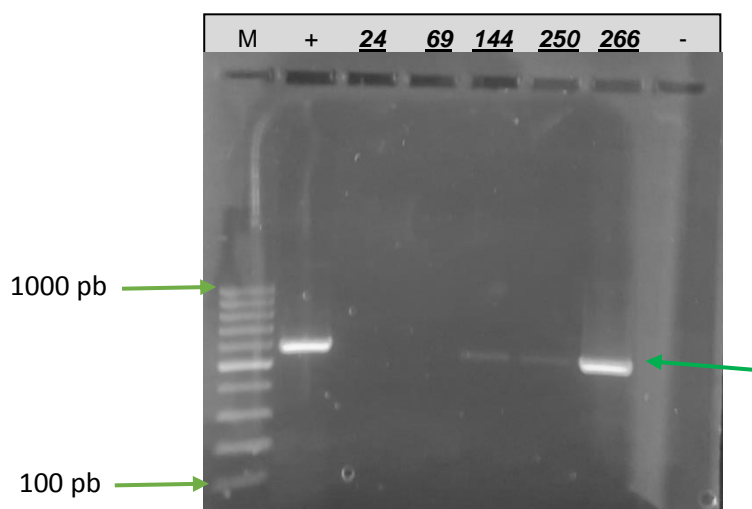


Figura 102 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 24, 69, 144, 250, 266; + - controlo positivo de DNA obtido de fungo purificado; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

b. PCR 2

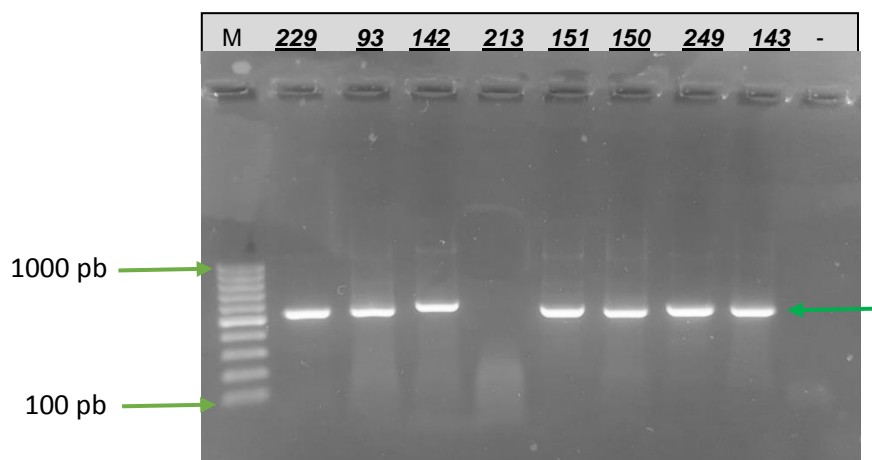


Figura 103 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 229, 93, 142, 213, 151, 150, 249, 143; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

c. PCR 3

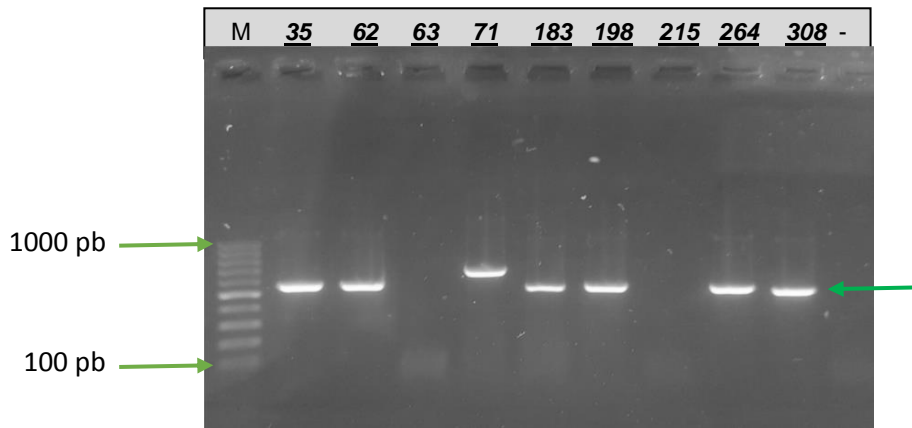


Figura 104 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 35, 62, 63, 71, 183, 198, 215, 264, 308; - - controle negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

d. PCR 4

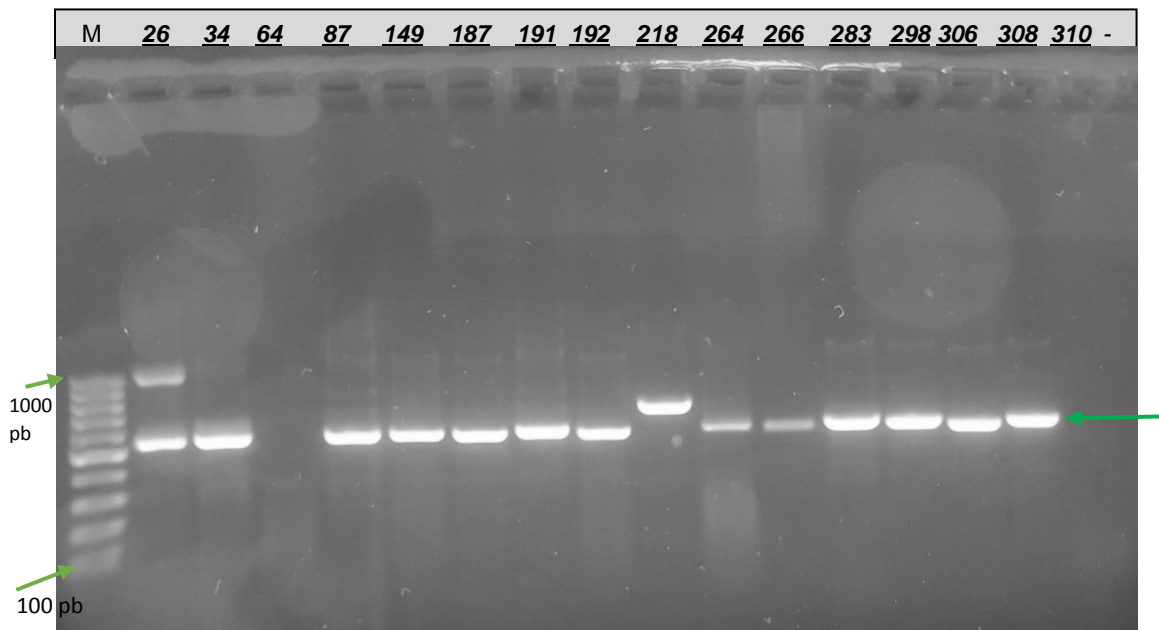


Figura 105 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 26, 34, 64, 87, 149, 187, 191, 192, 218, 264, 266, 283, 298, 306, 308, 310; - - controle negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 600 pb e 900 pb.

Após a procura das seqüências homólogas recorrendo ao BLAST do NCBI verificou-se que a seqüência obtida para o isolado 34 não era suficientemente específica, não tendo sendo assim possível a sua identificação.

Neste estudo, nem sempre foi possível a identificação dos fungos isolados ao nível da sua espécie, tendo sido apenas alguns identificados ao nível do género, pelo que se optou por usar o termo OTU ('operational taxonomic unit' – unidade taxonómica operacional) para os identificar taxonomicamente. Como se pode observar no Quadro 20 os 27 fungos isolados pertencem a 12 OTUs diferentes correspondentes a 12 géneros (Figura 106). O género de fungo obtido maioritariamente foi *Alternaria* (37%), com 10 dos 37 isolados, logo seguido pelo género *Fusarium* (33%), género ao qual pertencem 9 dos 35 isolados. Apesar de se terem obtido 12 diferentes OTUs, nem todos terão a mesma relevância neste trabalho como fungos causadores de doenças que causem perdas económicas na couve-brócolo, considerando por este facto os OTUs *Alternaria*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*, como os mais relevantes.

No Quadro 20 encontram-se distribuímos os fungos identificados molecularmente nas duas regiões, nas quatro parcelas em estudo, distribuídos pelas partes das plantas analisadas, o número a que corresponde cada isolado e a identificação dos mesmos, dando-nos assim uma visão de onde se encontra uma maior incidência dos fungos isolados.

Quadro 20 - Identificação molecular de isolados de fungos das plantas sintomáticas provenientes do campo.

<u>Regiões</u>	<u>Parcelas</u>	<u>Parte da planta analisada</u>	<u>Número dos isolados</u>	<u>Identificação dos fungos</u>
Ribatejo	<u>Praias</u>	Raíz	X	X
		Caule	142	<i>Cylindrocarpon olidum</i>
			298	<i>Alternaria</i> spp.
				<i>Fusarium</i> spp.
			<i>Corynespora</i> spp.	
		Pedúnculo	306	<i>Cladosporium</i> spp.
		Folha	62	<i>Alternaria</i> spp.
			150	<i>Epicoccum nigrum</i>
			151	<i>Alternaria</i> spp.
			218	<i>Alternaria</i> spp.
			308	<i>Epicoccum nigrum</i>
		<u>Álamos</u>	Raíz	X
	Caule		71	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
				<i>Rhizoctonia solani</i>
			183	<i>Fusarium</i> spp.
			187	<i>Alternaria</i> spp.
				<i>Fusarium lichenicola</i>
			191	<i>Fusarium</i> spp.
			192	<i>Thanatephorus cucumeris</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>
			250	<i>Fusarium</i> spp.
			266	<i>Fusarium</i> spp.
				<i>Neurospora</i> spp.
	Pedúnculo		264	<i>Alternaria</i> spp.
		<i>Corynespora</i> spp.		
Folha	87	<i>Fusarium</i> spp.		
	149	<i>Epicoccum</i> spp.		
	198	<i>Alternaria</i> spp.		

