

Avaliação do efeito de *Trichoderma harzianum* na cultura da cenoura

Rafael da Costa Pacheco Ferreira

Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadora: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor João Carlos da Silva Dias, Professor associado com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

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

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

Lisboa, 2022

Agradecimentos

Quero agradecer à minha mãe e irmãos pelo precioso apoio durante todo o meu percurso académico e por acreditarem nas minhas capacidades.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Dr.^a Mariana Mota, não só por toda a ajuda na elaboração deste trabalho, mas também por ser um pilar no meu percurso académico e por todo o contributo para o meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço também ao Eng. Paulo Leite e ao Eng. Gonçalo Pinto Coelho da PrimoHorta, imprescindíveis à realização deste trabalho, pela disponibilidade no que diz respeito à utilização dos terrenos para a realização do ensaio de campo, recolha de amostras, partilha de conhecimentos e toda a ajuda e interesse demonstrados no acompanhamento do ensaio.

Agradeço às pessoas que me são mais próximas que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Instituto Superior de Agronomia por me possibilitar conhecer pessoas fantásticas e pela valiosa formação que levo comigo para a vida, tanto a nível profissional como pessoal.

Resumo

Este trabalho visou avaliar o efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum* estirpe T22 do produto Trianum G© em campos de cenoura, analisando o efeito na população microbiana do solo, nomeadamente na abundância de fungos dos géneros *Pythium* e *Phytophthora*, procurando métodos expeditos para essa avaliação, e na produtividade e qualidade da cenoura.

Instalou-se um ensaio de campo com quatro modalidades: testemunha (M0), 50% (M50), 75% (M75) e 100% (M100) da dose recomendada para a aplicação do produto pertencente à Koppert©. Recolheram-se semanalmente amostras de solo desde a inoculação do solo com *T. harzianum* T22, e realizaram-se vários testes em laboratório para a avaliação da presença de microrganismos, da biomassa microbiana e da atividade enzimática da desidrogenase (AE) das amostras de solo ao longo do tempo. As cenouras das várias modalidades do ensaio foram avaliadas ao nível da produtividade e qualidade.

Os resultados obtidos mostram que a não aplicação de *T. harzianum* originou cenouras de menor qualidade, com maior taxa de refugo, e que a inoculação do solo com este fungo reduziu a população de fungos fitopatogénicos na rizosfera. A utilização de meios seletivos mostrou que M0 é simultaneamente a modalidade com menor número de colónias de *T. harzianum* e maior número de colónias de fungos fitopatogénicos, sugerindo um efeito benéfico do agente antagonista. Ao nível da AE, M0 apresenta valores mais elevados, sugerindo uma maior atividade microbiana global no solo da zona não tratada, sendo que a maior concentração do agente antagonista não resultou em menores valores de AE. O estudo da AE *in vivo* evidenciou o efeito do tratamento ao longo do tempo, tendo as amostras de solo mais próximas da data de aplicação de *T. harzianum* maiores níveis de AE.

A avaliação da atividade enzimática *in vivo* e a utilização de meios seletivos mostraram-se ferramentas úteis para implementação em contexto empresarial.

Palavras-chave: Antagonista, meios seletivos, desidrogenase, qualidade, controlo biológico.

Abstract

The main focus of this work was to evaluate the effects of the treatment with *Trichoderma harzianum* strain T22 of the product Trianum G© in carrot fields, analyzing the effects on the soil microbiological population, namely the abundance of *Pythium* and *Phytophthora* fungi, as well as to search for prompt methods to do this evaluation, and in the productivity and quality of carrots.

A field trial was installed consisting in four different modalities: control (M0), 50% (M50), 75% (M75) and 100% (M100) of the recommendation of application of the product property of Koppert©. Weekly soil collections were carried out since the date of soil inoculation with *T. harzianum* T22 and various laboratory tests were realized to assess the presence of microorganisms, microbial biomass and enzymatic activity (EA) over time. The productivity and quality of carrots of the different modalities was evaluated.

The results show that the control modality (M0) originated carrots with poorer quality and a higher product quantity that did not reach minimum commercial quality parameters. The application of this product demonstrated positive effect on the reduction of phytopathogenic fungi. Concerning the selective medium tests, M0 revealed to be simultaneously the modality with lower number of *T. harzianum* colonies and higher number of phytopathogenic colonies, suggesting a positive effect of the antagonistic agent. Regarding the EA, M0 shows higher levels which suggests higher global microbial activity, and higher concentration of application of *T. harzianum* didn't result in lower EA. The study of EA *in vivo* was useful to observe the effects of the application throughout time, in which the soil samples collected closer to the date of the realization of the treatment showed higher EA.

The assessment of EA *in vivo* and the use of selective medium demonstrated to be useful tools to be implemented in business context.

Key words: Antagonist, selective medium, dehydrogenase, quality, biological control.

Índice

1	Introdução	11
2	Revisão bibliográfica	13
2.1	Panorama das culturas hortícolas em Portugal	13
2.1.1	Principais culturas hortícolas.....	13
2.1.2	Principais regiões.....	14
2.2	Importância económica da cenoura.....	15
2.2.1	No mundo	15
2.2.2	Em Portugal	17
2.3	Cultura da cenoura.....	19
2.3.1	Descrição e origem	19
2.3.2	Condições edafoclimáticas para o desenvolvimento da cultura.....	20
2.3.3	Principais problemas.....	21
2.3.4	Técnicas culturais	23
2.3.5	Estratégias de proteção	24
2.4	<i>Trichoderma harzianum</i>	25
2.4.1	Taxonomia	25
2.4.2	Meios de cultura.....	25
2.4.3	Controlo biológico	26
2.5	Métodos para avaliação da presença de fungos dos géneros <i>Trichoderma</i> , <i>Pythium</i> e <i>Phytophthora</i>	27
2.5.1	Meios de cultura seletivos	27
2.5.2	Atividade enzimática da desidrogenase	28
2.5.3	Extração e quantificação de ADN a partir do solo	28
3	Métodos experimentais	29
3.1	Delineamento experimental.....	29
3.1.1	Localização do ensaio experimental.....	29
3.1.2	Tratamentos e esquema experimental	30
3.1.3	Caracterização climática	32
3.1.4	Caracterização edáfica.....	33
3.2	Instalação e acompanhamento da cultura.....	34
3.2.1	Preparação da cama para a sementeira.....	34
3.2.2	Sementeira e instalação do ensaio experimental	34
3.2.3	Tratamentos fitossanitários e fertilização.....	35
3.2.4	Colheita e transporte.....	38

