Doença das manchas castanhas da pereira ‘Rocha’:

resultados parciais obtidos no âmbito do Grupo Operacional Protecestenfilio e ensaios de patogenicidade com *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp.

Cláudia Rodrigues Pereira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica – Especialização em Hortofruticultura e Viticultura

Orientadora: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Júri

Presidente: Doutor Carlos Manuel Antunes Lopes, Professor associado com agregação, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

2022

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado foi realizada graças a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram a nunca desistir, pelo que estou profundamente grata por toda a dedicação.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Engenheira Cecília Rego, pela imediata disponibilidade em me ter aceitado como sua aluna de dissertação, por ter assumido este compromisso, pela imensa paciência, exigência e acima de tudo agradecer por toda a ajuda que me forneceu.

A todos os agentes do grupo operacional ProtecEstenfilio que possibilitaram a realização de todo este trabalho. Ao coordenador, Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional (COTHN), aos parceiros Cooperativa Agrícola do Bombarral Crl (CAB), Cooperativa Agrícola dos Fruticultores do Cadaval Crl (COOPVAL), Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola Lda (CPF), Estação Fruteira do Montejunto Crl (FRUTUS), Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste Crl (FRUTOESTE) e Associação dos Produtores Agrícolas da Sobrena (APAS), por terem realizado o trabalho de campo, a colheita e o envio de todo o material vegetal analisado. Aos fruticultores envolvidos, pela determinação e persistência na procura de respostas e soluções para o controlo da doença das manchas castanhas da pereira.

Um especial agradecimento aos meus pais, que por muitas palavras que utilize nunca será suficiente para descrever a forma inacreditável como me suportaram tanto financeiramente, através do seu sacrifício e trabalho, como emocionalmente, garantindo que nunca me faltava nada. No entanto, queria deixar um agradecimento em particular à minha mãe pelos anos de paciência, incentivo e apoio, por me ensinar a não desistir e me dar forças nos momentos mais difíceis. À minha irmã que sempre esteve presente em todos os momentos e caminhou a meu lado, por ser a pessoa que juntamente com os meus pais permitiram que isto deixasse de ser um objetivo e passasse a ser a minha realidade.

Aos meus amigos que me acompanham desde a infância quero agradecer por todo o apoio, companheirismo e amizade. Ao longo de vários anos puderam presenciar e auxiliar o meu crescimento pessoal e profissional. Por sempre saberem o que dizer nos momentos certos e principalmente por partilharem comigo momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos de curso, que sempre dividiram comigo a responsabilidade de ser aluna universitária, que me acompanharam ao longo deste percurso com a leveza e calma que sempre precisei. Pelo companheirismo, amizade e sobretudo pelos bons momentos que sempre

guardarei comigo. Um agradecimento em especial à Maria Gomes por ter sido a pessoa que mais me ajudou e apoiou neste período e por isso devo-lhe muito!

A todos os professores e funcionários do Instituto Superior de agronomia que me ajudaram sempre que precisei e conseguiram sempre despertar a minha curiosidade quanto aos mais variados temas.

Ao Banco Santander Universidades, que em parceria com o Instituto Superior de Agronomia, me atribuíram o Prémio de Incentivo ao Mestrado o que possibilitou a realização do mesmo.

Por fim, um agradecimento profundo a todos os que de certa forma contribuíram para o meu sucesso de forma direta e indireta. A todos os que me ajudaram a tornar na pessoa que sou! Um muito obrigado!

Resumo

A doença das manchas castanhas da pereira causa elevados estragos de produção e, consequentemente, avultados prejuízos em toda a cadeia de produção e comercialização. Tem sido associada à espécie *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons que infecta flores, frutos pequenos, folhas e frutos antes da colheita.

Este trabalho resulta da monitorização da estenfiliose em seis ensaios de campo instalados na região do Oeste, ao longo de quatro anos no âmbito do grupo Operacional Protectestenfilio. Adicionalmente, pretendeu-se clarificar os sintomas e etiologia da doença através da realização de testes de patogenicidade.

Na introdução apresenta-se uma breve revisão sobre a doença dando-se ênfase aos aspetos relacionados com a importância económica, distribuição geográfica, a etiologia, sintomatologia e epidemiologia da doença.

No capítulo 1 faz-se a caracterização dos pomares bem como das modalidades ensaiadas. A modalidade 1 (testemunha), sem remoção do material vegetal do solo com ou sem linha limpa, a modalidade 2, com remoção de material vegetal do solo, a modalidade 3 com aplicação de agentes de controlo biológico e a modalidade 4, com a aplicação de biocidas. Apresentam-se os resultados apurados para a incidência e de severidade da doença obtidos nos diferentes órgãos (flores, frutos pequenos, folhas e frutos à colheita) por pomar e por ano. As diferentes modalidades ensaiadas não relevaram eficácia na redução do inóculo potencial presente nos pomares o que pode ter sido resultado da influência da idade do pomar, do histórico da doença e/ou das condições meteorológicas ocorridas ao longo dos quatro anos de ensaio.

No capítulo 2 procede-se à realização de teste de patogenicidade com uma seleção de isolados de *Alternaria* sp. e *S. vesicarium* obtidos em diversos pomares em 2021. Todos os isolados de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp. foram patogénicos dando origem ao aparecimento de manchas castanhas semelhantes na epiderme da polpa dos frutos. A agressividade dos isolados mostrou-se variável e independente das características do pomar de origem.

Estes resultados confirmam que a doença das manchas castanhas é causada por um complexo de fungos, o que acarreta implicações diretas na proteção fitossanitária dos pomares.

Palavras-chave: *Stemphylium vesicarium*, *Alternaria* sp. incidência, severidade, patogenicidade, agressividade

Abstract

Brown spot of the pear causes high damage of production and, consequently, large losses throughout the production and marketing chain. It has been associated with *the* sp*ecies Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons that infects flowers, small fruits, leaves and fruits before harvest.

The first objective of this master thesis was to compile the results of disease incidence and severity obtained in six orchard trials installed in the Western region, over four years, under the "Grupo Operational Protectestenfilio" , additionally, has the intend to to clarify the etiology of brown spots of the pear through pathogenicity tests with a selection of isolates of *Alternaria* sp e *S. vesicarium*

Firstly, in the introduction, brief review on the disease is presented in which it is focused the economic importance, geographical distribution, etiology, symptomatology, and epidemiology.

In chapter 1, the orchards are characterized as well as the methods tested. Treatment 1 (control), without removal of plant material from the soil, treatment 2, removal of plant material from the soil, treatment 3 with the application of biological control and treatment 4 with the application of biocides. The results of incidence and severity of the disease are presented in different organs (flowers, small fruits, leaves and fruits at harvest) by orchards and by year. None of the treatments were effective in reducing the potential inoculum present in the orchards, which may have been the result of the influence of the age in the orchard, the history of the disease and/or the meteorological conditions that occurred over the four years of the test.

In Chapter 2, pathogenicity tests were performed with the analysis and selection of *Alternaria* sp and *S. vesicarium* obtained from different orchards in 2021. The aggressiveness of the isolates of both species under study was also evaluated. All isolates of *S. vesicarium* and *Alternaria* sp. were pathogenic, giving rise to the appearance of similar brown spots on the epidermis of the fruit pulp. The aggressiveness of the isolates was variable and independent of the characteristic of the original orchards.

These results confirm that brown spot disease is caused by a complex of fungi which will bring direct consequences on crops protection.

Keywords: *Stemphylium vesicarium*, *Alternaria* sp., incidence, severity, pathogenicity, aggressiveness

Índice

Agradecimentos ..... *I*

Resumo ..... *III*

Abstract ..... *IV*

Índice ..... *V*

Índice de Figuras ..... *VII*

Índice de Quadros ..... *XI*

Lista de Abreviaturas e símbolos *1*

1. Introdução *2*

1.1. A pereira 'Rocha' **3**

1.2. A doença das manchas castanhas **5**

1.2.1. Distribuição e importância económica 5

1.2.2. Etiologia 6

1.2.3. Sintomatologia 8

1.2.4. Epidemiologia 11

1.2.5. Fatores de risco que afetam o desenvolvimento da doença 12

2. Monitorização de ensaios ao longo de 4 anos *16*

2.1. Introdução **16**

2.2. Material e métodos **17**

2.3. Resultados e discussão **21**

2.3.1. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 1 21

2.3.2. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 2 26

2.3.3. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 3 31

2.3.4. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 4 36

2.3.5. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 5 42

2.3.6. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 6 47

3. Ensaios de patogenicidade com Stemphylium vesicarium e Alternaria **sp.** *54*

3.1. Introdução **54**

3.1.1. Breve revisão de *Alternaria* sp. 54

3.2. Material e Métodos **58**

3.3. Resultados e Discussão **60**

4. Conclusão 66
5. Referências Bibliográficas 68
6. Anexos 75

Índice de Figuras

Figura 1. Área de produção de pera com denominação de origem protegida (DOP)..... 3
Figura 2. Normais Climáticas para a região Oeste: histórico simulado - 1971-2000, estatística: média 30 anos..... 5
Figura 3. Conídios de *Stemphylium vesicarium* (A), ascósporos de *Pleospora allii* (B) e colónia com 10 dias mantida em gelose de batata dextrosada, na obscuridade (C). 7
Figura 4. Sintomas de doença das manchas castanhas: A – flores, B – folhas, C – frutos com infeção lateral, D – frutos com infeção na fossa apical..... 10
Figura 5. Ciclo de vida de *Stemphylium vesicarium* e *Pleospora allii* nos pomares de pereira. 12
Figura 6. Localização e respetivas coordenadas dos pomares onde se realizaram os ensaios de campo. 17
Figura 7. Ilustração demonstrativa do ensaio em estudo. 18
Figura 8. Esquema representativo da calendarização das colheitas e tipo de material vegetal colhido. 20
Figura 9. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 21
Figura 10. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 22
Figura 11. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 22
Figura 12. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 23
Figura 13. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 23
Figura 14. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 24
Figura 15. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 24
Figura 16. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio. 25
Figura 17. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 26

Figura 18. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 27
Figura 19. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 27
Figura 20. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 28
Figura 21. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 28
Figura 22. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 29
Figura 23. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 29
Figura 24. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio. 30
Figura 25. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 31
Figura 26. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 32
Figura 27. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 32
Figura 28. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 33
Figura 29. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 33
Figura 30. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 34
Figura 31. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 35
Figura 32. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. 35
Figura 33. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. 36

Figura 34. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. 37
Figura 35. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. 38
Figura 36. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. 38
Figura 37. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 39
Figura 38. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 39
Figura 39. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 40
Figura 40. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 41
Figura 41. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. 42
Figura 42. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. 43
Figura 43. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. 43
Figura 44. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. 44
Figura 45. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 44
Figura 46. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. 45
Figura 47. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 46

Figura 48. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 47
Figura 49. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de flores no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. 48
Figura 50. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. 48
Figura 51. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 49
Figura 52. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 49
Figura 53. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 50
Figura 54. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 50
Figura 55. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 51
Figura 56. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de frutos à colheita no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 51
Figura 57. Esquema representativo do método de inoculação de *Stemphylium vesicarium* (St.) e de *Alternaria* sp. (Al.) e medição do comprimento e largura da mancha. 59
Figura 58. Manchas produzidas por diferentes isolados de *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp., em frutos destacados de cultivar Rocha, 12 dias após a inoculação com disco de gelose contendo micélio dos isolados em estudo. 60
Figura 59. Área média das manchas causadas pelos isolados de *Stemphylium vesicarium* (St.) e de *Alternaria* sp. (Al.) em frutos destacados de pera Rocha, ao fim de doze dias, a 24ºC e sob condições de fotoperíodo natural, os valores com a mesma letra a, b, c não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0. 61

Índice de Quadros

Quadro 1. Caracterização dos pomares de cada ensaio de campo 18
Quadro 2. Distribuição das modalidades pelos pomares..... 19
Quadro 3. Identificação dos isolados de *Stemphylium vesicarium* (St) e de *Alternaria* sp. (Al) utilizados nos testes de patogenicidade..... 58
Quadro 4. Isolados utilizados nos ensaios: referência do isolado de Stemphylium vesicarium (St) no pomar de origem, histórico da doença, idade do pomar, modalidade ensaiada, tipo de material vegetal) e resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade (área da mancha) 62
Quadro 5. Isolados utilizados nos ensaios: referência do isolado de *Alternaria* sp. (Al) no pomar de origem, idade do pomar, modalidade ensaiada, tipo de material vegetal) e resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade (área da mancha) *Alternaria* sp. (Al) utilizados nos testes de patogenicidade..... 63

Lista de Abreviaturas e símbolos

GO - Grupo Operacional;

COTHN - Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional;

ISA - Instituto Superior de Agronomia;

COOPVAL - Cooperativa Agrícola dos Fruticultores Do Cadaval Crl;

APAS - Associação dos Produtores Agrícolas da Sobrena;

FRUTOESTE - Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste Crl;

FRUTUS - Estação Fruteira do Montejunto Crl;

CPF - Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola Lda;

CAB - Cooperativa Agrícola do Bombarral Crl;

DOP - denominação de origem protegida;

GPP - Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral;

INE - Instituto Nacional de Estatística

ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha

OP – Organização de Produtores

GO – Grupo Operacional

1. Introdução

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no âmbito do Grupo Operacional (GO) ProtecEstenfilio (PDR2020-1.0.1-FEADER-030869) coordenado pelo Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional (COTHN). O Instituto Superior de Agronomia (ISA) é responsável por parte do trabalho laboratorial que em parceria com a Cooperativa Agrícola do Bombarral Crl (CAB), Cooperativa Agrícola dos Fruticultores do Cadaval Crl (COOPVAL), Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola Lda (CPF), Estação Fruteira do Montejunto Crl (FRUTUS), Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste Crl (FRUTOESTE) e Associação dos Produtores Agrícolas da Sobrena (APAS) realizam o trabalho de campo.

O GO ProtecEstenfilio teve início em 2018, com a duração de 4 anos e o principal objetivo foi estudo da evolução da doença das manchas castanhas na cultura da pereira 'Rocha' e a aplicação de um conjunto de práticas sustentáveis que permitissem minimizar o impacto da doença.

A doença das manchas castanhas, associada ao fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E, G. Simmons (estado sexuado *Pleospora allii* (Rabenh.) Ces e de Not), tem tido uma importância crescente na cultura da pereira em Portugal (Diogo *et al* ., 2017). Ao longo do seu ciclo de vida, o fungo tem a capacidade de infetar e colonizar os detritos vegetais existentes no solo, a parte aérea da cultura e as infestantes existentes no pomar durante todo o ano quer no estado sexuado/assexuado quer como saprófita/patogénico (Köhl *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2005).

Nos pomares europeus a incidência e a severidade da doença têm sido elevadas, o que tem causado enormes prejuízos na produção, podendo chegar a 90% da produção total (Llorente e Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos ao longo do GO ProtecEstenfilio colocaram algumas dúvidas relativamente à etiologia da doença, nomeadamente, se seria causada apenas por *S. vesicarium* ou, pelo contrário, estaria associada a um complexo de fungos (Rego *et al* ., 2021). Face a esta dúvida optou-se por, ao longo desta dissertação designar a doença por doença das manchas castanhas.

1.1. A pereira ‘Rocha’

A pereira ‘Rocha’ é cultivada principalmente na região Oeste, com a denominação de origem protegida (DOP) “Pera Rocha do Oeste”, sendo os principais concelhos produtores Cadaval, Bombarral, Torres Vedras e Caldas da Rainha (Soares *et al* ., 2001) (Figura 1). Produz-se também pera Rocha, embora em menores quantidades, no Alentejo (nos concelhos de Ferreira do Alentejo e Elvas), em Trás-os-Montes (concelho de Carrazeda de Ansiães), no Minho (município de Braga) e na Beira Interior (em Lamego, na Guarda, em Manteigas, na Covilhã, em Belmonte e no Fundão).

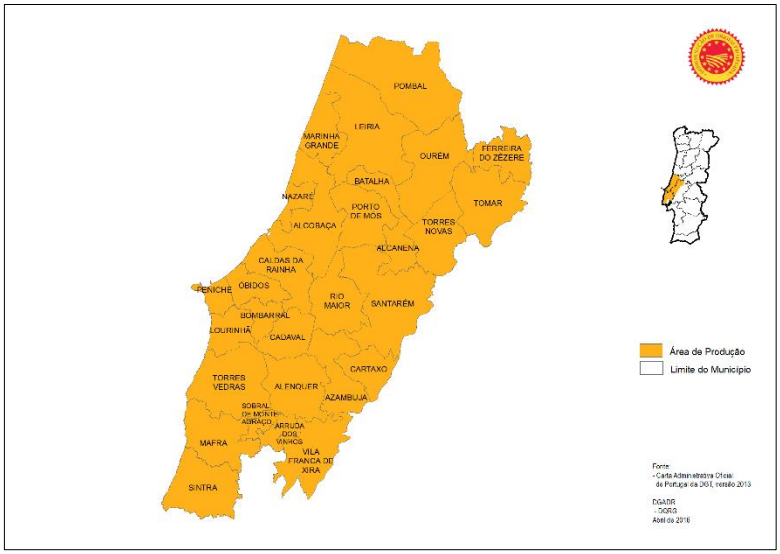

Figura 1. Área de produção de pera com denominação de origem protegida (DOP) (ANP, 2021).

A região do Oeste caracteriza-se, segundo a classificação climática de Koppen, por ter um clima temperado com inverno chuvoso e verão seco e pouco quente, tipo Csb (IPMA, 2020a). Esta classificação coincide com as normais climáticas da região Oeste para o período de 1970 a 2000 (Figura 2), onde se verifica que agosto é o mês mais quente (temperatura média de 21ºC) e seco (humidade relativa média de 72%) e janeiro o mês mais frio (temperatura média de 9ºC) e húmido (humidade relativa média de 83%). A precipitação anual média é de 873,8 mm, sendo dezembro o mês que tem a maior precipitação acumulada média de 133,7 mm, estando a precipitação concentrada nas estações de outono e inverno. (IPMA, 2020b).

A produção de pera ‘Rocha’ em Portugal tem registado algumas variações, devido à modernização estrutural das explorações agrícolas e ao recurso a práticas culturais mais adequadas nos pomares, desta forma, contribuindo para que a produtividade média dos pomares de pomóideas tenha duplicado nas ultimas três décadas (INE, 2021) Nos anos 2017 e 2018 registou-se uma produção de 202 277 e 162 502 toneladas, respetivamente (GPP, 2020).

De acordo com Gabinete de Planeamento, Politicas e Administração Geral (GPP), (2021), em 2019 Portugal registou uma produção de 198 465 toneladas de pera e em 2020 obteve uma produção de 131 004 toneladas, este último valor pode ser explicado pela heterogeneidade do abrolhamento e da precipitação na floração (com o impacto na atividade dos polinizadores e consequente diminuição da taxa de vingamento dos frutos) (INE, 2020).

Quanto a 2021, de acordo com as previsões do Instituto Nacional de Estatística (INE) (2021), estimou-se um aumento na produção de pera de 40%, recuperando para níveis de produtividade acima daquelas que foram registadas nos últimos anos. Segundo a Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha (ANP) em 2021 colheu-se 191.000 toneladas de fruto enquanto em 2020 obtiveram-se 120.000 toneladas. A ANP que representa aproximadamente 89 % da produção de pera em Portugal, estima que a produção nacional deste fruto na campanha de 2021 seja aproximadamente de 215.000 toneladas, um acréscimo relativamente ao volume estimado de 2020 de 135.000 toneladas (Afonso, 2021). Este aumento de produção, de acordo com a ANP citada por Diogo *et al* (2017), deve-se à junção de vários fatores tais como, a alternância da produção, com dois anos seguidos de produções mais baixas, as condições meteorológicas favoráveis no período de vingamento e a entrada de novos pomares. Acresce ainda que a COOPVAL com 950 hectares desta cultura contabilizaram na campanha valores recorde com 27 000 toneladas, após ter perdido 45 % do volume de produção em 2020 (Afonso, 2021).

A pera é o terceiro fruto mais produzido em Portugal (INE, 2018) e distingue-se por apresentar um grau de autoaprovisionamento médio (2010 a 2020) de 223,4 % (GPP, 2021). Desde 2010 até 2020 os valores de exportação são superiores ao de importação, realçando a grande importância da pera em Portugal. A pera produzida em Portugal tem como destino principal o Brasil, Reino Unido, França, Alemanha e Espanha (GPP, 2021).

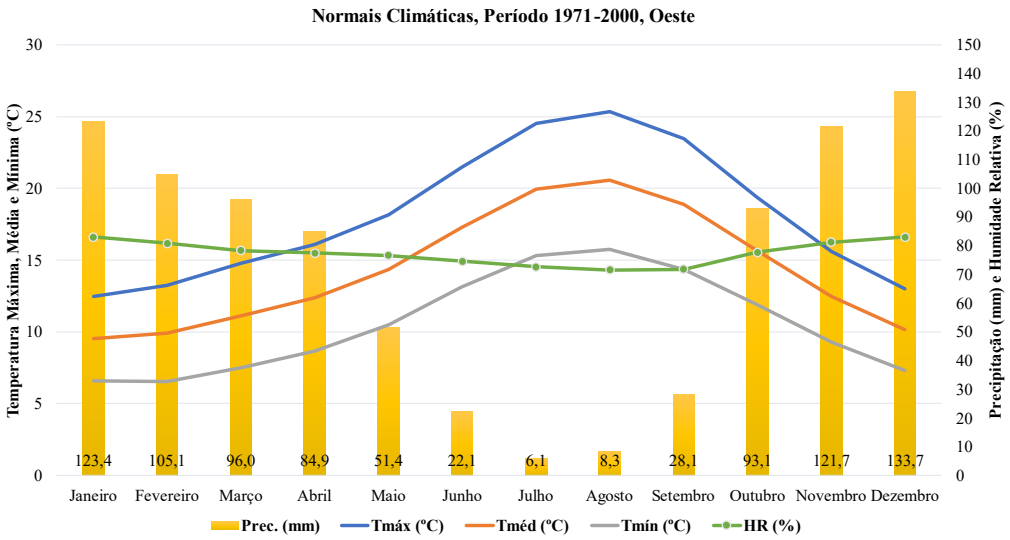

Figura 2. Normais Climáticas para a região Oeste: histórico simulado - 1971-2000, estatística: média 30 anos (Portal do Clima, 2020).

1.2. A doença das manchas castanhas

1.2.1. Distribuição e importância económica

A importância da doença das manchas castanhas tem aumentado progressivamente ao longo dos anos na Europa (Llorente e Montesinos, 2006). A doença foi pela primeira vez observada em Itália, na região de Emilia-Romagna, em 1975 (Ponti *et al* ., 1982). Seguiu-se Girona, em Espanha, em 1984, nas cultivares Passe Crassane e Conference (Vilardell, 1988) e França, em 1987 (Blancard *et al* ., 1989). Posteriormente, a doença propagou-se para regiões em que a produção de pera tem importância como La Rioja, em Espanha, Portugal em 1996 (Sousa *et al.*, 1998; Llorente *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2017), Holanda em 1997 (Heijne e Mourik, 2001) e Bélgica em 2002 (Llorente e Montesinos, 2006; Rossi *et al.*, 2005).

Em Portugal, a doença das manchas castanhas tem causado prejuízos avultados nas folhas e frutos, atingindo cerca de 50% da produção nalguns pomares. Na campanha de 2015, a doença causou prejuízos que ascenderam a 10 milhões de euros (Diogo *et al.*, 2017; Sousa, 2020). Entre 2014 e 2016 a doença das manchas castanha causou prejuízos perto dos 30 milhões de euros na fileira da pera rocha. Estima-se que desde 2015 a 2017 os prejuízos diretos na produção tenham sido de 29 704 milhões de euros e nas centrais fruteiras de 3,394 milhões de euros (Diogo *et al* ., 2017).

Os impactos desta doença na produção de pera 'Rocha' no Oeste variam estimando-se em média que 5% a 15% das perdas da fruta ocorram no pomar e 1 a 5% na central fruteira (Syngenta, 2020). Para os fruticultores o prejuízo não se resume apenas à perda direta de produção existe ainda um aumento acrescido com os custos de produção devido a um maior

número de tratamentos fitossanitários realizados ao longo da campanha e, uma maior e mais dispendiosa escolha dos frutos à colheita. Para as organizações de produtores (OP), os prejuízos incidem igualmente na conservação e processamento pela capacidade de frio que não é utilizada, pelo aumento de custos de embalamento dos frutos devido a maior escolha dos mesmos, pelo aumento dos custos de conservação pois conservam-se frutos que mais tarde vão para refugo, pela redução do período de conservação, pela maior produção de etileno em lotes contaminados e, consequente amarelecimento e perda de firmeza dos frutos nas câmaras de conservação. Além disto, os frutos podem estar contaminados no ato do embalamento e não apresentarem sinais visíveis, o que leva a maiores encargos pelas OP, devido a reclamações por parte dos clientes que receberam lotes contaminados (Diogo *et al* ., 2017).

Embora a doença das manchas castanhas tenha afetado a produção nos últimos anos, na campanha de 2021 foi caraterizada pelo aparecimento de situações isoladas que prejudicaram alguns produtores, no entanto, a sua relevância foi pouco significativa não influenciando a queda da produção (Afonso, 2021). Apesar de terem existido períodos de risco, as temperaturas mantiveram-se relativamente baixas o que pode ter limitado a progressão da doença que conjuntamente com a sensibilização e limpeza do solo que se tem feito recentemente nos pomares contribuiu para a existência de menos inóculo (Martins, 2021). Todavia, continua a exigir-se uma monitorização da doença quer pelo seu comportamento aleatório quer para conhecimento da patogenicidade das estirpes de espécies existentes nos pomares(Rego *et al* ., 2021).

1.2.2. Etiologia

A doença das manchas castanhas é associada ao fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons (estado sexuado *Pleospora allii* (Rabenh.) Ces e de Not). O fungo (estado assexuado) produz conidióforos eretos com apenas um conídio terminal (Llorente e Montesinos, 2006). Os conidióforos: são retos a curvos, simples ou 1-ramificados, amarelo-acastanhados a castanho-dourados e têm 1 a 4 septos, cilíndricos, que se alargam na zona da célula conidiogénica. Os conídios são escuros, castanho-dourado a castanho-azeitona, oblongo a ovais, multicelulares e multiseptados, com cinco septos transversos, com constrição num ou geralmente em três desses septos transversais (Figura 3A). Na forma sexuada, *Pleospora allii* (Rabenh.), surgem pseudotecas onde se diferenciam os ascos com oito ascósporos. As pseudotecas são castanhas a negras, globosas, ostioladas e ligeiramente achatadas com 300 - 400 μm de diâmetro. Os ascos são bitunicados, cilíndricos a clavados, afunilando para a base

em forma de botão (Simmons, 1969; Llorente e Montesinos, 2006). Os ascósporos são de cor amarela a acastanhada, elipsoidais ou oblongos com a base arredondada, metade superior estreita e o ápice pontiagudo, têm três a sete septos transversais e septos longitudinais (Figura 3B). O micélio é filamentoso, esparso e hialino (Simmons, 1969; Llorente e Montesinos, 2006). Em meio de cultura de gelose de batata dextrosada (PDA), na obscuridade, *S. vesicarium* desenvolve colónias circulares com uma textura aveludada, cotonosa ou feltrosa, com uma coloração variando de esbranquiçada a clara e a cinzento-escuro, com tons esverdeados a acastanhados. As margens das colónias são filiformes, inteiras ou onduladas de cor esbranquiçada (Hassan *et al.*, 2020) (Figura 3C).

Figura 3. Conídios de Stemphylium vesicarium (A), ascósporos de Pleospora allii (B) e colónia com 10 dias mantida em gelose de batata dextrosada, na obscuridade (C) (Fotografia de C. Francisco, 2021).

Tal como referido anteriormente, a etiologia da doença das manchas castanhas poderá estar associada a um conjunto de espécies de fungos, isto é, associada ao *S. vesicarium* e a outros organismos. A partir do material vegetal analisado no âmbito do GO Protecestenfilio destacam-se: *Penicillium* sp. e *Botrytis* sp., como dominantes a partir de flores, *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp. nas amostras de frutos pequenos (Rego *et al* ., 2021). Quanto às folhas com sintomas distinguiu-se *Alternaria* sp. como dominante e em relação aos frutos com sintomas à colheita a *Alternaria* sp. e *S. vesicarium* foram também os dominantes. É importante ainda destacar o isolamento de outros organismos como outras espécies de fungos e bactérias. Os resultados obtidos em 2020 permitiram concluir que o género *Alternaria* sp. foi dominante tanto nas folhas como em frutos com sintomas, enquanto o *S. vesicarium* foi apenas identificado nos frutos (Rego *et al* ., 2021).

O *Stemphylium vesicarium* possui uma ampla distribuição geográfica, encontrando-se presente em todos os continentes, podendo causar doenças mais ou menos graves em várias culturas tais como alho, cebola, cevada, espargo, luzerna, girassol, pereira e tomate, entre outras (Santos, 2019). Apesar de se encontrar presente em todos os continentes ainda não existem

referências da presença de doença das manchas castanhas em pereira fora da Europa (Comporta *et al* ., 2017; Diogo *et al* ., 2017).

O genoma do fungo *S. vesicarium* foi sequenciado recentemente, sendo um importante passo para a compreensão da sua fisiologia e do seu mecanismo de infeção, o que possibilitará o desenvolvimento de estratégias de controlo da doença mais eficazes e sustentáveis (Gazzetti *et al.*, 2019).

1.2.3. Sintomatologia

As peças florais podem ser infetadas desde o início da floração. Segundo Francisco (2021), citando Comporta *et al* (2017) e Reis *et al* (2018), as flores podem ser infetadas por *S. vesicarium* no início da floração e os sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de necroses nas sépalas, no ovário e nos estames. Em 2018 e 2020, verificou-se uma maior incidência em flores o que provocou o aparecimento de mais sintomas na fossa apical enquanto em 2019 e 2021 uma menor incidência em flores gerou mais sintomas na epiderme lateral nos frutos (Rego *et al* , 2021) (Figura 4 A1, 2, 3).

Nas folhas surgem pequenas manchas castanhas arredondadas de 1 a 8 mm de diâmetro, podendo apresentar um halo avermelhado quando o fungo está ativo. Com o evoluir da doença, as manchas podem estender-se às nervuras e às extremidades do limbo originando uma lesão em forma de cunha. Quando o ataque é severo, as manchas podem ocupar toda a folha, podendo acontecer uma desfoliação precoce. Estes sintomas manifestam-se de abril até início de junho (Llorente e Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2017) *(*Figura 4 B1, 2, 3*)*.

O aparecimento de sintomas nos frutos pode ocorrer desde o vingamento até à colheita do fruto (Llorente e Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2017). Os sintomas causados em frutos pequenos de 12-14 mm de diâmetro são difíceis de detetar, sendo somente visíveis mais tarde, quando o fruto já se encontra mais desenvolvido, isto é, à medida que ocorre o amadurecimento formam-se manchas castanhas à superfície destes (Figura 4 C1 e C2) e junto da fossa apical (Figura 4 D 1, 2), sem aureola, podendo atingir 10 – 20 mm (Rego *et al* ., 2021). A parte central escurece e adquire consistência de podridão seca que depois evolui para a parte interior da polpa tornando-se cinzenta a castanha escura (Sousa *et al.*, 2004). Próximo da colheita, a podridão seca torna-se uma podridão mole e avança rapidamente atingindo a cavidade carpelar, sendo vulnerável à infeção de outros fungos, nomeadamente, fungos saprófitos nas zonas necrosadas, tais como a *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., entre outros (Isidoro e Azevedo, 2005). Na superfície do fruto e no centro da podridão castanho-

escura diferenciam-se pontuações negras que são estruturas de reprodução do fungo. Os frutos infetados amadurecem mais cedo e caiem, originando perdas de produção (Diogo *et al* ., 2017) (Figura 4 D1 e D2).

Estes sintomas são semelhantes aos causados por outros agentes patogénicos (*Gymnosporangium* sp., *Septoria* sp., *Pseudomonas* sp. e *Alternaria* sp), gerando dúvidas quanto à identificação da doença (Isidoro e Azevedo, 2005). Segundo Dias (2020), citando vários autores a formação de pequenas feridas resultantes da presença da filoxera da pereira, *Aphanostigma pyri* Chol., facilita a infeção de *S. vesicarium* ou de *Alternaria* sp.

Nos pecíolos e pedúnculos desenvolvem-se pequenas manchas castanhas alongadas que, em casos de infeção severa, levam à queda prematura de folhas e frutos (Diogo *et al.*, 2017; Llorente *et al* ., 2012).

Trabalhos recentes desenvolvidos em Portugal e Itália revelaram a presença de cancros nos ramos da pereira a partir dos quais se isolou *S. vesicarium.* Tal facto sugere que o fungo pode permanecer também no lenho durante todo o ano (C. Rego, comunicação pessoal; R. Bugiani, comunicação pessoal).