Alentejo			249	<i>Alternaria</i> spp.	
			283	<i>Alternaria brassicicola</i>	
			310	<i>Pleospora herbarum</i>	
	<u>Quartijos</u>	Raíz	X	X	
		Caule	229	<i>Fusarium</i> spp.	
		Pedúnculo	X	X	
		Folha	144	<i>Cladosporium</i> spp.	
		<u>Herdade da Canada</u>	Raíz	X	X
			Caule	35	<i>Alternaria</i> spp.
				143	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
			Pedúnculo	X	X
	Folha	93	<i>Fusarium</i> spp.		

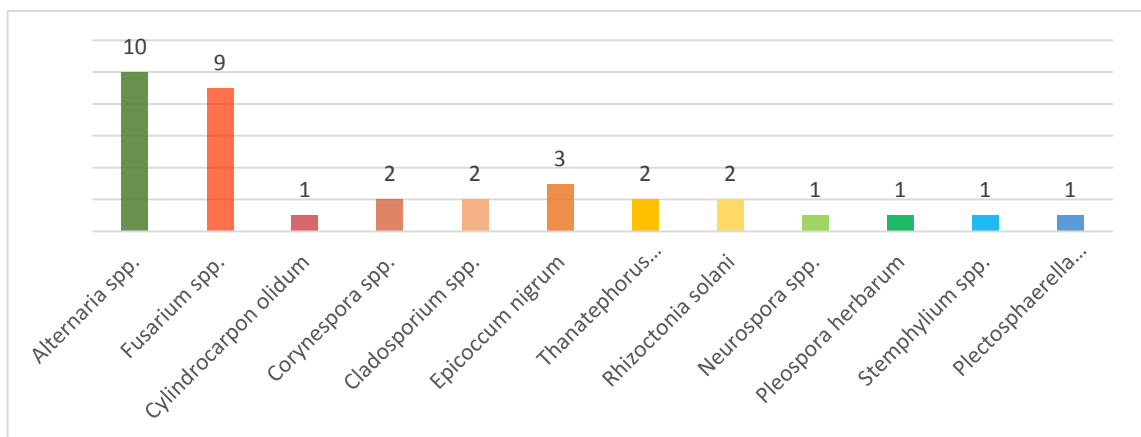


Figura 106 - Total de fungos isolados distribuídos por OTU, consoante o Quadro 20.

Para os OTUs dos géneros *Alternaria* e *Fusarium* não foi possível a identificação da espécie presente, enquanto a espécie de *Rhizoctonia* identificada foi a *R. solani*.

Após a amplificação por PCR com os 'primers' específicos para *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp. obteve-se a banda esperada entre os 778pb e os 835 pb e entre os 550 pb e os 600 pb, respetivamente (Figuras 107 e 108).

a. PCR do género *Alternaria*

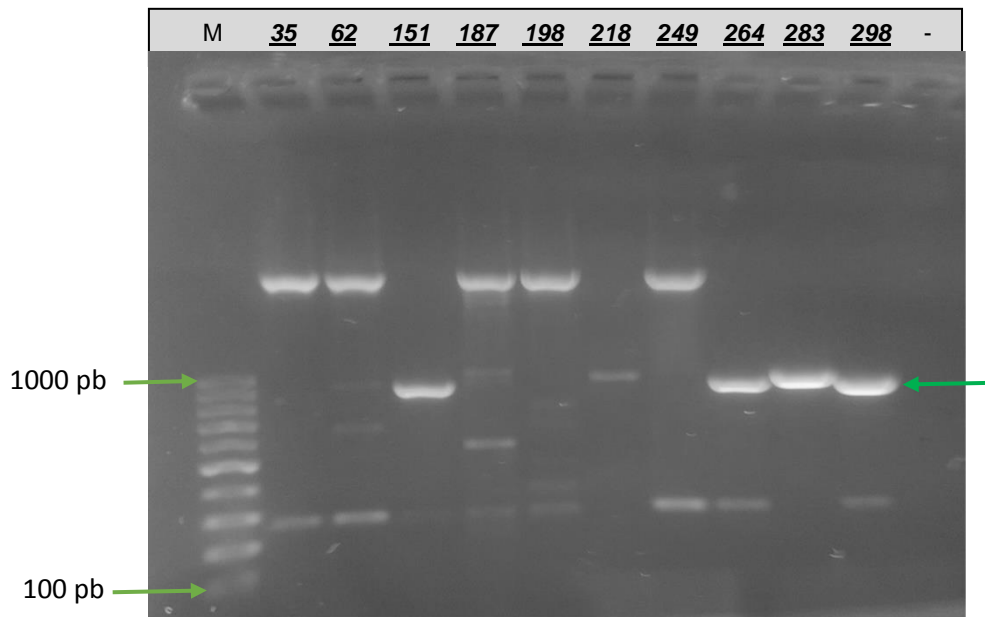


Figura 107 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 35, 62, 151, 187, 198, 218, 249, 264, 283, 298; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 778 pb e 835 pb.

b. PCR do género *Fusarium*

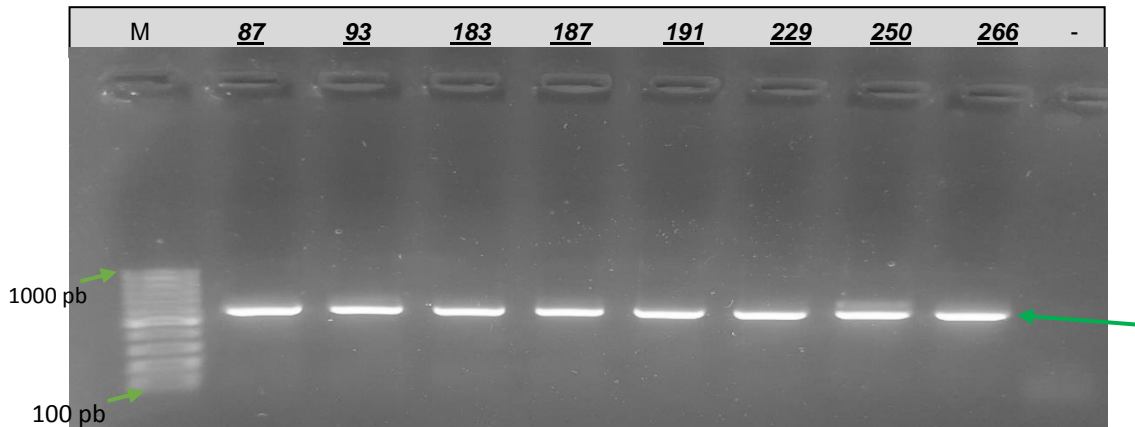


Figura 108 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% em que se observam os produtos amplificados resultantes de PCR usando DNA extraído das amostras 87, 93, 183, 187, 191, 229, 250, 266; - - controlo negativo; M- marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder; seta – corresponde às bandas dos produtos amplificados após PCR com o tamanho esperado entre 550 pb e 600 pb.

A análise bioinformática das regiões sequenciadas permitiu a identificação das espécies dos géneros *Fusarium* e *Alternaria* presentes. As espécies de *Alternaria* obtidas foram a *A. alternata* com 6 isolados dos 10 testados e a *A. brassicicola* com apenas um isolado (Quadro 21) (Figura 109) e as espécies de *Fusarium* foram *F. equiseti* tendo-se identificado 5 isolados dos 9 testados e quatro isolados de *F. oxysporum* (Quadro 22) (Figura 110).

Quadro 21 - Resultados das sequências nucleótídicas do género da *Alternaria* quando submetidas ao BLAST.

Número da Sequência	Nome
35	<i>Alternaria alternata</i>
62	<i>Alternaria alternata</i>
151	<i>Alternaria spp.</i>
198	<i>Alternaria alternata</i>
218	<i>Alternaria alternata</i>
264	<i>Alternaria alternata</i>
283	<i>Alternaria brassicicola</i>
298	<i>Alternaria alternata</i>

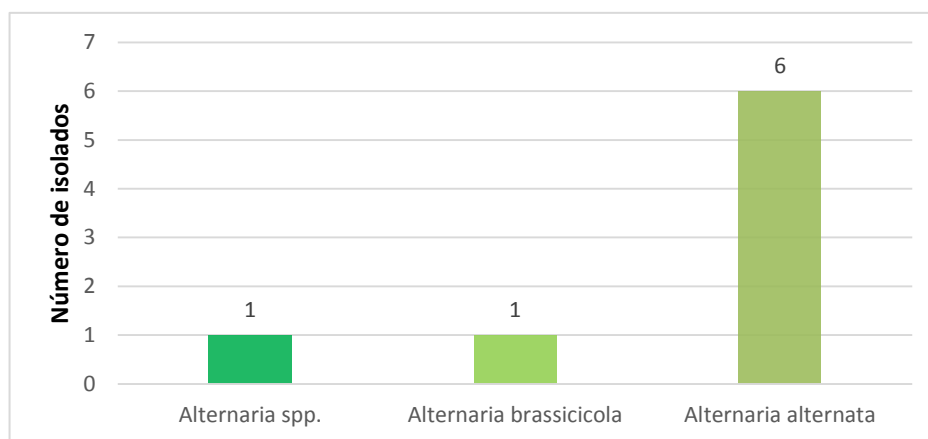


Figura 109 – Número total de espécies de *Alternaria* distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.

Quadro 22 - Resultados das sequências nucleótídicas do género do *Fusarium* quando submetidas ao BLAST.

Número da Sequência	Nome
87	<i>Fusarium equiseti</i>
93	<i>Fusarium equiseti</i>
183	<i>Fusarium equiseti</i>
187	<i>Fusarium oxysporum</i>
191	<i>Fusarium oxysporum</i>
229	<i>Fusarium oxysporum</i>
249	<i>Fusarium oxysporum</i>
250	<i>Fusarium equiseti</i>
266	<i>Fusarium equiseti</i>

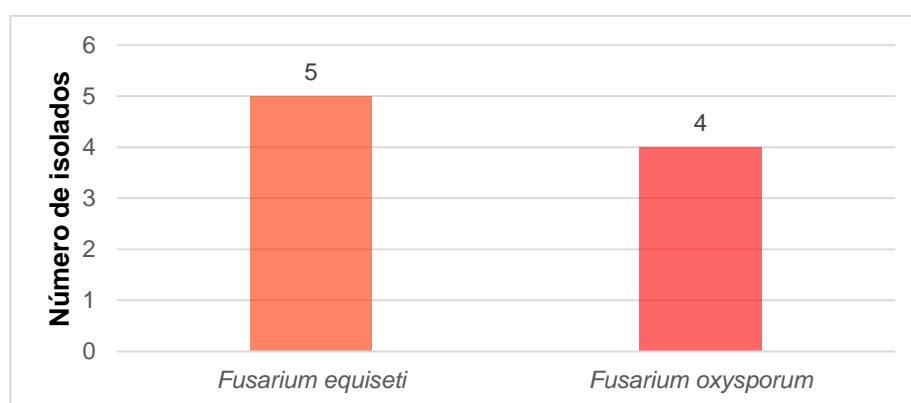


Figura 110 - Número total de espécies de *Fusarium* distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.