3.2.5	Observações e registos no campo	38
3.2.6	Registos laboratoriais nas cenouras.....	38
3.2.7	Análise estatística	41
3.3	Métodos laboratoriais	41
3.3.1	Preparação do meio de cultura para plaqueamento de extratos de solo	41
3.3.2	Inoculação e incubação de fungos	42
3.3.3	Atividade enzimática da desidrogenase	42
3.3.4	Extração de ADN	43
3.3.5	Quantificação do ADN.....	44
3.3.6	Preparação de meios de cultura seletivos	44
4	Resultados e discussão.....	45
4.1	Enquadramento dos resultados obtidos	45
4.2	Efeito do tratamento com <i>Trichoderma harzianum</i> na presença de microrganismos nas amostras de solo	45
4.3	Efeito do tratamento com <i>Trichoderma harzianum</i> na atividade enzimática da desidrogenase nas amostras de solo.....	47
4.4	Avaliação do efeito do tratamento com <i>Trichoderma harzianum</i> na biomassa microbiana do solo recorrendo a meios de cultura seletivos	51
4.5	Avaliação da presença de microrganismos no solo	53
4.6	Efeito do tratamento com <i>Trichoderma harzianum</i>	54
4.6.1	No peso da raiz	54
4.6.2	No comprimento da raiz	55
4.6.3	No diâmetro da raiz	55
4.6.4	Na taxa de refugo.....	56
4.6.5	Na coloração da raiz	58
4.6.6	Nos valores de Brix e produção	59
4.6.7	Na matéria seca	60
5	Conclusões e perspetivas	61
6	Referências Bibliográficas	63
7	Anexos	68

Índice de Figuras

Figura 1 - Área de ocupação das culturas hortícolas mais importantes em Portugal em 2020 (INE, 2021).....	13
Figura 2 - Produção anual das culturas hortícolas mais importantes em Portugal em 2020 (INE, 2021).....	14
Figura 3 - Produção e área colhida das culturas da cenoura e do nabo a nível mundial, entre 2000 e 2019 (FAO, 2021).....	16
Figura 4 – Produtividade da cultura da cenoura e do nabo no mundo entre 2000 e 2018 (FAO, 2021).....	16
Figura 5 - Evolução da produtividade das culturas da cenoura e do nabo no continente Asiático, Americano, Europeu e Africano entre 2010 e 2019 (FAO, 2021).....	17
Figura 6 – Produção e área dedicada à cultura da cenoura em Portugal entre 2011 e 2018 (GPP, 2021).	18
Figura 7 – Produtividade da cultura da cenoura em Portugal, entre 2011 e 2018 (GPP, 2021). 18	
Figura 8 – Evolução dos preços médios de importação e exportação da cenoura e do nabo em Portugal, entre 2010 e 2019 (GPP, 2021).....	19
Figura 9 - Fotografia aérea da área total do terreno de 45 hectares abrangido pela rampa pivotante, onde estiveram instaladas várias culturas hortícolas e forrageiras (Google Earth, 2021).....	29
Figura 10 – Localização das parcelas utilizadas na recolha de amostras (Google Earth, 2021).	30
Figura 11 - Ilustração do ensaio experimental instalado na parcela Faias.	31
Figura 12 - Média da quantidade total de precipitação da normal climatológica no período 1971 a 2000 (IPMA, 2021).	32
Figura 13 - Balança de precisão e paquímetro utilizados para efetuar as medições.	39
Figura 14 - Colorímetro portátil utilizado para efetuar medições de saturação, tonalidade e luminosidade de cada amostra colhida.....	40
Figura 15 - Refratómetro utilizado na medição do Brix (A) e fatias de cenoura utilizadas na determinação da matéria seca, após secagem na estufa a 100 °C durante 7 dias (B).	41
Figura 16 - Crivagem do solo (A) e filtragem após incubação das amostras para posterior medição no espectrofotómetro (B).....	43
Figura 18 - Kit de extração de ADN do solo utilizado.	44
Figura 18 – Placas de Petri inoculadas com extratos de solo da parcela Cartaxo, após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente.	46
Figura 19 - Cuvetes utilizadas na medição da absorvância para posterior cálculo da atividade enzimática. Cuvetes associadas ao solo do ensaio experimental em estudo (A) e cuvetes de amostra de solo fresca do ISA (B).....	48
Figura 20 - Placas inoculadas com fungos a partir de extratos de solo e com glucose e TTC para o estudo da atividade enzimática in vivo.	50
Figura 21 - Gráfico da curva de absorvância (A) com a sua respetiva leitura de absorvância (B), em análise espectrofotométrica.....	54
Figura 22 - Representatividade das várias causas de refugo nas modalidades M0, M50, M75 e M100 do ensaio experimental.....	58
Figura 23 - Cenouras categorizadas como refugo por (A) múltiplos defeitos e (B) bifurcação da raiz principal.	58