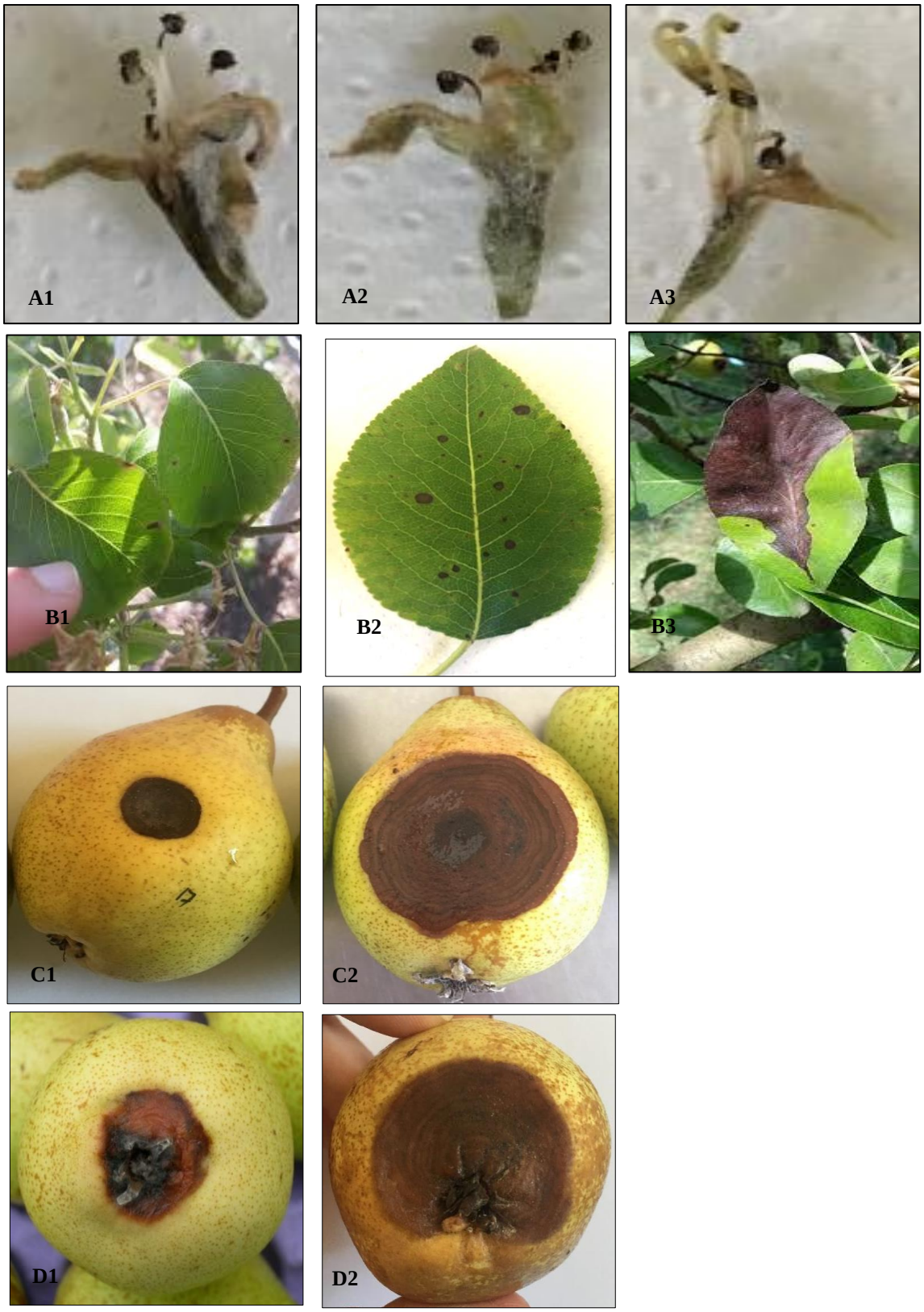

Figura 4. Sintomas de doença das manchas castanhas: A – flores, B – folhas, C – frutos com infeção lateral, D – frutos com infeção na fossa apical (Fotografia de A. Cabanas, 2018 e C. Rego, 2021).

1.2.4. Epidemiologia

De acordo com Rossi *et al.* (2005) o papel dos ascósporos e dos conídios na epidemiologia da doença ainda não está completamente compreendido. *P. allii* coloniza e hiberna nos detritos da cultura presentes no solo (folhas, frutos, ramos de pereira e tecidos mortos de infestantes), sendo esse o seu principal papel no ciclo de vida do fungo (Köhl *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2008). São produzidos pseudotecas quando as condições meteorológicas são desfavoráveis, nomeadamente de dezembro a abril e de agosto a outubro (Rossi *et al.*, 2008). A maturação das pseudotecas e, consequente, a libertação dos ascósporos, acontece a uma temperatura ótima de 10 a 15ºC e humidade relativa superior a 96% (Figura 5).

A precipitação é o principal fator para que ocorra a esporulação dos ascósporos e o vento pela sua disseminação. Iniciando-se a esporulação, os ascósporos originam as infeções primárias (Llorente *et al.*, 2012; Llorente e Montesinos, 2006). O micélio, que coloniza os detritos da cultura, diferencia-se e produz conídios que se propagam pelo ar e infetam todos os órgãos das pereiras, flores, folhas, frutos, pecíolos, pedúnculos e ramos, durante o período de crescimento, passando o fungo para o seu estado assexuado, *S. vesicarium*. Este estado, corresponde à fase patogénica e origina as infeções secundárias. A libertação dos conídios ocorre entre abril e novembro, tendo o máximo de produção no verão (julho a setembro), coincidindo com a fase de crescimento vegetativo da pereira (Rossi *et al.*, 2008). A temperatura ótima de germinação dos conídios encontra-se entre 20 e 30ºC embora as infeções possam ocorrer entre 20 e 25ºC, se as folhas ou frutos permanecerem humectados durante 6 horas (Llorente e Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2017) (Figura 5).

O inóculo presente nos resíduos que se encontram no pomar desempenha um importante papel na disseminação da doença, uma vez que, este patogénico pode hibernar em resíduos de plantas, multiplicando-se e reproduzindo-se sobre os resíduos (Köhl, *et al.*, 2013). O patogénio pode ser encontrado nas folhas e frutos mortos, mas também em resíduos de infestantes (Rossi *et al.*, 2005). Os conídios podem ser produzidos em infestantes durante a estação de crescimento de abril a novembro o que representa uma fonte de produção/disseminação contínua de inóculo causador de infeção em folhas e frutos de pera (Köhl *et al* ., 2013).

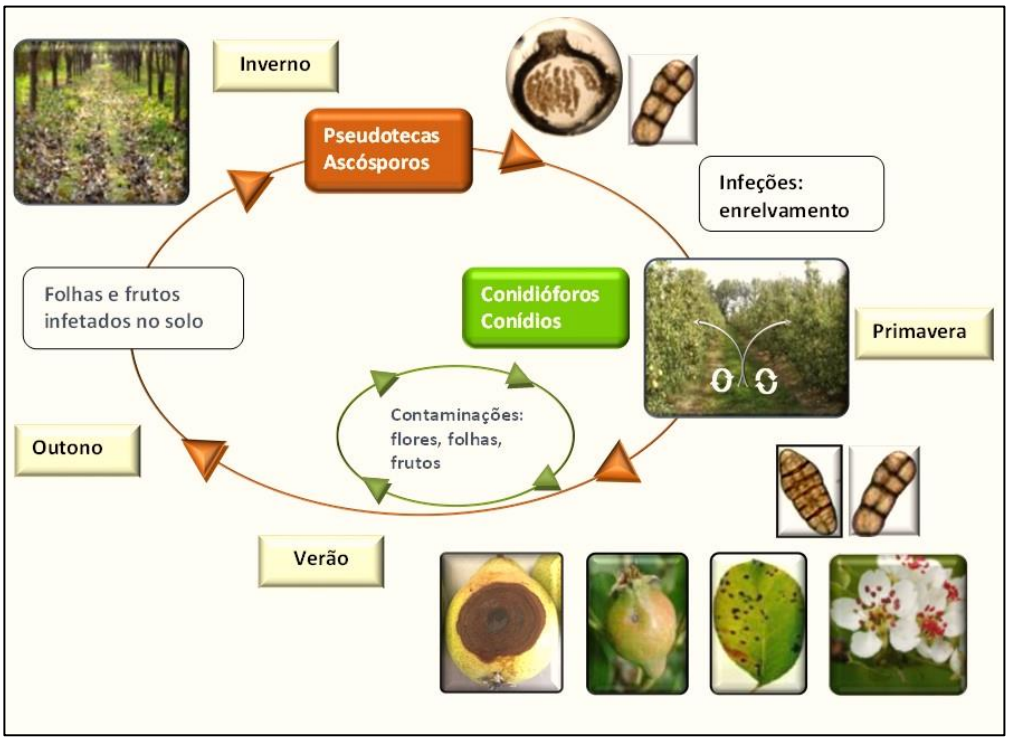

Figura 5. Ciclo de vida de Stemphylium vesicarium e Pleospora allii nos pomares de pereira (adaptado de Llorente *et al.*, 2012).

1.2.5. Fatores de risco que afetam o desenvolvimento da doença

Os **fatores meteorológicos** são aqueles que mais influenciam a doença, nomeadamente a temperatura e o período de humectação (Sousa *et al.*, 2004). Estes parâmetros afetam diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação do fungo (Sousa *et al.*, 2004). A temperatura é fundamental para a germinação dos conídios que ocorre entre os 15ºC e os 32ºC, enquanto a temperatura ótima para que ocorra a infeção se situa entre os 20ºC e os 25ºC, com um máximo a 22,6ºC em frutos da cultivar Passe Crassane e 21,1ºC em folhas da cultivar Conference (Llorente e Montesinos, 2006). Com teores de humidade relativa de 100 % e temperaturas entre 9,5ºC e 41,5ºC, consegue-se cerca 100% de germinação dos conídios para valores de temperatura de 18ºC a 32ºC podendo esta iniciar-se 3 horas após incubação (Santos, 2019; Sousa *et al.*, 2004). Contudo, para que a infeção ocorra não são só necessárias temperaturas adequadas, mas também períodos de humectação em folhas e frutos (Diogo *et al* ., 2017). De acordo com Sousa *et al* (2004) é necessária uma temperatura entre os 20ºC a 25ºC e um período de humectação de 4 horas para que se dê a infeção, em contrapartida segundo Llorente e Montesinos (2006) são necessárias 6 horas de humectação com temperaturas adequadas. Também é relevante que períodos de humidade relativa elevada no inverno

potenciam o desenvolvimento de pseudotecas enquanto períodos secos interferem com o processo de infeção (Llorente e Montesinos, 2006).

As **alterações climáticas** podem levar a variações na incidência/severidade da doença e, modificar a distribuição geográfica da doença, podendo influenciar o processo biológico do patogénico e conduzir a variações de suscetibilidade à doença. A incidência e a severidade da doença dependem de muitos fatores, entre os quais se destacam a quantidade e a fonte de inóculo presente no pomar e as condições meteorológicas propícias ao desenvolvimento do fungo (Moragrega *et al.*, 2018)..

Relativamente à **quantidade de inóculo** presente no pomar verificou-se que um pomar com um histórico elevado de doença apresenta *a priori* maior incidência da doença (Comporta *et al.*, 2017) e que a redução de inóculo no solo (infestantes) diminui significativamente a incidência da mesma (Jong e Heijne, 2008; Rossi *et al.*, 2008; Llorente *et al.*, 2012). Num estudo em que se tentou avaliar a importância dos detritos da cultura no solo como fonte de inóculo, cobrindo parte das linhas do pomar com plástico entre a plena floração e final de setembro apurou-se que as árvores sem cobertura de solo apresentaram o dobro da incidência de doença das manchas castanhas comparativamente às árvores com cobertura de plástico (Jong e Heijne, 2008). Também foi possível compreender que o número de esporos do fungo e a incidência da doença diminuíram com o afastamento da fonte de inóculo tendo sido encontrados esporos nas armadilhas, no entanto em quantidade é muito reduzida, a partir de distâncias de 45 metros (Jong e Heijne, 2008). O **tipo de resíduo da cultura** (folhas e lenha de poda) também tem influência na quantidade de inóculo produzido. Num estudo realizado na Holanda comprovou-se que o fungo raramente é encontrado na lenha de poda enquanto em folhas caídas e resíduos de infestantes é encontrado em grandes quantidades (Köhl *et al.*, 2013). A quantidade de inóculo de *S. vesicarium* nas folhas caídas diminui rapidamente durante o mês de outubro, ou seja, antes da sua decomposição, podendo resultar numa baixa quantidade de inóculo nas folhas no início da primavera. Já nas infestantes, o mesmo fator apresentou flutuações consideráveis ao longo da campanha (Köhl *et al.*, 2013).

A **origem do inóculo** também tem uma forte relação com a patogenicidade do fungo. Segundo um trabalho realizado por Moragrega *et al.* (2018), 42% do inóculo é não patogénico para a pereira, dos quais 85% são inóculo presente no ar. A maior parte dos isolados obtidos a partir de necroses (93%) e das pseudotecas (83%) são patogénicos para a pereira e têm severidade elevada a muito elevada. Os isolados recuperados de necroses em frutos e folhas de pereira desenvolvem uma rápida infeção, resultando num aumento da doença (Moragrega *et al*

, 2018). Os isolados recuperados a partir pseudotecas em detritos de folhas precisam de um período de tempo após a inoculação para iniciar a infeção, resultando num aumento da doença que segue um modelo logístico (Moragrega *et al* ., 2018).

Um estudo realizado em Portugal indicou que isolados obtidos a partir de material de diferentes pomares de pereira 'Rocha' relevaram diferente agressividade quando inoculados em folhas e frutos de pereira 'Rocha'. Tal, permitiu sugerir que a agressividade é característica genética do fungo, independente do histórico e da gestão da doença realizada no pomar (Reis *et al.*, 2018). A caracterização da agressividade dos isolados presentes nos pomares é mais relevante numa perspetiva de controlo da doença que a quantificação dos esporos (Reis *et al.*, 2018), o que contraria Köhl *et al.* (2013) que sugerem que a quantificação de DNA do fungo presente nos pomares na primavera seja utilizada para prever o risco de desenvolvimento da doença nos mesmos, de modo a evitar aplicações de fungicidas desnecessárias em pomares de baixo risco.

A **suscetibilidade** à doença apresenta variações também consoante a cultivar de pereira. As cultivares mais frequentes cultivadas e as mais economicamente importantes são as que apresentam maior suscetibilidade à doença. Existem cultivares mais suscetíveis, como a 'Passe Crassane', e menos suscetíveis, como a 'Williams'(Sousa., 2004; Diogo *et al* .,2017). A cultivar 'Rocha' apresenta uma suscetibilidade moderada ao fungo (Montesinos *et al.*, 1995; Llorente e Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017). Esta suscetibilidade ou resistência/tolerância de uma cultivar ao patogénico é determinada pela magnitude e eficiência da ativação dos mecanismos de defesa da planta, sendo uma rápida ativação dos mecanismos de defesa essencial para atingir um estado de resistência (Loon *et al.*, 2006). A cultivar 'Rocha' ativa os mecanismos de defesa tarde demais para responder de forma eficiente à infeção por *S. vesicarium* (Pereira *et al.*, 2015). Durante o processo de infeção ocorre a produção de toxinas especificas do fungo (SV - Toxinas I e II) (Llorente e Montesinos, 2006; Singh *et al* ., 2000). A SV- Toxina I, responsável pela necrose seletiva ao nível da nervura das folhas enquanto a SV-Toxina II é menos tóxica para o hospedeiro. Estas toxinas são responsáveis pelo desenvolvimento da doença e provocam mudanças na membrana plasmática das células foliares (Llorente e Montesinos, 2006; Singh *et al* ., 2000). Segundo Singh *et al* ., 2000 e Silva., 2011 referem que esta toxina é a encarregue do estabelecimento inicial da infeção por parte do fungo.

A existência de variabilidade patogénica dentro do fungo (*S. vesicarium*) pode justificar a especificidade das toxinas uma vez que estas só causam necroses em tecidos de pera mais suscetível e não afetam outros hospedeiros (Singh *et al* ., 2000; Silva., 2011).

A **idade dos tecidos vegetais** é também um fator de risco, dado que as folhas mais jovens e frutos imaturos são mais vulneráveis à infeção comparativamente com os tecidos mais velhos, ou seja, os tecidos com maior idade fisiológica. (Montesinos *et al* ., 1995). É de destacar a importância dos frutos que são os órgãos que economicamente têm mais importância e que, de acordo com Sousa *et al* ., 2004, ao longo do seu desenvolvimento vão perdendo em dureza e teor de ácidos e amido com o respetivo aumento de açucares, tornando os frutos mais vulneráveis à infeção por *S. vesicarium.*

A **fertilização** também deve ser tida em conta na gestão da doença. Árvores nutricionalmente desequilibradas apresentam geralmente maior incidência e severidade da doença (Gomes, 2015; Diogo *et al.*, 2017). A aplicação de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) no solo antes da floração ou solos com elevada concentração de cálcio reduz a incidência de doença das manchas castanhas nos frutos. Logo, frutos com maior teor de cálcio nos seus tecidos têm maior tolerância à doença (Toselli *et al* ., 2012).

2. Monitorização de ensaios ao longo de 4 anos

2.1. Introdução

Tal foi referido anteriormente em 1.1, esta tese desenvolveu-se no âmbito do projeto do GO ProtecEstenfilio e do trabalho laboratorial realizado no ISA.

Ao longo de 4 anos (2018 a 2021), o projeto estudou a evolução da doença das manchas castanhas na cultura da pereira 'Rocha' em seis ensaios de campo (aqui designados por pomar) avaliando-se um conjunto de produtos aplicadas ao revestimento vegetal/solo que cujo objetivo era reduzir o inóculo potencial presente no pomar e consequentemente diminuir os estragos e os prejuízos causados pela doença.

Os resultados obtidos ao longo do projeto resultaram em duas teses de mestrado (Dias, 2020 e Francisco, 2021), uma publicação de Rego *et al* . (2021) e algumas comunicações orais aquando dos anuais Balanços da Campanha. Contudo, estes trabalhos não reuniram a totalidade dos resultados obtidos relativos à incidência e severidade da doença para cada pomar ao longo dos 4 anos.

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi compilar e analisar a totalidade dos resultados obtidos para incidência e severidade da doença das manchas castanhas nos diferentes órgãos analisados, em cada pomar e ao longo de 4 anos.

2.2. Material e métodos

No ano de início do projeto, 2018, cada OP instalou um ensaio de campo num pomar de pereira 'Rocha', perfazendo um total de 6 ensaios, cuja localização se indica na figura 6.

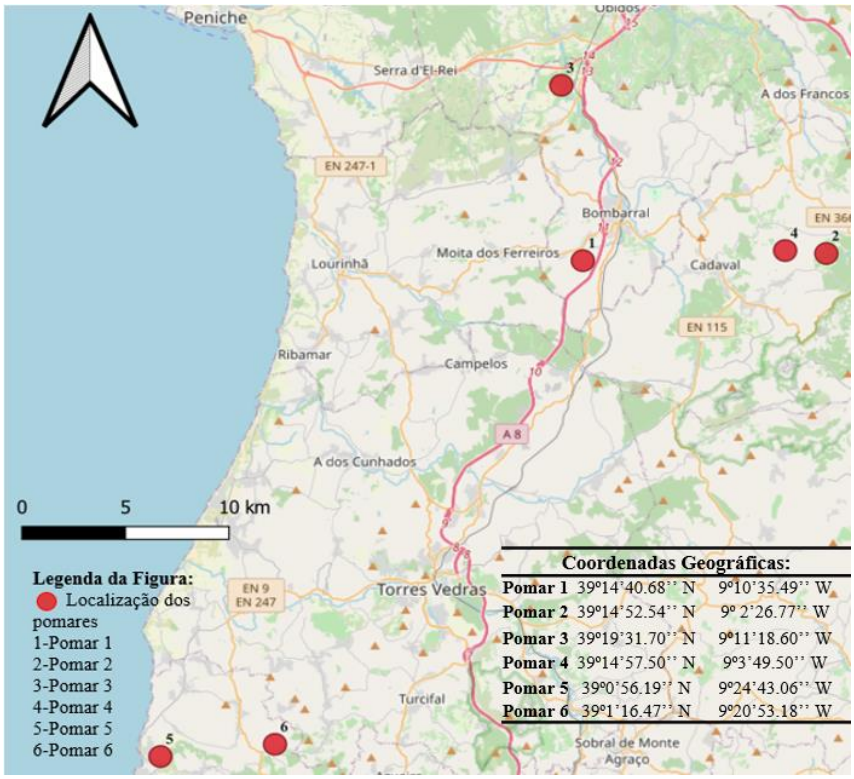

Figura 6. Localização e respetivas coordenadas dos pomares onde se realizaram os ensaios de campo.

No Quadro 1 encontra-se a caracterização do pomar, onde foram realizados os ensaios bem como o histórico da doença de cada pomar.

Instalaram-se blocos casualizados, com uma área de ensaio mínima de 1350 m^2 e um número mínimo de 66 árvores por modalidade. Por cada modalidade foram avaliadas oito árvores, quatro árvores consecutivas por cada linha e em duas linhas consecutivas, estando as árvores lado a lado. Na figura 7 encontra-se o esquema do ensaio para uma melhor compreensão do mesmo.

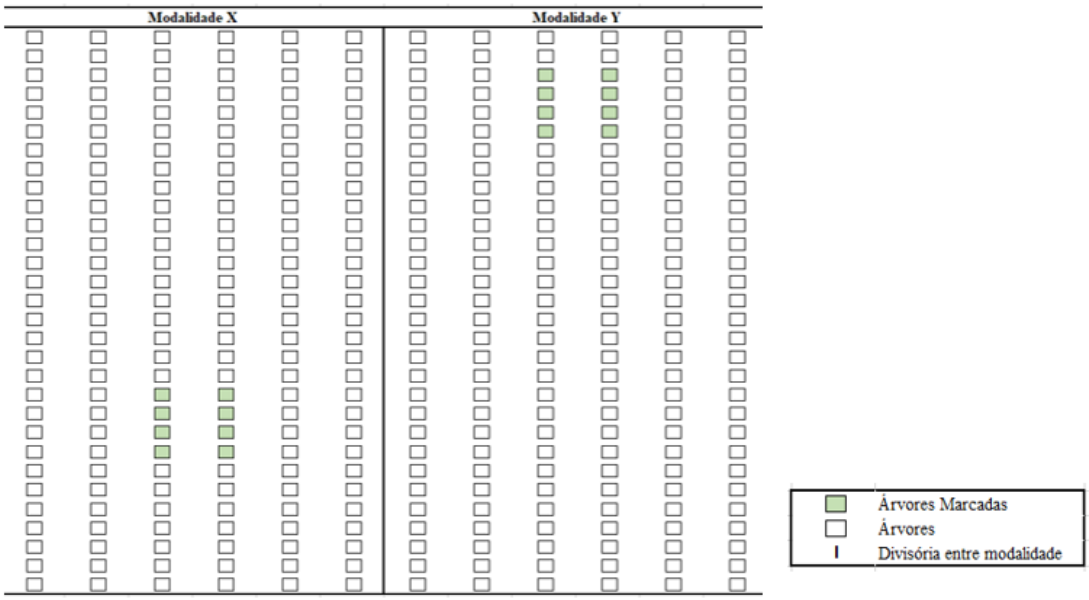

Figura 7. Ilustração demonstrativa do ensaio em estudo (adaptado de Francisco., 2021).

Quadro 1. Caracterização dos pomares de cada ensaio de campo

	Pomar					
Características	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Área	2,73	8,5	9,96	3,4	2,81	1,7
Ano de plantação	1992/1997 1975	1997	2008	2001 2004	2011/2012	1998
Porta-enxerto	BA*29 Marmeleiro-franco	EMA**	BA29	BA29 EMA	BA29	BA29
Compasso	2,0 x 4,0 3,0 x 4,0	1,8 x 4,0	1,0 x 3,5	1,8 x 4,0 1,2 x 3,8	1,0 x 4,0	1,0 x 4,0 2,0 x 4,5
Orientação	Sudoeste-Nordeste e Norte-Sul	Norte-Sul	Norte-Sul	Este-Oeste	Norte-Sul e Este-Oeste	Nordeste-Sudoeste
Modo de condução	Eixo central revestido Vaso	Eixo central revestido	Eixo central revestido	Eixo central revestido	Eixo central revestido	Eixo central revestido
Histórico da doença	Incidência baixa	Incidência elevada	Incidência baixa	Incidência média	Incidência média	Incidência elevada

* - Marmeleiro Provence; ** Marmeleiro East Malling

Avaliou-se a eficácia de várias modalidades, na redução de doença das manchas castanhas nos pomares em ensaio. As modalidades em ensaio encontram-se assinaladas no Quadro 2 e correspondem a situações experimentais diferentes:

A modalidade 1 é a modalidade testemunha (sem qualquer intervenção) e a modalidade 2 representa a modalidade em que se realiza a remoção do material vegetal do solo com o

objetivo de reduzir o inóculo potencial existente do pomar e, consequentemente, diminuir as infeções primárias que possam surgir nas flores, frutos e folhas.

Na modalidade 3 foi aplicado Micoplas + VIT-ORG nos pomares 1, 2 e 4, MyrN no pomar 3 e Condor Shield nos pomares 5 e 6. O Micoplas é um agente de controlo biológico, o VIT-ORG é um adubo organomineral líquido com extratos vegetais. O Myr N resulta de um conjunto de extratos vegetais naturais e o Condor Shield é um biofungicida.

Na modalidade 4 foi aplicado FRUITCARE no pomar 3, Fosfato de amónio+ ureia no pomar 4 e lixívia (biocida, desinfetante) nos pomares 5 e 6, respetivamente. O FRUITCARE é produto biocida á base de peróxido de hidrogénio + acido peracético + acido acético.

Nos Anexo 1 a Anexo 7 encontram-se as fichas informativas dos produtos fitossanitários anteriormente descritos. As características, modo e momento de aplicação destes mesmos produtos nas modalidades 3 e 4, encontram-se referidos no anexo 8.

Os restantes tratamentos fitossanitários, assim como as fertilizações e a regas foram realizados em toda a área, de acordo com a tomada de decisão do técnico e do agricultor (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição das modalidades pelos pomares

Pomar	Modalidade 1	Modalidade 2	Modalidade 3 (aplicação ao solo de agentes de controlo biológico)	Modalidade 4 (aplicação ao solo de biocidas)
1	**Testemunha** • entre linha triturada • sem remoção do material do solo • com ou sem linha limpa	**Remoção de material vegetal do solo:** eliminação/remoção física do material foliar, frutos e/ou lenhosos	MICOPLAS + VIT-ORG	
2			MICOPLAS + VIT-ORG	
3			MYRN	B3 - FRUITCARE
4			MICOPLAS + VIT-ORG	C1 - Fosfato monoamónio + Ureia
5			TIGRE /CONDOR SHIELD	B1 - Lixivia
6			TIGRE / CONDOR SHIELD	B1 - Lixivia

Foram realizadas colheitas de flores e frutos com 12-14 mm de diâmetro (sem sintomas visíveis) e folhas e frutos à colheita com sintomas com o objetivo de avaliar a incidência e a severidade de *S. vesicarium* nas modalidades ensaiadas. O processamento do material vegetal incluiu isolamentos microbiológicos e identificação dos fungos isolados (Francisco, 2021). Na figura 8 apresenta-se um esquema ilustrativo da época de colheita e materiais colhidos, respetivamente.

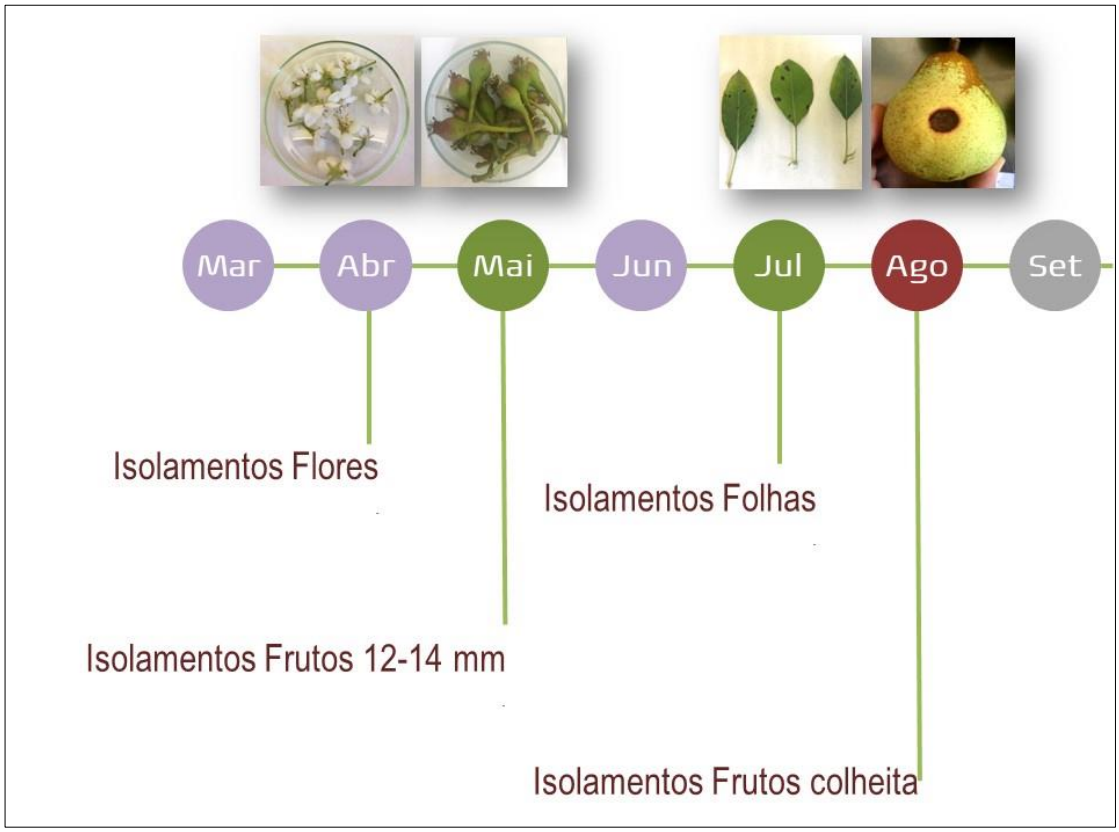

Figura 8. Esquema representativo da calendarização das colheitas e tipo de material vegetal colhido (adaptado de Rego *et al* ., 2021).

Foram calculadas a incidência e a severidade médias de *S. vesicarium* de cada órgão analisado por pomar e por modalidade para cada pomar. A incidência corresponde à percentagem de isolamentos microbiológicos que desenvolveram o fungo e a severidade à percentagem de fragmentos que em cada placa de Petri desenvolveram *S. vesicarium*. Os resultados da incidência e da severidade de *S. vesicarium* de cada órgão foram submetidos a uma análise de variância com recurso ao programa STATISTICA 10.0 e a comparação das médias efetuou-se recorrendo ao teste de Tukey HSD (com nível de significância de 0,05). Os resultados obtidos pela análise de variância por órgão analisado e por modalidade encontram-se apresentados nos anexos 9 a 12.

2.3. Resultados e discussão

Apresenta-se a compilação dos resultados da incidência e severidade médias de *S. vesicarium* por pomar, por órgão (flores, frutos com 12-14 mm de diâmetro, folhas com sintomas e frutos à colheita) e por modalidade obtidos ao longo dos quatro anos de ensaios.

2.3.1. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 1

Relativamente às infeções de *S. vesicarium* nas flores verificou-se que para os valores apurados para a incidência e severidade não existiram diferenças significativas entre modalidades ao longo dos quatro anos em estudo (Figura 9 e Figura 10).

Em 2018, o maior valor de incidência ocorreu na modalidade 1 (testemunha) com 50%, enquanto em 2019 a modalidades 1 e 3 apresentaram valores nulos. Constata-se que a modalidade 1 (testemunha) evidenciou uma maior variação de valores, quando comparada com as restantes modalidades apresentadas (Figura 9).

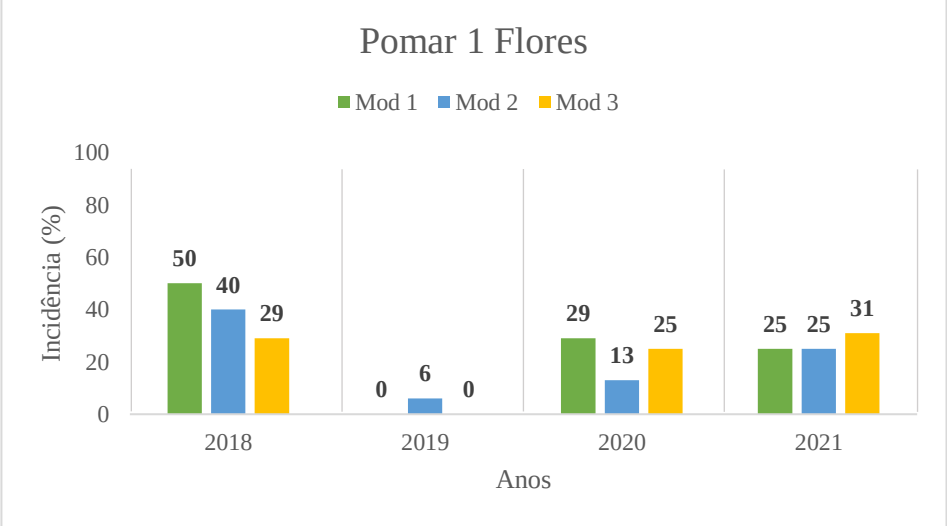

Figura 9. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto à severidade o valor mais elevado foi obtido na modalidade 1 (testemunha) em 2018 com 19%, enquanto o menor valor foi obtido em 2019 com valores nulos na modalidade 1 e 3. Quanto aos resultados apresentados por modalidade, estes demonstram alguma variabilidade (Figura 10), embora a modalidade 1 (testemunha) tenha sido a que obteve maior discrepância de valores.