Posteriormente à nova análise bio-informática, recorrendo novamente ao BLAST do NCBI, apresentámos a diversidade de fungos das diversas regiões de estudo distribuídas pelas diferentes parcelas no Quadro 23, tendo como objectivo obter uma visão geral dessa mesma diversidade e onde se encontravam com maior incidência os agentes patogénicos causadores de perdas económicas na cultura da couve-brócolo.

Quadro 23 – Diversidade de fungos resultantes das sequências nucleóticas dos isolados de fungos quando submetidas ao BLAST.

Regiões	Parcelas	Diversidade dos fungos obtidos
Ribatejo	Praias	<i>Cylindrocarpon olidum</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
		<i>Cladosporium spp.</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
		<i>Epicoccum nigrum</i>
		<i>Alternaria spp.</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
	Álamos	<i>Epicoccum nigrum</i>
		<i>Thanatephorus cucumeris e Rhizoctonia solani</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>
		<i>Fusarium oxysporum</i>
		<i>Fusarium oxysporum</i>
		<i>Thanatephorus cucumeris e Rhizoctonia solani</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>
		<i>Epicoccum spp.</i>
		<i>Alternaria alternata</i>
Alentejo	Quartijos	<i>Fusarium oxysporum</i>
		<i>Cladosporium spp.</i>
	Herdade da Canada	<i>Alternaria alternata</i>
		<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>

Como se pode observar no Quadro 23 os 28 fungos isolados pertencem a 9 OTUs diferentes correspondentes a 9 géneros/espécies (Figura 111). O género de fungo obtido maioritariamente foi *Fusarium* (37%), com 9 dos 28 isolados, logo seguido pelo género *Alternaria* (33%), género ao qual pertencem 9 dos 35 isolados.

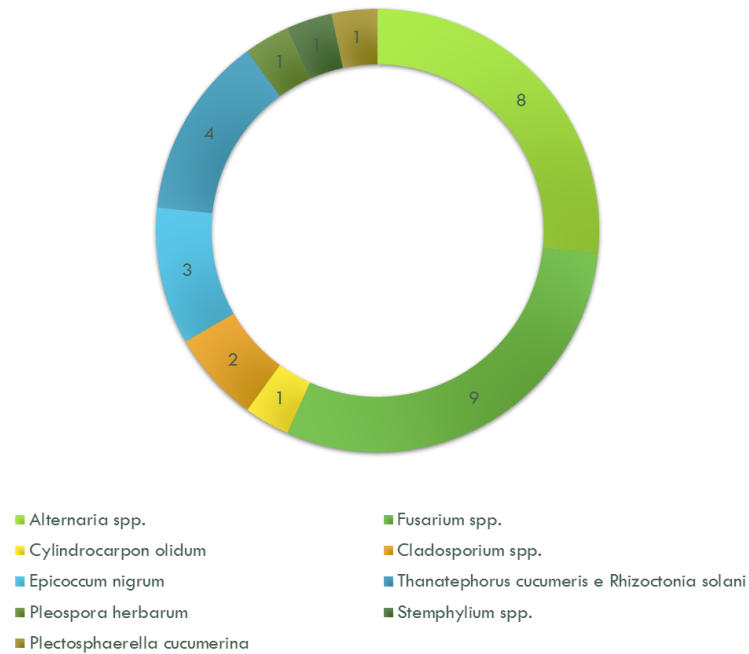
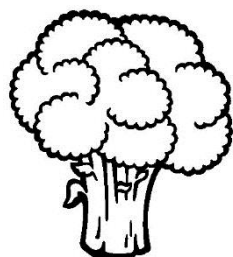


Figura 111 – Número total dos isolados de fungos distribuídas por diferentes OTU resultantes do BLAST.



5. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

5.1. Identificação molecular dos patógenos associados às doenças da couve-brócolo

O principal objetivo deste trabalho era o de identificar e caracterizar os principais patógenos responsáveis por consideráveis perdas de produção na cultura da couve-brócolo em duas das principais regiões produtoras desta cultura, Ribatejo e Alentejo.

Para a identificação desses patógenos, efetuou-se o isolamento e identificação molecular dos microorganismos associados aos sintomas apresentados por patógenos nas plantas do campo. Da primeira análise geral efetuada aos patógenos isolados, observou-se que eram constituídos, na sua totalidade, por fungos, num total de 35 isolados, sendo 28 destes correspondentes a plantas provenientes do Ribatejo e 7 provenientes de plantas do Alentejo. Pela observação destes resultados concluiu-se que a região do Ribatejo apresenta uma maior diversidade de fungos presentes na cultura da couve-brócolo que a região do Alentejo, ficando assim, esta cultura na região do Ribatejo a apresentar uma maior probabilidade de perdas económicas originadas por micoses.

Estando este trabalho dividido pelo estudo de 4 parcelas distribuídas, duas em cada região, observou-se que a presença de patógenos (fungos) por parcela é bastante equilibrada dentro de cada região. Assim, na parcela Praias encontraram-se 11 isolados e na parcela Álamos 17 isolados, ambas localizadas no Ribatejo, enquanto nas localizadas na região do Alentejo, parcela Quartijos e parcela Herdade da Canada, se isolaram 4 e 3 fungos diferentes, respetivamente. Assim, numa primeira análise, a parcela que mostra estar mais contaminada será a parcela Álamos, na região do Ribatejo.

Da análise molecular realizada a cada um dos 35 isolados, verificou-se inicialmente, a ausência de amplificação por PCR em 7 desses isolados, o que se deveu ao facto de provavelmente ter ocorrido um erro no processo de extração do DNA, que poderá ter sido ocasionado pela perda do 'pellet final' de DNA total, aquando de uma das lavagens e remoções do sobrenadante. Assim, o processo de identificação continuou apenas para 28 isolados. Destes, o fungo com o número **34** não foi possível identificar molecularmente, uma vez que o cromatograma de sequenciação obtido apresentava uma grande sobreposição de picos, não permitindo assim a identificação por correspondência de bases de DNA, com as da base de dados. Este facto pode ter ocorrido por o fungo não estar em cultura pura, mas sim numa mistura de fungos, todos eles com características morfológicas idênticas, sendo por isso impossível de purificar.

Apesar de a couve-brócolo apresentar um leque variado de doenças, tais como, o **Pontuado bacteriano** (Bacterial leaf spot), a **Podridão negra** (Black rot), **Podridão mole bacteriana** (Bacterial soft rot), o **Pé Negro** (Black leg), a **Podridão Negra** (Black Root), a **Ferrugem branca** (White Rust), a **Mancha em anel** (Ring Spot), a **Mancha Branca das Folhas** (White Leaf Spot), o **Mofo Branco** ('Sclerotinia stem rot' e 'Watery soft rot'), a **Hérnia ou Potra da Couve** (Clubroot), a **Alternariose** (Alternaria Leaf Spot), **'Damping-off'**, **Podridão das raízes** (Phytophthora root rot), **Míldio** (Downy mildew), **'Bottom rot'**, **Amarelecimento** (Yellows), **Verticilose** (Verticillium wilt) e **Oídio** (Powdery mildew) (Conn *et al.*, 2013), as mais prevalentes nas nossas condições foram a **Alternariose** (Alternaria Leaf Spot), causada pelos fungos *Alternaria brassicicola* e pela *Alternaria alternata*, o que está de acordo com o referido por (Conn *et al.*, 2013) e o **'Damping-off'**, causado por *Fusarium oxysporum* tal como referido por (Agris, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>), para além deste foi ainda encontrado associado à doença, o fungo *Fusarium equiseti*. Em termos percentuais a presença destes fungos foi maior que a de qualquer dos outros, apresentado 37% do género *Alternaria* e 33% de isolados do género *Fusarium*. No entanto, também foi encontrado em plantas sintomáticas da região do Ribatejo, na parcela Álamos o fungo *Rhizoctonia solani*, tanto na sua forma imperfeita, como na forma forma perfeita, (*Thanatephorus cucumeris*) com 2 isolados presentes.

Para além dos fungos referidos, encontram-se também associados às partes sintomatológicas analisadas isolados dos fungos, *Cylindrocarpon olidum*, *Corynespora* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Neurospora* spp., *Pleospora herbarum*, *Stemphylium* spp. e *Plectosphaerella cucumerina*. Destes, os fungos dos géneros *Cylindrocarpon olidum*, *Corynespora* spp., *Cladosporium* spp., *Pleospora herbarum*, *Stemphylium* spp. e *Plectosphaerella cucumerina* são patogénicos em diversas culturas de interesse agronómico (NSW - www.dpi.nsw.gov.au). No entanto, nenhum destes fungos está associado a doenças já descritas para a cultura da couve-brócolo (Conn *et al.*, 2013).

Os fungos *Epicoccum nigrum* e *Neurospora* spp. encontram-se descritos como fungos antagonistas de fungos patogénicos, estando associados ao controlo biológico de doenças, daí poderem ser encontrados muitas vezes também em plantas sintomáticas, onde o seu crescimento é muitas vezes potenciado pela presença da doença (Landum *et al.*, 2015).

Verificou-se com este trabalho, que com a amplificação e sequenciação da região ITS, nem sempre é possível identificarmos os fungos até à classificação

espécie, o que se deve muitas vezes à elevada homologia dessa região entre fungos da mesma espécie, assim como aconteceu para o caso dos fungos *Fusarium* e *Alternaria*. Por esta razão procedeu-se à amplificação e sequenciação parcial do gene da β -tubulina, gene este que apresenta uma maior variabilidade genética entre espécies (Nasri, 2015).