Índice de Quadros

Quadro 1 – Elementos do ensaio experimental de campo e sua descrição.	31
Quadro 2 - Evolução da precipitação e das temperaturas mínima e máxima, de novembro de 2020 a abril de 2021, desde a instalação até à colheita da cultura da cenoura na parcela onde se instalou o ensaio experimental (IPMA, 2021).....	33
Quadro 3 – Análise físico-química de dezembro de 2010 do solo da parcela Faias, onde se realizou o ensaio experimental.	34
Quadro 4 – Lista dos fertilizantes utilizados durante o ciclo cultural da cenoura na parcela Faias, onde foi instalado o ensaio experimental.	36
Quadro 5 – Lista de fungicidas e inseticidas utilizados no combate a pragas e doenças da cultura da cenoura na parcela Faias.....	36
Quadro 6 – Lista de herbicidas utilizados para o controlo de infestantes na parcela Faias.	37
Quadro 7 - Lista dos fertilizantes utilizados durante o ciclo cultural da cenoura na parcela Cartaxo, de onde foram recolhidas amostras de solo para análise laboratorial.	37
Quadro 8 - Lista de fungicidas e inseticidas utilizados no combate a pragas e doenças na parcela Cartaxo.	37
Quadro 9 - Lista de herbicidas utilizados para o controlo de infestantes na parcela Cartaxo.	38
Quadro 10 - Atividade enzimática [AE ((u.a).(g MS) ⁻¹)] das amostras de solo recolhidas na parcela Cartaxo.	47
Quadro 11 - Atividade enzimática [AE ((u.a).(g MS) ⁻¹)] das amostras de solo recolhidas das diferentes modalidades do ensaio experimental realizada na parcela Faias.....	49
Quadro 12 - Contagem de colónias das placas de meio seletivo para o género Trichoderma obtidas a partir do plaqueamento das amostras de solo recolhidas do ensaio experimental.	51
Quadro 13 - Contagem de colónias das placas de Petri contendo meio seletivo para os géneros Pythium e Phytophthora obtidas a partir do plaqueamento das amostras de solo recolhidas do ensaio experimental.	52
Quadro 14 – Peso médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.....	55
Quadro 15 – Comprimento médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.	55
Quadro 16 – Diâmetro médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.....	56
Quadro 17 – Taxa de refugo média das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.	56
Quadro 18 - Saturação, tonalidade e luminosidade médias das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.....	59
Quadro 19 – Grau Brix médio das amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.....	59
Quadro 20 – Produção associada a 90 cenouras de cada modalidade do ensaio experimental.	60
Quadro 21 - Matéria seca média das amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.....	60

Lista de abreviaturas e siglas

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AE** – Atividade enzimática
- cv** – Cavalos vapor
- ISA** – Instituto Superior de Agronomia
- M0** – Modalidade 0
- M100** – Modalidade 100
- M50** – Modalidade 50
- M75** – Modalidade 75
- mM** – Milimolar
- MS** – Matéria seca
- MST** – Meio seletivo para *Trichoderma* spp.
- PDA** – Potato dextrose agar
- PDB** – Potato dextrose broth
- PVP** – Primaricina-vancomicina-pentacloronitrobenzeno
- rpm** – Rotações por minuto
- TPF** – Trifenilformazan
- TTC** – Cloreto de trifeniltetrazólio
- u.a.** – Unidade de absorvância

1 Introdução

Em 2018, a cultura da cenoura foi a segunda cultura hortícola mais expressiva no país em termos de produção, logo a seguir ao tomate, com 92 mil toneladas (INE, 2018). A produção de culturas hortícolas em Portugal está intimamente relacionada com a região do Ribatejo e Oeste, que possui o maior número de explorações e áreas de cultivo relativamente a qualquer outra região (INE, 2002). Esta região engloba a margem sul de Lisboa, zona esta com solos de textura arenosa propícios para o cultivo de cenoura em grande extensão. Assim, nesta região, esta cultura assume grande dimensão económica. Uma das principais empresas neste sector é a PrimoHorta, onde os ensaios de campo do presente trabalho decorreram, que gere uma área relevante desta cultura, onde se produzem cerca de 30000 toneladas de cenoura anualmente.

Na cultura da cenoura, os fungos dos géneros *Pythium* e *Phytophthora* são das principais causas de perdas económicas e de redução da qualidade do produto final (Gardé & Gardé, 1988; Patkowska et al., 2020).

A aplicação repetida de produtos fitossanitários para o combate às doenças da cultura tem implicações na qualidade do produto final, na biodiversidade do ecossistema agrícola, na poluição de solos e águas de superfície e subterrâneas (Messiaen, 1979; Souza & Resende, 2006). A aplicação destes produtos representa ainda custos na produção possivelmente evitáveis, tanto a nível agronómico como logístico e económico.

Segundo Amaro (2003) e Patkowska et al. (2018), *T. harzianum* atua como antagonista de fungos e outros microrganismos fitopatogénicos presentes no solo, sendo assim de elevado interesse para os produtores a criação de condições favoráveis ao estabelecimento e crescimento deste microrganismo no solo, de modo a reduzir a dependência da produção agrícola na luta química.

Neste contexto, o presente trabalho possui os seguintes objetivos:

- i. Estabelecer métodos de análise microbiológica passíveis de realizar em contexto empresarial, ou seja, com baixo investimento ao nível de material de laboratório.
- ii. Monitorizar o desenvolvimento de *T. harzianum* em diferentes parcelas de cultivo da cenoura e modalidades de tratamento;
- iii. Avaliar o efeito de *T. harzianum* nas características biológicas dos solos nas parcelas em estudo;

- iv. Estabelecer uma relação entre a população de *T. harzianum* e a incidência de doenças do solo (ex: doenças associadas a *Pythium* sp. ou *Phytophthora* sp.) na cultura da cenoura nas diferentes parcelas.
- v. Estabelecer uma relação entre a população de *T. harzianum* e a produtividade obtida na cultura da cenoura e na qualidade do produto obtido.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Panorama das culturas hortícolas em Portugal

2.1.1 Principais culturas hortícolas

Em 2020, o conjunto de culturas hortícolas atingiu a produção de 1215 mil toneladas, e ocupou uma área de 44334 ha em todo o país.