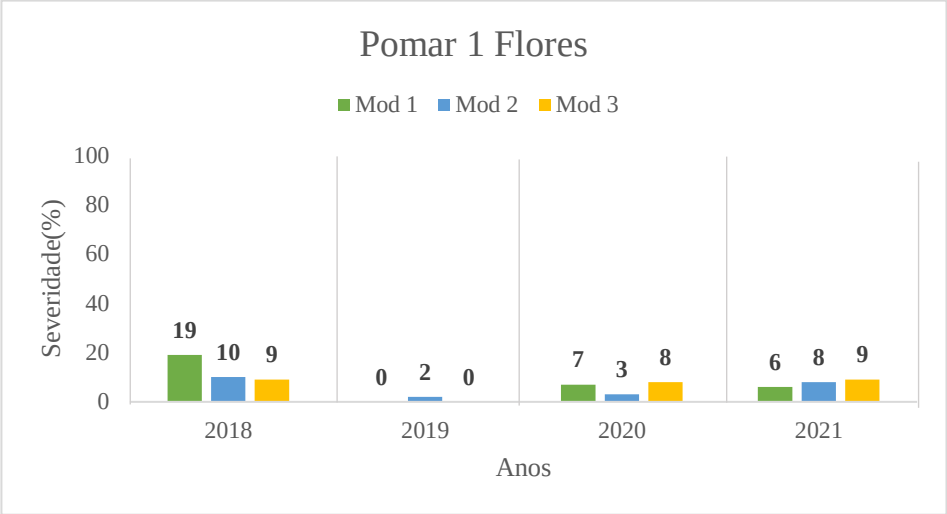

Figura 10. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto às infeções de *S. vesicarium* nos frutos com 12-14 mm observa-se que, os valores apresentados para a incidência e severidade não diferiram significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 11 e Figura 12). A modalidade 1 (testemunha) e a modalidade 3 de 2018 e 2020 revelaram respetivamente o menor valor (19%), enquanto no último ano de estudo, a modalidade 1 (testemunha), apresentou o maior valor (75%). Comparando a modalidade 1 (testemunha) com as restantes modalidades registou-se uma maior variação, entre 19% a 75%. Entre as modalidades 2 e 3 os resultados foram variáveis (Figura 11).

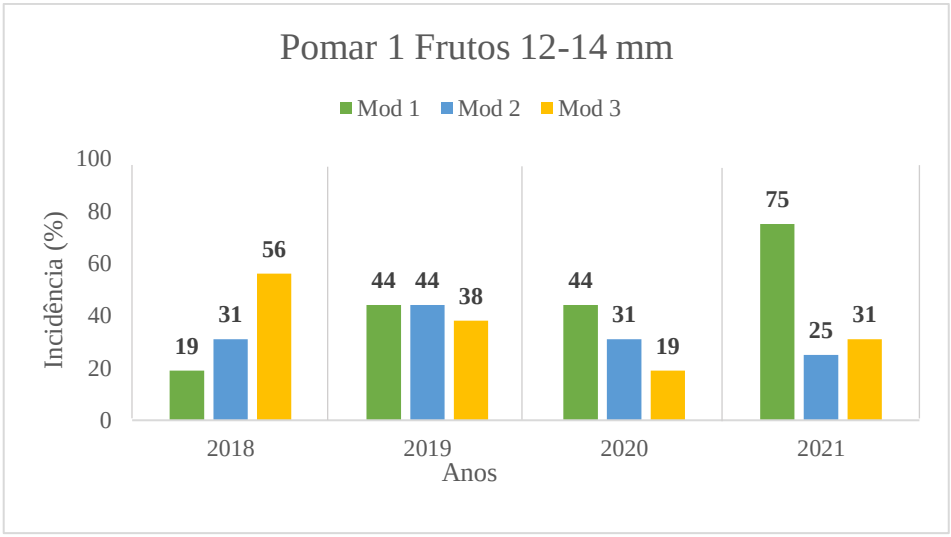

Figura 11. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente à severidade, o menor valor foi alcançado em 2020 na modalidade 3 (5%), porém o maior valor foi obtido para a modalidade 1 (testemunha) em 2021 (44%). Os resultados foram variáveis entre as modalidades 2 e 3 (Figura 12).

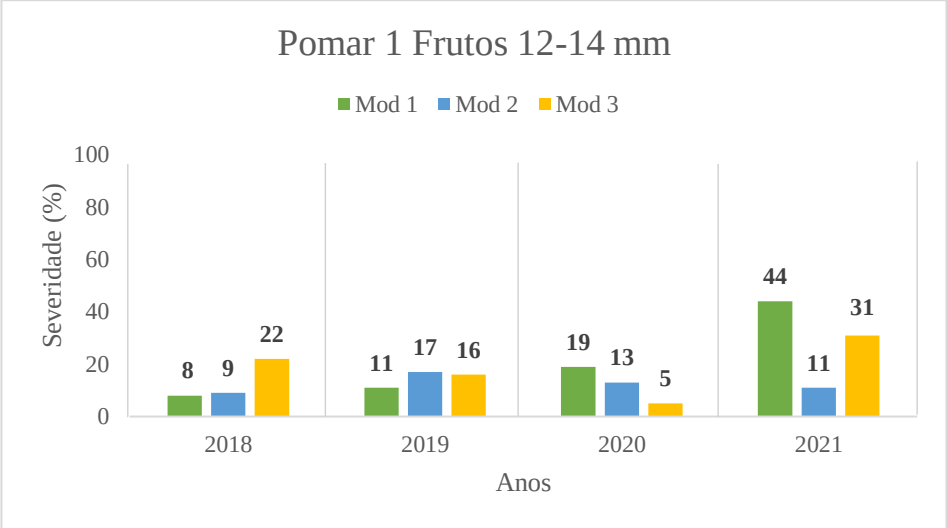

Figura 12. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nas folhas as infeções de *S. vesicarium* demonstraram que, para os valores analisados para a incidência e severidade, não existiram diferenças significativas entre modalidades ao longo do período em estudo (Figura 13 e Figura 14). Na modalidade 2, em 2018, obteve-se um valor nulo para a incidência enquanto em 2020 se verificou o maior valor (50%). Entre as modalidades 2 e 3 os resultados foram variáveis (Figura 13). Não são apresentados valores nem de incidência nem de severidade em 2021 pois não foram recebidas amostras de folhas por ausência de sintomas nas parcelas em estudo.

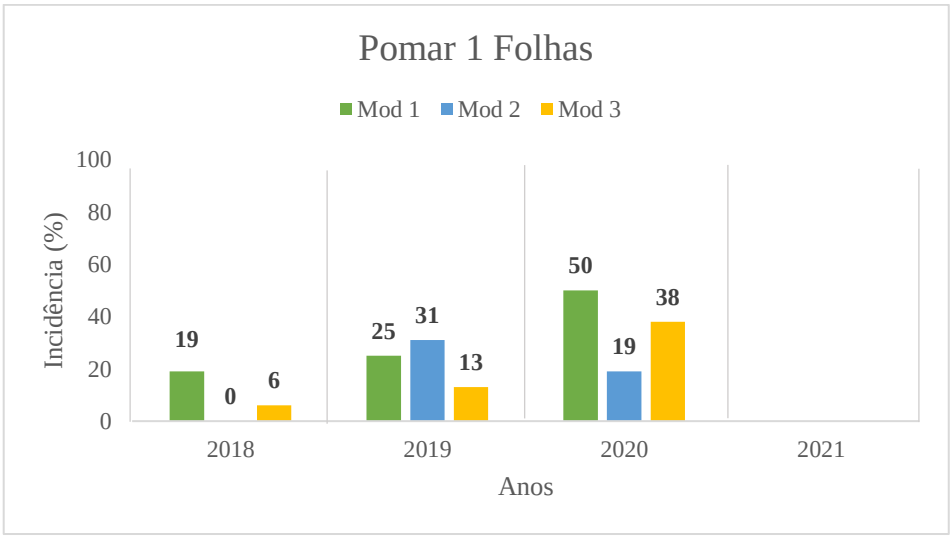

Figura 13. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Os valores de severidade apresentados são muito baixos, com o maior valor na modalidade 1 (testemunha) (22%) e valor nulo na modalidade 2 em 2018. Considerando os valores da modalidade 1 (testemunha) face à modalidade 2 e 3, observa-se que a primeira modalidade é aquela que maior variação apresenta, ou seja, entre 9% e 22%, porém as modalidades 2 e 3 variam pouco (Figura 14).

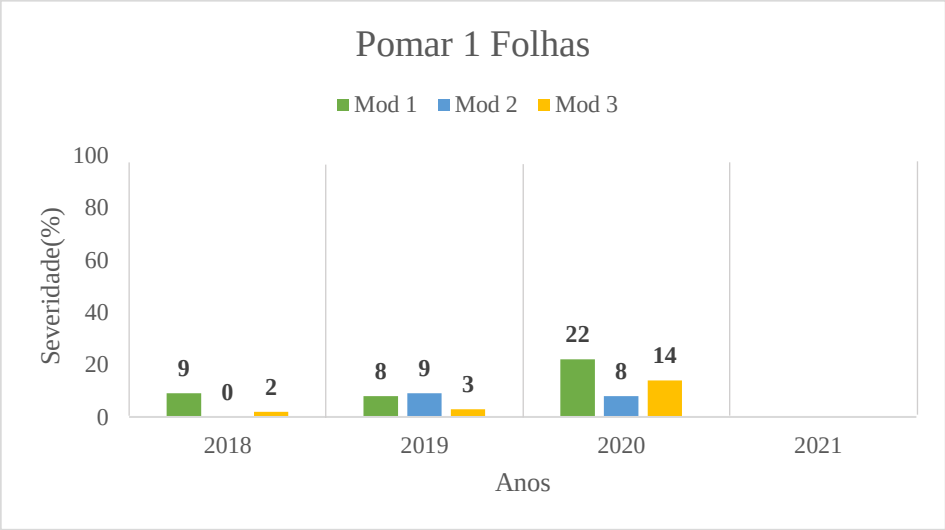

Figura 14. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nos frutos à colheita a incidência e severidade de *S. vesicarium* não diferiram significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos em análise (Figura 15 e Figura 16).

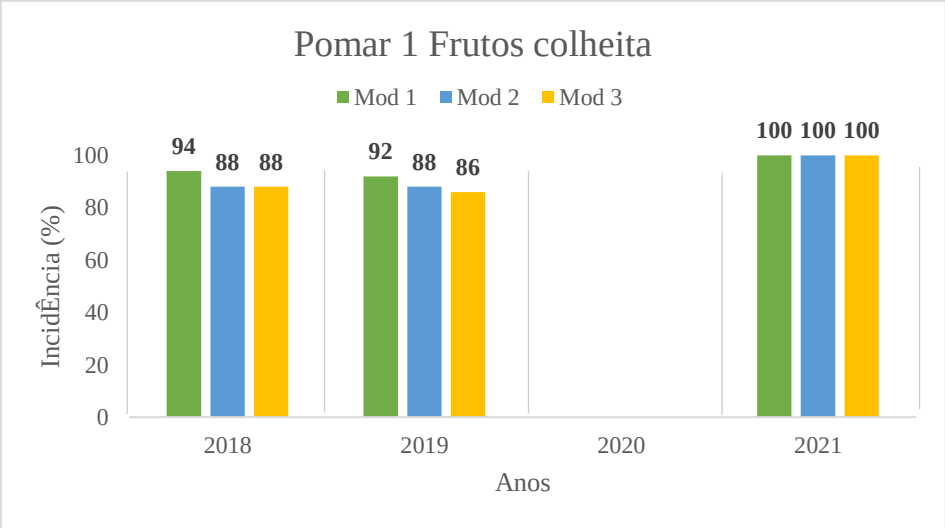

Figura 15. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Não foram recebidas amostras de frutos à colheita para a incidência e severidade em 2020 por ausência de sintomas nas parcelas em estudo. Os valores de incidência são muito elevados, variando entre 86% para a modalidade 3 em 2019 e 100% para as modalidades 1, 2 e 3 em 2021 (Figura 15).

Quanto à severidade, o menor valor foi alcançado em 2019 na modalidade 2 (61%) enquanto o maior valor foi obtido para a modalidade 3 em 2021 (100%). Comparando a modalidade 1 (testemunha) com as modalidades 2 e 3, verifica-se que esta não sofreu qualquer alteração, por sua vez a modalidade 2 foi aquela que registou maior variação entre os 61 % e 95 % (Figura 16).

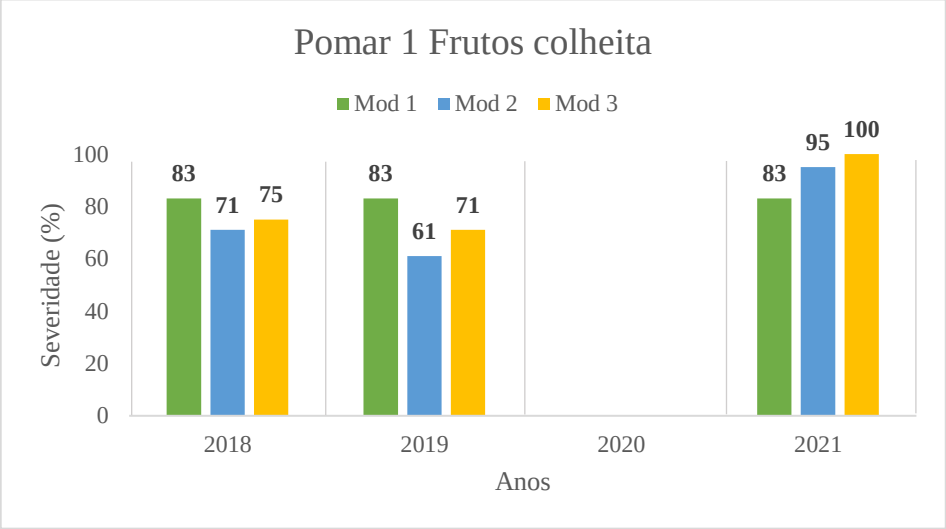

Figura 16. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 1 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Analisando os resultados apurados para o pomar 1 ao longo dos quatro anos de ensaio e para cada um dos órgãos avaliados verificamos que as modalidades 2 (remoção do material vegetal) e 3 (Micoplas + VIT-ORG) não se mostraram eficazes eficácia na redução da infeção de *S. vesicarium*. Observou-se que os menores resultados de incidência ocorrem nas flores e em seguida nas folhas. Em contrapartida, nos frutos à colheita os valores são bastante maiores, nomeadamente em 2021 com as três modalidades em estudo a terem 100 % de incidência.

Esta ocorrência poderá estar relacionada com a idade elevada do pomar (25 e 47 anos) que conduz a uma maior quantidade de inóculo presente no solo do pomar resultante da lenha de poda, folhas, frutos acumulados no solo ao longo dos anos (Francisco, 2021). Esta característica do pomar superou, possivelmente, o provável efeito redutor associado ao Micoplas (biofungicida) e do VIT-ORG (adubo organomineral com extratos vegetais). Contudo, este pomar foi referenciado pela OP como um pomar com baixa incidência de doença

das manchas castanhas o que discorda totalmente dos resultados apurados ao longo do projeto. Eventualmente esta discrepância pode estar relacionada a ocorrência de condições meteorológicas favoráveis à doença durante o ensaio e/ou aumento de agressividade dos isolados presentes no pomar (Francisco, 2021).

2.3.2. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 2

Quanto à incidência e severidade de *S. vesicarium* nas flores apurou-se que não existiram diferenças significativas entre modalidades ao longo dos quatro anos de ensaios (Figura 17 e Figura 18).

A maior incidência ocorreu na modalidade 2 em 2018 (94%) e a menor na modalidade 3 em 2019 (13%). A modalidade 1 (testemunha) revelou valores decrescentes para a incidência e a severidade ao longo dos quatro anos, contudo, a modalidade 2 é a que mais varia entre os 94% e os 19%, para a incidência e os 50% e os 6% para a severidade (Figura 17 e Figura 18).

O valor de severidade mais baixo surgiu em 2019 na modalidade 3 (5%) enquanto o valor mais elevado foi obtido para a modalidade 2 em 2018 (50%) (Figura 18).

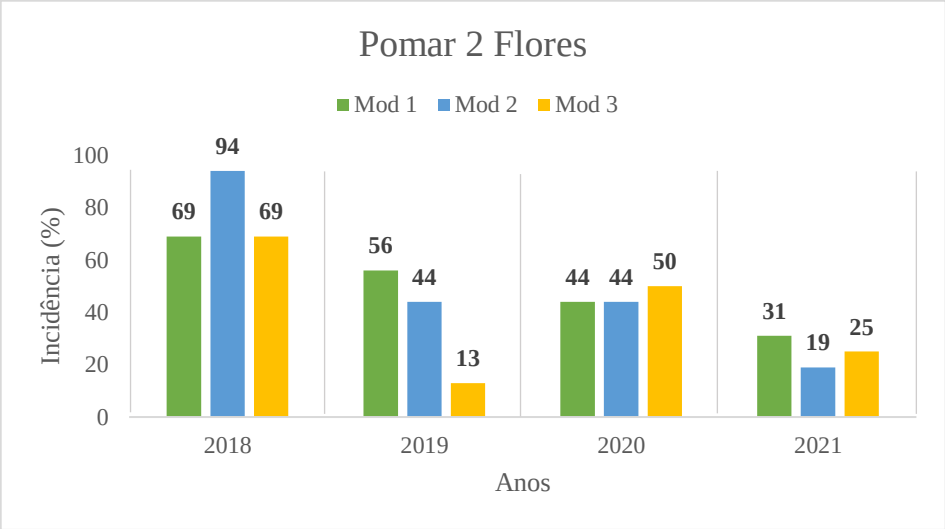

Figura 17. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

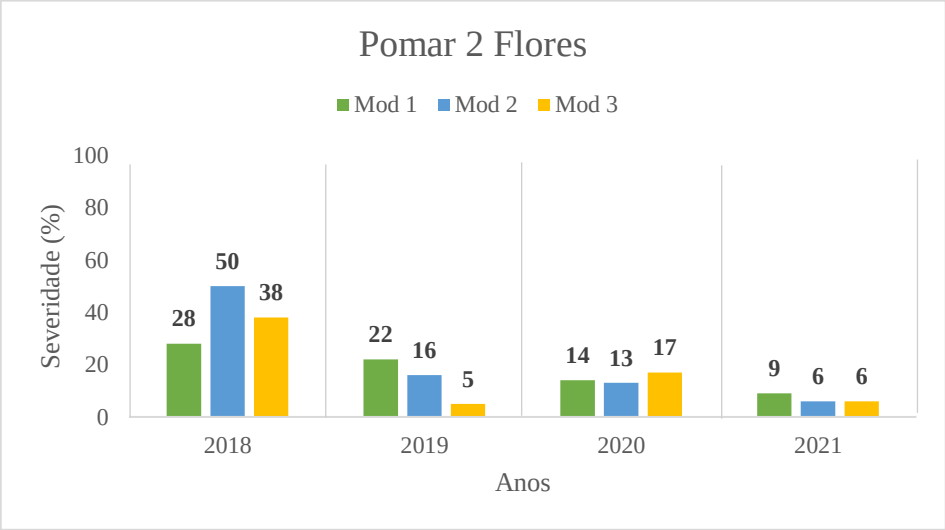

Figura 18. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Em frutos com 12-14 mm verificou-se que não existiram diferenças significativas entre os valores apurados de incidência e de severidade para modalidades em estudo, ao longo dos quatro anos analisados (Figura 19 e Figura 20).

O menor valor de incidência foi 25% e ocorreu na modalidade 3 do ano de 2018, modalidade 1 (testemunha) em 2020 e na modalidade 1 (testemunha) e modalidade 2 em 2021. O valor de incidência mais elevado (63%) apurou-se na modalidade 2 em 2018. Entre as restantes modalidades, os resultados foram pouco variáveis (Figura 19).

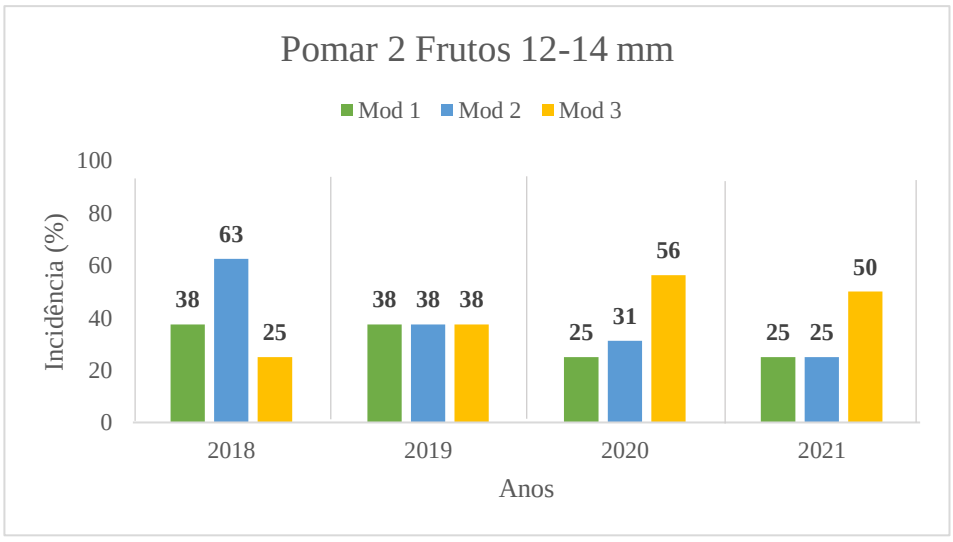

Figura 19. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

No que diz respeito à severidade, o maior valor foi alcançado em 2018 na modalidade 2 em 2021 (23%) enquanto o menor valor (8%) foi obtido em 2018 na modalidade 3, em 2019

na modalidade 1 (testemunha) e em 2021 para a modalidade 2. Entre as restantes modalidades, os resultados foram um pouco oscilantes (Figura 20).

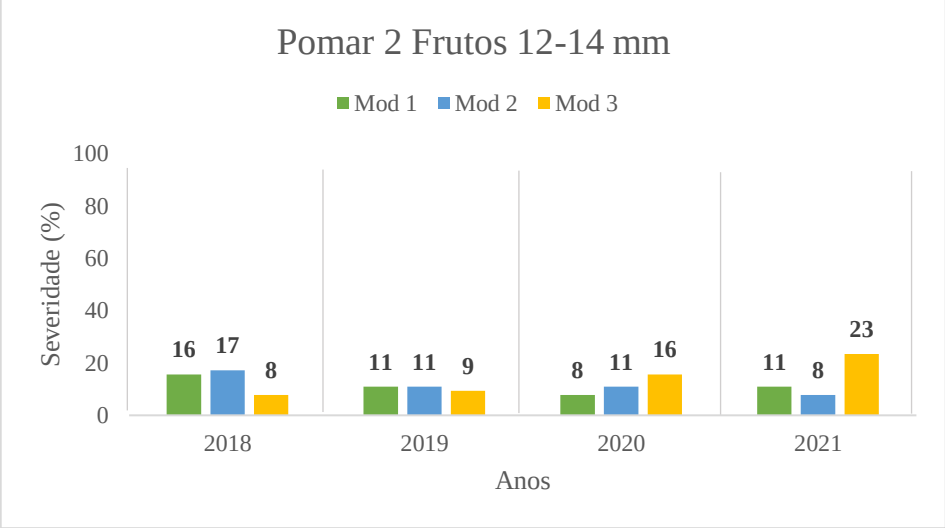

Figura 20. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto à incidência e severidade de *S. vesicarium* nas folhas verificou-se que não existiram diferenças significativas entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 21 e Figura 22). No primeiro ano de ensaio, os valores obtidos para a incidência foram iguais para as 3 modalidades em estudo. A modalidade 1 revelou o menor valor (25%) em 2019 enquanto em 2020 apresentou o maior valor (75%). Entre as modalidades 2 e 3 os resultados foram variáveis (Figura 21).

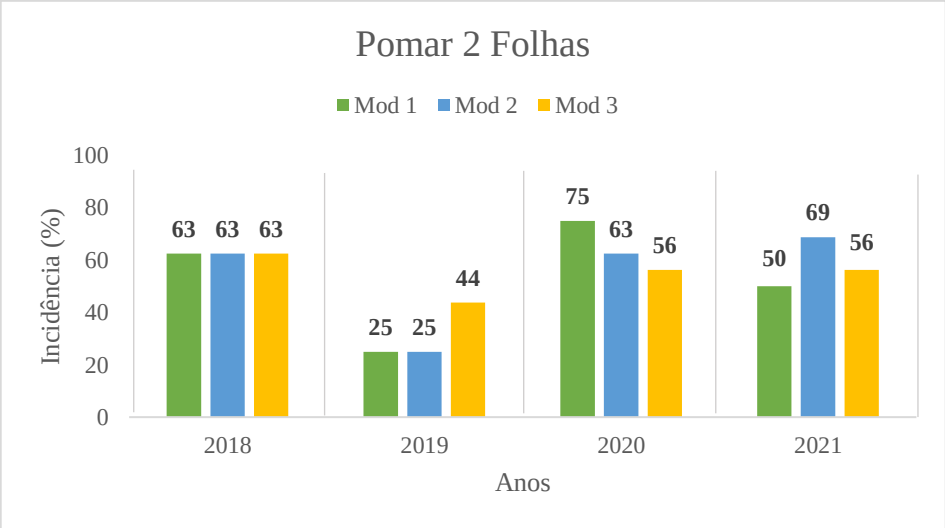

Figura 21. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente à severidade, o menor valor foi alcançado em 2019 na modalidade 2 (6%) enquanto o maior valor foi obtido para a modalidade 1 (testemunha) em 2020 (30%). Entre as modalidades 2 e 3, os resultados foram variáveis (Figura 22).

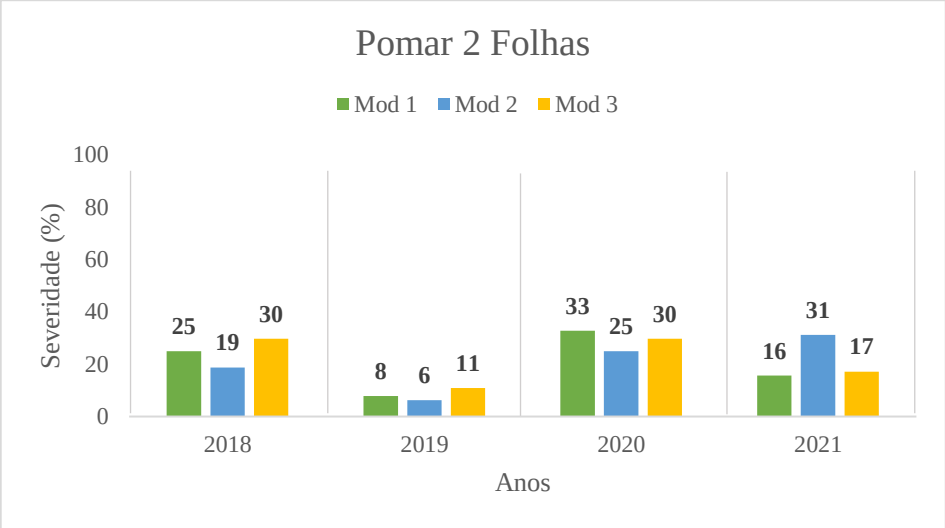

Figura 22. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto aos valores de incidência e severidade nos frutos antes da colheita observou-se que não diferiram significativamente entre modalidades de 2018 a 2021 (Figura 23 e Figura 24). Os valores de incidência na modalidade 1 (testemunha) variaram entre 20% em 2020 (menor valor), 78% para 2018 e 100% para 2019 e 2021. No quarto ano de ensaio a incidência foi de 100% para as 3 modalidades (Figura 23).

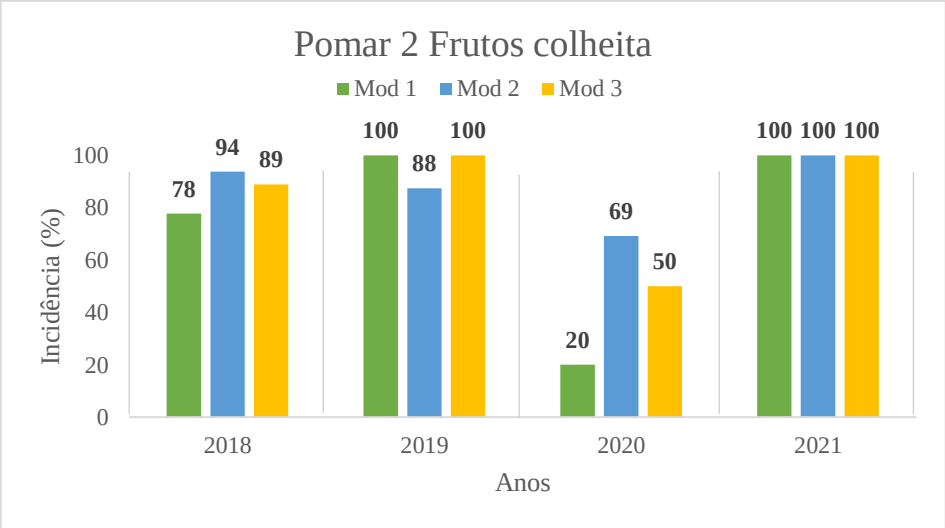

Figura 23. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Para a severidade, os menores e maiores valores foram alcançados na modalidade 1 (testemunha) em 2020 (18%) e 2021 (81%), respetivamente. Entre as modalidades 2 e 3 ocorreram algumas variações ao longo dos anos de ensaio (Figura 24).

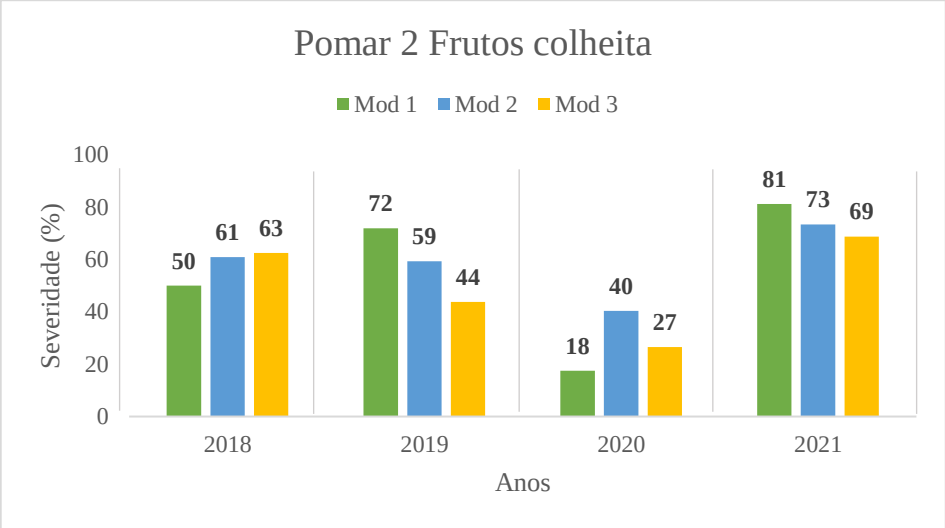

Figura 24. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 2 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Os resultados relativos ao pomar 2 revelaram que a modalidades 2 (remoção do material vegetal) e a modalidade 3 (Micoplas + VIT-ORG) não foram eficazes na redução da doença. A modalidade 1 (testemunha), na maioria dos órgãos analisados, apresenta valores inferiores ou iguais àqueles apresentados nas restantes modalidades, comprovando a ineficácia destes. É de destacar os valores obtidos para a incidência nas flores e nas folhas, pois foi nessa situação que a modalidade 1 (testemunha) foi superior ou igual às restantes modalidades, isto é, em 2019 e 2021 nas flores e no caso das folhas em 2019.

Os valores de incidência apresentados para os frutos à colheita foram muito elevados (100%) quer em 2019 para a modalidade 1 (testemunha) quer para modalidade 3 em 2021 no qual se regista em todas as modalidades 100%. Estes valores de incidência são consistentes com a informação dada pela OP que caracterizava o pomar com histórico de doença elevado que estaria associado à presença de uma maior quantidade de inóculo acumulado ao longo de vários anos e consequentemente, acarretando maiores estragos na produção (Comporta *et al* ., 2017).

Outros fatores podem eventualmente contribuir para este resultado tal como, a idade do pomar. Sendo um dos pomares mais antigos do ensaio é provável que o inóculo potencial disponível seja elevado, que exitam populações de isolados mais agressivos ou mais resistentes aos produtos utilizados para combater a doença (Mota *et al* ., 2019).

2.3.3. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 3

Nas flores, a incidência e severidade de *S. vesicarium* não diferiram significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 25 e Figura 26).