Assim, após o estudo da sequência parcial do gene da β -tubulina, o número total de isolados obtidos passou para 30, ficando assim os isolados repartidos por, 22 na região do Ribatejo, com 8 isolados na parcela Praias e 14 na parcela Álamos, e no Alentejo com 5 isolados, 2 na parcela Quartijos e 3 na parcela Herdade da Canada. Estes resultados, vêm uma vez mais mostrar que o Ribatejo e nomeadamente a parcela Álamos, como sendo a zona onde mais isolados foram encontrados.

Considerando os dois fungos fitopatogénicos mais prevalentes neste estudo, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp, verificou-se que, espécies de ambos os géneros se encontram tanto numa região como noutra, sendo que no Ribatejo o número total de isolados do fungo *Alternaria* spp., foi de 7, tendo sido isolado 1 no caule, 5 em folhas e 1 no pedúnculo das plantas infetadas. No Alentejo um fungo do género *Alternaria* foi isolado no caule de uma planta sintomática. Os fungos do género *Fusarium* foram encontrado em 7 isolados na região do Ribatejo, tendo sido 6 em caules e 1 numa folha e no Alentejo foram encontrados 2 isolados, 1 num caule e outro numa folha. Estes resultados vêm mostrar que o Ribatejo é uma região que apresenta maior quantidade de inóculo destes importantes fungos causadores de doenças em plantas, talvez por ser uma região com maior tradição em culturas hortícolas, enquanto, na região do Alentejo, tradicionalmente se cultivavam mais cereais e em regime de sequeiro (Barros & Calado, 2012; Kelly, Clark, Bryson, Jellis & Tonguç, 2015), que são condições mais adversas à manutenção e proliferação destes agentes, e as gramíneas não constituem hospedeiro preferencial destes patogénios.

5.2. Condições edafo-climáticas e sua relação com o aparecimento de doenças

Tendo este estudo incidido sobre duas regiões edafo-climáticas diferentes, e tendo-se verificado a ocorrência de casos de doença mais prevalentes no Ribatejo do que no Alentejo, importa focar as principais diferenças em termos climáticos destas duas regiões. Assim, através das informações das estações meteorológicas dos distritos de Santarém e Beja, para 30 anos, pode-se verificar que em 5 meses do ano (janeiro, junho, agosto, outubro e dezembro), época em que as couves-brócolo estão no campo, o Ribatejo apresenta temperaturas médias mais baixas que o Alentejo. Por outro lado, a precipitação no Ribatejo é maior que no Alentejo, 710,1 mm e 549,7 mm respetivamente. Com base nestas informações verifica-se que a região do Ribatejo apresenta condições mais amenas, em termos de temperaturas, e uma maior quantidade de precipitação, o que favorece a proliferação e manutenção destes fungos no campo (Agrios, 2005).

Quando se têm em conta as condições climatéricas no ano em que foi efetuada a cultura abrangendo os meses de setembro a dezembro do ano de 2016 e dos de janeiro e fevereiro do ano 2017, verifica-se que as temperaturas médias mínimas na região do Ribatejo são mais amenas que nas da região do Alentejo. Relativamente à precipitação durante o ciclo da cultura, temos uma maior precipitação na região do Alentejo (382,9 mm) em relação à região do Ribatejo (348,9 mm). No entanto, apesar destas pequenas diferenças, entre a temperaturas e a precipitação, nas duas regiões, estas não são consideradas para que, neste ano, se considerem um fator relevante para distinguir uma maior ou menor incidência de patogénios causadores de doenças na cultura da couve-brócolo. Para além disso, a pequena diferença registada na precipitação das duas regiões, pode não ser preponderante, uma vez que as culturas são regadas em ambos os casos, o que poderá anular o efeito da precipitação nessas regiões.

Assim, neste trabalho, e com estas condições, pode-se concluir que os elementos climáticos das duas regiões, no ano em estudo, não foram o principal fator responsável pela incidência de fungos causadores de perdas económicas na cultura da couve-brócolo, levando assim a que outros fatores de produção sejam explorados.

O solo constitui ainda atualmente, a principal base e suporte de crescimento, da maioria das culturas. Iniciando pela região do Ribatejo e abrangendo as duas parcelas, Praias e Álamos, os solos que as constituem pertencem à família dos Aluviossolos que incluem texturas francas (Cardoso, 1965). Moreira (2013) menciona

que estas texturas francas são caracterizadas por terem um arejamento, infiltração e capacidade de retenção da água, nutrientes e penetração dos raios solares que se situam entre as características de texturas argilosas e arenosas, o que as torna muito favoráveis à manutenção de patogénios no solo. Quanto à região do Alentejo, Cardoso (1965) refere que os solos presentes na parcela Quartijos pertence à família dos solos calcários vermelhos de calcários e os solos da parcela Herdade da Canada pertencem a duas famílias de solos, uma a dos solos Mediterrâneos Vermelhos ou Amarelos de rochas cristalofílicas básicas e outra à dos Solos Mediterrâneos Pardos de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneríticas ou cristalofílicas afins. Como as plantas de couve-brócolo não possuem uma raiz muito profunda só se analisou a textura do primeiro horizonte, sendo este em ambas as parcelas, Quartijos e Herdade da Canada, constituído por uma textura franca-argilosa ou franca-argilosa-arenosa, tendo assim, ao nível deste horizonte as mesmas características que os solos das parcelas da região do Ribatejo.

Pela análise dos solos das quatro parcelas em estudo, verifica-se que estes têm melhores condições de disseminação de certos patogénios, como é no caso de *Fusarium* spp., uma vez que este, em curtas distâncias, dissemina-se através da água e passa a época desfavorável sob a forma de estruturas de resistências (Agris, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>). Black (2001) e Conn *et al.*, (2013) afirmam que no caso da *Rhizoctonia solani*, também este um fungo de solo, o seu desenvolvimento e o aparecimento da doença é favorecido pela humidade encontrada neste e tem maior gravidade em solos que são moderadamente húmidos como é o caso dos presentes nas parcelas estudadas neste trabalho.

5.3. Relação dos microorganismos obtidos do material edáfico das diferentes parcelas com a presença de doença nas couves-brócolo

Os patogénios identificados nos solos das diversas parcelas mostram um total de 64 isolados, tendo sido 29 destes obtidos na região do Ribatejo (17 isolados na parcela Praias e 12 isolados na parcela Álamos) e 35 na região do Alentejo (18 isolados na parcela Quartijos e 17 isolados na parcela Herdade da Canada). Pela observação destes resultados, pode-se verificar que os solos em estudo na região do Alentejo apresentam um maior número de isolados de fungos, que os da região do Ribatejo, tornando o Alentejo, teoricamente mais propício ao desenvolvimento de doenças na cultura da couve-brócolo. No entanto, tendo em conta os patogénios encontrados nas plantas de couve-brócolo, verificou-se pela comparação e caracterização morfológica dos isolados obtidos nos solos, que apenas na parcela das Praias se encontrava presente *Fusarium* spp.. Uma vez que nesta parcela não foram detetados problemas de Fusariose nas plantas, admite-se que o fungo do género *Fusarium* encontrado se tratasse de uma espécie de *Fusarium* não patogénica (Validov, Kamilova & Lugtenberg, 2011; Steinberg, Lecomte, Alabouvette & Edel-Hermann, 2016).

O facto de se encontrarem mais fungos no solo e menos doenças nas plantas, também pode ser indicativo que os fungos encontrados possam constituir um efeito antagonista nos patogénios, impedido que estes se instalem na cultura produzindo doença. O Alentejo é uma zona onde tradicionalmente houve uma menor agricultura intensiva e por consequência menos horticultura, tendo havido assim também uma menor utilização de fungicidas, permitindo preservar mais o bioma natural dos solos e como tal menor destruição de microorganismos (Ghorbani, Wilcockson, Koocheki & Leifert, 2008; Weller, Raaijmakers, Gardener & Thomashow, 2002).

5.4. Relação dos microorganismos obtidos do material vegetal proveniente dos viveiros com a presença de doença nas couves-brócolo

Os fungos isolados das 7 amostras de plântulas e substrato proveniente de três viveiros testado revelaram a presença de 31 diferentes tipos de fungos no substrato, 17 nas raízes, 3 nos caules e 11 nas folhas. Quando se analisou e comparou morfológicamente estes tipos fungos com os obtidos nas couves-brócolo sintomáticas, encontraram-se patogénios das espécies *Alternaria*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*, tanto nos substratos, como nas raízes das plântulas dos três viveiros.

Nesta discussão referem-se apenas os isolados em que se obteve correspondência com os patogénios obtidos das plantas sintomáticas do campo. Assim, nas amostras; 1 (viveiro 1), 7 (viveiro 2) e 3 e 5 (viveiro 3) concluiu-se que o fungo *Alternaria alternata*, que foi encontrado nos isolados das plantas sintomáticas teve uma correspondência com um isolado das raízes das plântulas, que por sua vez se pode ter instalado na cultura e foi isolado desta em amostras de plantas das 4 parcelas em estudo. O patogénio pode ter sido ser transportado para o campo através das plantas provenientes do viveiro. Na amostra 5 (viveiro 3) nas raízes das plântulas, encontrou-se o fungo *Rhizoctonia solani*, bem como a sua forma perfeita *Thanatephorus cucumeris*. Os autores Black (2001), Conn *et al.*, (2013) e Agrios (2005) referem que este patogénio se encontra presente na maioria dos solos e, uma vez estabelecido num campo, permanece indefinidamente e dissemina-se através da chuva, da rega, das alfaias e do transporte de solo contaminado. Como este patogénio foi encontrado associado a raízes de plântulas pode-se concluir que a fonte de inóculo no campo poderá ter sido proveniente de plântulas do viveiro 3.

As amostras; 2 (viveiro 2), 4 (viveiro 1) e 6 (viveiro 3) não apresentaram fungos patogénicos aquando da sua análise.