Em termos de área ocupada por cada cultura no país, em 2020 a abóbora revelou-se a cultura mais expressiva ao deter 5090 ha, seguida pela couve-brócolo com 3950 ha, couve-repolho com 3902 ha, a cultura da cenoura com 2610 ha e por fim a alface com 2452 ha (Figura 1) (INE, 2021).

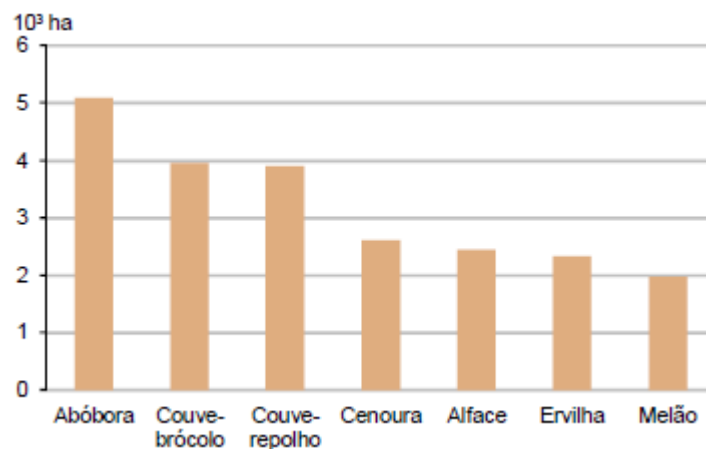


Figura 1 - Área de ocupação das culturas hortícolas mais importantes em Portugal em 2020 (INE, 2021).

Respeitante à produção anual de culturas hortícolas em Portugal no ano de 2020 (Figura 2), verifica-se que o tomate para consumo em fresco ocupa o primeiro lugar (144 mil toneladas), seguido da cenoura (134 mil toneladas) e da abóbora (121 mil toneladas) (INE, 2021).

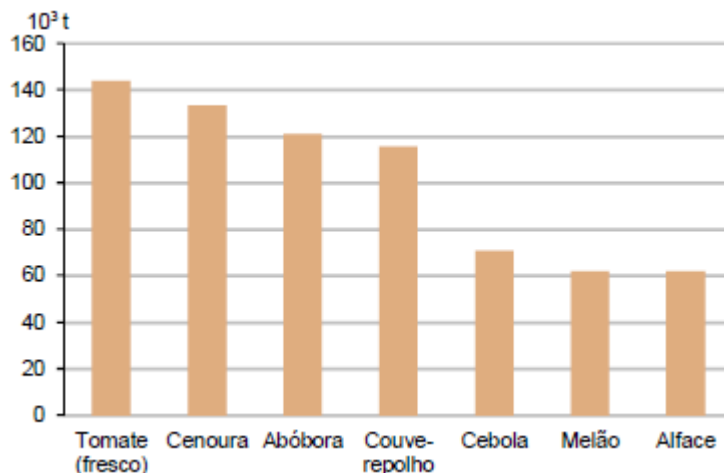


Figura 2 - Produção anual das culturas hortícolas mais importantes em Portugal em 2020 (INE, 2021).

2.1.2 Principais regiões

De acordo com GPPAA (2007), Ribatejo e Oeste é a região com maior área total com horticultura, seguida pela região do Alentejo, com pesos no Continente de 61% e 21%, respetivamente. Relativamente às culturas hortícolas extensivas ao ar livre, são mais expressivas as regiões do Ribatejo e Oeste e Alentejo (INE, 2002).

Respeitante às explorações com hortícolas em estufa e as suas áreas, o Algarve possui 645 ha, seguido pelo Ribatejo e Oeste com 493 ha, representando 42% e 32% da área total do Continente, respetivamente. Apesar da região do Algarve possuir uma maior área dedicada às hortícolas de estufa, é no Ribatejo e Oeste onde se encontra o maior número de explorações, o que resulta em menor área média por exploração (0,6 ha) comparativamente ao Algarve (1,1 ha), sendo ainda assim superior à área média por exploração no Continente de 0,4 ha (GPPAA, 2007).

Relativamente à área dedicada à produção de hortícolas intensivas ao ar livre, o Ribatejo e Oeste destaca-se com mais de 60% da área total do país, e com uma área média por exploração de 1,4 ha, sendo a única região que ultrapassa a área média por exploração do Continente (0,8 ha). Entre Douro e Minho, Alentejo e Beira Litoral são as regiões com maior expressão após o Ribatejo e Oeste, região esta detentora da maior percentagem de explorações com mais de 1 ha (36%). Nas hortícolas intensivas verifica-se uma elevada representatividade das grandes explorações, no entanto são as pequenas e médias explorações responsáveis por gerar mais de metade da margem bruta total da atividade,

destacando-se a região de Entre Douro e Minho, em que estas explorações representam mais de 80% da margem bruta regional (GPPAA, 2007).

Ao nível das hortícolas extensivas, a região do Ribatejo e Oeste demonstra-se novamente muito importante no país, a par com o Alentejo, representando no seu conjunto quase 70% da área total. O Alentejo destaca-se pelo facto de ser a única região em que se verifica uma área média por exploração (1,8 ha) superior à média do Continente (0,5 ha) e superior a 1 ha. É de realçar que se verifica um predomínio das explorações com menos de 1 ha, representando cerca de 90% do total das explorações e 36% da área total. Já no que diz respeito à distribuição da margem bruta por classe de dimensão económica das explorações, verifica-se a dominância das grandes explorações, sendo que 80% do total da margem bruta da atividade se concentra na região do Ribatejo e Oeste (GPPAA, 2007).