Em 2019, o valor da incidência para as quatro modalidades em estudo foi nulo bem como para a modalidade 1 (testemunha) em 2018. O maior valor de incidência ocorreu na modalidade 2 em 2018. Entre as modalidades 2, 3 e 4 os resultados foram variáveis (Figura 25).

Vicissitudes alheias ao ensaio impediram a realização da modalidade 3 em 2021 o que, justifica a ausência de resultados para todos os órgãos analisados (flores, folhas e frutos).

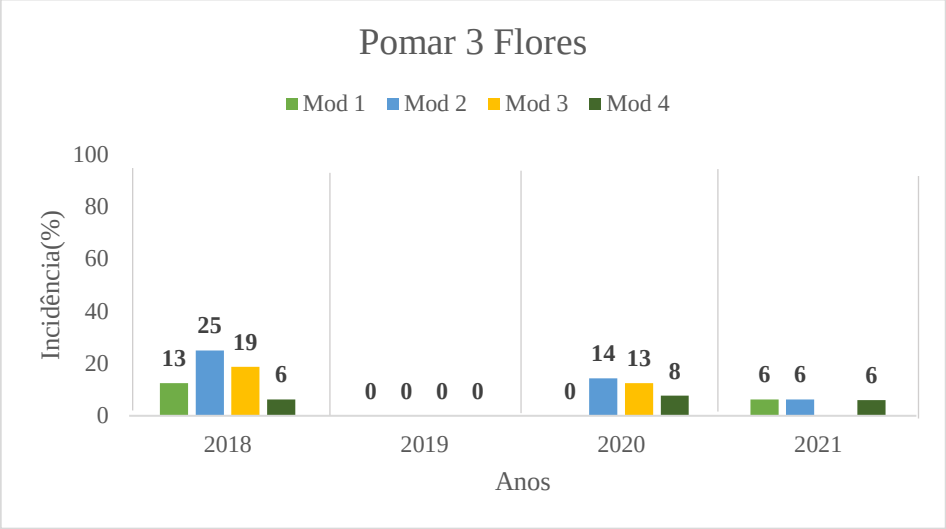

Figura 25. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente à severidade, os valores obtidos foram muito baixos sendo nulos em 2019. Entre as modalidades 2, 3 e 4, os resultados foram variáveis (Figura 26).

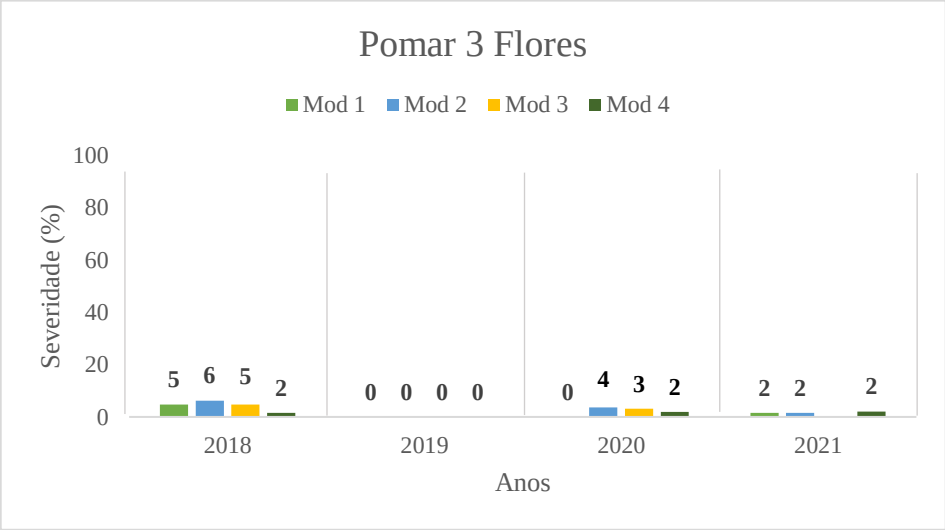

Figura 26. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto à incidência e severidade de *S. vesicarium* em frutos 12 - 14 mm verificou-se não existirem diferenças significativas entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 27 e Figura 28). O menor valor de incidência para as quatro modalidades foi obtido em 2020 sendo nulo nas modalidades 2 e 4. O maior valor de incidência ocorreu na modalidade 2 em 2018 (38%). É de realçar, os valores idênticos da modalidade 1 (testemunha) comparativamente com as outras modalidades em estudo. Os resultados obtidos entre as modalidades 2, 3 e 4 foram oscilantes (Figura 27).

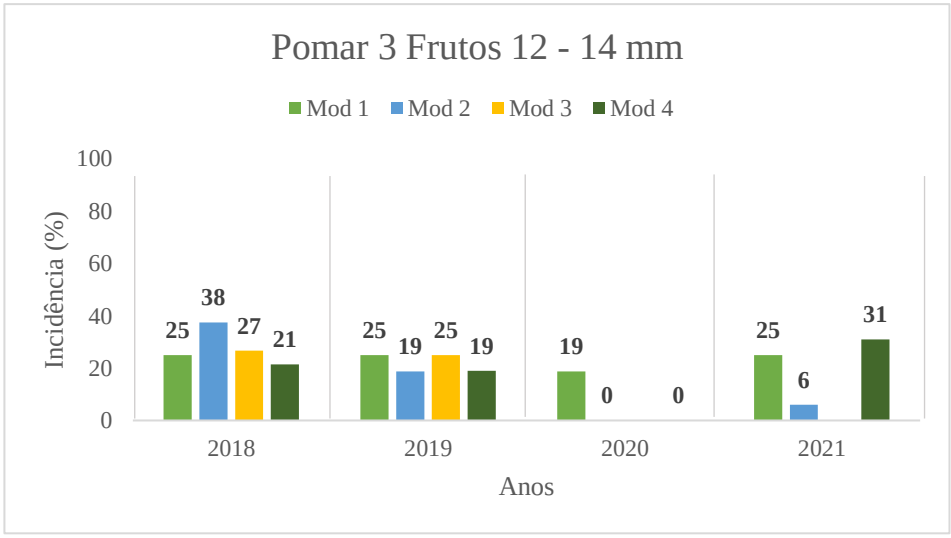

Figura 27. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Considerando a severidade, os valores obtidos foram muito baixos sendo nulos em 2020 nas modalidades 2 e 4. Entre as modalidades 2, 3 e 4 os resultados foram pouco variáveis (Figura 28).

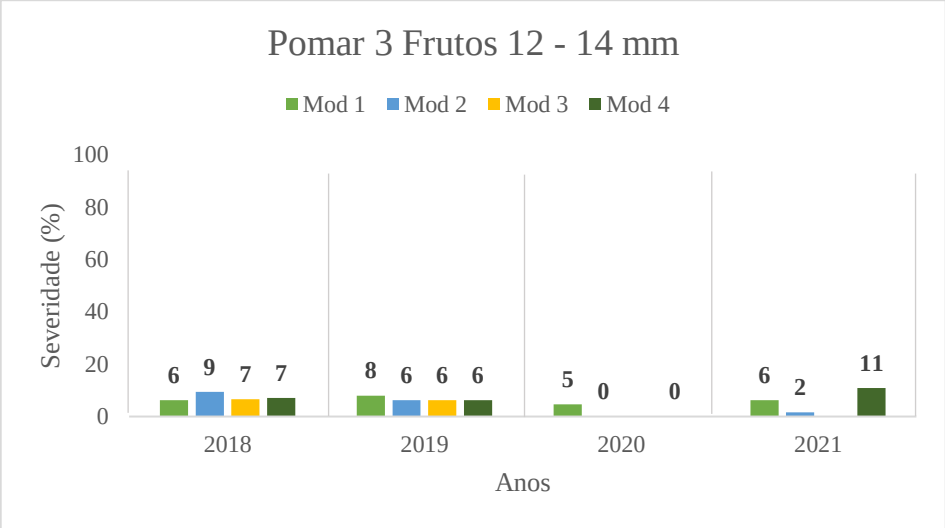

Figura 28. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente à incidência e severidade de *S. vesicarium* nas folhas verificou-se que os valores obtidos não diferiram significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos de estudo (Figura 29 e Figura 30).

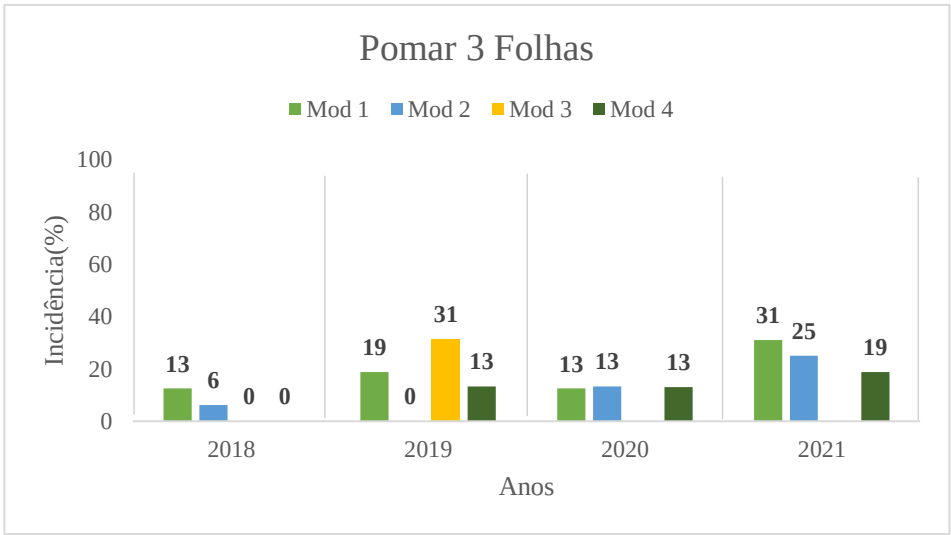

Figura 29. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

A incidência foi nula nas modalidades 3 e 4 em 2018 e na modalidade 2 em 2019. O valor mais elevado de incidência ocorreu na modalidade 3 em 2019 e na modalidade 1 (testemunha) em 2021 (31%). Comparando a modalidade 1 (testemunha) com as restantes, esta

apresentou pouca variação sendo a modalidade 3 aquela onde se obteve maior discrepância. Entre os resultados das modalidades 2, 3 e 4 ocorreram algumas oscilações. (Figura 29).

Quanto à severidade, os valores obtidos foram muito baixos sendo nulos em 2018 nas modalidades 3 e 4 e 2019 na modalidade 2. Entre as modalidades 2, 3 e 4 os resultados foram variáveis (Figura 30).

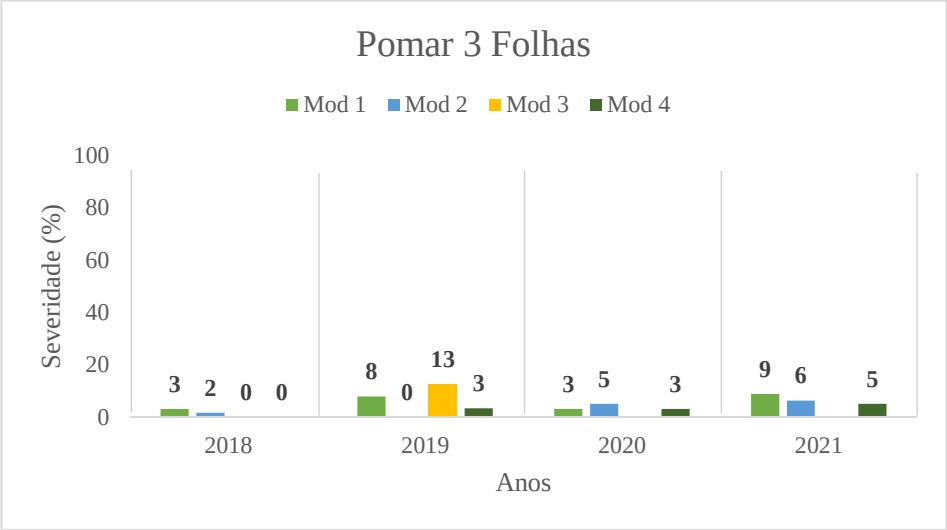

Figura 30. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nos frutos à colheita existiram diferenças significativas em 2019 para os valores da incidência entre modalidades. A modalidade 4 diferiu significativamente da modalidade 1 (testemunha) enquanto as modalidades 2 e 3 não diferiram entre si nem das modalidades 1 (testemunha) e 4. O valor de incidência foi nulo na modalidade 2, em 2021 e o maior valor de incidência ocorreu na modalidade 3 em 2018 (75%) (Figura 31).

Analisando os valores de incidência é de destacar os maiores valores nos dois primeiros anos, os menores valores no terceiro ano e a disparidade de valores em 2021 (Figura 31).

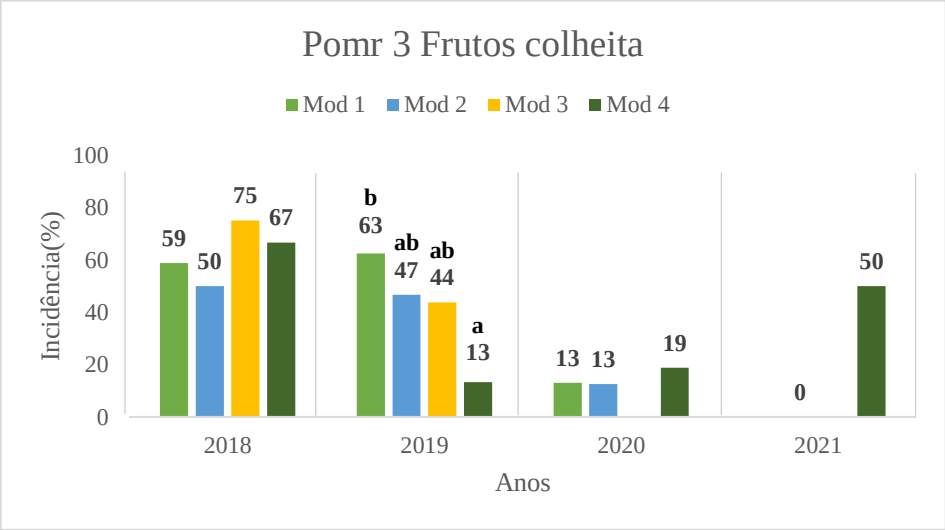

Figura 31. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto à severidade não existiram diferenças significativas entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados. Os valores obtidos foram nulos em 2021 na modalidade 2 e o maior valor foi alcançado em 2018 na modalidade 3 (55%). Entre as modalidades 2, 3 e 4 os resultados foram variáveis (Figura 32).

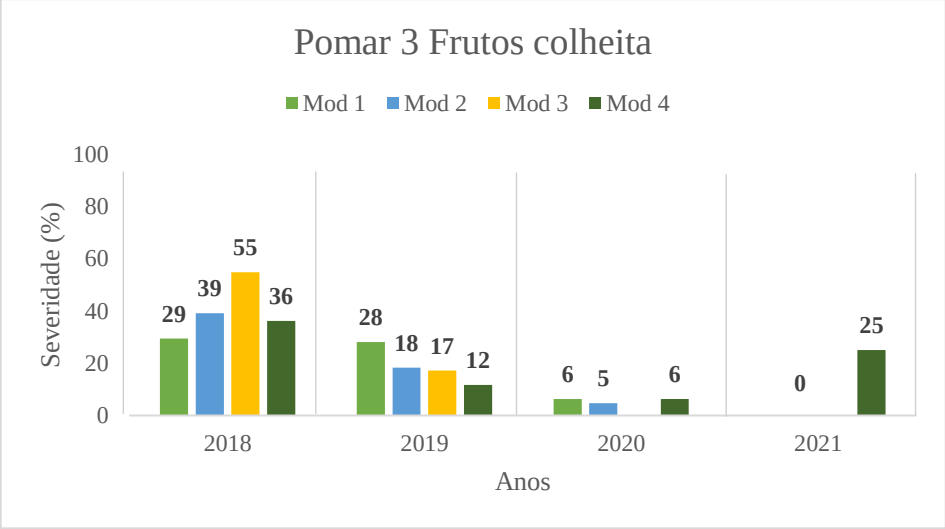

Figura 32. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 3 ao longo dos 4 anos de ensaio.

A análise global dos resultados permite assinalar que a maior incidência ocorreu nos frutos de 12-14 mm e nos frutos à colheita enquanto os valores menores ocorreram nas flores e folhas com valores proeminentemente mais baixos nas flores. Quanto à severidade, os valores adquiridos nos três primeiros órgãos de estudo (flores, frutos 12-14mm e folhas) foram muito baixos realçando os frutos à colheita com valores consideravelmente superiores.

Tendo em conta, os valores obtidos no pomar 3 ao longo dos quatro anos de ensaio constata-se que a modalidade 1 (testemunha) manteve-se na generalidade inferior ou igual à restantes modalidades, destacando-se valores mais elevados obtidos nas restantes modalidades nas folhas em 2021 e nos frutos à colheita em 2019. Assim sendo, neste pomar a redução da infeção de *S. vesicarium* foi mais eficiente comparativamente com os outros pomares para a modalidade 2 (remoção do material vegetal), modalidade 3 (MyrN, complexo de nutrientes com aminoácidos) e modalidade 4 (FRUITCARE, biocida). Entre a modalidade 3 (MyrN) e a modalidade 4 (FRUITCARE) ocorreram oscilações variáveis ao longo dos anos.

Os valores baixos de incidência e severidade obtidos neste pomar, comparando com os outros pomares em ensaio, podem ser parcialmente justificados pela menor idade do pomar (14 anos) que influencia a presença de inóculo potencial acumulado. Estão valores foram, igualmente concordantes com a informação de histórico baixo de doença das manchas castanhas fornecido pela OP.

2.3.4. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 4

Relativamente às flores verificou-se que a incidência e severidade de *S. vesicarium* não diferiu significativamente entre modalidades do ano 2018 a 2021 (Figura 33 e Figura 34).

Em 2018, o valor mais elevado de incidência ocorreu na modalidade (56 %) enquanto o valor mais baixo (0%) foi registado na modalidade 3 em 2020. A modalidade 1 (testemunha) apresentou maioritariamente valores inferiores às restantes modalidades (Figura 33).

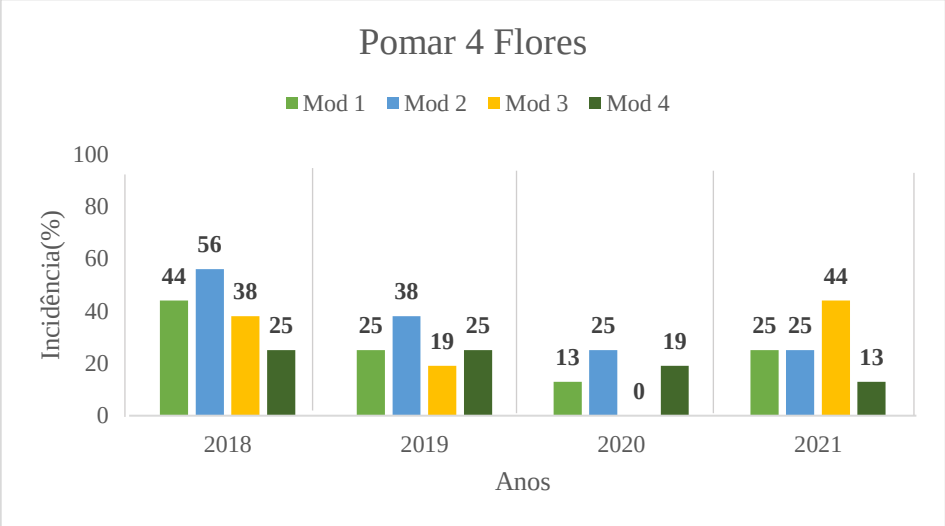

Figura 33. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto à severidade de *S. vesicarium*, o maior valor ocorreu na modalidade 2 em 2018 (22%) e o menor valor ocorreu em 2020 na modalidade 3 (0%). Salienta-se que a modalidade 2 apresentou um decréscimo na severidade entre 2018 e 2021 (Figura 34).

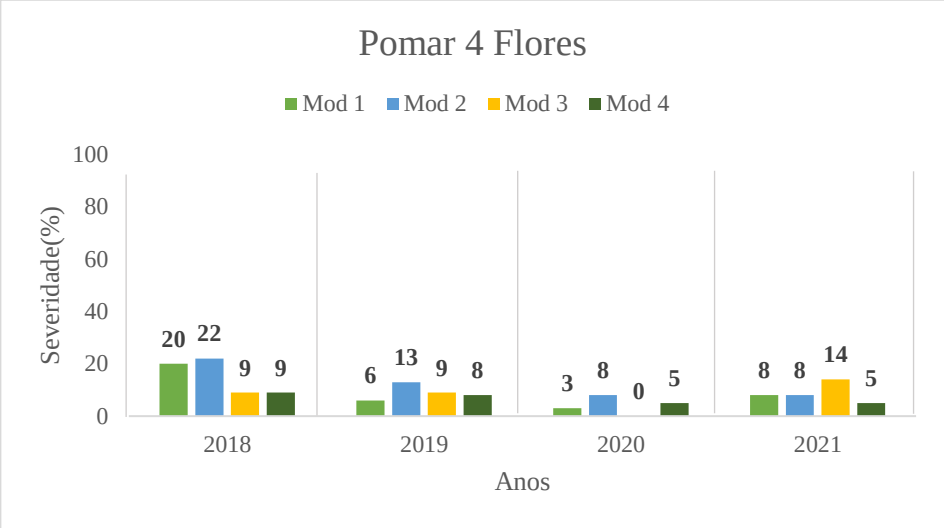

Figura 34. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nos frutos de 12-14 mm não existiram diferenças significativas entre a incidência e a severidade de *S. vesicarium* nos quatro anos de ensaio (Figura 35 e Figura 36).

Os menores e maiores valores de incidência ocorreram no ano 2021 e 2020, respetivamente. A modalidade 1 (testemunha) apresentou o valor mais elevado em 2021 (88%) e o valor mais baixo (0%) em 2020. É de realçar os valores análogos obtidos nos dois primeiros anos do ensaio. Quanto às restantes modalidades 2, 3 e 4, os resultados foram oscilantes nos anos 2018, 2019 e 2021 (Figura 35).

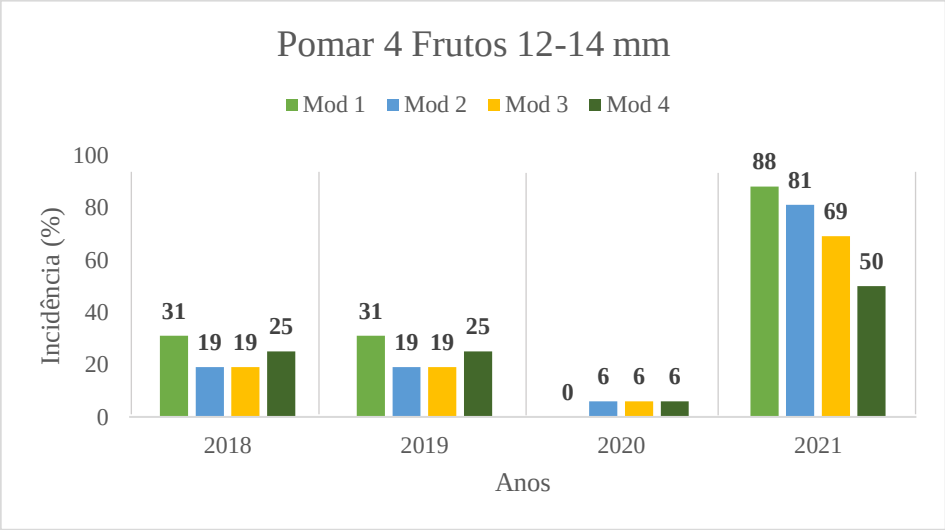

Figura 35. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto aos valores obtidos para a severidade, os resultados são similares aos obtidos para a incidência com maiores valores em 2021 e menores em 2018, 2019 e 2020. O maior valor ocorreu em 2021 na modalidade 2 com 67 % e o menor valor em 2020 com severidade nula (Figura 36).

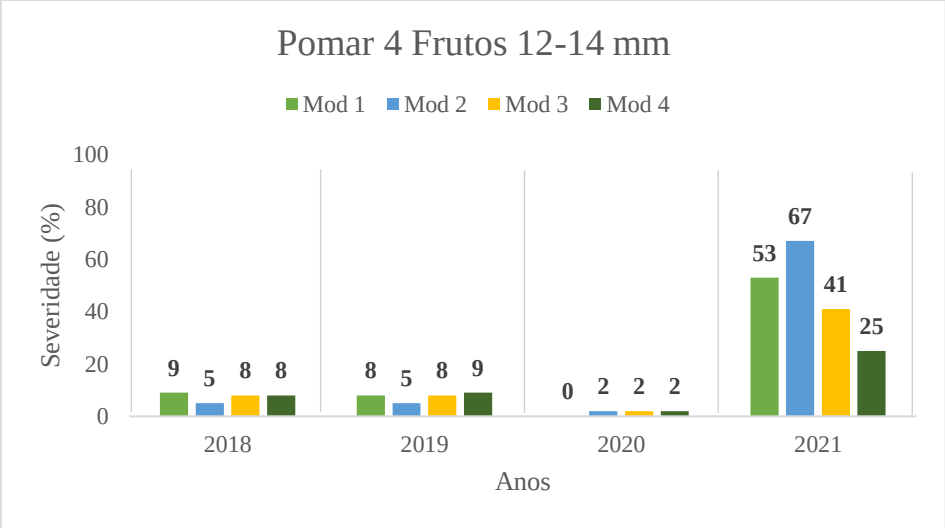

Figura 36. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente, à incidência de *S. vesicarium* em folhas verificou-se existirem diferenças significativas entre modalidades em todos os anos, exceto em 2019. Em 2018, 2020 e 2021, a modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 4 e as modalidades 2 e 3 não diferiram entre si nem da modalidade 1 (testemunha) e 4, respetivamente. É de salientar que o maior valor ocorreu no ano de 2020, na modalidade 1 (testemunha) (75%) e o menor valor na modalidade 3 e 4 em 2021 (0%) (Figura 37).

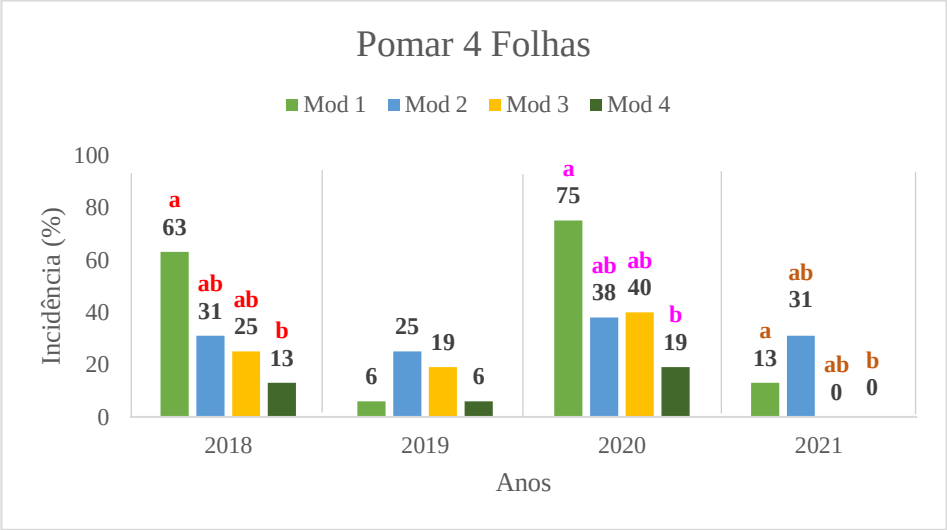

Figura 37. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto à severidade de *S. vesicarium* é possível observar que se registaram diferenças significativas em 2018, 2020 e 2021 (mesma tendência que a incidência) (Figura 38). A modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 4, enquanto a modalidade 2 e 3 não diferem significativamente entre si nem da modalidade 1 (testemunha) e 4, respetivamente. O maior valor registou-se na modalidade 1 (testemunha) em 2020 (25%) e o menor valor ocorreu na modalidade 3 e 4 em 2021 (0%). Em 2019, os valores de severidade para as quatro modalidades em ensaio não diferiram entre si (Figura 38).

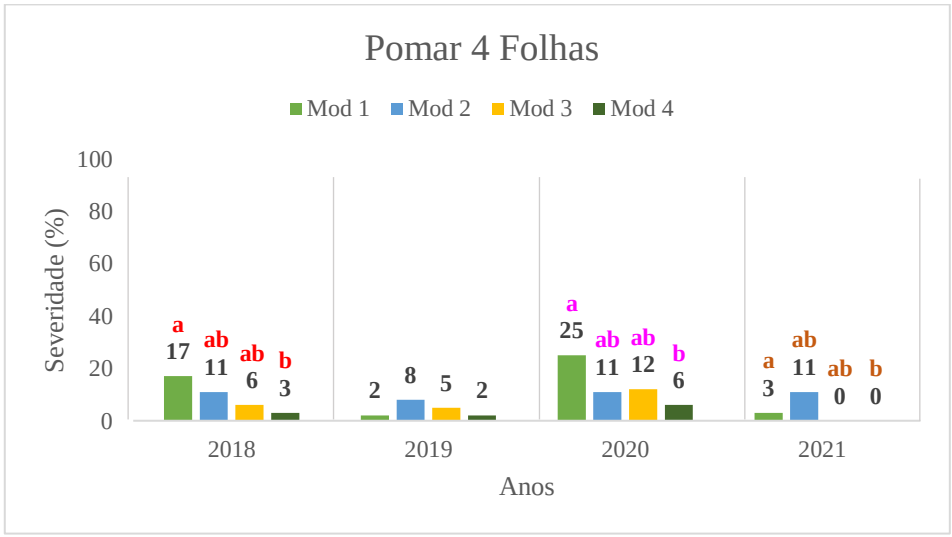

Figura 38. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Nos frutos à colheita surgiram diferenças significativas em 2018 para os valores de incidência de *S. vesicarium* entre modalidades (Figura 39).

A modalidade 1 (testemunha) e a modalidade 4 diferiram significativamente entre si. As modalidades 2 e 3 não diferiram significativamente entre si, nem das modalidades 1 (testemunha) e 4, respetivamente. Os maiores valores de incidência ocorreram em 2018 e 2021, na modalidade 3 e 4, respetivamente com um valor de (94%); o menor valor foi registado no ano 2019 na modalidade 4 com 47%. (Figura 39).

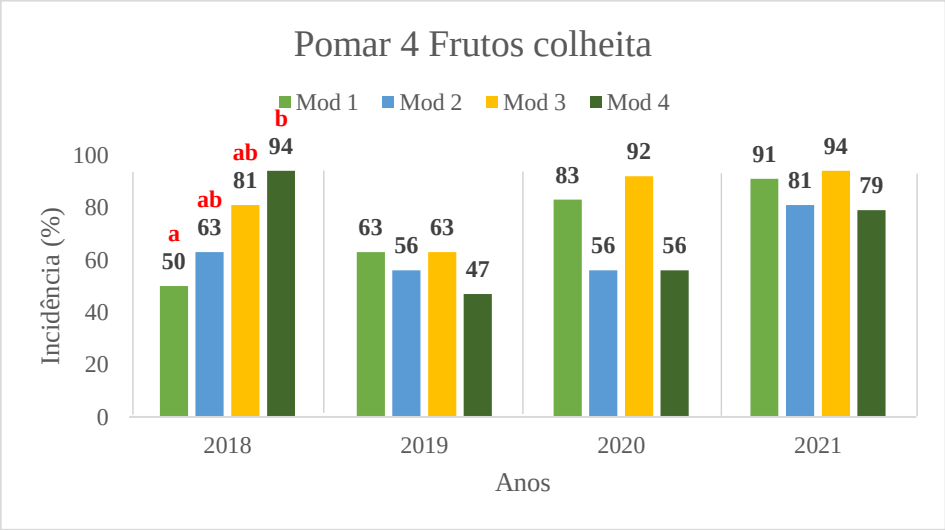

Figura 39. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto à severidade de *S. vesicarium*, os resultados tendem a ser semelhantes aos obtidos da incidência não registando diferenças significativas em 2019, 2020 e 2021. Em 2018, pelo contrário, existiram diferenças significativas entre a modalidade 1 (testemunha) e a modalidade 4; as modalidades 2 e 3 não diferiram significativamente entre si nem da modalidade 1(testemunha) e 4, respetivamente. O maior valor foi registado em 2018 na modalidade 4 (81%) e o menor valor foi registado em 2019 na modalidade 3 e 4 com 25%. (Figura 40).