5.5. Relação dos microorganismos obtidos do material proveniente da água de rega com a presença de doença nas couves-brócolo

A análise efetuada à água utilizada para a rega das diferentes parcelas revelou um total de 25 isolados, sendo 14 desses correspondentes à região do Ribatejo (6 isolados na parcela Praias e 8 na parcela Álamos) e 11 correspondentes à região do Alentejo (4 isolados na parcela Quartijos e 7 na Herdade da Canada).

Nestes 25 isolados, foram encontrados os fungos *Fusarium equiseti* e *Fusarium oxysporum* na água de rega da parcela Álamos. O facto de a água se encontrar contaminada, pode ter estado na origem do elevado número de plantas infetadas, com estas espécies de fungos, nesta parcela. Sabe-se que a água de rega é atualmente um dos grandes responsáveis pela contaminação de solos e culturas com fungos e outros agentes fitopatogénicos (Palmero, Iglesias, Lomas, Santos & Tello, 2009). Estes fungos, que podem ter tido a sua proveniência na água de rega, podem ter-se instalado na cultura, tendo sido posteriormente isolado de caules e folhas de planta sintomática. Os restantes isolados não revelaram correspondência com nenhum dos patogénios isolados das plantas doentes.

Os sistemas de rega utilizados podem também estar relacionados com uma maior ou menor propensão para o aparecimento e disseminação das doenças. Segundo Almeida (2013) a rega por aspersão, é o sistema mais utilizado para o cultivo da cultura das brássicas, favorece a dispersão e desenvolvimento de diversas doenças. Este sistema de rega, devido à presença de água nas folhas e 'rain-splash' é responsável pela disseminação de esporos entre as plantas de uma cultura (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994). No entanto, este foi o sistema utilizado em todas as parcelas deste estudo, podendo ter também contribuído para uma maior dispersão dos patogénios encontrados, nomeadamente de *Alternaria* spp., uma vez que é um fungo que esporula na superfície dos tecidos infetados e os seus esporos de multiplicação ou assexuados, são do tipo conídio (Taj, Meena, Giri, Pandey, A. Kumar & A. Kumar, 2015).

O sistema de rega mais aconselhado seria um sistema de rega localizada, no entanto este se não for bem dimensionado também pode ser potenciador do desenvolvimento de fungos radiculares como *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* devido ao aumento da humidade ao nível da raiz e do caule (Agrios, 2005; APS- <http://www.apsnet.org>; Conn *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 1994). Este sistema apresenta várias vantagens em relação à aspersão, pois permite manter a maior parte do solo em boas condições de arejamento e de humidade, evitando-se o stress hídrico,

podendo operar em praticamente todo o tipo de topografia do terreno e pode regar algumas culturas com uma quantidade de água bastante inferior à que é necessária quando se usam outros métodos de rega. Este também não promove o crescimento de infestantes porque a parte não cultivada do solo, ou seja, a entrelinha da cultura, não é molhada pela água de rega, o que por sua vez aumenta a eficácia e reduz os custos das operações de controlo de infestantes. Também a transitabilidade de máquinas agrícolas se realiza mais facilmente não havendo uma tão grande compactação do solo e preservando assim a sua estrutura.

Quando se relaciona o número total de fungos em cada parcela com o sistema de rega utilizado, podemos concluir que o sistema de aspersão 'pivot' utilizado na parcela Herdade da Canada corresponde a um menor número de isolados (12), seguido da parcela Praias, com o sistema de rega por aspersores estáticos com um total de 30 isolados. O maior número de isolados foi encontrado nas parcelas Quartijos, 33 isolados e Álamos 115 isolados, em que os sistemas de rega utilizados foram canhão e aspersores estáticos, respetivamente. Assim, verifica-se que não há relação direta entre o sistema de rega utilizado, uma vez que as parcelas com maior número de isolados utilizaram sistemas de rega diferentes. Além disso, o sistema de rega utilizado nas duas parcelas da região do Ribatejo (aspersores estáticos) é o mesmo e verificou-se uma grande discrepância no aparecimento de isolados. Uma razão possível que justifique esta discrepância, pode ter a ver com a contaminação da água de rega da parcela Álamos com *Fusarium* spp..

5.6. Sequenciação de culturas, operações culturais e total de produção (ton/ha) em cada parcela

A cultura antecedente à cultura da couve-brócolo pode ter influência no leque de patogénios encontrados. Segundo os autores Agrios (2005), APS (<http://www.apsnet.org>), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994) não devem ser cultivadas brássicas no mesmo campo com um intervalo inferior a 3 anos e também não cultivar plantas sensíveis a *Fusarium* spp. sequencialmente. Verificou-se que as sequências de culturas utilizadas nas parcelas deste estudo tiveram em conta esta regra, exceto a parcela Herdade da Canada em que a sequência foi Couve-brócolo (2015) → Soja (2016) → Couve-brócolo (2016/2017), apesar de esta parcela não ter cumprido a regra da sequência cultural ideal, curiosamente não foi na que se verificou a maior incidência de doença nas couve-brócolo.

Relativamente às outras sequências de culturas, nenhuma utilizou outras espécies da família das Brássicas, tendo-se mesmo assim encontrado elevado número de casos de doença. As operações culturais de mobilização de solo e eliminação de infestantes são consideradas como um eficaz controlo de patogénios *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp., como referem os autores Agrios (2005), Conn *et al.*, (2013) e Howard *et al.*, (1994), permitindo a eliminação de possíveis hospedeiros alternantes ou hospedeiros que funcionem como repositórios destas doenças nas culturas. Estas operações culturais foram realizadas de igual forma em todas as parcelas do nosso estudo, em calendários culturais diferentes, exceto na parcela Herdade da Canada que foi aplicado o inseticida Steward como complemento às operações já realizadas, o que provavelmente ainda veio evitar uma maior ocorrência de doença. Os tratamentos fitossanitários realizados incidiram sobretudo nos tratamentos para a Alternariose em ambas as regiões e em todas as parcelas deste trabalho. Estes tratamentos foram realizados devido ao histórico de Alternariose nesta cultura e de uma forma preventiva, no entanto verificou-se que continuaram a aparecer focos da doença contribuindo para quebras na produção. Este facto pode estar relacionado com a existência de formas resistentes do fungo devido à elevada pressão de seleção originada pelo uso contínuo de fungicidas, que levou a uma seleção de estirpes mais resistentes aos produtos fitofarmacêuticos (Tymon & Johnson, 2014). A Alternariose apenas não foi detetada na parcela Quartijos na região do Alentejo, pois os tratamentos preventivos foram realizados na segunda quinzena de outubro e na primeira de novembro quando se verificou uma maior humidade no ar devido à elevada precipitação registada nestes meses, associada ao intervalo ótimo de temperaturas para o desenvolvimento deste patogénio, ou seja, durante o período em

que estavam reunidas as condições ótimas definidas pelo triângulo da doença (Agrios, 2005).

As produções por hectare de cada parcela também mostram alguma relação com a incidência de doença das respetivas parcelas, uma vez que a parcela mais produtiva foi a Quartijos com uma produção de 12,2 ton/ha, tendo-se nas outras 3 verificado uma produção mais homogénea entre si, com a Herdade da Canada com uma produção de 6,3 ton/ha e as duas parcelas do Ribatejo com 7 ton/ha e 7,8 ton/ha, respetivamente para a parcela Praias e Álamos.

5.7. Conclusões gerais

Com este trabalho pode-se verificar a incidência de graves doenças causadores de perdas económicas na cultura de couve-brócolo, como a Alternariose e a Fusariose. Apesar da cultura, nas 4 parcelas em estudo, ter sido feito de igual forma e o seu acompanhamento ter sido feito por uma empresa especializada nesta cultura, pode-se concluir que a presença de doença pode muitas vezes fugir do controlo de quem produz. Assim, este trabalho mostrou que há variáveis importantes a ter em conta, como o estado sanitário das plantas a instalar no terreno, que não só podem causar perdas de produção imediatas, naquele ano e naquela cultura, como contaminar os solos com fungos, que são habitantes deste e como tal aí podem permanecer por várias décadas como é o caso dos fungos dos géneros *Fusarium* e *Alternaria*. A presença destes fungos nos solos vai impedir, a curto prazo, a utilização destes por culturas idênticas ou outras que sejam hospedeiras destes patogénios.

Também a água de rega, mostrou ser um fator de produção importante, pois uma vez contaminada com patogénios estes, se tiverem na cultura um hospedeiro preferencial ir-se-ão instalar nela e causar doença, como se verificou em algumas das parcelas deste estudo. Cada vez mais existe a preocupação de uma utilização sustentável da água da rega, não só porque esta se apresenta como um fator limitante em muitas regiões do mundo, mas porque a sua qualidade é cada vez mais baixa, transportando nela muitos patogénios, o que está relacionado com a intensificação das zonas agrícolas. Com este trabalho pode-se comprovar a extrema importância que poderá ter a realização de análises à água para avaliação da presença de microorganismos fitopatogénicos.

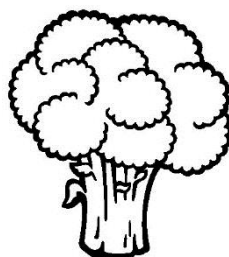
Ainda com relação ao uso eficiente deste recurso escasso, sugere-se que os sistemas de rega possam ser modificados para outros que façam um uso da água

mais eficiente, como sistemas de rega localizados em vez dos de aspersão utilizados. Os sistemas de rega localizados podem assim contribuir não só para uma economia de água, como para a manutenção de um melhor estado sanitário das plantas, uma vez que não ajudam à dispersão dos patogénios, nem criam condições de elevada humidade ao nível da folhagem, caules e raízes.

Este trabalho veio mostrar que para a realização de uma cultura, neste caso a da couve-brócolo, não basta ter todos os fatores de produção necessários e uma tecnologia bem estruturada, pois a presença dos patogénios está para além de tudo isso. Como se verificou com este estudo os patogénios podem comprometer o estado sanitário de uma cultura indo em último caso provocar graves diminuições na produção e rendimento finais.