Segundo GPPAA (2007), a atividade horticultura tem maior relevância no Ribatejo e Oeste, Algarve e Alentejo, com 23,5%, 17,3% e 9,4% da margem bruta total da região, respetivamente. No sector da Horticultura apenas 32,4% da superfície de hortícolas está associada a explorações especializadas, sendo que estas geram uma margem bruta de 43,3% da margem bruta total da atividade, o que indicia elevadas produtividades associadas às atividades mais intensivas, nomeadamente as estufas (GPPAA, 2007).

2.2 Importância económica da cenoura

2.2.1 No mundo

As estatísticas mundiais publicadas pela FAO (Figura 3) agregam os dados relativos às culturas da cenoura e do nabo, sendo que a cenoura representa cerca de 95% dos valores apresentados.

No período de 2000 a 2019, a quota de produção mais elevada respeitante a estas culturas pertence ao continente asiático com 58,5% da produção, seguido pela Europa com 24,9%, o continente americano com 10,5%, África e Oceânia com 5% e 1,1%, respetivamente (FAO, 2021).

A produção tem vindo a aumentar gradualmente ao longo do período considerado, tendo atingido o valor de 45 milhões de toneladas no ano de 2019. Já ao nível da área dedicada a estas culturas, o aumento foi significativo até 2011, atingindo 1,1 milhões de hectares (Figura 3). A área de produção tem oscilado desde então, mantendo-se no mesmo valor em 2019 (FAO, 2021).

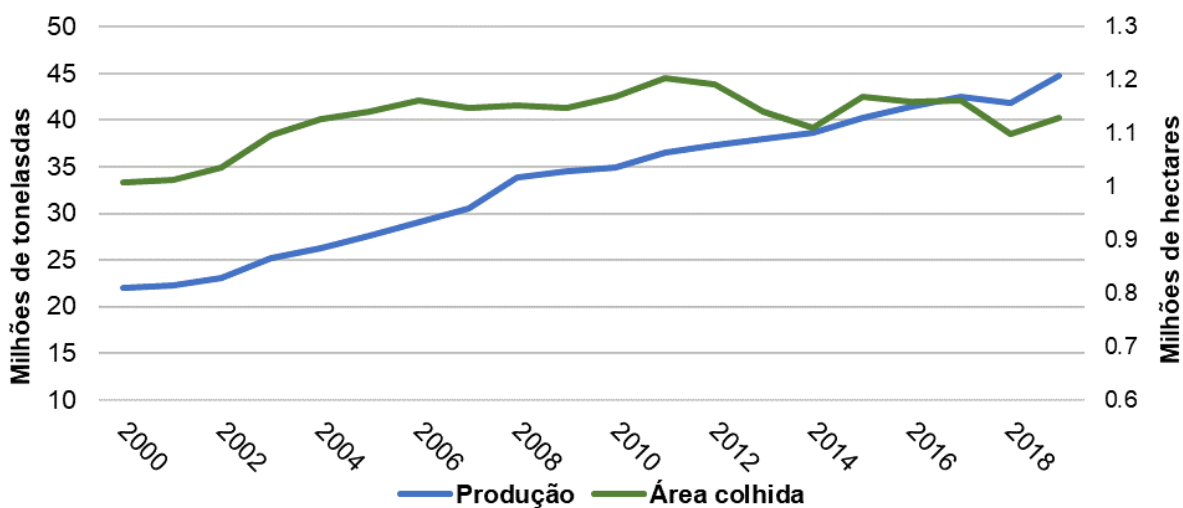


Figura 3 - Produção e área colhida das culturas da cenoura e do nabo a nível mundial, entre 2000 e 2019 (FAO, 2021).

Respeitante à produtividade, a cultura da cenoura tem vindo a apresentar aumentos graduais, transitando de aproximadamente 22 t.ha⁻¹ para 38 t.ha⁻¹ entre 2000 e 2018, resultado do contínuo aumento de produção e da estabilização da área dedicada ao cultivo desta cultura no mundo (Figura 4) (FAO, 2021).

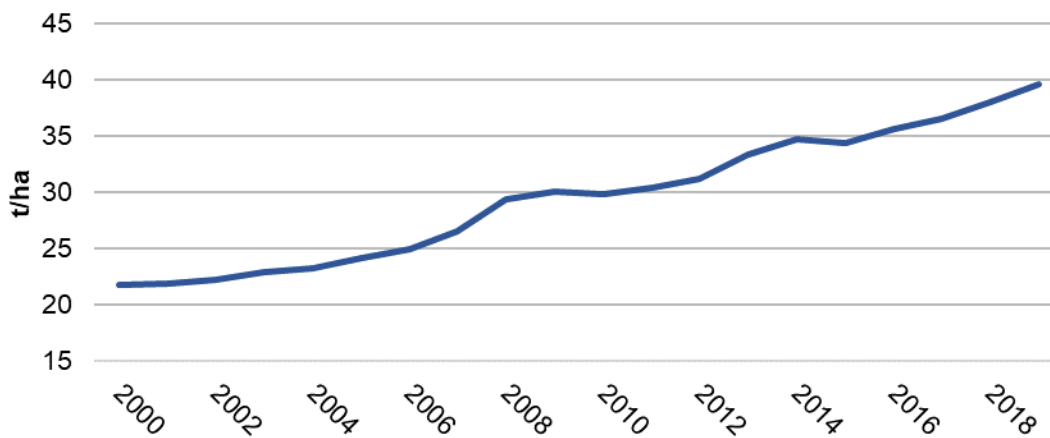


Figura 4 – Produtividade da cultura da cenoura e do nabo no mundo entre 2000 e 2018 (FAO, 2021).