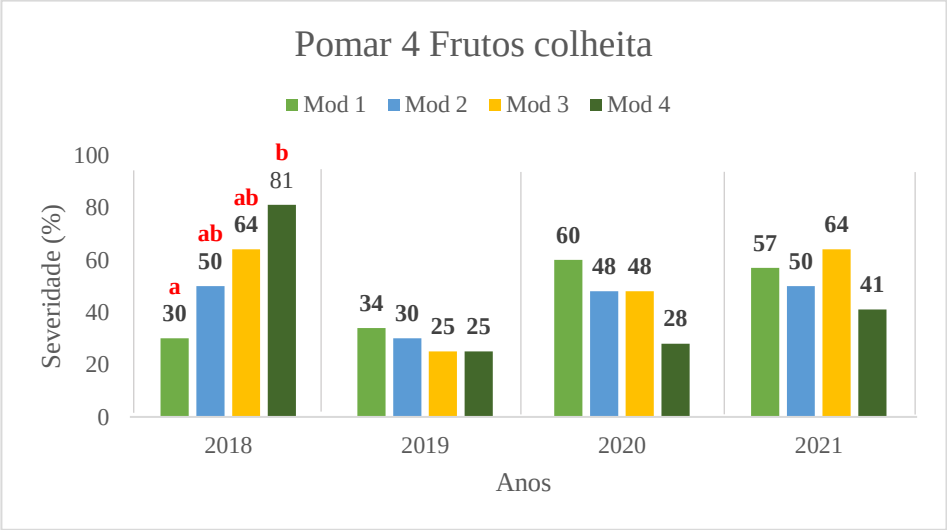

Figura 40. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 4 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

A incidência de *S. vesicarium* nos órgãos analisados é elevado entre 2018 e 2021 sendo de destacar os valores obtidos na modalidade 2 (remoção do material vegetal) nas flores, na modalidade 3 (Micoplas + VIT-ORG) e na modalidade 4 (fosfato de monoamónio + ureia) nos frutos à colheita. A modalidade 1 (testemunha) revelou valores superiores às restantes modalidades nos frutos 12-14 mm e nas folhas. A modalidade 4 apresentou valores elevados apenas nos frutos à colheita no primeiro ano de ensaio (2018) mantendo-se nas folhas com valores mais baixos de incidência e severidade.

A modalidade 4 consiste na aplicação de fosfato de monoamónio + ureia, cuja função seria reduzir a produção da elevada quantidade de inóculo presente no pomar através da rápida degradação das folhas que se encontram presentes no solo (Isidoro e Azevedo, 2005b; Llorente *et al.*, 2006). Embora se tenha verificado que os resultados foram favoráveis para o pomar 4, obteve-se percentagens de incidência baixas, a aplicação de ureia ao solo tem gerado algum desacordo entre os autores. Llorente *et al.* (2006) relatam que este meio de luta cultural é pouco consistente na redução da quantidade de ascósporos e conídios enquanto, Isidoro e Azevedo (2005b) relatam que a aplicação de ureia tem um elevado efeito sobre a biodegradação das folhas caídas no solo e na redução do número de pseudotecas nas folhas.

No decorrer dos ensaios os menores valores de incidência ocorreram nas folhas e os valores muito baixos da severidade surgiram nos frutos de 12-14 mm e nas folhas.

De um modo geral, não houve eficácia na redução da doença das manchas castanhas, o que pode ter sido consequência da idade do pomar entre 18 e os 21 anos e, do histórico da doença médio referenciado pela OP.

2.3.5. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 5

No pomar 5, os valores apurados para a incidência e severidade *S. vesicarium* nas flores não diferiram significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 41 e Figura 42).

Em 2018, o maior valor de incidência ocorreu na modalidade 1 (testemunha) com 81 % e o menor surgiu em 2020 e 2021 (0%) na modalidade 4 e 3, respetivamente. É de destacar que no primeiro ano de ensaio, 2018, os valores de incidência e severidade registados foram os maiores no período de 4 anos de estudo (Figura 41 e Figura 42).

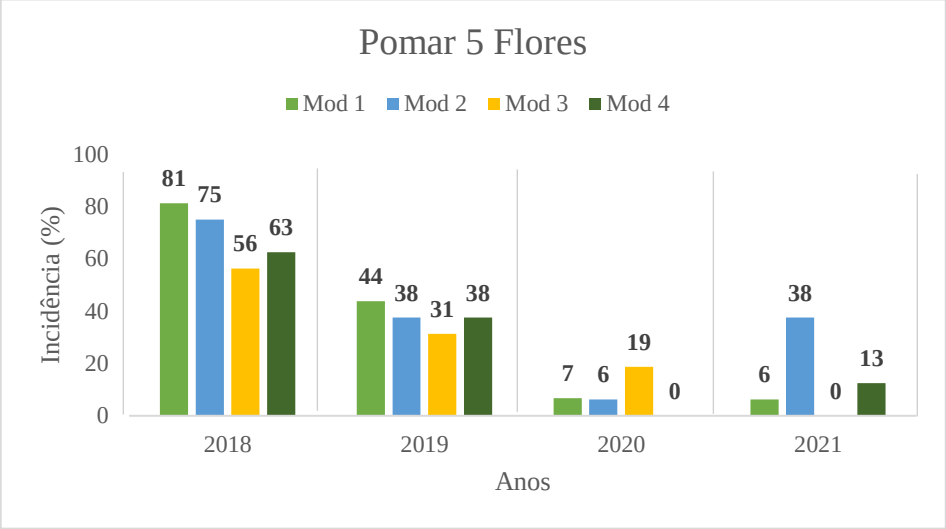

Figura 41. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio.

A severidade maior ocorreu no ano 2018, na modalidade 1 (testemunha) (30 %) e o menor valor registou-se no ano 2020 e 2021 na modalidade 4 e 3, respetivamente. No primeiro ano de ensaio os valores foram os mais elevados. Entre as modalidades 2, 3 e 4 os resultados foram variáveis (Figura 42).

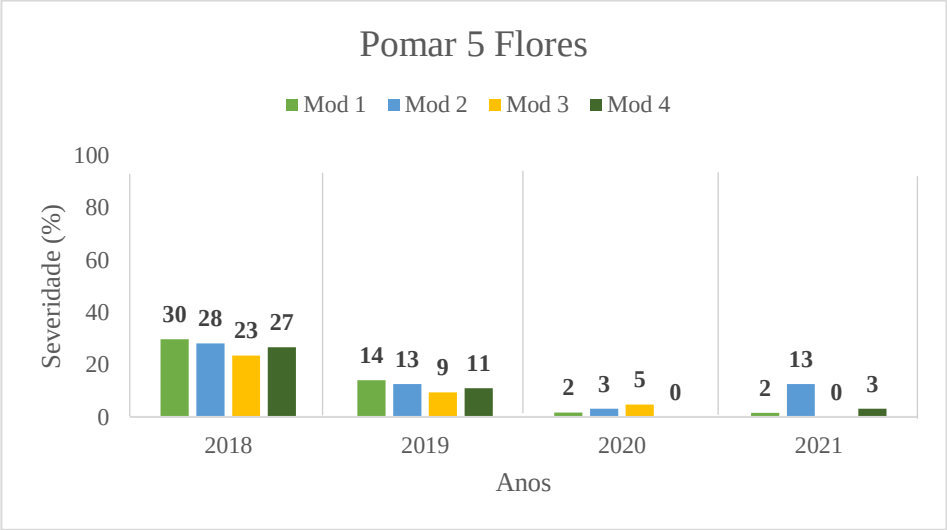

Figura 42. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nos frutos de 12-14 mm não existiram diferenças significativas entre os valores de incidência e severidade *S. vesicarium* obtidos ao longo do período em estudo. Vicissitudes alheias ao ensaio impediram a realização da modalidade 3 em 2019 o que justifica a ausência de resultados. (Figura 43). O menor e maior valor de incidência *S. vesicarium* para as quatro modalidades em estudo foi obtido na modalidade 1 (testemunha) em 2020 e 2021, respetivamente, com 7% e 69 %.

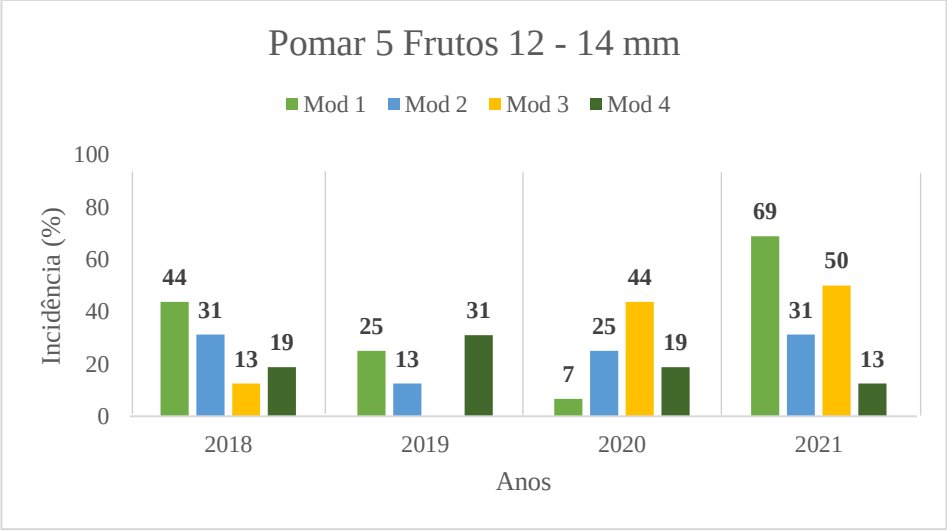

Figura 43. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Relativamente à severidade *de S. vesicarium*, o maior valor (25%) ocorreu em 2021 na modalidade 1 (testemunha) e o menor valor foi 3% ocorreu em 2018 na modalidade 1 (testemunha), em 2019 na modalidade 2, em 2020 na modalidade 1 (testemunha) e, em 2021 na modalidade 3 (Figura 44).

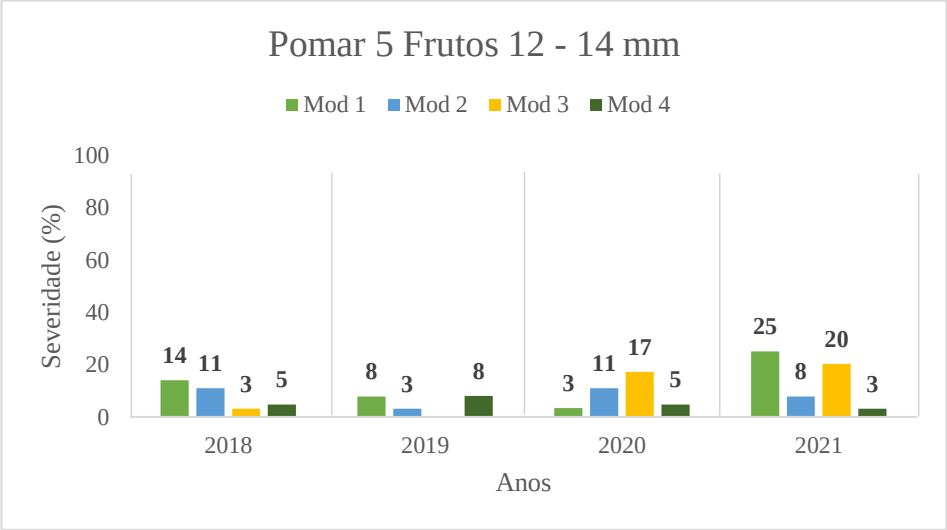

Figura 44. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Quanto à incidência de *S. vesicarium* nas folhas verificou-se a existência de diferenças significativas apenas em 2018 (Figura 45). A modalidade 1 (testemunha) e modalidade 3 diferiram significativamente da modalidade 2; a modalidade 4 não diferiu significativamente das restantes modalidades. A modalidade 2 revelou um valor nulo em 2018, contudo em 2019 apresentou o maior valor (56%) (Figura 45).

A modalidade 1 (testemunha) apresentou um decréscimo ao longo dos três anos de estudo, registando uma diminuição considerável de 2019 para 2020, comparando com as restantes modalidades esta foi a segunda modalidade com maiores valores. Não foram recebidas amostras de folhas em 2021 por ausência de sintomas nas parcelas em ensaio.

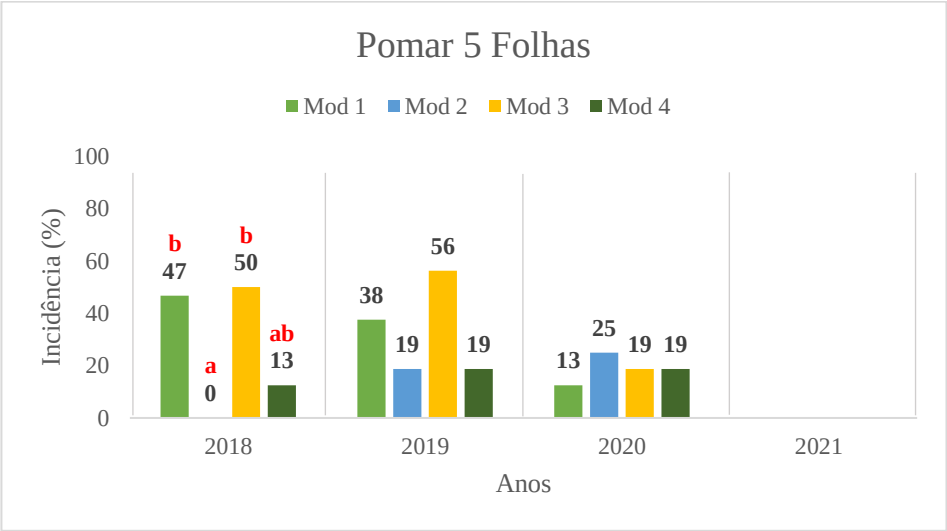

Figura 45. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Relativamente à severidade de *S. vesicarium* nas folhas verificou-se que não existiram diferenças significativas entre as modalidades ao longo dos quatro anos de ensaio (Figura 46). Na generalidade, os valores de severidade foram menores para as modalidades em ensaio sendo em 2018 nulo na modalidade 2 (Figura 46).

Embora com menores valores, (mesma tendência na incidência), a modalidade 1 (testemunha) na severidade apresentou também uma redução de valores ao longo dos três anos de estudo, pelo que esta modalidade foi a segunda modalidade com os valores mais elevados.

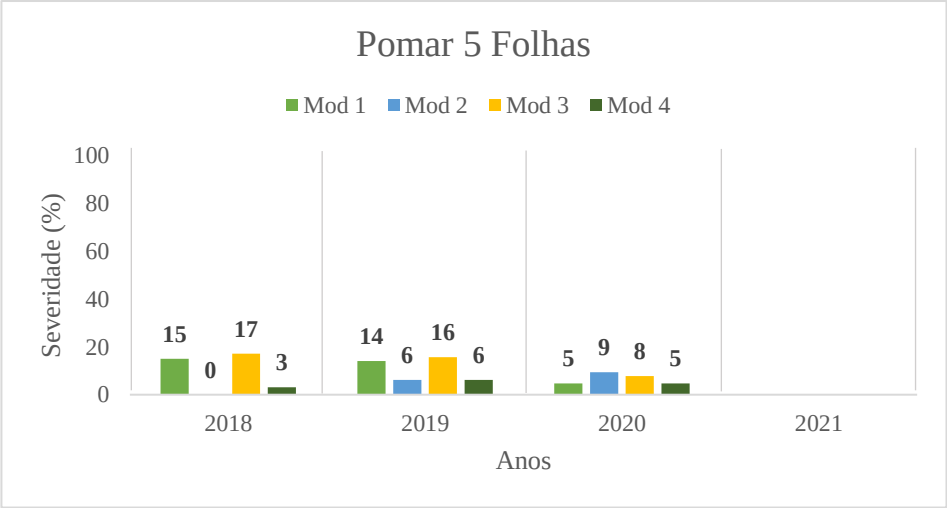

Figura 46. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Nos frutos à colheita existiram diferenças significativas entre os valores incidência de *S. vesicarium* em 2019 (Figura 47). A modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 2, e as modalidades 3 e 4 não diferiram entre si nem das modalidades 1 (testemunha) e 4, respetivamente. A modalidade 2 e 3 em 2018 e a modalidade 1 (testemunha) em 2019 apresentaram um valor de 100%. O menor valor de incidência ocorreu no ano 2020 na modalidade 1(testemunha) e 2 (31%) (Figura 47).

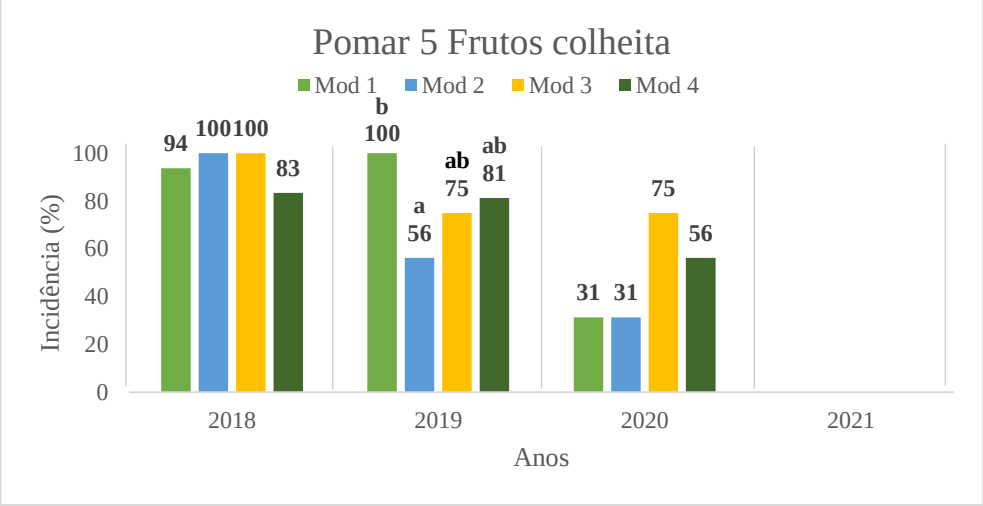

Figura 47. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Em relação à severidade de *S. vesicarium* existiram diferenças significativas entre os valores obtidos para as modalidades em todos os anos de estudo (Figura 48). Os valores mais elevados ocorreram em 2018, primeiro ano de ensaio. A modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 4 enquanto a modalidade 2 e 3 não diferiram significativamente entre si nem da modalidade 1 (testemunha) e 4, respetivamente. No segundo ano de estudo a modalidade 1 (testemunha) é significativamente diferente da modalidade 2, e as modalidades 3 e 4 não diferem significativamente entre si nem das modalidades 1 (testemunha) e 2, respetivamente. Em 2020, a modalidade 3 difere significativamente das modalidades 1 (testemunha) e 2, porém, a modalidade 4 não difere significativamente das restantes modalidades desse ano (Figura 48).

Salienta-se que aos valores obtidos para as modalidades 1 (testemunha), 2 e 4 foram diminuindo ao longo dos anos de ensaio (Figura 48).

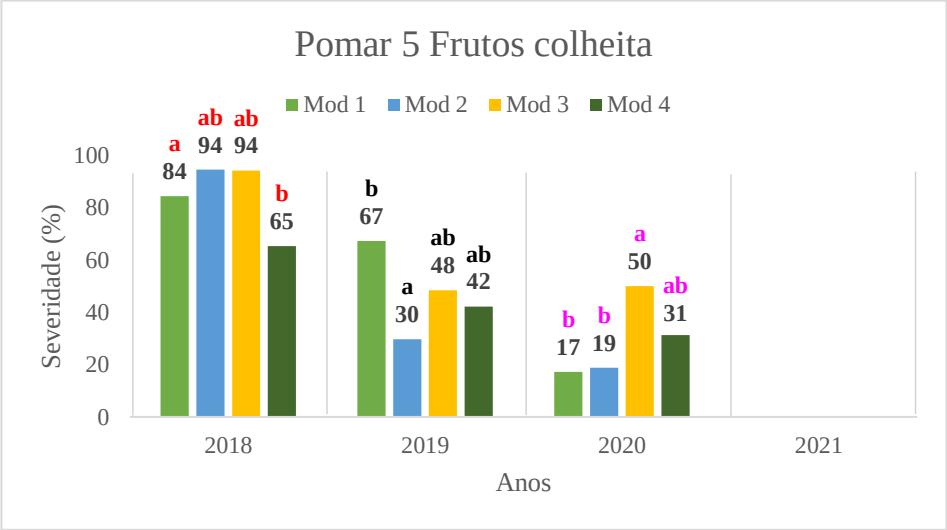

Figura 48. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 5 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Os resultados revelaram que a modalidade 1 (testemunha) nalguns anos de ensaio surgiu com valores superiores às restantes modalidades, o que pressupõe alguma eficácia das modalidades na redução de *S. vesicarium.* Esta situação ocorre nas flores nos dois primeiros anos de ensaio, nos frutos 12-14 mm, em 2021 e nos frutos à colheita em 2019.

Tendo em conta, um histórico de doença médio do pomar e o facto do pomar ser o mais novo em ensaio (10/11 anos) esperar-se-iam resultados mais positivos relativamente á eficácia das modalidades e consequente redução da doença das manchas castanhas. Assim sendo, pressupõe-se que outros fatores se podem ter sobreposto e influenciado as infeções de *S. vesicarium* no pomar.

2.3.6. Incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium* no Pomar 6

Nas flores, a incidência e a severidade de *S. vesicarium* não diferem significativamente entre modalidades ao longo dos quatro anos analisados (Figura 49 e Figura 50). Verificou-se que em 2021, o valor da incidência para a modalidade 1 (testemunha) é nulo, porém o maior da incidência ocorreu na modalidade 2, no primeiro ano de estudo (2018) (50%) (Figura 49).

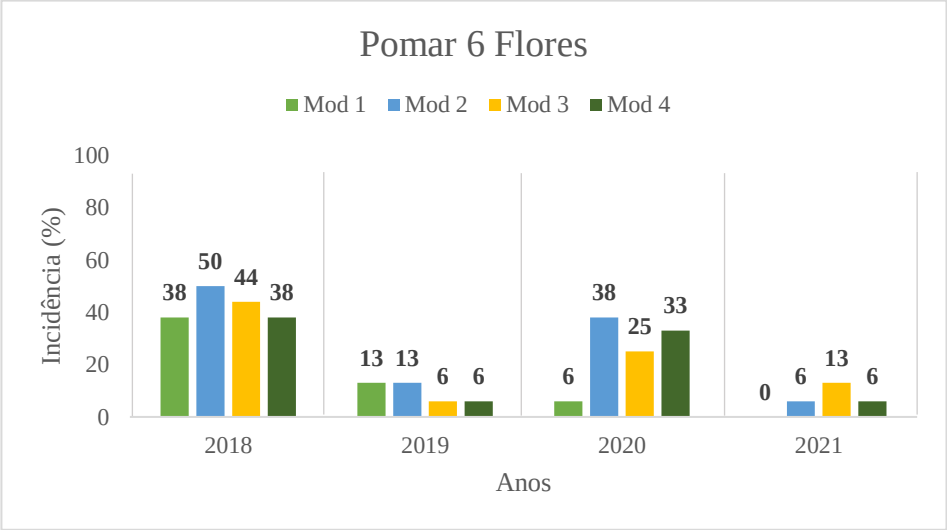

Figura 49. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de flores no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Os valores de severidade foram baixos sendo nulo na modalidade 1 (testemunha) no último ano de estudo (Figura 50).

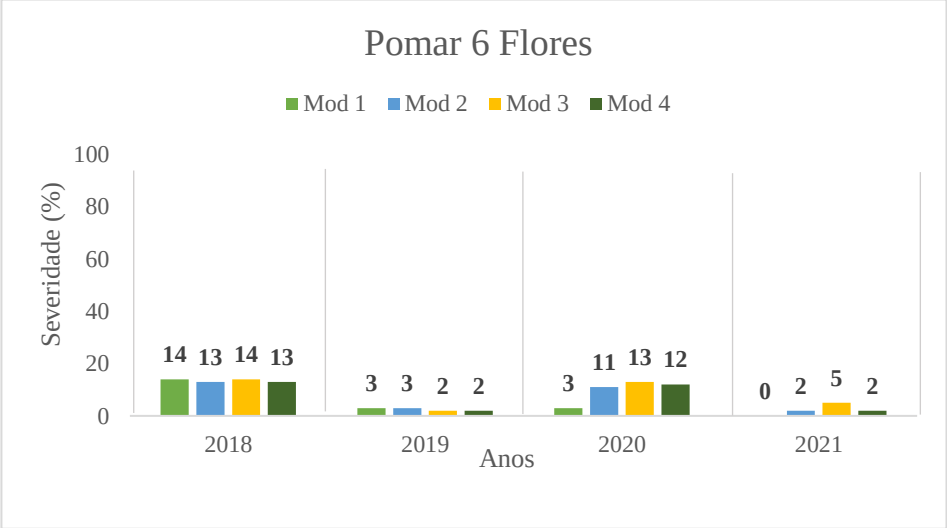

Figura 50. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio.

Os valores de incidência e severidade para os frutos de 12-14 mm infetados por *S. vesicarium* diferiram significativamente em 2020 e 2021 (Figura 51). Para a incidência em 2020, a modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 3, enquanto a modalidade 2 e 4 não diferem significativamente entre si nem das modalidades 1 (testemunha) e 3, respetivamente. No último ano do ensaio, 2021, a modalidade 1 (testemunha) demonstrou ser significativamente diferente da modalidade 3, contudo a modalidade 2 e 4 não diferem significativamente entre si nem das modalidades 1 (testemunha) e 3, respetivamente. O maior e menor valor de incidência surgiu em ambas as situações na modalidade 1 (testemunha) em

2018 com 56 % e em 2021 com um valor nulo, respetivamente, ocorrência difícil de explicar no âmbito do ensaio em curso. (Figura 51).

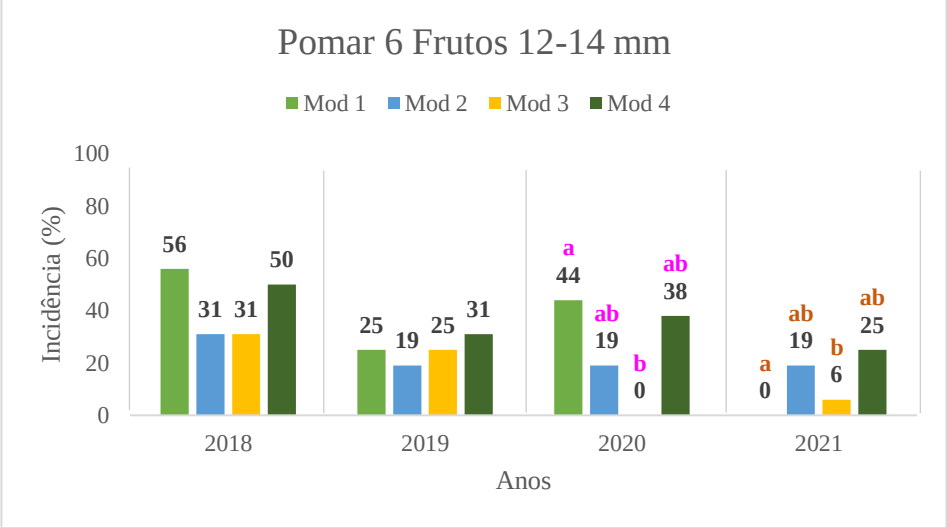

Figura 51. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Em relação à severidade, no ano 2020 e no ano de 2021, a modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 3 e a modalidade 2 e 4 não revelaram diferenças significativas entre si nem das modalidades 1(testemunha)e 3, respetivamente (Figura 52).

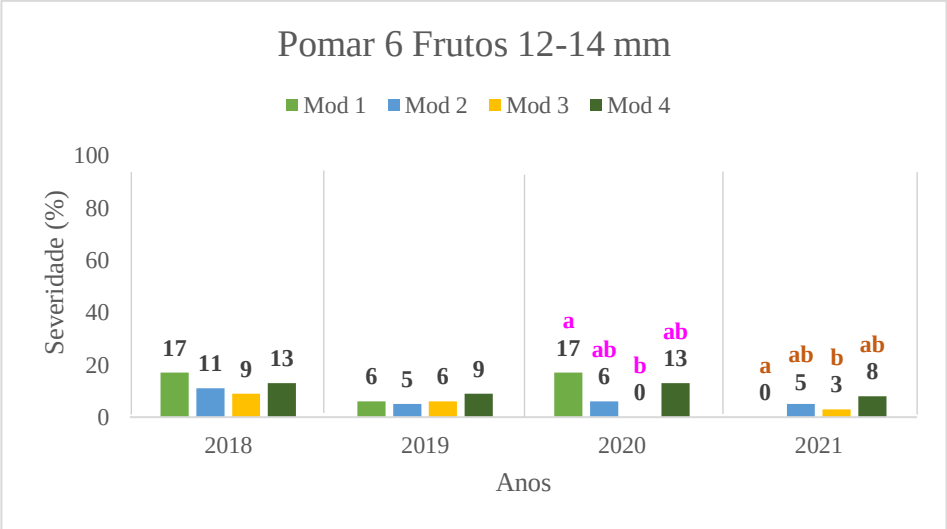

Figura 52. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos 12-14 mm no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto às infeções de *S. vesicarium* nas folhas, os valores apurados para a incidência e severidade, permitiram apurar diferenças significativas entre as modalidades em 2019 tendo a modalidade 1 (testemunha) diferido significativamente das restantes modalidades (Figura 53 e Figura 54).

A modalidade 1 revelou o valor mais elevado (56 %) em 2018 e 2019. A modalidade 2 e a modalidade 3 registaram valores nulos em 2019 (Figura 53).

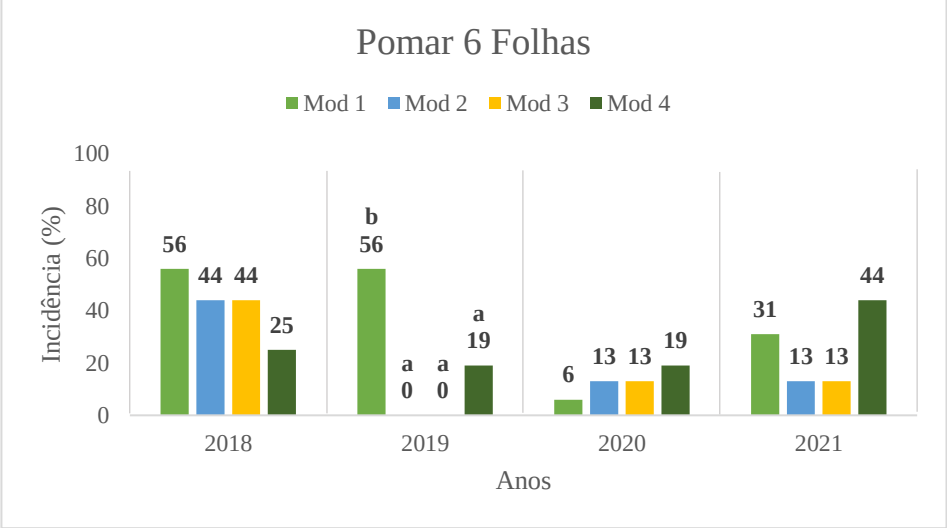

Figura 53. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

No que diz respeito à severidade, em 2019 a modalidade 1 (testemunha) diferiu significativamente da modalidade 2 e da modalidade 3. A modalidade 4 não diferiu significativamente das restantes modalidades deste ano. A maior incidência registou-se em 2018 na modalidade 1 (testemunha) (31%) e a menor ocorreu nas modalidades 2 e 3, em 2019 (Figura 54).

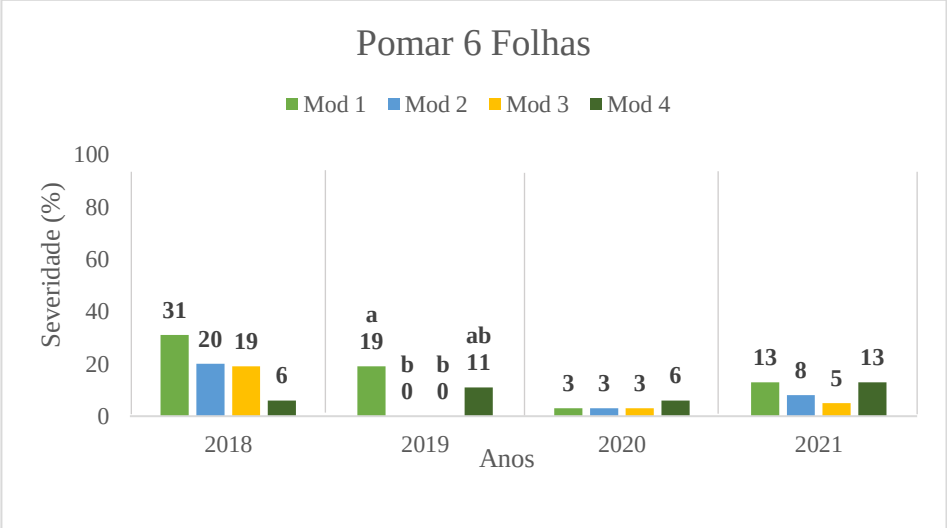

Figura 54. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de folhas no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto às infeções de *S. vesicarium* nos frutos à colheita verificou-se que existiram diferenças significativas em 2020 para os valores da incidência e severidade entre modalidades

(Figura 55 e Figura 56). A incidência da modalidade 4 (47%) diferiu significativamente da modalidade 1 (testemunha) (100%). As modalidades 2 e 3 não diferiram entre si nem das modalidades 1 e 4, respetivamente. Em 2020 registou-se o maior (100%) e o menor valor ocorreu em 2019 na modalidade 3 e 4 (44%) (Figura 55). Vicissitudes alheias ao ensaio impediram a realização de avaliação em 2021 (Figura 55).