5.8. Perspetivas futuras

Este trabalho veio abrir o leque de questões ao controlo fitossanitário da cultura da couve-brócolo e das hortícolas em geral. Assim, com as conclusões obtidas relativas à baixa incidência de Alternariose quando se efetuaram tratamentos de acordo com a maior probabilidade de ocorrência da doença, dever-se-ia realizar um estudo comparativo entre a incidência da doença seguindo os calendários de tratamento e quando se efetuavam os tratamentos de acordo com a ocorrência das condições ideais para o seu aparecimento. Este estudo poderia conduzir à elaboração de um modelo de previsão de tratamentos não só para a couve-brócolo, mas também para outras hortícolas, nomeadamente para as brássicas em geral.



REFERÊNCIAS

- ADP Fertilizantes, S.A., 2010, Nitromagnésio, <http://www.adp-fertilizantes.pt>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5ª edição). USA: Department of Plant Pathology, University of Florida
- Almeida, D. (2013). *Manual de Culturas Hortícolas – Volume I – 2ª Edição*. Barcarena: Editorial Presença
- Barros, J., Freixial, R. (2011). *Controlo químico de infestantes. Texto de apoio aos alunos*. Universidade de Évora: Departamento de Fitotecnia.
- Barros, J., Calado, J. (2012). *Itinerário Técnico dos Cereais de Outono-Inverno. Texto de apoio aos alunos*. Universidade de Évora: Departamento de Fitotecnia.
- Barros, J., Calado, J. (2011). *Rotação de culturas. Texto de apoio aos alunos*. Universidade de Évora: Departamento de Fitotecnia.
- BASF Crop Protection Portugal, 2017, Butisan S, <https://www.agro.basf.pt>
- BASF Crop Protection Portugal, 2017, SIGNUM, <https://www.agro.basf.pt>
- Black, L. L. (2001). *Vegetable diseases: A Practical Guide*. AVRDC International Cooperators
- Bayer CropScience Portugal, 2009, Altacor, <http://www.bayercropscience.pt>
- Cardoso, J. V. J. C. (1965). *Solos de Portugal – Sua classificação, caracterização e génese – 1- A sul do Rio Tejo*. Lisboa: Secretaria de Estado da Agricultura, Direcção-Geral dos Serviços Agrícolas
- Carta dos solos de Portugal. N°27-C. Serviço de reconhecimento e de ordenamento agrário. (SROA)
- Carta dos solos de Portugal. N°27-D. Serviço de reconhecimento e de ordenamento agrário. (SROA)
- Carta dos solos de Portugal. N°43-A. Serviço de reconhecimento e de ordenamento agrário. (SROA)
- Carta dos solos de Portugal. N°43-C. Serviço de reconhecimento e de ordenamento agrário. (SROA)

Climate-Data.org, Clima Beja, <https://pt.climate-data.org>

Climate-Data.org, Clima Santarém, <https://pt.climate-data.org>

Conn, K. E, Rosenberger, S. A., Gabor, B., Kao, J., Krause, D. (2013). *Crucifer Disease Guide*. Seminis

County of Grande Prairie No.1, 2012, <http://www.countygp.ab.ca>

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, 2009, Fitofarmacêuticos- Goal Supreme, <http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/lista/rotulos>

Doyle, J. Doyle, J. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 e 15

FAO, 2017, FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

Félix, M. R. F. (2014). *Introdução à Proteção das Plantas*. Universidade de Évora: Departamento de Fitotecnia.

Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, A., Leifert, C. (2008). *Soil management for sustainable crop disease control: a review*. *Environmental Chemistry Letters*, 6 (3), 149-162

Hall, T. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 e 98

Howard, R. J., Garland, J. A., Seaman, W. L. (1994). Chapter 8 – crucifers broccoli, Brussels sprouts, cabbage, cauliflower, radis, rutabaga, turnip. (pp. 173-179). *Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada*. Canada: the Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada.

Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica. Anuário Climatológico de Portugal, Parte I. Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, Lisboa, 1991

IPMA, 2017, Área educativa- Clima de Portugal Continental, Instituto Português do Mar e da Atmosfera

IPMA, 2016, Boletim Climatológico, Agosto 2016, Portugal Continental

IPMA, 2016, Boletim Climatológico, Setembro 2016, Portugal Continental

IPMA, 2016, Boletim Climatológico, Outubro 2016, Portugal Continental

IPMA, 2016, Boletim Climatológico, Novembro 2016, Portugal Continental

IPMA, 2016, Boletim Climatológico, Dezembro 2016, Portugal Continental

IPMA, 2017, Boletim Climatológico, Janeiro 2017, Portugal Continental

IPMA, 2017, Boletim Climatológico, Fevereiro 2017, Portugal Continental

INE, 2016, Estatísticas Agrícolas 2015, Instituto Nacional de Estatística

Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durlind, M. B., Kolseth, A., Steinberg, C., Persson, P., Friberg, H. (2015). *Genus-Specific Primers for Study of Fusarium Communities in Field Samples*. American Society for Microbiology: Applied and Environmental Microbiology

Keller, J., Bliesner, R. D. (1990). *Sprinkle and trickle irrigation*. New York: Van Nostrand Reinold

Kelly, C., Clark, B., Bryson, R., Jellis, G., Tonguç, L. (2015). *The Encyclopaedia of Cereal Diseases*. Centre for Bioimaging: Rothamsted Research Ltd

Kucharek, T., Strandberg, J. (2000). *Black Rot of Crucifers*. Florida: Plant Pathology Fact Sheet

Kucharek, T. (2000). *Alternaria Diseases of Crucifers*. Florida: Plant Pathology Fact Sheet

Kucharek, T. (2000). *Downy Mildew of Crucifers*. Florida: Plant Pathology Fact Sheet

Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., Pryor, B. M. (2013). *The sections of Alternaria: formalizing species-group concepts*. The Mycological Society of America

Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (2016). *Catálogo Nacional de Variedades*. Lisboa

Moreira, U. (2013). *PRÁTICAS DE SOLOS: Solo; Propriedades do solo; Regras de colheita de amostras de terra para análise; Determinação do valor do pH; Regras de colheita de material vegetal para análise; Corretivos; Erosão; Fertilidade e*

produtividade; Leis da fertilização; Classificação dos nutrientes; Tipo de adubações; Adubos; Cálculo de adubações; Mobilizações do solo. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, Lda

Nasri, T., Hedayati, M. T., Abastabar, M., Pasqualotto, A. C., Armaki, T. M., Hoseinnejad, A., Nabili, M. (2015). *PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically importante species of Aspergillus.* Journal of Microbiological Methods 117, 144-147

NSW Goverment, 2017, <http://www.dpi.nsw.gov.au>

Oliveira, I. (2011). *Técnicas de Regadio – Teórica e Prática – 2ª edição.* Beja: Isaurindo Oliveira

Palmero, D., Iglesias, M., Lomas, T., Santos, M., Tello, J. C. (2009). *Species of Fusarium Isolated from River and Sea Water of Southeastern Spain and Pathogenicity on Four Plant Species.* Plant Disease, 377-385

Pereira, L. (2004). *Necessidades de Água e Métodos de Rega.* Sintra: Publicações Europa-América, LDA

Rimmer, S. R., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L. (2007). Part I – Introduction. *Compendium of Brassica Diseases* (pp. 1-14). St. Paul: The American Phytopathological Society

SAPEC AGRO PORTUGAL, 2017, EKYP MZ, <http://www.sapecagro.pt>

SAPEC AGRO PORTUGAL, 2017, Judo, <http://www.sapecagro.pt>

SAPEC AGRO PORTUGAL, 2017, Steward, <http://www.sapecagro.pt>

Schiavon, A., Blind, A. D., Eckstein, B., Pinheiro, J. B., Vendrame, L. P. C, Hanashiro, M. M., Jorge, M. H. A., Vidal, M. C., Filho, M. M., Botrel, N., Madeira, N. R., Melo, R. A. C. (2015). *Coleção Plantar Brócolis.* Brasília: Embrapa

Shahidian, S., Guimarães, R. C., Rodrigues, C. M., Chambel, A., Alexandre, C. A., Santos, F. L., Basch, G., Andrade, J. A., Coelho, R. (2012). Capítulo 3 – Clima e estado do tempo. Fatores e elementos do clima. Classificação do clima. *Hidrologia Agrícola* (pp. 23-80). Évora: Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM)

Steinberg, C., Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, E. (2016). *Root Interactions with Nonpathogenic Fusarium oxysporum: Hey Fusarium oxysporum, What Do You Do in Life When You Do Not Infect a Plant?*. França: Belowground Defence Strategies in Plants, Signaling and Communication in Plants

Symbolevolution, 2017, Sistemas de Aspersão- Aspersores Estáticos, <http://www.symbolevolution.pt>

Taj, G., Meena, PD, Giri, P., Pandey, D., Kumar, A., Kumar, A. (2015). *Pathogenesis mechanisms employed by Alternaria species*. Journal of Oilseed Brassica, 6 (2): 213-240

Traxco, S.A, 2016, Sistemas de Aspersão- Canhão, <http://www.traxco.pt>

Traxco, S.A, 2016, Sistemas de Aspersão- 'Pivot', <http://www.traxco.pt>

The American Phytopathological Society, 2017, <http://www.apsnet.org>

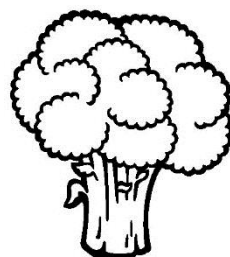
Tymon, L., Johnson, D. A. (2014). *Fungicide Resistance of Two species of Alternaria from Potato in the Columbia Basin of Washington*. Plant disease 98 (12): 1648-1653

Validov, S. Z., Kamilova, F. D., Lugtenberg, B. J. J. (2011). *Monitoring of pathogenic and non-pathogenic Fusarium oxysporum strains during tomato plant infection*. Holanda: Leiden University, Institute of Biology

Verma, V., Gond, S., Kumar, A., Kharwar, R., Strobel, G. (2007). *The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of Azadirachta indica A. Juss. (neem) from Varanasi (India)*. Microb. Ecol. 54 (1), 119–125

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., Thomashow, L. S. (2002). *Microbial Populations Responsible For Specific Soil Suppressiveness To Plant Pathogens*. Annu. Ver. Phytopathol. 40: 309-48