Ao nível dos continentes, é possível observar (Figura 5) que o continente asiático é o que mais contribui para a produtividade a nível mundial, tendo aumentado continuamente ao longo do período considerado, atingindo as 45 t.ha⁻¹. Tanto o continente europeu como o americano têm vindo a apresentar crescimentos nas suas produtividades, de valores muito semelhantes, ainda que o continente americano tenha ultrapassado o continente europeu em 2019 ao atingir uma produtividade de aproximadamente 39 t.ha⁻¹. O continente africano apresenta os valores mais baixos, tendo alcançado a produtividade mais alta de aproximadamente 21,5 t.ha⁻¹ no ano 2012 (FAO, 2021).

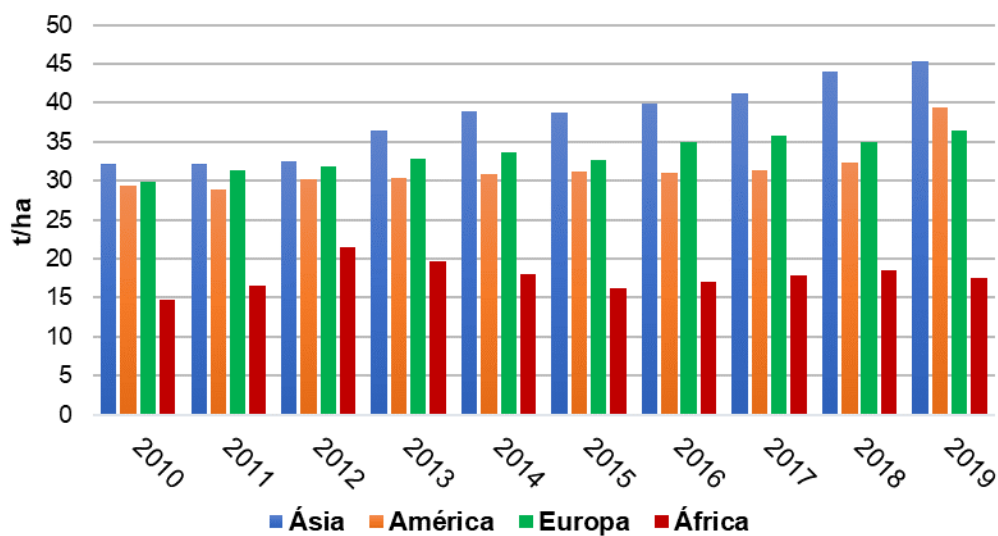


Figura 5 - Evolução da produtividade das culturas da cenoura e do nabo no continente asiático, americano, europeu e africano entre 2010 e 2019 (FAO, 2021).

2.2.2 Em Portugal

No panorama nacional, entre 2011 e 2018 a área de cultivo de cenoura estabilizou entre os 2000 e os 1500 ha, contrariamente ao que se verifica relativamente à produção na qual se notou um crescimento significativo até ao ano 2014, ultrapassando as 100 mil toneladas, tendo depois decrescido e estabilizado perto das 90 mil toneladas (Figura 6) (GPP, 2021).

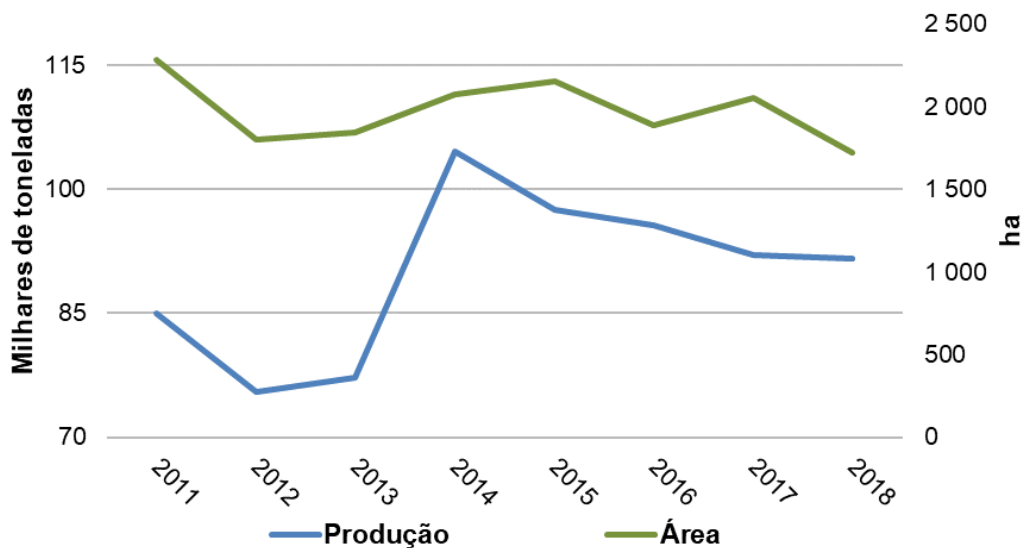


Figura 6 – Produção e área dedicada à cultura da cenoura em Portugal entre 2011 e 2018 (GPP, 2021).

No que diz respeito à produtividade da cultura em Portugal, através da Figura 7 é possível observar que a produtividade sofreu um aumento significativo entre 2011 e 2018, ainda que tenha sofrido algumas oscilações, passando de 37 t.ha⁻¹ para 53 t.ha⁻¹ (GPP, 2021).