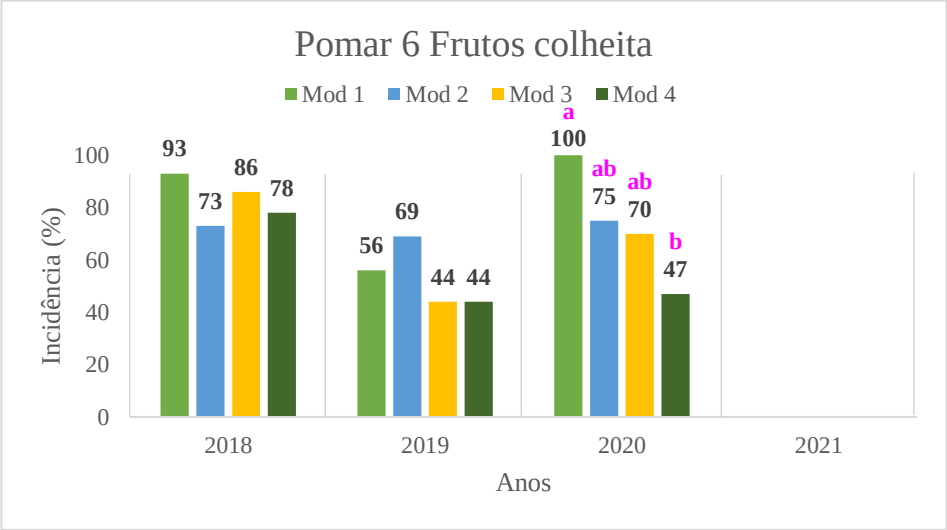

Figura 55. Incidência de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Quanto à severidade, tal como na incidência, em 2020 a modalidade 1 (testemunha) é significativamente diferente da modalidade 4, enquanto na modalidade 2 e 3 não existe diferenças significativas entre si e entre a modalidade 1 e 4, respetivamente. O maior valor registou-se em 2020 (84%), o menor foi registado em 2019 na modalidade 3 (20%) (Figura 56).

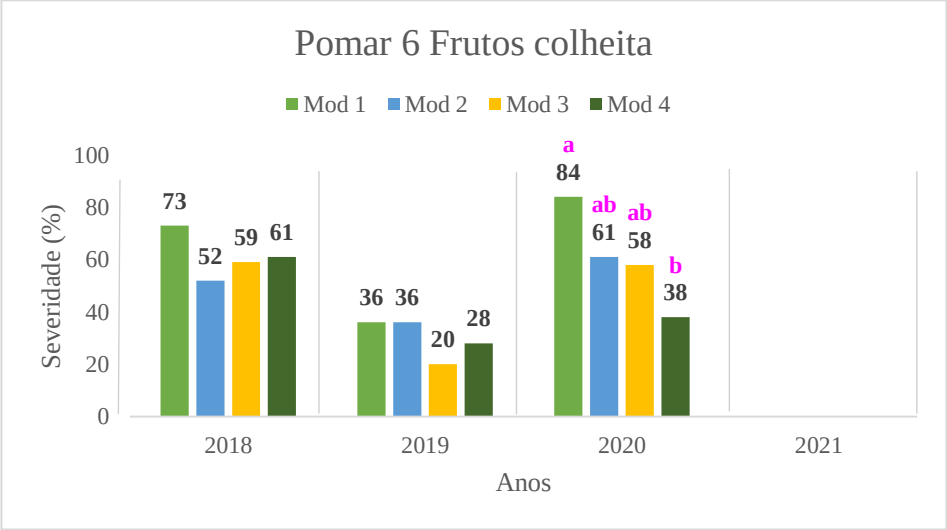

Figura 56. Severidade de Stemphylium vesicarium nas amostras de frutos à colheita no Pomar 6 ao longo dos 4 anos de ensaio. Os valores afetados pela mesma letra e pela mesma cor (a, b, c) não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.

Em suma, analisando globalmente os resultados obtidos neste projecto pode referir-se que alguns surgem em concordância com estudos anteriormente realizados outros, porém ficam muito aquém do esperado. Assim,

- As flores podem ser infetadas durante a floração o que, caso suceda, pode comprometer a produção do ano (Reis *et al* ., 2021); os sintomas nas flores são muito pouco visíveis a olho nu;
- Os frutos com 12-14 mm de diâmetro, assintomáticos, podem estar infetados com *S. vesicarium* (Comporta *et al* ., 2017);
- As folhas são o primeiro órgão no pomar em que os sintomas de doença das manchas castanhas são visíveis (Isidoro e Azevedo, 2005).
- Os frutos à colheita são os órgãos em que a incidência e a severidade de doença das manchas castanhas é mais elevada (Sousa *et al.*, 2004). Nesta época ocorrem condições de alto risco de infeção, isto é, temperatura e humidade favoráveis ao desenvolvimento da doença e presença de mais inóculo de *S. vesicarium* nos pomares.
- O aumento verificado nos valores de incidência e severidade médias de *S. vesicarium* em quase todos os pomares as folhas, mas principalmente nos frutos à colheita, justifica-se, em parte, por estas amostras apresentarem sintomas associados à doença das manchas castanhas.
- As condições meteorológicas (temperaturas elevadas e humidade relativa baixa) que ocorreram nos pomares podem também não ter sido as mais favoráveis ao desenvolvimento dos agentes de biocontrolo comprometendo a sua eficácia (Llorente *et al* ., 2010).
- Quanto à modalidade 4 (FruitCare, fosfato de monoamónio e lixívia) na maioria dos pomares não diferiu da testemunha exceto no pomar 6, em que a aplicação de lixívia diferiu da testemunha nos frutos à colheita. A lixívia é um biocida que atua apenas superficialmente nos detritos das culturas, destruindo momentaneamente os microrganismos. Acresce ainda que, as pseudotecas de *S. vesicarium*, presentes nos detritos das culturas, são estruturas de resistência e, por isso, dificilmente são afetadas pela lixívia (C. Rego, comunicação pessoal).
- Entre os resultados obtidos não houve diferenças significativas entre modalidades em cada pomar para a maioria das amostras. Tal revela que as modalidades não se diferenciaram entre si, ou seja, comportaram-se de forma idêntica independentemente da (o) pratica/produto em cada modalidade.

- Esta situação sugere que independentemente do meio de luta cultural que se adote o histórico de doença das manchas castanhas, a idade do pomar, a agressividade dos isolados e/ou as edafoclimáticas que lhe estão associadas podem ter influenciado os resultados (Comporta *et al* ., 2017). Um pomar onde o histórico de doença seja elevado, à uma acumulação de inóculo potencial no solo é maior (Comporta *et al* ., 2017) podendo tornar-se impercetível o efeito das modalidades em ensaio. Por exemplo, o pomar 3 com histórico baixo e 10 anos de idade revelou valores baixos de incidência e severidade ao longo dos 4 anos de ensaio enquanto no pomar 5 com histórico médio e com 6-7 anos de idade, os valores de incidência e severidade foram bastante elevados.
- Talvez a antecipação da época de remoção/aplicação dos produtos em cada modalidade, pudesse conduzir a uma maior eficácia das modalidades, pois o inóculo potencial seria reduzido o que limitaria as infeções de *S. vesicarium*.

3. Ensaios de patogenicidade com *Stemphylium* vesicarium e *Alternaria* sp.

3.1. Introdução

Em 2018 e 2019 constatou-se que, nos isolamentos microbiológicos realizados a partir das amostras de material vegetal, não se desenvolvia apenas *S. vesicarium* e que, por vezes, nem era a espécie predominante (Rego *et al* ., 2021). Assim, nos anos seguintes (2020, 2021), procedeu-se à identificação da maioria das espécies de fungos que eram isolados a partir das amostras de material vegetal colhido. Para além de *Stemphylium vesicarium* foram identificadas espécies dos géneros, *Alternaria, Botrytis, Penicillium, Rhizopus, Trichoderma e Epicoccum* (Francisco, 2021, Rego *et al* ., 2021).

Em 2021, apurou-se que *Alternaria* sp. foi predominante nas amostras de folhas com sintomas em todos os pomares, tendo a sua máxima expressão no pomar 3, com 80%. *Alternaria* sp. e *S. vesicarium*, em conjunto, explicaram a quase totalidade dos fungos presentes nos isolamentos das folhas (Francisco, 2021). Em relação à identificação dos géneros de fungos presentes nas amostras de frutos com sintomas à colheita, *Alternaria* sp. e *S. vesicarium* foram os dominantes em todos os pomares. *Alternaria* sp. foi superior a *S. vesicarium* nos pomares 2 (37%), 3 (69%) e 5 (31%) e *S. vesicarium* foi o fungo dominante nos pomares 4 (45%) e 6 (61%). Verificou-se também que *Botrytis* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Epicoccum* sp. não se desenvolveram ou tiveram uma expressão muito baixa nos isolamentos dos frutos com sintomas à colheita em todos os pomares (Francisco, 2021).

Estes resultados apurados em dois anos consecutivos nos seis pomares em estudo questionam a etiologia da doença das manchas castanhas podendo esta ser causada um complexo de fungos constituído por *S. vesicarium* e *Alternaria* sp. Este último poderá comportar-se como fungo oportunista, instalando-se nas manchas existentes (Santos, 2019; Dias, 2020) ou, como patogénico infetando o hospedeiro.

Neste capítulo pretendeu-se esclarecer esta hipótese realizando testes de patogenicidade com isolados *Alternaria* sp. e *S. vesicarium* obtidos em 2021 nos seis pomares em ensaio (cumprimento dos Postulados de Koch).

3.1.1. Breve revisão de *Alternaria* sp.

O género *Alternaria* é associado a mais de 4000 espécies de plantas, tendo a capacidade de infetar uma enorme gama de hospedeiros, como fruteiras, leguminosas, brássicas, plantas ornamentais e animais (Lawrence *et al* ., 2013; Thomma, 2003). As espécies saprófitas de *Alternaria* são responsáveis por grandes perdas de produção, conseguindo colonizar culturas

como fungos oportunistas, causando deterioração após a colheita e durante o armazenamento, podendo ser encontradas em tecidos de plantas hospedeiras senescentes, ou previamente infetadas (Henriques, 2018; Lawrence *et al* ., 2013; Pavón *et al* ., 2015). As espécies patogénicas são responsáveis por prejuízos nas culturas ou durante o armazenamento (Armitage *et al* ., 2015; Henriques, 2018; Lawrence *et al* ., 2013; Thomma, 2003; Woudenberg, 2015).

Alternaria alternata infecta pereiras, principalmente das cultivares Nijisseiki e Ya Li no Japão e na China, respetivamente (Pavón *et al* ., 2015). A doença desenvolve-se principalmente em folhas e frutos, as necroses aparecem pela primeira vez em forma de pequenas manchas pretas nas folhas, que caem prematuramente em caso de infeções fortes, por sua vez, nos frutos, as necroses são maiores produzindo fendas e queda prematura (Pavón *et al* ., 2015).

Simmons (1967) identificou de 276 espécies de *Alternaria*, baseado na conidiogénese e nas características dos conídios (Patriarca & Pinto, 2018a). O desenvolvimento de técnicas moleculares menos ambíguas para a identificação das espécies tem permitido a validação de estudos clássicos baseados exclusivamente na morfologia das espécies, descobrir novas espécies e identificar a relação filogenética no género de *Alternaria* e entre géneros próximos (Henriques, 2018). Atualmente, a identificação do género da *Alternaria* baseia-se na análise morfológica cultural e molecular de isolados (Lawrence *et al* ., 2016).

Diversas espécies de *Alternaria* spp. podem ser isoladas a partir de órgãos afetados previamente por outros fungos, tais como *A. alternata* ou *A. tenuissima* tendo já sido descritas em plantas como pepino, mirtilos, maça e algumas ervas daninhas (Lawrence *et al.*, 2016). Um estudo realizado na Holanda permitiu identificar *Alternaria arborescens* e *Alternaria alternata* em *Pyrus communis* causando a morte de botões florais (Wenneker *et al.*, 2019).

A espécie de *A. alternata* produz colónias de coloração negra a preto-oliváceo por vezes acinzentada, com rápido crescimento em laboratório. Em gelose de batata dextrosada (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), esta espécie pode atingir um diâmetro que varia entre 33 a 72 mm em sete dias a 25 + 1°C, na obscuridade (Ali *et al* .,2006; Durand, 2017). De acordo com Simmons e Roberts (1993), os conidióforos primários curtos e eretos e cadeias entre 2 a 6 conídios que formam conidióforos secundários a partir dos quais se produzem cadeias curtas de 1 a 5 conídios (Andersen *et al* ., 2002; Bessadat *et al* ., 2016; Serdani *et al* ., 2002). Os conídios podem ser obclavados, obpiriformes, ovóides ou elipsoidais, por vezes com um hilo cónico ou cilíndrico, hialinos a castanho-dourados ou castanho-escuros (Ali *et al* ., 2006; Bessadat *et al* ., 2014; Dube, 2014; Devappa *et al* ., 2016).

Quanto à espécie *A. arborescens* é reconhecido pela presença de conidióforos primários longos, ocasionalmente com algumas ramificações subterminais e um aglomerado terminal de cadeias que lhe confere um aspeto arborescente (Patriarca e Pinto, 2018). Os conidióforos primários são longos. O primeiro conídio da cadeia pode ser até duas vezes maior que o conídio que o precede (Andersen *et al* ., 2002); Wenneker *et al.*, 2019). Os conídios apresentam-se ovóides, obpiriformes ou elipsoidais, por vezes apresentando um hilo apical afunilado, bronzeados a castanho-claros (Akhtar *et al* ., 2014; Bessadat *et al* ., 2014). As colónias são castanho-bronzeadas a pretas, com textura feltrosa, margem irregular e crescimento rápido em PDA na obscuridade a 20°C (Wenneker *et al.*, 2019).

A maioria das espécies de *Alternaria* sp. sobrevivem sobre a forma de micélio ou conídios em detritos de culturas, no ar ou no solo (Patriarca & Pinto, 2018b; Pavón *et al* ., 2015; Woudenberg, 2015; Woudenberg *et al* ., 2013). A dispersão do fungo pode ocorrer através do vento, água, insetos entre outros. A presença de melanina, nos esporos e nas paredes celulares do fungo, permite a proteção destas estruturas do efeito da radiação e condições adversas, determinando a capacidade de dispersão, contaminação e resistência ao fungo (Patriarca & Pinto, 2018b). Em condições adequadas os conídios de *Alternaria* sp germinam e produzem tubos germinativos que penetram nos estomas, cutículas ou feridas (Thomma, 2003). A penetração no hospedeiro pode ocorrer com formação de apressórios e com a consequente produção de toxinas e/ou enzimas (Thomma, 2003).

A espécie *A. alternata* pode hibernar no solo, em sementes, resíduos de cultura infetados ou tecidos de hospedeiro, sob a forma de micélio e/ou conídios. Estes esporos podem ser transportados pelo ar, através da variação de humidade no ar ou com a exposição à luz (Troncoso-Rojas e Tizndo-Hernández, 2014).

Existe diversa informação quanto às condições climáticas em que a *Alternaria* sp se desenvolve. De acordo com Harteveld,. (2014), as condições ambientais que permitem a infeção e o desenvolvimento da doença variam consoante as regiões. Nos EUA, as condições ótimas para *A. mali* iniciar a infeção foliar foram 5 horas de período de humectação nas folhas e uma temperatura de 24ºC. enquanto no Japão, as condições ideais para a infeção foliar ocorreram entre os 28°C a 30°C (Harteveld *et al* ., 2014). De acordo com Troncoso-Rojas e Tizndo-Hernández, (2014), a temperatura ótima para a germinação em vários estudos demonstrou ser os 25°C, quase para todas as espécies de *Alternaria* . Contudo, consoante o hospedeiro, a temperatura ótima para o desenvolvimento de *Alternaria* sp pode variar em função do período de humectação (Hatzipapas *et al.*, 2002). No caso dos citrinos, as condições

ótimas para a infeção por *Alternaria* variam entre os 23 - 27 °C e, para uma pequena infeção basta um período de humectação de 4 a 8 horas e para uma infeção mais severa é necessário um período de humectação de 10 a 12 horas nas folhas sob a forma de orvalho ou precipitação. Assim, quanto menor a temperatura maior terá de ser o período de humectação para que a infeção ocorra (Akimitsu *et al* ., 2003; Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández, 2014).

Temperaturas distintas podem indicar uma reação especifica do hospedeiro, sendo necessário condições especificas. Por exemplo, a temperatura ótima de infeção por *Alternaria alternata* para o tomateiro é de 25 °C enquanto para a maça é de 28 - 31 °C (Troncoso-Rojas e Tizndo-Hernández, 2014).

3.2. Material e Métodos

Os testes de patogenicidade foram realizados em peras 'Rocha' aparentemente sãs, sem sintomas de doença visíveis. Entre os isolados disponíveis, obtidos a partir de flores, folhas e frutos, foram selecionados 20 isolados de *S. vesicarium* e de 20 *Alternaria* sp. (Quadro 3).

Quadro 3. Identificação dos isolados de *Stemphylium vesicarium* (St) e de *Alternaria* sp. (Al) utilizados nos testes de patogenicidade

Isolado	Pomar de origem	Modalidade	Origem do isolado	Género
St1	Pomar 1	M2	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St2	Pomar 1	M3	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St3	Pomar 1	M3	Flores	*S. vesicarium*
St4	Pomar 1	M1	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St5	Pomar 2	M3	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St6	Pomar 2	M1	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St7	Pomar 3	M1	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St8	Pomar 3	M2	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St9	Pomar 3	M3	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St10	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St11	Pomar 4	M3	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St12	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*S. vesicarium*
St13	Pomar 4	M1	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St14	Pomar 5	M2	Flores	*S. vesicarium*
St15	Pomar 5	M3	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St16	Pomar 5	M1	Frutos 12-14 mm	*S. vesicarium*
St17	Pomar 6	M1	Folhas	*S. vesicarium*
St18	Pomar 6	M1	Folhas	*S. vesicarium*
St19	Pomar 6	M3	Flores	*S. vesicarium*
St20	Pomar 6	M4	Folhas	*S. vesicarium*
Al1	Pomar 1	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al2	Pomar 1	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al3	Pomar 1	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al4	Pomar 2	M2	Flores	*Alternaria* sp.
Al5	Pomar 2	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al6	Pomar 2	M4	Flores	*Alternaria* sp.
Al7	Pomar 3	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al8	Pomar 3	M2	Flores	*Alternaria* sp.
Al9	Pomar 3	M2	Flores	*Alternaria* sp.
Al10	Pomar 3	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al11	Pomar 3	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al12	Pomar 3	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al13	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*Alternaria* sp.
Al14	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*Alternaria* sp.
Al15	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*Alternaria* sp.
Al16	Pomar 4	M4	Frutos colheita	*Alternaria* sp.
Al17	Pomar 4	M2	Flores	*Alternaria* sp.
Al18	Pomar 6	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al19	Pomar 6	M3	Flores	*Alternaria* sp.
Al20	Pomar 6	M1	Flores	*Alternaria* sp.

A produção de inóculos de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp. decorreu em placas Petri contendo gelose de batata dextrosada (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) as quais foram incubadas por um período de 10 dias, a 24°C, na obscuridade.

A superfície das peras foi desinfetada com 70% de etanol e inoculada, sem lesão, com discos miceliais de 3 mm de diâmetro retirados da margem das colónias de *S. vesicarium* e de

Alternaria sp. Posteriormente, a região de inoculação foi protegida com algodão húmido e selado com "Parafilm" o que favorece a infeção e evita as contaminações.

Os frutos testemunha foram inoculados com discos de PDA de 3 mm de diâmetro e seguido o procedimento acima referido. Realizaram-se quatro réplicas por isolado e o ensaio decorreu à temperatura de 24ºC e sob condições de fotoperíodo natural.

Doze dias após a inoculação procedeu-se ao cálculo da área da mancha produzida através da medição do comprimento e largura da mancha. Calculou-se o valor correspondente a metade do comprimento e largura, fez-se a média e através da fórmula do círculo ($A = \pi r^2$) obteve-se aproximadamente a área da mancha (Figura 57).

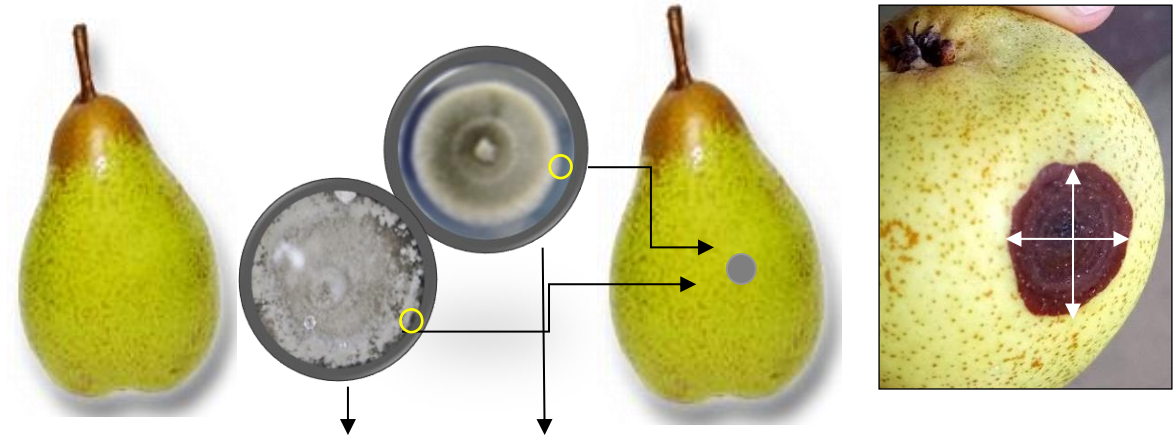

Figura 57. Esquema representativo do método de inoculação de Stemphylium vesicarium (St.) e de Alternaria sp. *(Al.) e medição do comprimento e largura da mancha.*

De seguida, foram retirados fragmentos da margem das manchas que, posteriormente, foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) (NaOCl) (30 segundos), passado por água destilada esterilizada (30 segundos) e, retirado o excesso de água num disco de papel de filtro esterilizado. Os fragmentos provenientes de cada fruto inoculado foram colocados numa placa de Petri com PDA + cloranfenicol (250mg/L) e incubados a 24°C, na obscuridade. Todos os isolamentos do material vegetal analisado foram efetuados numa câmara de fluxo laminar "FluFrance Modelo 180" (FluFrance, França). Seguiu-se um período de incubação durante 10 a 15 dias a 25,0 ± 0, numa estufa em condições de obscuridade.

Procedeu-se à identificação das colónias dos fungos que se desenvolveram com base nas características morfológicas e culturais dos fungos nomeadamente *S. vesicarium* (Hassan *et al* ., 2020; Simmons, 1969) e *Alternaria* sp. (Simmons, 2007).

Os resultados apurados foram submetidos a uma análise de variância, cujos valores se encontram no anexo 17, com recurso ao programa STATISTICA 10.0 e a comparação das médias efetuou-se recorrendo ao teste de Tukey HSD (com nível de significância de 0,05).

3.3. Resultados e Discussão

Doze dias após a inoculação de frutos destacados de pera Rocha com os 20 isolados de *S. vesicarium e* 20 isolados de *Alternaria* sp eram visíveis manchas castanhas nos frutos inoculados e a ausência dos mesmos nos usados como testemunha. Em torno do ponto de inoculação, desenvolveu-se uma mancha castanha, ligeiramente em depressão, de consistência média a dura e de contorno arredondado (Figura 58).

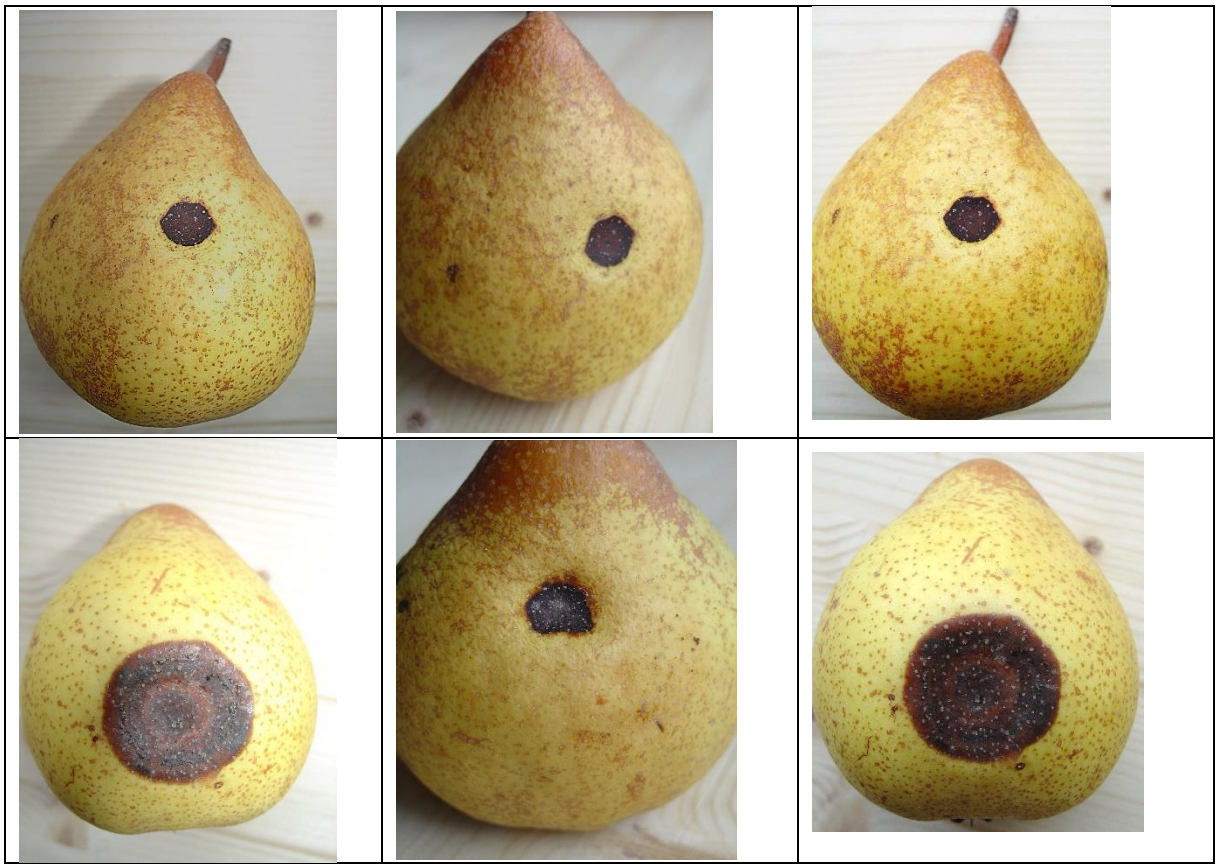

Figura 58. Manchas produzidas por diferentes isolados de Stemphylium vesicarium e Alternaria sp., *em frutos destacados de cultivar Rocha, 12 dias após a inoculação com disco de gelose contendo micélio dos isolados em estudo.*

Todos isolados de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp. originaram sintomas de doença nas peras inoculadas. As peras testemunha permaneceram assintomáticas. A análise da área das manchas e comparação respetiva das médias permitiu encontrar diferenças significativas entre agressividade entre isolados de *S. vesicarium* e *Alternaria* sp. (α=0,05) (Figura 59).

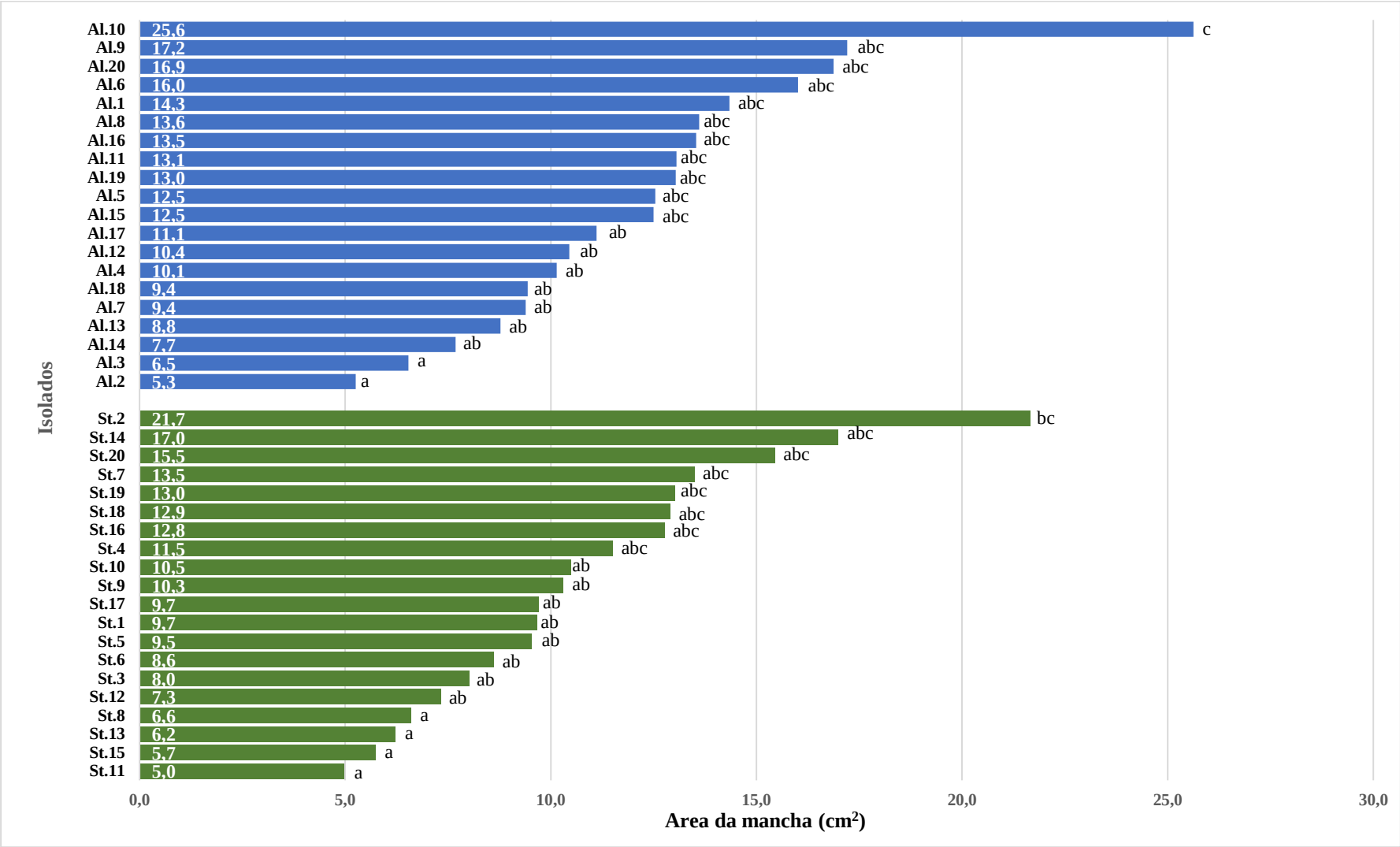

Figura 59. Área média das manchas causadas pelos isolados de Stemphylium vesicarium (St) e de Alternaria sp. *(Al) em frutos destacados de pera Rocha, ao fim de doze dias, a 24ºC e sob condições de fotoperíodo natural, os valores com a mesma letra a, b, c não diferem significativamente para α=0,05 (teste de Tukey), STATISTICA 10.0.*

Os isolados St.11, St.13, St.15, St.8, Al.2 e Al.3 revelaram causar manchas com áreas menores e diferiram significativamente do isolados St.2 e Al.10. Os isolados de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp., St12, Al.14, St.3, St. 6, Al.13, Al.7, Al.18, St.5, St.1, St.17, Al.4, St.9, Al.12, St.10, Al.17, St.4, Al.15, Al.5, St.16, St.18, St.19, Al.19, Al.11, St.7, Al.16, Al.8, Al.1, St20, Al.6, Al.20, St.14 e Al9, não diferiram significativamente entre si (Figura 59).

Analisando a agressividade dos isolados de *S. vesicarium* em conjunto com outras características dos isolados (pomar de origem, o histórico de doença das manchas castanhas, a idade do pomar, a modalidade realizada e o tipo de material vegetal) verificamos que não é possível estabelecer uma relação de causa efeito (Quadro 4).

Quadro 4. Isolados utilizados nos ensaios: referência do isolado de Stemphylium vesicarium (St) no pomar de origem, histórico da doença, idade do pomar, modalidade ensaiada, tipo de material vegetal) e resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade (área da mancha)

Isolado	Pomar de origem	Histórico de doença	Idade do pomar	Modalidade	Tipo de material vegetal	Área da mancha (cm^2)
St.11	Pomar 4	média	16 e 20	M3	Frutos colheita	5,0
St.15	Pomar 5	média	9 e 10	M3	Frutos 12-14 mm	5,7
St.13	Pomar 4	média	16 e 20	M1	Frutos 12-14 mm	6,2
St.8	Pomar 3	baixa	13	M2	Frutos 12-14 mm	6,6
St.12	Pomar 4	média	16 e 20	M4	Frutos colheita	7,3
St.3	Pomar 1	baixa	24, 29 e 47	M3	Flores	8,0
St.6	Pomar 2	elevada	24	M1	Frutos colheita	8,6
St.5	Pomar 2	elevada	24	M3	Frutos colheita	9,5
St.1	Pomar 1	baixa	24, 29 e 47	M2	Frutos colheita	9,7
St.17	Pomar 6	elevada	23	M1	Folhas	9,7
St.9	Pomar 3	baixa	13	M3	Frutos 12-14 mm	10,3
St.10	Pomar 4	média	16 e 20	M4	Frutos colheita	10,5
St.4	Pomar 1	baixa	24, 29 e 47	M1	Frutos colheita	11,5
St.16	Pomar 5	média	9 e 10	M1	Frutos 12-14 mm	12,8
St.18	Pomar 6	elevada	23	M1	Folhas	12,9
St.19	Pomar 6	elevada	23	M3	Flores	13,0
St.7	Pomar 3	baixa	13	M1	Frutos 12-14 mm	13,5
St.20	Pomar 6	elevada	23	M4	Folhas	15,5
St.14	Pomar 5	média	9-10	M2	Flores	17,0
St.2	Pomar 1	baixa	24, 29 e 47	M3	Frutos colheita	21,7

Relativamente aos isolados de *Alternaria* sp., embora não existisse informação sobre a sua possível relação com as características do pomar (Quadro 5), optamos por efetuar uma

análise semelhante à realizada para *S. vesicarium* tendo verificado que, aparentemente, também não existia uma relação entre as características e a agressividade dos isolados de *Alternaria* sp.