Wikipedia, 2017, Xanthomonas campestris pv. campestris, https://en.wikipedia.org/wiki/Xanthomonas_campestris_pv._campestris



ANEXOS

Anexos I – Calendários das Operações Culturais Geral

Parcela/Quinzena	<u>Ribatejo</u>		<u>Alentejo</u>	
	Praias	Álamos	Quartijos	Herdade da Canada
1ª de setembro	- Controlo químico de infestantes em pós-plantação (Goal + Butisan)	- Gradagem - Rototerra - Adubação de fundo (10.12.6) - Plantação	- Controlo químico de infestantes em pós-plantação (Goal + Butisan)	
2ª de setembro		- Controlo químico de infestantes em pós-plantação (Goal + Butisan)		- Adubação de fundo (10.10.22)
1ª de outubro	- Aplicação de inseticida para a lagarta (Judo) - Aplicação de fungicida para a Alternariose (EKYP MZ) - Adubação de cobertura (Rhizovit 31)			- Gradagem - Rototerra - Plantação - Controlo químico de infestantes em pós-plantação (Goal + Butisan)
2ª de outubro		- Adubação de cobertura (Nitromagnésio)	- Aplicação de inseticida para a lagarta (Judo) - Aplicação de fungicida para a Alternariose (EKYP MZ)	
1ª de novembro	- Aplicação de inseticida para a lagarta (Altacor) - Aplicação de fungicida para a Alternariose (SIGNUM)		- Aplicação de inseticida para a lagarta (Judo) - Aplicação de fungicida para a Alternariose (SIGNUM) - Adubação de	- Aplicação de fungicida para a Alternariose (EKYP MZ)

			cobertura (Nitromagnésio)	
2ª de novembro	- 1ª Colheita		- 1ª Colheita - Aplicação de inseticida para a lagarta (Altacor)	
1ª de dezembro			- Última colheita	- Aplicação de inseticida para a lagarta (Steward) - Aplicação de fungicida para a Alternariose (SIGNUM)
2ª de dezembro		- 1ª Colheita		
1ª de janeiro	- Última colheita	- Última colheita		
2ª de janeiro				- 1ª Colheita
1ª de fevereiro				
2ª de fevereiro				- Última colheita
...				
1ª de agosto				
2ª de agosto	- Gradagem - Rototerra - Adubação de fundo (13.10.20) - Plantação		- Gradagem - Rototerra - Adubação de fundo (10.10.22) - Plantação	

Anexos II – Informações correspondentes a cada parcela da região do Ribatejo

Parcela das Praias

	Área	Cultura Antecedente	Operações Culturais	Fertilização	Solos	Sistema de Rega
Praias	7,5 hectares	Batata	Gradagens + Rototerra	1- Adubo de Fundo: 13-10-20 ENTEC (300 kg/hectare) 2- Adubo de cobertura: 31-0-0 Rhizovit 31 (300 kg/hectare)	Ac	Cobertura Total - Aspersores

	Controlo			Data		Toneladas Totais	Ton/hectares	Desinfecção das Máquinas
	Doenças	Pragas	Infestantes	Plantação	Colheita			
Praias	1º: EKYP MZ 2,5 kg/hectare – Alternariose 2º: SIGNUM 1,2 kg/hectare – Alternariose	1º: Judo 0,75 ml/hectares - Lagarta 2º: ALTACOR 200 ml/hectare	GOAL Supreme 0,2L/hectare + BUTISAN 1,5L/hectare	27 de agosto	18 de novembro	53 000	7	Não

Parcela dos Álamos

	Área	Cultura Antecedente	Operações Culturais	Fertilização	Solos	Sistema de Rega
Álamos	1,8 hectares	Milho	Gradagens + Rototerra	1- Adubo de Fundo: 10-12-6 (600 kg/hectare) 2- Adubo de cobertura: Nitromagnésio	Ac	Cobertura Total - Aspersores

	Controlo			Data		Toneladas Totais	Ton/hectares	Desinfecção das Máquinas
	Doenças	Pragas	Infestantes	Plantação	Colheita			
Álamos	-	-	GOAL Supreme 0,2L/hectare + BUTISAN 1,5L/hectare	14 de setembro	19 de dezembro	14 000	7,8	Não

Anexo III – Informações correspondentes a cada parcela da região do Alentejo

Parcela da Herdade da Canada

	Área	Cultura Antecedente	Operações Culturais	Fertilização	Solos	Sistema de Rega
HDC	10 hectares	Soja	Gradagens + Rototerra	1- Adubo de Fundo: 10-10-22 ENTEC (400 kg/hectare)	Pv Pm + BVC	Pivot

	Controlo			Data		Toneladas Totais	Ton/hectares	Desinfecção das Máquinas
	Doenças	Pragas	Infestantes	Plantação	Colheita			
HDC	1º: EKYP MZ 2,5 kg/hectare – Alternariose 2º: SIGNUM 1,2 kg/hectare – Alternariose	1º: Steward 85 g/hectare - Lagarta	GOAL Supreme 0,2L/hectare + BUTISAN 1,5L/hectare	5 de outubro	27 de janeiro	63 000	6,3	Não

Parcela dos Quartijos

	Área	Cultura Antecedente	Operações Culturais	Fertilização	Solos	Sistema de Rega
Quartijos	13 hectares	Girassol	Gradagens + Rototerra	1- Adubo de Fundo: 10-10-22 ENTEC (500 kg/hectare) 2- Adubo de cobertura: Nitrogénio	Vc	Canhão

	Controlo			Data		Toneladas Totais	Ton/hectares	Desinfecção das Máquinas
	Doenças	Pragas	Infestantes	Plantação	Colheita			
Quartijos	1º: EKYP MZ 2,5 kg/hectare – Alternariose 2º: SIGNUM 1,2 kg – Alternariose	1º: Judo 0,75 ml/hectare - Lagarta 2º Tratamento igual ao 1º 3º: ALTACOR 100 g/hectare- Lagarta	GOAL Supreme 0,2L/hectare + BUTISAN 1,5L/hectare	29 de agosto	23 de novembro	159 000	12,2	Não

Anexo IV – Adaptação da tabela geral do isolamento de fungos das plantas sintomáticas sem desinfeção

Brócolos que morreram no campo	Extração	Nome	Total	Estruturas da planta	Ribatejo		Alentejo	
					Raíz Circular	Martins	Borges	Pires
Fungo 1	-	-	1	Colo do caule				
				Folha		1		
Fungo 2	-	-	2	Colo do caule				
				Folha		2		
...								
Fungo 172	-	Cladosporium	1	Colo do caule				
				Folha			1	
Fungo 313	-	-	1	Colo do caule				
				Raíz		1		
				Folha				
Fungo 328	-	-	1	Colo do caule				
				Folha	1			

Anexo V – Adaptação da tabela geral do isolamento de fungos das plantas sintomáticas com desinfecção

Brócolos que morreram no campo	Extração	Nome	Total	Estruturas da planta	Ribatejo		Alentejo	
					Raíz Circular	Martins	Borges	Pires
Fungo 22	-	-	1	Colo do caule		1		
				Folha				
Fungo 23	-	-	1	Colo do caule				
				Folha		1		
...								
Fungo 151	X	<i>Alternaria</i> spp.	2	Colo do caule				
				Folha		2		
Fungo 183	X	<i>Fusarium equiseti</i>	1	Colo do caule	1			
				Folha				
Fungo 312	-	-	1	Colo do caule				
				Folha				1

**Anexo VI – Sequências nucleótídicas após sequenciação
(MACROGEN 1)**


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_ITS1  TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGTATT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_ITS1  CCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGTTGGTGTTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGTGGAGACTCGCCTTAAGTAAT

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_ITS1  TGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTATCAGCAAAGTCTAGCATCCATTAAGCTTTTTTCAACTTTTGACTCGGA

      310
.....|.....|.....|.....
62_ITS1  TCAGGTAGGGATACCCGT

```

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
71_ITS1  GCACACCTTTCTCTTTCATCCCATACACACCTGTGCACCTGTGAGACAGATGTTTTCTAGGGGGAAAGGAATTTTATGGAACCAATTTTCTTTGAACTT
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
71_ITS1  CTGTCTACTTAATCTATATAAACTCAATTTATTTTAAAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCG
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
71_ITS1  CATCCATGAAAAACCCAGCGAAATGCCATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCT
      310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
71_ITS1  TGGAGCATGCCTGTTTGAATATCCTGAAA

```



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
183_ITS1 CCTGTAAAAAGGGACGGCCCCGCCGAGGACCCATAAATCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATC

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
183_ITS1 TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
183_ITS1 GCCAGTATTCCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTCCCCAAATCGATTG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
183_ITS1 GCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCG

      410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
183_ITS1 GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

```

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
198_ITS1 CCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
198_ITS1 GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
198_ITS1 TGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTAAAGTAATTGGCAGCCGG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
198_ITS1 CCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG

      ....|....
198_ITS1 GATACCCGC

```


**Anexo VII – Sequências nucleótídicas após sequenciação
(MACROGEN 2)**

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

 310_ITS1 GGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCCTTTGCGCACTTCTTGTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTGT

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

 310_ITS1 AATTGCAATCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

 310_ITS1 AGTGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCC

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

 310_ITS1 TCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCCTTAAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAATCTTG

410 420 430 440 450 460 470 480 490

 310_ITS1 CACTTTGAATCAGCCTTGGTTGAGCATCCATCAAGACCACATTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATC

**Anexo VIII – Sequências nucleótídicas após sequenciação
(MACROGEN 3)**

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

 35_TEF1 CCATCGACATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGGTTAGTACCCCTCTGCCACTACATCAAGTCTTTACAATGCTAACATGTTGTACTCAGTAC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