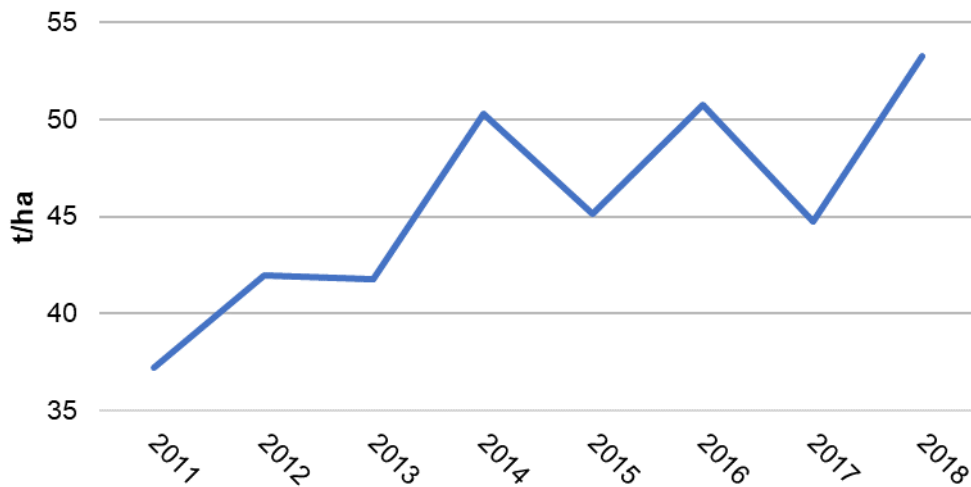


Figura 7 – Produtividade da cultura da cenoura em Portugal, entre 2011 e 2018 (GPP, 2021).

Pela observação da Figura 8, relativamente ao comércio internacional de cenoura, é possível aferir que, no período considerado, o preço médio de exportação é sempre superior ao preço médio de importação da cenoura e do nabo, verificando-se também uma tendência semelhante no que diz respeito às oscilações de ambos os preços. Tanto o preço médio de exportação como o preço médio de importação têm vindo a aumentar, ainda que o incremento seja mais notável ao nível da exportação, tendo atingido em 2018 o valor de 0,54 €. kg^{-1} , uma diferença de 0,25 €. kg^{-1} relativamente ao ano 2010 (GPP, 2021).

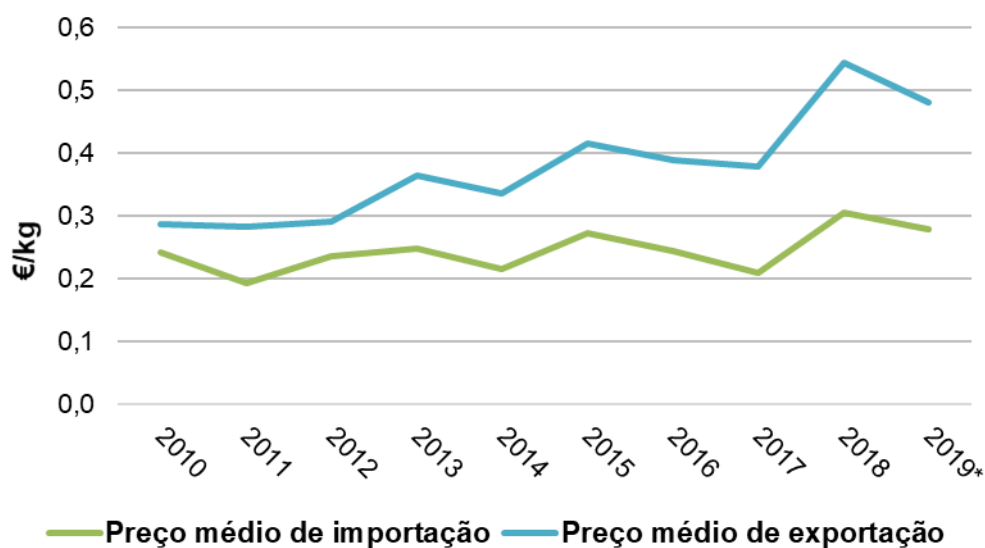


Figura 8 – Evolução dos preços médios de importação e exportação da cenoura e do nabo em Portugal, entre 2010 e 2019 (GPP, 2021).

2.3 Cultura da cenoura

2.3.1 Descrição e origem

A cenoura cultivada para a produção de raízes pertence à família das umbelíferas, género *Daucus*, mais especificamente à subespécie *Daucus carota* subsp. *sativus* (Gardé & Gardé, 1988). Conforme afirma Almeida (2006), trata-se de uma planta bienal, apesar de ser cultivada como anual, e possui um sistema radicular apumado. A floração origina flores brancas em forma de umbela, e acontece após vernalização da cultura. As raízes da cenoura desenvolvem-se a partir do hipocótilo e possuem elevada capacidade de armazenamento de fotoassimilados (Que et al., 2019).

No que diz respeito à origem da cenoura cultivada, vários documentos históricos apontam para a Ásia central como centro de origem. As cenouras orientais ou asiáticas diferenciaram-se na região da sua origem, enquanto as cenouras ocidentais ter-se-ão diferenciado na região da Turquia. O cultivo da cenoura está documentado desde o século X no Irão e Arábia, e mais tarde na Península Ibérica e na Europa Central, no século XIV, cenouras estas de cor púrpura ou amarelas, de pigmentação distinta das cenouras atualmente populares, que aparecem documentadas na Holanda entre os séculos XVI e XVII (Almeida, 2006).

A cenoura oriental é rica em antocianinas, de cor amarela ou roxa, e a típica cenoura ocidental é rica em carotenoides, podendo variar na sua cor (amarela, laranja ou vermelha) consoante a pigmentação das raízes, e caracteriza-se pela sua forma cónica ou cilíndrica e pelo sabor mais doce comparativamente com as cenouras orientais. Por sua vez, as cenouras orientais possuem raízes cónicas, mais grossas e curtas, apresentam um espigamento mais precoce que as ocidentais e menores teores de carotenoides (Que et al., 2019).