Quadro 5. Isolados utilizados nos ensaios: referência do isolado de *Alternaria* sp. (Al) no pomar de origem, idade do pomar, modalidade ensaiada, tipo de material vegetal) e resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade (área da mancha) *Alternaria* sp. (Al) utilizados nos testes de patogenicidade

Isolado	Pomar de origem	Idade do pomar	Modalidade	Tipo de material vegetal	Área da mancha
Al.2	Pomar 1	24, 29 e 47	M3	Flores	5,3
Al.3	Pomar 1	24, 29 e 47	M3	Flores	6,5
Al.14	Pomar 4	16 e 20	M4	Frutos colheita	7,7
Al.13	Pomar 4	16 e 20	M4	Frutos colheita	8,8
Al.7	Pomar 3	13	M3	Flores	9,4
Al.18	Pomar 6	23	M3	Flores	9,4
Al.4	Pomar 2	24	M2	Flores	10,1
Al.12	Pomar 3	13	M3	Flores	10,4
Al.17	Pomar 4	16 e 20	M2	Flores	11,1
Al.15	Pomar 4	16 e 20	M4	Frutos colheita	12,5
Al.5	Pomar 2	24	M3	Flores	12,5
Al.19	Pomar 6	23	M3	Flores	13,0
Al.11	Pomar 3	13	M3	Flores	13,1
Al.16	Pomar 4	16 e 20	M4	Frutos colheita	13,5
Al.8	Pomar 3	13	M2	Flores	13,6
Al.1	Pomar 1	24, 29 e 47	M3	Flores	14,3
Al.6	Pomar 2	24	M4	Flores	16,0
Al.20	Pomar 6	23	M1	Flores	16,9
Al.9	Pomar 3	13	M2	Flores	17,2
Al.10	Pomar 3	13	M3	Flores	25,6

O conjunto de resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade permite provar que, para além de *S. vesicarium*, *Alternaria* sp. pode ser responsável por manchas em peras, pelo menos nas condições em que os ensaios foram realizados.

Com base nos resultados obtidos, (Figura 59 e nos Quadros 4 e 5), observa-se que o isolado de St 11 tem a menor área da mancha, com 5 cm^2, pertencendo ao pomar 4 com um histórico de doença médio e uma idade do pomar entre os 16 e 20 anos. Quanto ao isolados St 2, pomar 1, é possível verificar que este causou a maior área da mancha com cerca de 21,7 cm^2 histórico de estenfiliose baixo e uma idade que varia entre os 24 anos aos 47 anos.

Quanto à Alternaria o isolado obtido do pomar 1, Al.2 tem a menor área de mancha com 5,3 cm^2 com uma idade de 24, 29 e 47 anos enquanto o isolado Al.10 possui a maior área da mancha cerca de 25,6 cm^2 localizado no pomar 3, com uma idade de 13 anos.

Estes resultados contrariam o espectável pois, seria de esperar que o pomar com um histórico de doença mais elevado tivesse uma maior área da mancha quer de *S. vesicarium* quer de *Alternaria* sp. Constata-se que a idade do pomar não está diretamente relacionada com à área da mancha e consequentemente, com a agressividade dos isoladas. Assim, os isolados provenientes de pomares com maior idade podem apresentar áreas de manchas variáveis e o mesmo se verifica para pomares com menor idade. Tomando como o exemplo o isolado de St 14 é possível verifica-se que é um dos mais agressivos embora o histórico de doença seja baixo.

Quanto às modalidades de origem dos isolados, os resultados obtidos para as áreas da mancha são muito diversos, não ocorrendo nenhuma que se destacasse particularmente. Contudo, era de presumir que a modalidade 1 apresentasse maior área da mancha, dado que não se procedeu a nenhum tratamento (mais inóculo potencial) e que, nas restantes modalidades surgissem manchas de menores dimensões pela ação dos tratamentos que tinham por objetivo a diminuição de inoculo.

O tipo de material vegetal utilizado para os testes de patogenicidade revela que para o caso do *S. vesicarium* as áreas das manchas foram menores para os isolados que tiveram origem nos frutos 12-14 mm, enquanto os obtidos a partir de as folhas, flores e frutos à colheita originaram manchas de maiores. No que diz respeito à *Alternaria* sp. as áreas das manchas foram muito diversas. Por exemplo, os isolados que tiveram origem nas flores originaram tanto os valores mais elevados quanto mais baixos de áreas de manchas.

Embora a maioria dos resultados não apresentem diferenças significativas entre si e uma relação aparente entre a origem do pomar, o histórico de doença, a modalidade e o tipo de material vegetal utilizado para os testes de patogenicidade, foi detetada a presença de isolados de *Alternaria* sp. onde se esperava encontrar apenas *S. vesicarium*. Trabalhos elaborados por Francisco, (2021) e Prencipe *et al .,* (2022) permitiram identificar a presença desta espécie. Constatou-se que embora o *S. vesicarium* fosse o patogénico mais frequentemente isolado a partir das manchas das doenças castanhas na Pera Europeia, também se isolaram espécies de *Alternaria* (Prencipe *et al .,* 2022). Neste estudo, foram identificadas *A. arborescens, A. alternata* e outras espécies de *Alternaria*. Verificaram que todos os isolados de *Alternaria* spp. foram patogénicos sem diferenças no início do desenvolvimento e entre isolados de fruto e folhas. Os isolados em estudo produziam manchas negras tanto em frutos (com lesão), por

inoculação de conídios quer em frutos (sem lesão) por inoculação de micélio (Prencipe *et al* ., 2022). Conclui-se ainda que os isolados de *Alternaria* spp. em estudo colonizam as peras (com ou sem lesão) e causavam sintomas de podridão negra mesmo em frutos imaturos (Prencipe *et al* ., 2022).

Considerando que a *A. alternata* foi previamente associada à morte de botões florais na pera europeia e na pera do japão, o estudo realizado por Prencipe *et al* ., (2022) demonstra que para além da espécie anteriormente referida, outras espécies de *Alternaria* estão associadas à doença das manchas nas peras, que era apenas associada a *S. vesicarium*.

Ao longo do projeto GO Protecestenfilio constatou-se uma maior eficácia relativamente à doença quando nos pomares se optava pela aplicação de produtos fitofarmacêutico em mistura (um produto fitofármaco específico para *S. vesicarium* e, um outro com um maior espetro de ação maior) (Rego, comunicação pessoal). Esta ocorrência positiva poderá estar relacionada com o facto de a doença das manchas castanhas não estar associada apenas a um patogénio, mas sim, a complexo de fungos patogénicos. Esta prática conduz a maiores gastos por parte do agricultor, embora esse valor possa ser amortizado com a redução doença e consequente aumento de produção em quantidade e qualidade.

A utilização intensa e consecutiva de produtos fitofarmacêuticos acarreta riscos ambientais e de aparecimento de populações resistentes. Além disso, as alterações climáticas, nomeadamente, o aumento da temperatura média pode afetar o desenvolvimento precoce de *Alternaria* sp. causando contaminações mais severas (Prencipe *et al* ., 2022). mais severas. Neste sentido, é de extrema importância o estudo da alteração destes parâmetros e complexo de fungos associados à doença para delinear uma proteção fitossanitária holística e sustentável.

4. Conclusão

O presente trabalho contribuiu para esclarecer aspetos relativos à doença das manchas castanhas nomeadamente em relação aos meios de luta. Ao longo de quatro anos, em seis pomares, avaliou-se a eficácia de um conjunto de meios de luta, técnica cultural, agente de controlo biológico e biocida na redução de inóculo potencial de *S. vesicarium*.

Os resultados da incidência e da severidade da doença revelaram que as modalidades estudadas, nomeadamente a modalidade 1 (testemunha) sem remoção de material vegetal, a modalidade 2, com remoção do material vegetal e a modalidade 3 e 4, com a aplicação ao solo de agentes de controlo biológico e biocidas, respetivamente. Os resultados apresentados são muito variáveis entre as amostras recolhidas e ao longo dos anos. Era previsível que com quatro anos de ensaio, o efeito das modalidades comece a ser observado de forma gradual e a diminuição de inóculo nas mesmas seja mais evidente. Apesar dos resultados das modalidades, todos os meios de luta culturais que conduziram à redução de inóculo nos pomares são importantes e devem ser adotados, pois contribuem para a diminuição da presença do fungo, e, assim, da incidência da doença.

A identificação das espécies de fungos isoladas a partir das diferentes amostras vegetais analisadas ao longo de dois anos permitiu pôr a hipótese da doença das manchas castanhas não ser apenas causada por *S. vesicarium* mais sim, por um complexo de fungos patogénicos, nomeadamente, *S. vesicarium* e/ou *Alternaria* sp.

Os ensaios de patogenicidade realizados em peras Rocha destacadas revelaram que isolados de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp. causavam sintomas nos frutos semelhantes entre si e característicos da doença das manchas castanhas. A agressividade dos isolados mostrou-se variável e independente das características do pomar de origem. Estes resultados obtidos em laboratório devem ser confirmados em ensaios de campo.

Estes resultados têm consequências diretas na eficácia da proteção fitossanitária a adotar nos pomares. Esta deverá incluir boas praticas culturais e utilização em de produtos fungicidas naturais, biológicos e/ou de síntese que relevem eficácia relativamente a *Alternaria* sp e *S. vesicarium* Também é importante referir que é provável que ocorra um aumento relativo da importância de *Alternaria* sp. em detrimento de *S. vesicarium* resultado do aumento da temperatura que favorece as espécies deste género.

Embora os valores obtidos no projeto ProtecEstenfilio tenham sido dispares e confusos, os estudos sobre a doença das manchas castanhas revestem-se de elevado interesse para sector

frutícola nacional. Assim, perspetivam-se algumas linhas de investigação, que visam esclarecer dúvidas decorrentes dos estudos realizados.

Destacam-se as seguintes:

- Dar continuidade às ações de colheitas de material vegetativo em pomares selecionados, com o objetivo de avaliar as populações de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp.;
- Enriquecer a coleção de *S. vesicarium* e de *Alternaria* sp., atualmente existente, com novas aquisições que incluam isolados de outros hospedeiros;
- Identificar a espécie do género *Alternaria* envolvida na doença das manchas castanhas.

Pesquisar novos meios de luta que possam complementar ou constituir alternativa aos ensaiados no projeto ProtecEstenfilio.

5. Referências Bibliográficas

Afonso, C. (2021). Ano de oportunidade para a pêra rocha? *Frutos, Legumes e Flores* 74 - 78.

Akhtar, N., Bashir, U., Mushtaq, S. (2014). First report of leaf spot of rice Caused by *Alternaria arborescens* in Pakistan. *Plant Disease* 98: 846.

Akimitsu, K., Peever, T. L., & Timmer, L. W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding Alternaria diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology* 4(6): 435 - 446.

Ali, A., Akhtar, N., Mirza, J.H., Bajwa, R. (2006). Addition to micromycetes of Lahore, Pakistan. *Mycopath*. 4: 17 - 25.

Andersen, B., Krøger, E., Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* 106: 170 - 182. https://doi.org/10.1017/S0953756201005263 .

ANP (Associação Nacional de Produtores de Pera "Rocha.") (2021). *História da Pera "Rocha". Associação Nacional de Produtores de Pera "Rocha"*. https://perarocha.pt/pera-rocha/ , acedido a 28 de Novembro de 2021.

Armitage, A. D., Barbara, D. J., Harrison, R. J., Lane, C. R., Sreenivasaprasad, S., Woodhall, J. W., Clarkson, J. P. (2015). Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal Biology* 119, 994 - 1006. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.012.

Aveling, T., Naude, S. (1992). First report of *Stemphylium vesicarium* on garlic in South Africa. *Plant Disease* 76: 4.

Bessadat, N., Berruyer, R., Hamon, B., Bataille-Simoneau, N., Benichou, S., Kihal, M., Henni, D.E., Simoneau, P. (2016). *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* 148: 181 - 197.

Bessadat, N., Simoneau, P., Benichou, S., Setti, B., Kihal, M., Henni, D.E. (2014). Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* sp. causing leaf blight of solanaceous plats in Algeria. *African Journal of Agricultural Research* 8.

Blancard D., Allard E., Brest P. (1989). La stemphyliose du poirier ou ‘‘macules brunes’’. *Phytoma* 406: 37 - 39.

Bloesch, B., Viret, O. (2013). Stades phénologiques repères des fruits à pépins (pommier et

poirier). *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 45: 128 - 131.

Comporta, T., Reis, P., Mota, M., Oliveira, C., Rego, C. (2017). Estenfiliose da pêra Rocha II. *Frutas, Legumes e Flores* 174: 26.

Devappa, V., Thejakumar, M.B. (2016). Morphological and physiological studies of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease of Chilli (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Applied and Pure Science and Agricultur*e 2: 26 - 30.

Dias, D. (2020). *Monitorização da estenfiliose em ensaios de campo da FRUTOESTE, CRL*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Diogo, E., Sánchez, C., Leão, M., Sousa, R. (2017). A Estenfiliose da Pereira Rocha em Portugal. *Agrotec* : 46 - 48.

Dube, J.P., (2014). *Characterization of* Alternaria alternata *isolates causing brown* spot *of potatoes in South Africa*. MSc Thesis, University of Pretoria, Petroria, Africa do Sul.

Durand, A.M.A. da S. (2017). *Alternariose em couve-brócolo no Ribatejo e Oeste*. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

Francisco, C. (2021). *Doença das manchas castanhas da pereira "Rocha":contributo para a proteção.* Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal.

Gazzetti, K., Diaconu, E., Nanni, I., Ciriani, A., Collina, M. (2019). Genome Sequence Resource for *Stemphylium vesicarium*, causing Brown Spot Disease of Pear. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32: 935 - 938. https://doi.org/10.1094/mpmi-11-18-0299-a.

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

GPP (2021). *Informção sobre produtos*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas, Gabinete de Planeamento e Políticas, Lisboa, Portugal. https://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos

GPP (2020). *Informção sobre produtos*. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas, Gabinete de Planeamento e Políticas, Lisboa, Portugal. https://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos.

Harteveld, D. O. C., Akinsanmi, O. A., Chandra, K., & Drenth, A. (2014). Timing of infection and development of Alternaria diseases in the canopy of apple trees. *Plant disease 98*(3): 401 - 408. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0676-RE

Hassan, M., Yousuf, V., Bhat, Z., Bhat, N., Shah, T., Khan, M., Mir, R., Rather, R., Shafi, S. (2020). Morpho-cultural and pathogenic variability among isolates of *Stemphylium vesicariu*m (Wallr.) E. Simmons, causing Stemphylium blight in onion collected from different geographical regions of Kashmir valley. *Indian Phytopathology* 73: 469 - 481. https://doi.org/10.1007/s42360-020-00253-8.

Hatzipapas, P., Kalosaka, K., Dara, A., Christias, C. (2002). Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research* 106: 1349 - 1359. https://doi.org/10.1017/S0953756202006792.

Henriques, B. (2018). *Contribuição para o estudo de fungos do género Alternaria em solanáceas no Ribatejo e Oeste Beatriz Galvão Camelo dos Reis Henriques.* Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Heijne B. Mourik J. 2001. Zwartvruchtrot op peer neemt toe. *Fruitteelt Den Haag* 91: 18 - 19.

INE (2018). *Estatísticas Agrícolas 2017* - Instituto Nacional de Estatística (INE), I.P. Av. António José de Almeida 1000-043 Lisboa Portugal.

INE (2020). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas, novembro 2020*. Instituto Nacional de Estatística (INE), I.P., Lisboa, Portugal.

INE (2021). *Previsões agrícolas:31 de julho de 2021*. Instituto Nacional de Estatística (INE), I.P., Lisboa, Portugal.

IPMA (2020a). *Normais climatológicas.* Instituto Português do Mar e da Atmosfera, http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/, acedido a 27 de novembro de 2021.

IPMA (2020b). *Horas de frio acumuladas para fruteiras - atualização diária.* Instituto Português do Mar e da Atmosfera,Lisboa, Portugal. https://www.ipma.pt/pt/agrometeorologia/fruta/index.jsp?page=dthto_co.xml, acedido a 30 de novembro de 2021.

Isidoro N., Azevedo J. (2005). Estenfiliose (*Stemphylium vesicarium*) da pereira 'Rocha', na região do Oeste. *In Manual Técnico de Produção Integrada de pera 'Rocha'*, Projecto AGRO nº 1, Cadaval, Portugal, 87 - 98.

Jong, P.F., Heijne, B. (2008). Exclusion of the inoculum source of brown spot (*Stemphylium vesicarium*). *In Acta Horticulturae* 800: 833 - 838. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.113.

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

Pathology 137: 609 - 619. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0274-8.

Köhl, J., Groenenboom-De Haas, B., Goossen-Van De Geijn, H., Speksnijder, A., Kastelein, P., De Hoog, S., Gerrits Van Den Ende, B. (2009). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124: 151 - 162. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9402-2.

Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105: 530 - 546. https://doi.org/10.3852/12-249.

Lawrence, D. P., Rotondo, F., Gannibal, P. B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15. https://doi.org/10.1007/s11557-015-1144-x.

Llorente, I., Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease* 90: 1368 - 1375. https://doi.org/10.1094/PD-90-1368 .

Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function* 26: 239 - 245. https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1.

Llorente, I., Vilardell, A., Montesinos, E. (2006). *Infection Potential of Pleo*spora *allii and Evaluation of Methods for Reduction of the Overwintering Inoculum of Brown* Spot *of Pear*. Plant Disease 90: 1511 - 1516. https://doi.org/10.1094/PD-90-1511 .

Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P., Pattori, E., Bugiani, R., Rossi, V., Montesinos, E. (2010). Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *European Journal of Plant Pathology* 128: 127 - 141. https://doi.org/10.1007/s10658-010-9637-6.

Loon, L., Rep, M., and Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135 - 162. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425 .

Mamgain A, Roychowdhury R, Tah J. (2013). Alternaria pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology* 1: 1 - 9.

Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P. (1995). *Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by Stemphylium vesicarium and influence of leaf and fruit age. Plant Disease* 79: 471 - 473. https://doi.org/10.1094/PD-79-0471.

Moragrega, C., Puig, M., Ruz, L., Montesinos, E., Llorente, I. (2018). Epidemiological features

and trends of brown spot of pear disease based on the diversity of pathogen populations and climate change effects. *Phytopathology* 108: 223 - 233. https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0079-R.

Mota, M., Cabanas, A., Reis, P., Comporta, T., Oliveira, C., Rego, C. (2019). *Stemphylium vesicarium: diferentes isolados têm diferentes virulências e causam diferentes problemas no pomar*. AGROINOV nº7, 20 pp.

Patriarca, A., Pinto, V. (2018). *Alternaria*. *Reference Module. In Food Science* 1 - 8,Elsivier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22572-9

Pavón, M., Gonzalez, I., Martín, R., García, T. (2015). Importancia del género *Alternaria* como patógeno de cultivos vegetales (I). *Phytoma España 265*: 46 - 50.

Pereira, V., Sousa, L., Sousa, A., Pais, M. (2015). Mechanisms of resistance/tolerance of Pyrus communis to *Stemphylium vesicarium*. A transcriptome analysis. *Agroforestry Systems* 89: 991 - 1017. https://doi.org/10.1007/s10457-015-9831-9.

Ponti I., Cavanni P., Brunelli A. (1982). "Maculatura bruna" delle pere: eziologia e difesa. *Inform Fitopat.* 3: 35 - 40.

Portal do Clima. (2020). Site do Portal do Clima. http://portaldoclima.pt/pt/, acedido a 28 de novembro de 2021.

Prencipe, S., Meloni, G. R., Nari, L., Schiavon, G., & Spadaro, D. (2022). Pathogenicity, molecular characterization and mycotoxigenic potential of *Alternaria* spp. agents of black spots on fruit and leaves of *Pyrus communis* in Italy. *Phytopathology* 10.1094/PHYTO-03-22-0103-R.

Rego C., Cabanas A., Mota M., Oliveira C. (2019). *A estenfiliose e as infestantes*. AGROINOV Fruticultura nº 6, 28pp.

Rego, C., Pedro Luz, J., Azevedo, J., Dias, A., Garcia, A., Cabanas, A., Oliveira, C., Mota, M., Francisco, C., Amaro, C., Rasteiro, C., Garcia, D. F. A., Dionísio, Z., Antunes, R., Aniceto, M., Dias, D., Isaque, S., Gomes, R., Batista, M. J., Martins, C. (2021). GO ProtecEstenfilio - Estudar a evolução da estenfiliose na cultura da pereira "Rocha" e aplicar um conjunto de práticas que permitam minimizar o impacto da doença, com base na utilização otimizada dos recursos. *In Grupos Operacionais de Fruticultura 2018-2022*. (2022) C. Martins e M. Simões (Eds.), Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional - Centro de Competências (COTHN-CC), Alcobaça, 283–342.

Reis, P., Mota, M., Rego, C., Oliveira, C., Comporta, T. (2018). Incidence and pathogenicity of brown spot disease in ' Rocha' pear Portuguese orchards. *In Acta Horticulturae* 1303:

335 - 342. DOI:10.17660/actahortic.2021.1303.47.

Rossi, V., Pattori, E., Giosué, S., Bugiani, R. (2005). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology* 111: 361 - 370. https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3 .

Rossi, Vittorio, Pattori, E., Bugiani, R. (2008). Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear. *European Journal of Plant Pathology* 121: 147 - 159. https://doi.org/10.1007/s10658-007-9258-x.

Santos, R. R. (2019). *Incidência e severidade de estenfiliose em pereira ' Rocha ' no Oeste e avaliação da eficácia biológica de fungicidas*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal, 83 pp. https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/18392.

Serdani, M., Kang, J., Andersen, B., Crous, P.W. (2002). Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106: 561 - 569.

Simmons, E. (1969). Perfect states of Stemphylium. *Mycologia 60*: 1 - 26. https://doi.org/10.1080/00275514.1969.12018697.

Simmons, E. (2007). *Alternaria*: *An Indentification Manual*. *CBS Biodiversity Series,* 6. American Society of Microbiology Washington D.C., USA, 775pp.

Simmons, E.G., Roberts, R.G. (1993). *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon* 48: 109 - 140.

Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., Kohmoto, K. (1999). Purification and Biological Characterization of Host-Specific SV-Toxins from *Stemphylium vesicarium* Causing Brown Spot of European Pear. *Phytopathology* 89: 947 - 953.

Singh, P., Park, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., Kohmoto, K. (2000). Effects of host-selective SV-toxin from Stemphylium vesicarium, the cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. *Journal of Phytopathology* 148: 87 - 93. https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00474.x.

Soares J., Silva A. Alexandre J. (2001). O Livro da pera 'Rocha' - Volume Primeiro. ANP-Associação Nacional de Produtores de Pera 'Rocha', Cadaval, Portugal, 183 pp.

Sousa A., Oliveira H., Rego C., Sousa R., Valdiviesso T., Godinho J. Branco J. (1998). "Stemphyliose" da pereira em Portugal. *In Actas da 2ª Reunião Bienal da Sociedade*

Portuguesa de Fitopatologia, 24-25 (Setembro), Oeiras, Portugal, 68-75.

Sousa R. (2020). Entrevista "Estenfiliose da pereira: como está a região oeste a lidar com a doença?". Syngenta Portugal. *Blog Alimentar com Inovação*. https://blog.syngenta.pt/estenfiliose-da-pereira-como-esta-a-regiao-oeste-a-lidar-com-a-doenca/, acedido a 10 de Dezembro de 2020.

Sousa, A., Pina, A., Sousa, A. (2004). A Stemphyliose da Pereira Rocha em Portugal - Perspectivas para os seu controlo. *Cadernos Rurais,* Nº2, 1 - 23. http://www.cothn.pt/publicfiles/xnievuqu4dd5zle866c7vzoouqbejarvaxrjla5n.pdf .

Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225 - 236. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x .

Toselli, M., Sorrenti, G., Quartieri, M., Baldi, E., Marcolini, G., Solieri, D., Marangoni, B., Collina, M. (2012). Use of Soil-and Foliar-Applied Calcium Chloride To Reduce Pear Susceptibility To Brown Spot (*Stemphylium vesicarium*). *Journal of Plant Nutrition* 35: 1819 - 1829. https://doi.org/10.1080/01904167.2012.706678 .

Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E. (2014). *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In *Postharvest Decay, Control Strategies,* 143-187. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3.

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

Vilardell P. (1988). *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. *Fruticult Profesional,* 18: 51 - 55.

Walton J. (1996). Host-selective toxins: Agents of compatibility. *Plant Cell* 8: 1723 - 1733. https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1723.

Wenneker, M., Pham, K. T. K., Woudenberg, J. H. C., Thomma, B. P. H. J. (2019). Identification of *Alternaria* spp. as causal agent of dead flower buds disease of pear (Pyrus communis) in the Netherlands and methods for disease control. *European Journal of Plant Pathology* 155: 967 - 981. https://doi.org/10.1007/s10658-019-01827-7.

Woudenberg, J. H. C. (2015). *Restyling Alternaria*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology 75*: 171 - 212. https://doi.org/10.3114/sim0015.

6. Anexos

Anexo 1. Ficha técnica do produto Tigre (Crimolara, Portugal).

CRIMOLARA S. A.

TIGRE

TIGRE - Controlo de Fungos

Bioinovação Agrícola

COMPOSIÇÃO	
Matéria Seca	51%
Matéria Orgânica	38%
N	3%
Cu*	4,5%
Aminoácidos Livres	4,2%
Peso Específico	1,28g/cm²

* solúvel em água e complexado por ácido heptaglucónico

ORIGEM:
Concentrado aquoso de extracto e seiva de várias plantas comestíveis, rico em aminoácidos procedentes de hidrólise enzimática, enriquecido por sua vez com cobre.

CRIMOLARA

Campo Grande,30-8.ºH
1700-096 Lisboa

Tel: 217 818 940
Fax: 217 818 969
Correio electrónico: geral@crimolara.pt

Autorizado em Modo de Produção Biológico

PRODUTO ÚNICO DE TRIPLA ACÇÃO:
1) Amplo espectro
2) Estimula as defesas internas da planta
3) Nutricional

Não promove a criação de resistência dos fungos

Amplo espectro de eficácia

Produto de elevada vida útil

Principais Benefícios:
1. Defesa da planta de forma natural
2. Accão preventiva contra fungos foliares
3. Travao desenvolvimento do fungo uma vez detectado
4. Efeito dessecante nas zonas atingidas e nos cortes de colheita
5. Complemento nutricional
6. Resíduo zero
7. Não tem intervalo de segurança

UTILIZAÇÕES RECOMENDADAS VIA FOLIAR

Uso Preventivo—2cc/L (cada 7-10 dias)

Uso Curativo—3cc/L (cada 5-7dias)

CRIMOLARA
Produtos Químicos, S.A.

Anexo 2. Ficha técnica do produto Condor Shield (Crimolara, Portugal), em espanhol.

FICHA TÉCNICA

APROVADO
Dep. Qualidade

CONDOR SHIELD

SECCIÓN 1: IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DEL FABRICANTE

1.1 Identificador del producto.

NOMBRE DEL PRODUCTO:
CONDOR SHIELD

CATEGORÍA DEL PRODUCTO:
Medio de defensa fitosanitario y estimulante biológico.

FABRICANTE: ATENS, S.L.:
Agrotecnologías Naturales, S.L. (ATENS): Ctra.T-214, s/n, Km.4,125 - 43762 La Riera de Gaià. - Apdo. de Correos 260 43830 Torredembarra (Tarragona) - Tel. (34) 977 655 793 - Fax. (34) 977 655 856.

SECCIÓN 2: DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO.

GÉNERO Y ESPECIE DE LOS HONGOS CONTENIDOS EN EL PRODUCTO:
Trichoderma koningii cepa TK7 exclusiva de Atens.

CANTIDAD DE MICROORGANISMOS VIABLES:
10^9 esporas de *Trichoderma koningii* por g. del producto.

COMPOSICIÓN CUALI-CUANTITATIVA:

Materia orgánica	56%
Trichoderma koningii	($1x10^9$ CFU/g)
Bacterias de la rizosfera	(10^3 CFU/g)

Azúcares solubles, esporas de Trichoderma koningii.

PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

Granulometría: < 120 µm.
Solubilidad: > 95%
Densidad aparente o peso específico: 0.5 Kg/L
Color: blanco verdoso
Materia seca: 97%
Materia Orgánica: 65%
pH en agua (1:5): 4.5
N: 0.2%
P_2O_5: 0.3%
K_2O: 0.2%

VENCIMIENTO O CADUCIDAD DEL PRODUCTO:
12 meses a temperatura ambiente, 18 meses refrigerado (Si se cumplen las siguientes medidas de seguridad: No exponer directamente a los rayos del sol. Mantener en un lugar fresco y seco).

MEDIO EN EL QUE SE ENCUENTRA SUSTENTADO CON SUS CARACTERÍSTICAS:
CONDOR SHIELD es un producto biológico natural compuesto por propágulos de *T. koningii* que estimulan el desarrollo y las defensas vegetales, mezclados homogéneamente con sustratos y excipientes solubles que actúan como carrier y estimulantes de la propia actividad del hongo. Las riquezas que estos sustratos le confieren al inóculo en cuanto a elementos nutricionales, así como otras características físico-quimicas, se encuentran expresados en el apartado anterior acerca de "propiedades físico químicas".

CARACTERÍSTICAS GENERALES Y MODO DE ACCIÓN EN EL VEGETAL:
CONDOR SHIELD es un formulado especialmente diseñado para su aplicación en semilleros, viveros y campo; proporcionando a las plantas importantes beneficios: mejora el estado fitosanitario general del vegetal, incrementos de la productividad debido a, entre otras cosas, una inactivación de los compuestos tóxicos en la zona radicular, un incremento en la toma de nutrientes y en la eficiencia del uso del nitrógeno, así como un aumento de la solubilidad de elementos nutritivos en el suelo. Induce la formación de raicillas y estimula la colonización de la rizosfera y de la raíz por otros microorganismos beneficiosos.

Anexo 3. Ficha técnica do produto Condor Shield (Crimolara, Portugal), em espanhol (cont.).

FICHA TÉCNICA

CONDOR SHIELD

La formulación en polvo permite una alta versatilidad de aplicaciones: adaptaciones al sistema de riego y pulverización foliar, mezclas con sustratos de cultivo, aportado con agua mediante pulverizadores, entre otros.

La aplicación de tratamientos fungicidas, pueden afectar o inhibir el desarrollo del hongo. Consultar el servicio técnico para la tabla de compatibilidades.

CONDOR SHIELD es apto para utilizar en todas las especies vegetales.

DOSIS DE EMPLEO:

Utilización	Dosis	Frecuencia
Semillero de hortícolas y Viveros (Aplicaciones vía riego o pulverización).	0,25 g/m²	10-20 días
Campo de hortícolas (entre 40.000 y 60.000 plantas/Ha)	1-2 Kg/Ha	20-30 días
Hortalizas con una densidad de más de 200 plantas/m2 (Invernadero y campo)	1 g/m²	10-20 días
Cultivo extensivo	1 Kg/Ha	Mensual
Viñas y Frutales	1 g/planta	1er Año: Trimestral Años sucesivos: 2-3 aplicaciones al año
Frutales tropicales (Aguacate, Mango)	2 g/planta	1er Año: Trimestral Años sucesivos: 2-3 aplicaciones al año
Céspedes (Semillas y tepes)	1 g/m²	Mensual

Nota: esta información es relativa al producto inalterado y conforme a las especificaciones del productor. La información contenida está basada en el conocimiento del producto a la fecha que figura en el encabezamiento de este documento.

La información contenida en este documento no dispensa de la lectura de la etiqueta y la ficha de datos de seguridad correspondientes.

Anexo 4. Ficha técnica do produto Myr N (Crimolara, Portugal).

Crimolara – Produtos Químicos S.A.

IMYR N

É um produto à base de aminoácidos levógiros, obtidos por hidrólise enzimática de substâncias orgânicas proteicas de origem vegetal.
A presença combinada de Azoto, Aminoácidos e Ác. Húmicos, permite ao formulado uma acção enérgica sobre o desenvolvimento da planta, favorecendo inclusive, a superação de situações de stress climático. Myr N, é extremamente solúvel e apresenta uma elevadíssima velocidade de acção.
Por outro lado a acção estimulante das substâncias húmicas solúveis em confronto com as raízes vai-lhe render um efeito rápido e completo quando aplicado em fertirrigação.