 35_TEF1 TATGTCACCGTTAGTATGTTACACCTTCTCTTTGTATCCCCACTCATCATGTATAACCTTCCATCATGTATCCCCTTCTATCATGTTGCTGTTGCTCTT

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

 35_TEF1 GCTGAGCTCGCTCTTGCCTTGCCTGAGCTCGCTGTTGCTCTTGCCTTGCCTGGGTTCAATCTTGCAGTCTTGTGCAAGACGTTCCCTCCAGCATCATGCT

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

 35_TEF1 GCCGCCTCAGGATCTGGCGGCACTTTCCCTGGATAATGGTCTCACCTGCTGGTGTGAGTCCCAACATCACACCTCCGTTGGCTGCACATCCTCTGCATCCT

410 420 430

 35_TEF1 CTCCGCTCTTTGCTTTCTCCCTCTTCACAACACTCAGC

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_TEF1  CCATCGACATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGGTTAGTACCCCTCTGCCTACTACATCAAGCTCTTTACAATGCTAACATGTTGTACTCAGTAC
          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_TEF1  TATGTCACCGTTAGTATGTTCACACCTTCTTTGTATCCCCACTCATCATGTATAACCTTCCATCATGTATCCCCTTCTATCATGTTGCTTGCTT
          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_TEF1  GCTGAGCTCGTGTTGCTTTGCTTGCTTGCTTGGTTCGTTCTTGCGGTCTTGTGCAAGACGTTCCTTCCATCATCATGCTGCCGCCTCAGGATCTGGCGGC
          310     320     330
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
62_TEF1  ACTTTCCCTGGATATGGTCTCATGTCTGGTGTAGTCC

```



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
151_TEF1  TTAGTACCCCTCTGCCACTACATCAAGTTCCTTACAATGCTAACATGTTGTACTCAGTACTATGTCACCGTCATTGACGCCCCCGGTCACCGTGATTC

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
151_TEF1  ATCAAGAACATGATCAC TGGTACCTCCCAGGCCGACTGCGCTAATCTCATCAATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCC

      210     220     230     240     250
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
151_TEF1  AGACTCGTGAGGAGGCTCTCCGTCCGTTACACCCTCGGTGTCAAGGAGCTCAGCGTTGC

```



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
198_TEF1 GTATCACCATCGACATTGCTCTCTGCACCTCCATACTCCCAAAGTTATTACCCCTCTCCCACCACCACCATCTTCCTTTCATCTGTTTTTTTATTTTTT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
198_TEF1 TTGTAAATGTCCTATTTATATTTCACTACTCCCCCCCCCTTCCCCCTTCAGACCCCTACTCATTATACTTTTCCAACCCCTCCCCCTCC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
198_TEF1 ATCTCCTTACTACTACCGCCCTCCCCCAATTACTACTATACTTTTTATTATATCTTCTTCACCCCCCTTACTTTAGTCTCACTTCTCTCCCCTTAT

      310     320     330     340
    ...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
198_TEF1 TATTCTCATCATATCCTTACTCTTATAAATTTTACTTCTACTTTCACTC

```

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
218_TEF1 GTC TGA AAG GAG AGG GAG GGA ACC AAT CG AGG TAC TTC CCC GGC ATG TTC AAC AT TGC CGT GTAG C TCG CCC ACT TGC TCG AAAAA CAG TCC CTT GGT CTC
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
218_TEF1 GTAA ATC AGG GCCC ATAC GAACA ATATG CAAA TAAAG CACCA TCCCC CCCAG AC GAAAA GACC TTAG CACCC ATGTT GTCG TTTGCC GGTG AGCCCA ATA
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
218_TEF1 CCC TATTC TTTTC AATTG CCG CCGG TAGTGG TGAG TTAG AGGC TGGTAG C TCCC AGGATGG CCGGACTCATG AGCACGC TCTCTCC GC TTA CTCCCTCG GT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
218_TEF1 GTCAG CAG CTCATCC TTGCC ATCAAC AAGATGG ACGCC ACCAG TGGTCGG AGGAAC GTTACC AGGAAATCATCC AGGAGACCTCCA ACTTCTTTA AGAA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
      |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
218_TEF1 GGTCGGCTACA ACCCA ACCACG TTCCTTC TTTCCCA TCTCCGG TTTGT TGGTGACA ACATGATTG AGGCATCATCCA ACTGCC CCTGGTAG AGGGTTG

```

510 520 530 540 550

218_TEF1 GCAGAAAGAAACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCGTCGACGCCA

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

229_Fa CATGAGCATTAATCCTGCCATTCCGTCCAAATCCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGACCGGTCAC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

229_Fa TTGATCTACCAGTGCCTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAGTCACTTTCCCTTCAAATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTTC

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

229_Fa CCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCATAATGACCGTAAATTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCG

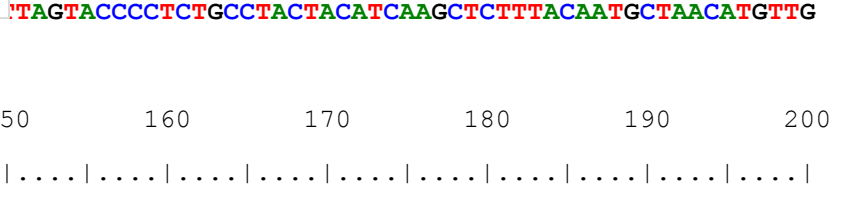
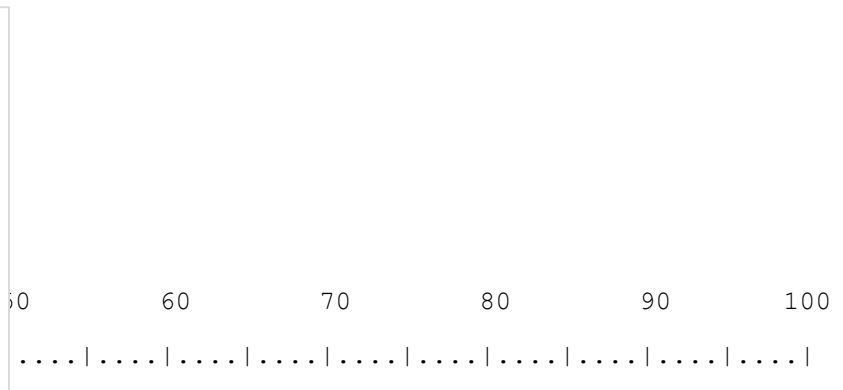
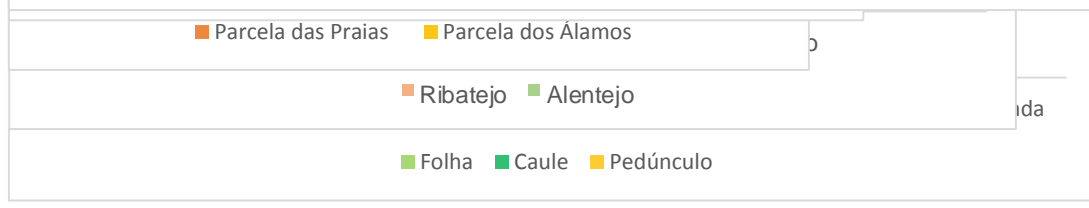
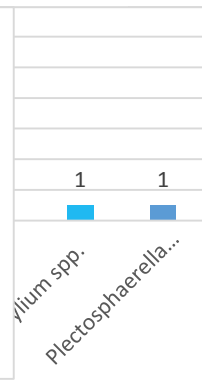
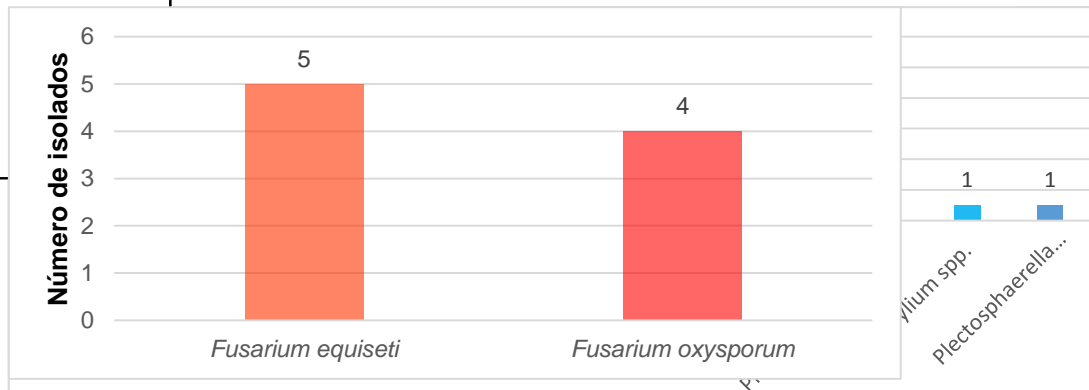
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

229_Fa AAGGGAGCGTTTGCCCTCTTACCAATTCACCAACCTCAATGAGTGCCTCGTCACGTGTGAAGCAGTCACTAACCAATCAACAAATAGGAAGCCGCTGAGCT


```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
264_TEF1 AGCGTGGTATCACCATCAACAATTGCTCTCTGGAAGTTC AAGACTCCCAAGGTTAGTACCCCTCTGCCTACTACATCAAGCTCTTTACAATGCTAACATGT
          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
264_TEF1 TGTACTCAGTACTATGTCACCGTCAATTGACGCCCCCGGTACCGTGAATTCATCAAGAACATGATCTCTGGTACCTCCCCCCCCACTGCGCTATTCTCA
          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
264_TEF1 TCATTGCCCCCGGTACTGCTGATTTTTAGCCTTAATTACTCCAATTTTTTTTTATATTTCCTTACCACCCCTTTAAACAACCTTCCGTTTCCCCCTCTCCC
          310     320
...|...|...|...|...|...|...
264_TEF1 CCTCTTCCCTCCTCATTTCAATACGCC TTC

```

298_TEF1 TACTCAGTACTATGTCACCGTCAATTGACGCCCCCGGTACCGTTGATTTTCATCAAGAACAATGATCACGGGTACCTCCCAGGCCGACTGCGCTATTCTCAT

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

298_TEF1 CGTTGCCGCCGGTACTGGTGCAGTTTCGAGGCCGGGAATCTCCAGGGTTGGTCCGGACTTTTTTGTGGCGGGCGTGGGGGGCGGGCGCCTCGCGGTGTCAC

310 320 330

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

298_TEF1 GGGGTTCCGGCTCTTCCCTCATCAAACGTGCGCTTCCGG