COMPOSIÇÃO:

Azoto (N) Orgânico	5%
Carbono (C) de origem Biológica	19%
Matéria orgânica	33%
Aminoácidos vegetais totais	27%
Aminoácidos vegetais livres	22%
Ácidos Húmicos	6%
C/N	3,8
pH	5,6
Peso específico	1,14 kg/L

MODALIDADES DE UTILIZAÇÃO (em Condições Médias)
Pode ser utilizado tanto em aplicação foliar, com a maioria dos produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes mais comuns, como em fertirrigação. As doses e modalidades de emprego serão estabelecidas com base nas exigências da cultura e do estado nutricional da mesma.

Aplicação Foliar:
250-450cc/hl por 2 a 4 vezes durante o ciclo vegetativo, em função da cultura, das condições agronómicas e da exigência nutricional.

Aplicação em Fertirrigação:
2 A 4 L/ha por 2 a 4 vezes durante o ciclo vegetativo, em função da cultura, das condições agronómicas e da exigência nutricional.

Campo Grande, 30-8.ºH
1700-093 Lisboa
Tel. 217818940
Fax 217818969
E-mail: geral@crimolara.pt
www.crimolara.pt

Anexo 5. Ficha técnica do produto Micoplas (K Adriatica, Itália).

Adriatica

ADRIATICA Spa
Strada Dogado 300 / 19-21
45017 Loreo (ROVIGO) ITALIA

www.k-adriatica.it
E info@k-adriatica.it

MICOPLAS

ADUBO Orgânico mineral NP 4,5 10
mistura, pobre em cloro

A mistura de fungos e microorganismos não patogénicos presentes no **MICOPLAS** torna-o interessante para vários sectores agrícolas. A formulação é liofilizada com granulametria uniforme bem separada. **MICOPLAS** é classificado como fertilizante organo-mineral. Três unidades de micro-organismos podem ser distinguidos Bacillus subtilis, Trichodermas, Streptomices, e todos eles são antagonistas e concorrentes biológicos de diversos fungos patogénicos do solo (Armillaria, Fusarium, Stemphilium, Slerotinia, ecc.). Todos os outros micro-organismos presentes no **MICOPLAS** Bacillus thuringensis, Pseudomonas aurofaciens, Microellobosporia, Thermomonospora, Nocardia, Rhizobium, Aspergillus - realizam uma acção de degradação e mineralização da matéria orgânica, bem como a melhoria da estrutura do solo. Além disso eles também fazem "aeróbicas" do ambiente que colonizam, criando assim condições mais favoráveis para o enraizamento e para absorção dos nutrientes contidos na rizosfera. Podemos, portanto, dizer que o MICOPLAS é um revitalizador biológico do solo.

CULTIVO

USO

fertirrigação

integração compost

COMPOSIÇÃO

Azoto total (N)	4,5%
Azoto orgânico (N)	2,5%
Azoto amnoniacal (N)	2%
Pentóxido de fósforo total (P_2O_5)	10%
Pentóxido de fósforo (P_2O_5) solúvel em citrato de amónio neutro e em água	10%
Solúvel em água pentóxido de fósforo (P_2O_5)	10%
Carbono orgânico de origem biológica (C)	7,5%

Fertilizantes minerais: fosfato monoamônio.
Componentes orgânicos: epitélio de animais hidrolisado

MODO DE USAR

TRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS DE COLHEITA (resíduos de milho, girasol, tabaco; palha, adubação verde, ramos, brotos, etc.): 3-5 kg./ha em pelo menos 600 litros de água. Distribuir uniformemente a solução sobre resíduos de culturas. Resíduos com alto teor de celulose deve ser retirados do chão antes do tratamento.

REVITALIZAÇÃO DO SOLO E DA RIZOSFERA

- **Árvores de fruto, vinha, azeitona, citrinos e arbustos em geral:** aplicar 2-3 gr. de **MICOPLAS** por planta, após diluição em água.

N.B. Para **"ajudar" nas aplicações** (condições climáticas adversas, ataques de parasitas, stress térmico), aplicar 10-15 gr. de **MICOPLAS** por planta após diluição em água.

- **Vegetais** (tomate, melão, pepino, medula, morango, etc.) e **plantas de flor**: aplicar 400-600 gr. de **MICOPLAS** por 1000 m^2 na preparação do solo. É aconselhável dissolver anteriormente a formulação em pelo menos 150-200 litros de água.

N.B. Para **"ajudar" nas aplicações** (condições climáticas adversas, ataques de parasitas, stress térmico), aplicar 800-1000 gr. de **MICOPLAS** por 1000 m^2 após diluição em água.

MICOPLAS pode ser misturado com fertilizantes de fertirrigação. É altamente recomendado fazer testes em pequena escala, antes do uso, para verificar a compatibilidade dos produtos.

PREPARAÇÃO DO COMPOSTO. Mistura 700-800 gr. por m^3 de substrato.
Os fertilizantes orgânicos e correctivos orgânicos do solo / animais de criação, não devem ter acesso à terra durante pelo menos 21 dias, após a aplicação do produto.

Technical Sheet – Product MICOPLAS (rev.00) 16-07-15

Ufficio commerciale Italia - Italian sales office
T +39 0426 669618

Ufficio commerciale estero - Foreign sales office
T +39 0426 669616

Amministrazione - Administration
T +39 0426 669611 - F +39 0426 669630

C.F. 02907070235 - P.IVA 01135290292 - CCIAA n. 02907070235 - Cap. Soc. 1.848.000,00 € - Reg.Fabbricanti n. 127/06

Anexo 6. Ficha técnica do produto VIT-ORG (Green Has Italia, Itália).

GREEN HAS ITALIA
Progresso in Agricoltura

VIT-ORG

FONTE DE ELEMENTOS NUTRITIVOS EM FORMA ORGANOMINERAL

VIT-ORG é um adubo organomineral líquido que contém extratos vegetais.
Aplicado na planta:
- melhora a penetração dos produtos fitossanitários e dos fertilizantes minerais;
no solo:
- ativa a microflora;
- melhora a estrutura física;
- aumenta o conteúdo de matéria orgânica;
- incrementa a disponibilidade e a absorção dos nutrientes;
- reduz os efeitos negativos da salinidade e dos herbicidas.
Se recomenda aplicar em solos com baixa matéria orgânica, problemas de salinidade ou pH elevados.

CULTURAS	DOSES		FASES DE APLICAÇÃO E SUGESTÕES
	Fertirrega	Foliar	
FRUTEIRAS, CITRINOS, VIDEIRA, OLIVEIRA	20 - 60 l/ha	2,5 - 5 l/ha	Em maduração e em caso de solos problemáticos
HORTÍCOLAS EM CAMPO ABERTO E CULTURAS INDUSTRIAIS	20 - 40 l/ha	2 - 3 l/ha	Depois de um tratamento de esterilização ou em pós-transplante, em maduração e em caso de solos problemáticos
HORTÍCOLAS EM ESTUFAS	20 - 40 l/ha	1,5 - 2,5 l/ha	
FLORES E ORNAMENTAIS	10 - 20 l/ha	1 - 1,5 l/ha	Ao transplante e depois da poda repetindo cada 15 - 20 dias
VIVEIRO	10 l/ha	1 - 1,5 l/ha	Cada 15 dias
FERTIRREGA: Distribuir o produto a uma concentração de 0,2 - 0,3%			
FOLIAR: Volume de água recomendado 1.000 l/ha			

ADUBOS ORGANOMINERAIS
ADUBO ORGANOMINERAL NK FLUIDO

COMPOSIÇÃO: % p/p (equivalente a % p/v a 20°C)

Azoto (**N**) total	**4**% p/p (5,2% p/v)
Azoto (N) orgânico	3% p/p (3,9% p/v)
Óxido de Potássio (**K_2O**) total	**6**% p/p (7,8% p/v)
Óxido de Potássio (K_2O) solúvel em água	6% p/p (7,8% p/v)
Matéria orgânica	**33**% p/p (42,9% p/v)

PROPRIEDADES QUÍMICO-FÍSICAS:
Densidade (20°C): 1,3 g/ml
pH (1% sol. aq. p/p): 7,0 ± 0,5 u. pH
Condutividade elétrica (sol. aq. 1 g/l): 400 µS/cm

COMPATIBILIDADES: VIT-ORG pode ser misturado com a maioria dos herbicidas e produtos fitossanitários normalmente usados na agricultura; evitar mistura com produtos a base de cobre, enxofre e muitos ricos em micronutrientes. Em culturas ou variedades sensíveis, é recomendado realizar um teste prévio em uma pequena área de cultura, antes de aplicar extensivamente.

ARMAZENAMENTO: guarde-se o envase em lugar fresco e seco a temperaturas compreendidas entre +5°C e +50°C.

ENVASES DISPONÍVEIS: 1 L (1,3 kg) - 5 L (6,5 kg) - 10 L (13 kg) - 20 L (26 kg)

STPT732-02/18 - Os dados técnicos são indicativos e podem variar sem pré-aviso.

GREEN HAS ITALIA S.p.A.
Corso Alba, 85/89 – 12043 CANALE d'Alba (CN) – ITALIA
Tel. +39 0173 95 433 – Fax +39 0173 97 94 64
e-mail: greenhasitalia@greenhasitalia.com
www.greenhasitalia.com

Anexo 7. Ficha técnica do produto Fruitcare (Fomesa Fruitech, Espanha).

FOMESA FRUITECH

FICHA TÉCNICA

FRUITCARE® -AP

COADJUVANTE DE TECNOLOGIA

Finalidade:

Coadjuvante de tecnologia para a desinfecção das águas de tratamento nos armazéns de frutas e hortaliças.

Composição:

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....25 % P/P
ÁCIDO PERACÉTICO.....5 % P/P
ÁCIDO ACÉTICO .....8 % P/P

Propriedades:

Aspecto: Líquido transparente incolor
Cheiro: acético
pH (20ºC): Aprox. 3 (solução 1%)
Densidade (20ºC) (Kg/L): Aprox. 1.12

Modo de Uso e dose:

FRUITCARE-AP é utilizado como um coadjuvante de tecnologia no tratamento da água nos armazéns de frutas e hortaliças, após diluição em água do produto.

Dose para drecher: 0.2 - 0.3% (De 200 a 300 mL por cada 100 litros de água).

Não misturar com PENBOTEC nem com produtos alcalinos

Dose para balsa de imersão: 0.1 - 0.15% (De 1 a 1.5 L por cada 1000 litros de água).

Apresentação:

Garrafa de plástico. Conteúdo neto: 30 Kg.

Data de revisão: 01/2017

ISO 9001 BUREAU VERITAS Certification

Camí del Racó, 10 – Pol. Ind. Norte
46469 Beniparrell – Valencia (Espanha)
T. +34 96 121 18 62
F. +34 96 121 41 13
info@fomesafruitech.net
www.fomesafruitech.net

Anexo 8. Características, modo e momento de aplicação dos produtos comerciais utilizados nos ensaios nas modalidades 3 (biofungicidas) e 4 (biocidas).

Pomar	Produto comercial	Agentes Ativos	Formulação / Teor de s.a.	Dosagem	Momentos de aplicação
Pomar 5 e 6	Tigre*	Aminoácidos vegetais enriquecidos com cobre	51% Matéria seca; 38% Matéria Orgânica; 3% N; 4,5 % Cu; 4,2% Aminoácidos livres	2 L/ha* + 9 L/ha***	Janeiro
				2,5 kg/ha **+ 9 L/ha***	Março
	Condor Shield**	*Trichoderma koningii* TK7	1 x 10^{9} esporos/g	1,5 kg/ha **+ 6 L/ha***	Junho
	Myr N***	Azoto + aminoácidos + ácidos húmicos	5% N; 19% C; 33% Matéria Orgânica; 49% Aminoácidos vegetais; 6% Ácidos Húmicos	1,0 kg/ha **+ 3 L/ha***	Julho
Pomar 1 e 2	Micoplas	*Bacillus subtilis* + *Trichoderma* sp. + *Streptomices* sp.	4,5 % N; 10% P2O5; 7,5% C	2,0 kg/ha (débito mínimo 600 l/ha)	Fevereiro a abril (1 a 2 aplicações)
	VIT-ORG	Bioestimulante orgânico líquido à base de extratos vegetais ricos em polissacarídeos	4% N; 6% K20; 33% Matéria orgânica;	2,5 L/ha	
Pomar 5 e 6	Lixivia	Hipoclorito de sódio	10 – 15 %	2 L/ha	3 aplicações: início de março e cadência de 1 mês
Pomar 3	FRUITCARE	Peróxido de hidrogénio +Ácido paracético + Acido acético	25% + 5% + 8%	1 L/ha	
Pomar 4	Fosfato monoamónio	Fosfato Monoamónio	12% N; 62% P205	2 kg/ hl	Janeiro (>90% folhas no chão)
	Ureia	Ureia (correção pH: 5)	46 % N	2 kg/ hl	

*, **, *** fazem corresponder o produto comercial à respetiva dosagem a utilizar em cada momento de aplicação, ao longo da linha do quadro.

Anexo 9. Análise de variância (com nível de significância de 0,05) dos resultados da incidência e severidade *Stemphylium vesicarium* nas Flores por modalidade para cada pomar, STATISTICA 10.0.

Pomar 1

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,52083	1	2,52083	13,44444	0,000647
"Modalidade"	0,04167	2	0,02083	0,11111	0,895084
Error	8,43750	45	0,18750		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1875,000	1	1875,000	12,41379	0,000991
"Modalidade"	78,125	2	39,063	0,25862	0,773256
Error	6796,875	45	151,042		

Pomar 2

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	10,08333	1	10,08333	38,21053	0,000000
"Modalidade"	0,04167	2	0,02083	0,07895	0,924216
Error	11,87500	45	0,26389		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	10208,333	1	10208,333	28,96552	0,000003
"Modalidade"	182,292	2	91,146	0,25862	0,773256
Error	15859,375	45	352,431		

Pomar 3

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,42112	1	0,42112	5,08717	0,028257
"Modalidade"	0,17404	3	0,05801	0,70081	0,555757
Error	4,38736	53	0,08278		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	263,199	1	263,199	5,08717	0,028257
"Modalidade"	108,776	3	36,259	0,70081	0,555757
Error	2742,102	53	51,738		

Pomar 4

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,26563	1	1,26563	10,56522	0,001892
"Modalidade"	0,54687	3	0,18229	1,52174	0,218064
Error	7,18750	60	0,11979		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	976,563	1	976,563	9,74026	0,002772
"Modalidade"	507,813	3	169,271	1,68831	0,179082
Error	6015,625	60	100,260		

Pomar 5

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,38817	1	0,38817	5,22568	0,025927
"Modalidade"	0,28844	3	0,09615	1,29436	0,284980
Error	4,30833	58	0,07428		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	347,824	1	347,824	4,53291	0,037506
"Modalidade"	186,576	3	62,192	0,81050	0,493221
Error	4450,521	58	76,733		

Pomar 6

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,10007	1	4,10007	21,94970	0,000017
"Modalidade"	0,91567	3	0,30522	1,63402	0,191175
Error	11,02083	59	0,18679		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	5750,043	1	5750,043	15,32443	0,000237
"Modalidade"	897,693	3	299,231	0,79748	0,500206
Error	22138,021	59	375,221		

Anexo 10. Análise de variância e comparação de médias (Teste de Tukey, com nível de significância de 0,05) dos resultados da incidência e severidade *Stemphylium vesicarium* nos Frutos com 12-14 mm de diâmetro por modalidade para cada pomar, STATISTICA 10.0.

Pomar 1

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,68750	1	4,68750	21,49682	0,000031
"Modalidade"	0,50000	2	0,25000	1,14650	0,326854
Error	9,81250	45	0,21806		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6888,021	1	6888,021	19,49631	0,000063
"Var2"	1588,542	2	794,271	2,24816	0,117325
Error	15898,438	45	353,299		

Pomar 2

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6,75000	1	6,75000	29,27711	0,000002
"Modalidade"	0,87500	2	0,43750	1,89759	0,161734
Error	10,37500	45	0,23056		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6302,083	1	6302,083	23,72549	0,000014
"Modalidade"	494,792	2	247,396	0,93137	0,401474
Error	11953,125	45	265,625		

Pomar 3

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,18750	1	0,18750	3,46154	0,069354
"Modalidade"	0,37500	2	0,18750	3,46154	0,039964
Error	2,43750	45	0,05417		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	117,188	1	117,188	3,46154	0,069354
"Modalidade"	234,375	2	117,188	3,46154	0,039964
Error	1523,438	45	33,854		

Pomar 4

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,14063	1	0,14063	3,00000	0,088403
"Modalidade"	0,04688	3	0,01563	0,33333	0,801263
Error	2,81250	60	0,04688		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	87,891	1	87,891	3,00000	0,088403
"Modalidade"	29,297	3	9,766	0,33333	0,801263
Error	1757,813	60	29,297		

Pomar 5

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	3,48880	1	3,48880	19,96822	0,000036
"Modalidade"	1,12024	3	0,37341	2,13724	0,105111
Error	10,30833	59	0,17472		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	5140,412	1	5140,412	17,61627	0,000092
"Modalidade"	1910,838	3	636,946	2,18282	0,099550
Error	17216,146	59	291,799		

Pomar 6

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,00000	1	4,00000	23,70370	0,000009
"Modalidade"	1,87500	3	0,62500	3,70370	0,016352
Error	10,12500	60	0,16875		

Comparação de médias - Teste Tukey - Incidência (α = 0,05)

"Modalidade"	Var6	1	2
3	0,000000	b	
2	0,187500	b	a
4	0,375000	b	a
1	0,437500		a

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	5166,016	1	5166,016	18,75887	0,000057
"Modalidade"	2685,547	3	895,182	3,25059	0,027867
Error	16523,438	60	275,391		

Comparação de médias - Teste Tukey - Severidade (α = 0,05)

"Modalidade"	Var5	1	2
3	0,000000	b	
2	6,250000	b	a
4	12,500000	b	a
1	17,187500		a

Anexo 11. Análise de variância e comparação de médias (Teste de Tukey, com nível de significância de 0,05) dos resultados da incidência e severidade *Stemphylium vesicarium* nas Folhas com Sintomas por modalidade para cada pomar, STATISTICA 10.0.

Pomar 1

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	6,02083	1	6,02083	26,59509	0,000005
"Modalidade"	0,79167	2	0,39583	1,74847	0,185657
Error	10,18750	45	0,22639		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	10208,33	1	10208,33	22,18868	0,000024
"Modalidade"	1588,54	2	794,27	1,72642	0,189496
Error	20703,13	45	460,07		

Pomar 2

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	20,02083	1	20,02083	84,29825	0,000000
"Modalidade"	0,29167	2	0,14583	0,61404	0,545635
Error	10,68750	45	0,23750		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	40833,33	1	40833,33	61,40992	0,000000
"Modalidade"	494,79	2	247,40	0,37206	0,691412
Error	29921,88	45	664,93		

Pomar 3

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,76667	1	0,76667	6,44586	0,014733
"Modalidade"	0,00071	2	0,00035	0,00298	0,997023
Error	5,23333	44	0,11894		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	660,33	1	660,33	5,88442	0,019444
"Modalidade"	35,90	2	17,95	0,15998	0,852656
Error	4937,50	44	112,22		

Pomar 4

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	11,53832	1	11,53832	53,23643	0,000000
"Modalidade"	2,64107	3	0,88036	4,06186	0,010845
Error	12,78750	59	0,21674		

Comparação de médias - Teste Tukey - Incidência (α = 0,05)

"Modalidade"	Var6	1	2
4	0,1875	b	
2	0,3750	b	a
3	0,4000	b	a
1	0,7500		a

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	11410,903	1	11410,903	43,66246	0,000000
"Modalidade"	3112,475	3	1037,492	3,96984	0,012066
Error	15419,271	59	261,344		

Comparação de médias - Teste Tukey - Severidade (α = 0,05)

"Modalidade"	Var5	1	2
4	6,2500	b	
2	10,9375	b	a
3	11,6667	b	a
1	25,0000		a

Pomar 5

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	22500,00	1	22500,00	14,02597	0,000407
"Modalidade"	1250,00	3	416,67	0,25974	0,854100
Error	96250,00	60	1604,17		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2822,27	1	2822,27	12,28045	0,000872
"Modalidade"	263,67	3	87,89	0,38244	0,766015
Error	13789,06	60	229,82		

Pomar 6

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,00	1	1,00	8,72727	0,004473
"Modalidade"	0,13	3	0,04	0,36364	0,779478
Error	6,88	60	0,11		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	976,56	1	976,56	7,65306	0,007523
"Modalidade"	117,19	3	39,06	0,30612	0,820854
Error	7656,25	60	127,60		

Anexo 12. Análise de variância e comparação de médias (Teste de Tukey, com nível de significância de 0,05) dos resultados da incidência e severidade *Stemphylium vesicarium* nos Frutos com Sintomas por modalidade para cada pomar, STATISTICA 10.0.

Pomar 2

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	8,09663	1	8,09663	34,82743	0,000001
"Modalidade"	1,37436	2	0,68718	2,95588	0,064774
Error	8,36923	36	0,23248		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	29785,41	1	29785,41	25,18761	0,000014
"Modalidade"	3101,56	2	1550,78	1,31140	0,282006
Error	42571,51	36	1182,54		

Pomar 3

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1,02083	1	1,02083	7,73684	0,007876
"Modalidade"	0,04167	2	0,02083	0,15789	0,854411
Error	5,93750	45	0,13194		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1575,52	1	1575,52	6,90114	0,011735
"Modalidade"	26,04	2	13,02	0,05703	0,944630
Error	10273,44	45	228,30		

Pomar 4

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	29,10548	1	29,10548	147,40834	0,000000
"Modalidade"	1,46508	3	0,48836	2,47336	0,071616
Error	10,46474	53	0,19745		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	120052,54	1	120052,54	84,46601	0,000000
"Modalidade"	7718,72	3	2572,91	1,81023	0,156504
Error	75329,53	53	1421,31		

Pomar 5

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	15,01563	1	15,01563	65,22624	0,000000
"Modalidade"	2,17188	3	0,72396	3,14480	0,031583
Error	13,81250	60	0,23021		

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	54931,64	1	54931,64	53,03268	0,000000
"Modalidade"	11044,92	3	3681,64	3,55437	0,019481
Error	62148,44	60	1035,81		

Comparação de médias - Teste Tukey - Severidade (α = 0,05)

"Modalidade"	Var5	1	2
1	17,1875	b	
2	18,7500	b	
4	31,2500	b	a
3	50,0000		a

Pomar 6

Análise de Variância - Incidência (α = 0,05)

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	29,16667	1	29,16667	175,00000	0,000000
"Modalidade"	2,21930	3	0,73977	4,43860	0,007423
Error	8,83333	53	0,16667		

Comparação de médias - Teste Tukey - Incidência (α = 0,05)

"Modalidade"	Var6	1	2
4	0,4667	b	
3	0,7000	b	a
2	0,7500	b	a
1	1,0000		a

Análise de Variância - Severidade (α = 0,05)

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	199375,93	1	199375,93	141,45717	0,000000
"Modalidade"	16571,41	3	5523,80	3,91914	0,013361
Error	74700,52	53	1409,44		

Comparação de médias - Teste Tukey - Severidade (α = 0,05)

"Modalidade"	Var5	1	2
4	38,3333	b	
3	57,5000	b	a
2	60,9375	b	a
1	84,3750		a

Anexo 13. Resultados obtidos para os 40 isolados de *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. nos ensaios de patogenicidade realizados em peras rocha: área da mancha, raio 1 e 2, média e média das repetições.

Ref. isolado	Área (cm^2)	raio 1 (cm)	raio 2 (cm)	Média (cm)	Média repetições (cm)
St1	10,8	2	1,7	1,9	
St1	10,8	1,8	1,9	1,9	
St1	9,6	1,7	1,8	1,8	
St1	7,5	1,4	1,7	1,6	1,8
St2	27,3	2,8	3,1	3,0	
St2	21,2	2,4	2,8	2,6	
St2	25,5	2,8	2,9	2,9	
St2	12,6	1,7	2,3	2,0	2,6
St3	4,9	1,3	1,2	1,3	
St3	12,6	1,6	2,4	2,0	
St3	7,1	1,2	1,8	1,5	
St3	7,5	1,4	1,7	1,6	1,6
St4	13,9	2,4	1,8	2,1	
St4	8,6	1,7	1,6	1,7	
St4	14,5	3,1	1,2	2,2	
St4	9,1	2,8	0,6	1,7	1,9
St5	1,3	0,9	0,4	0,7	
St5	7,1	1,3	1,7	1,5	
St5	14,5	1,2	3,1	2,2	
St5	15,2	2,4	2	2,2	1,6
St6	8,3	1,7	1,6	1,6	
St6	5,3	1,4	1,2	1,3	
St6	8,6	1,8	1,5	1,7	
St6	12,3	1,6	2,4	2,0	1,6
St7	14,5	2,6	1,7	2,2	
St7	25,5	2,6	3,1	2,9	
St7	10,5	0,9	2,8	1,8	
St7	3,5	1,2	0,9	1,1	2,0
St8	5,1	1,3	1,3	1,3	
St8	8,0	2,0	1,2	1,6	
St8	9,1	1,0	2,4	1,7	
St8	4,2	0,7	1,7	1,2	1,4
St9	4,0	0,9	1,4	1,1	
St9	13,5	1,7	2,5	2,1	
St9	13,5	2,2	2	2,1	
St9	10,2	1,7	1,9	1,8	1,8
St10	10,2	1,7	1,9	1,8	
St10	7,5	1,5	1,6	1,6	
St10	11,6	2,2	1,7	1,9	
St10	12,6	2,2	1,8	2,0	1,8
St11	4,2	1,3	1,0	1,2	
St11	2,7	1,2	0,7	0,9	
St11	8,3	2,4	0,9	1,6	
St11	4,7	0,8	1,7	1,2	1,2

Anexo 14. Resultados obtidos para os 40 isolados de *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. nos ensaios de patogenicidade realizados em peras rocha: área da mancha, raio 1 e 2, média e média das repetições (cont.).

Ref. isolado	Área (cm^2)	raio 1 (cm)	raio 2 (cm)	Média (cm)	Média repetições. (cm)
St12	11,6	1,7	2,2	1,9	
St12	7,1	1,3	1,7	1,5	
St12	4,9	1,6	0,9	1,3	
St12	5,7	1,2	1,5	1,4	1,5
St13	1,8	0,6	0,9	0,8	
St13	4,9	1,1	1,4	1,3	
St13	8,6	1,7	1,6	1,7	
St13	9,6	1,4	2,1	1,8	1,4
St14	8,6	1,6	1,7	1,7	
St14	15,2	2,2	2,2	2,2	
St14	23,8	3,1	2,4	2,8	
St14	20,4	2,8	2,3	2,6	2,3
St15	3,8	1,4	0,8	1,1	
St15	9,1	1,2	2,2	1,7	
St15	6,6	1,1	1,8	1,5	
St15	3,5	0,9	1,2	1,1	1,3
St16	12,6	1,4	2,6	2,0	
St16	9,1	1,6	1,8	1,7	
St16	11,3	2,1	1,7	1,9	
St16	18,1	1,7	3,1	2,4	2,0
St17	19,6	2,2	2,8	2,5	
St17	8,6	2,4	0,9	1,7	
St17	5,7	2,3	0,4	1,4	
St17	4,9	0,8	1,7	1,3	1,7
St18	22,1	2,2	3,1	2,7	
St18	16,6	1,8	2,8	2,3	
St18	4,9	1,6	0,9	1,3	
St18	8,0	1,9	1,3	1,6	2,0
St19	6,6	1,7	1,2	1,5	
St19	10,8	1,3	2,4	1,9	
St19	17,3	2,5	2,2	2,4	
St19	17,3	2,6	2,1	2,4	2,0
St20	18,9	2,4	2,5	2,5	
St20	12,6	1,9	2,1	2,0	
St20	15,2	2,5	1,9	2,2	
St20	15,2	2,1	2,3	2,2	2,2
Al1	12,6	2,2	1,8	2,0	
Al1	22,9	2,4	3,0	2,7	
Al1	13,9	1,8	2,4	2,1	
Al1	8,0	1,7	1,5	1,6	2,1
Al2	9,1	1,8	1,6	1,7	
Al2	1,5	0,6	0,8	0,7	
Al2	3,8	1,2	1,0	1,1	
Al2	6,6	1,6	1,3	1,5	1,2

Anexo 15. Resultados obtidos para os 40 isolados de *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. nos ensaios de patogenicidade realizados em peras rocha: área da mancha, raio 1 e 2, média e média das repetições (cont.).

Ref. isolado	Área (cm^2)	raio 1 (cm)	raio 2 (cm)	Média (cm)	Média repetições. (cm)
Al3	2,3	0,8	0,9	0,9	
Al3	6,2	1,4	1,4	1,4	
Al3	4,5	1.0	1,2	1,2	
Al3	13,2	2,0	2,1	2,1	1,4
Al4	10,2	1,6	2,0	1,8	
Al4	5,7	1,5	1,2	1,4	
Al4	8,0	1,5	1,7	1,6	
Al4	16,6	2,4	2,2	2,3	1,8
Al5	10,8	2,0	1,7	1,9	
Al5	28,3	3,1	2,9	3,0	
Al5	6,6	1,3	1,6	1,5	
Al5	4,5	1,2	1,2	1,2	1,9
Al6	11,9	2,4	1,5	2,0	
Al6	20,4	2,7	2,4	2,6	
Al6	11,6	2,2	1,7	1,9	
Al6	20,0	2,9	2,2	2,5	2,2
Al7	19,1	1,8	3,1	2,5	
Al7	4,3	1,1	1,3	1,2	
Al7	5,6	1,3	1,4	1,3	
Al7	8,6	1,6	1,7	1,7	1,7
Al8	19,6	2,8	2,2	2,5	
Al8	7,5	1,2	1,9	1,6	
Al8	17,3	2,4	2,3	2,4	
Al8	9,9	1,7	1,9	1,8	2,0
Al9	20,8	2,4	2,8	2,6	
Al9	16,3	2,0	2,6	2,3	
Al9	26,4	2,8	3,0	2,9	
Al9	5,3	0,9	1,7	1,3	2,3
Al10	29,2	2,9	3,2	3,1	
Al10	27,3	3,1	2,8	3,0	
Al10	20,4	2,4	2,7	2,6	
Al10	25,5	2,7	3,0	2,9	2,9
Al11	8,6	1,4	1,9	1,7	
Al11	15,2	2,4	2,0	2,2	
Al11	15,9	2,0	2,5	2,3	
Al11	12,6	1,9	2,1	2,0	2,0
Al12	8,3	1,9	1,4	1,6	
Al12	6,4	1,6	1,3	1,4	
Al12	14,9	1,7	2,7	2,2	
Al12	12,3	1,7	2,3	2,0	1,8
Al13	6,4	1,6	1,3	1,4	
Al13	9,3	1,9	1,6	1,7	
Al13	11,3	2,4	1,5	1,9	
Al13	8,0	1,4	1,8	1,6	1,7

Anexo 16. Resultados obtidos para os 40 isolados de *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. nos ensaios de patogenicidade realizados em peras rocha: área da mancha, raio 1 e 2, média e média das repetições (cont.).

Ref. isolado	Área (cm^2)	raio 1 (cm)	raio 2 (cm)	Média (cm)	Média repetições. (cm)
Al14	7,5	1,2	1,9	1,6	
Al14	5,3	1,1	1,5	1,3	
Al14	8,8	0,9	2,5	1,7	
Al14	9,1	1,4	2,0	1,7	1,6
Al15	10,2	2,4	2,2	1,8	
Al15	11,3	2,1	1,7	1,9	
Al15	12,6	1,7	2,3	2,0	
Al15	15,9	2,2	2,3	2,3	2,0
Al16	13,9	2,4	1,8	2,1	
Al16	14,5	2,1	2,2	2,2	
Al16	12,6	2,8	2,6	2,0	
Al16	13,2	1,9	2,2	2,1	2,1
Al17	13,9	1,8	2,4	2,1	
Al17	9,6	1,6	1,9	1,8	
Al17	17,3	2,3	2,4	2,4	
Al17	3,6	1,3	0,9	1,1	1,8
Al18	4,9	1,6	0,9	1,3	
Al18	7,8	1,5	1,7	1,6	
Al18	10,2	1,9	2,2	1,8	
Al18	14,9	2,4	2,0	2,2	1,7
Al19	16,3	2,4	2,2	2,3	
Al19	16,3	2,5	2,1	2,3	
Al19	12,6	2,0	2,0	2,0	
Al19	7,1	2,2	0,8	1,5	2,0
Al20	28,3	3,2	2,8	3,0	
Al20	14,5	2,1	2,2	2,2	
Al20	14,5	2,4	1,9	2,2	
Al20	10,2	2,9	3,1	1,8	2,3

Anexo 17. Análise de variância da área das manchas(cm^2**)**, obtida nos ensaios de patogenicidade realizados em peras Rocha com *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* sp. ($\alpha = 0,05$)

Area	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	21352,01	1	21352,01	814,0168	0,000000
"Var1"	2959,19	39	75,88	2,8927	0,000005
Error	3147,65	120	26,23		