A cenoura é um vegetal de raiz que contém carotenóides, flavonóides, poliacetilenos, vitaminas e minerais, sendo que todos estes compostos possuem vários benefícios nutricionais e de saúde. Estes têm ação antioxidante, anticancerígena e promovem a imunidade, para além de reduzir problemas cardiovasculares e de colesterol elevado, diabetes, hipertensão e problemas renais (Dias, 2014; Dias, 2022).

A classificação das cultivares de cenoura é feita consoante três critérios: comprimento, forma geral da raiz e aptidão para utilização, correlacionando-se com o comprimento dos ciclos vegetativos das diferentes cultivares (Gardé & Gardé, 1988). A cultivar mais utilizada em Portugal e que predomina no mercado europeu é a 'Nantes', de raiz cilíndrica, semicomprida (15-20 cm), de pele lisa, polpa cor de laranja e sem coração (Almeida, 2006).

2.3.2 Condições edafoclimáticas para o desenvolvimento da cultura

Segundo Almeida (2006), a temperatura ótima de crescimento compreende-se entre os 16 e os 18°C, apresentando temperaturas mínima e máxima de desenvolvimento de 5 e 35°C, respetivamente (Rubatzky et al., 1999). Temperaturas médias diárias entre os 15 e os 21°C favorecem o crescimento vegetativo e radicular, além de otimizar a cenoura ao nível da cor e da forma da raiz.

A cultura da cenoura tem preferência por solos profundos, com boa drenagem e soltos que possuam textura grosseira. Os solos devem possuir uma boa capacidade de retenção de água

e simultaneamente apresentar boas condições de drenagem (Maroto, 1986; Rubatzky et al., 1999). Terrenos compactos originam raízes fibrosas e/ou deformações, com pouco interesse comercial. O intervalo ótimo de pH para o desenvolvimento da cultura situa-se entre 6,0 e 6,8 (Almeida, 2006).

2.3.3 Principais problemas

2.3.3.1 Culturais

O déficit hídrico e terrenos excessivamente compactados provocam a textura fibrosa, depreciando o produto a nível comercial. O rachamento das raízes é geralmente provocado por variações bruscas de humidade no solo, e a bifurcação e deformação das raízes acontece em solos pedregosos ou excessivamente pesados (Almeida, 2006; Maroto, 1986).

Temperaturas altas (média de 24 °C) resultam em raízes curtas e esféricas, enquanto as temperaturas baixas (média de 12-13 °C) promovem o alongamento da raiz, para além de estimular, em certas cultivares, a floração precoce (Almeida, 2006; Rubatzky et al., 1999), o que deprecia comercialmente a cenoura ao provocar um gosto amargo e prejudicar a colheita em si (Maroto, 1986). Acima dos 25 °C a cultura não só é limitada no desenvolvimento da cor das raízes (também acontece com temperaturas abaixo dos 15 °C), como o crescimento radicular torna-se secundário ao crescimento vegetativo. Temperaturas superiores a 30 °C reduzem o crescimento vegetativo e promovem gosto e textura indesejáveis do produto final (Almeida, 2006; Maroto, 1986; Rubatzky et al., 1999).

A fraca capacidade de competição com as infestantes no início do desenvolvimento da cultura exige a aplicação de herbicidas ou a prática da monda manual de infestantes (Turner et al., 2018).

Ao nível da colheita, este procedimento exige que as plantas possuam pecíolos fortes de modo a possibilitar a colheita mecânica através da parte aérea (Turner et al., 2018).

2.3.3.2 Fitossanitários

Os fungos do solo dos géneros *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis* e *Phytophthora* podem causar problemas graves, sendo responsáveis pela murchidão de plântulas (Gardé & Gardé, 1988).

Os fungos *Alternaria dauci*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora carotae* e *Erysiphe heraclei* são também inimigos importantes da cultura da cenoura (Patkowska et al., 2020).

As plântulas de cenoura sofrem frequentemente de “damping-off” ou podridão, que se caracteriza inicialmente pelo seu emurchecimento devido à morte prematura das extremidades das raízes, resultando mais tarde na morte dos indivíduos. Esta doença é provocada por vários patogénios, tais como *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Stemphylium radicinum*. O seu controlo é feito minimizando o inóculo presente no solo, utilizando fungicidas e recorrendo à fumigação (Rubatzky et al., 1999).

“Cavity spot” é uma das doenças mais importantes a nível mundial na cultura da cenoura, sendo provocada por *Pythium* spp.. Esta doença provoca lesões castanhas em depressão que se estendem na horizontal sob a epiderme da raíz principal. Ainda que o género *Pythium* esteja frequentemente associado à doença em plântulas, plantas mais maduras podem ser afetadas, e apesar de em muitos casos não se verificar o apodrecimento da raíz, o seu crescimento é afetado. Esta doença é promovida por más condições de drenagem do solo, sendo os meios de combate mais usuais a utilização de fungicidas, fumigação, ou evitando solos infectados (Rubatzky et al., 1999; Suffert & Guibert, 2007).

A podridão seca ou “dry rot”, causada por *Fusarium oxysporum*, provoca uma redução no crescimento das plantas, bem como o seu emurchecimento, descoloração vascular, amarelecimento das folhas, decadência negra do caule, base dos pecíolos e das raízes. Esta doença acontece devido a esporos persistentes no solo, sendo promovida por solos quentes e com alto teor de humidade. O seu controlo é realizado através de fumigação, gestão da humidade do solo e cultivares resistentes (Rubatzky et al., 1999).

A podridão por *Phytophthora* spp. é provocada por várias espécies deste género, em que o patogénio provoca o aparecimento de bandas largas húmidas e firmes ao longo das raízes, de cor castanho escuro, que posteriormente resultam no amolecimento dos tecidos e formação de micélio branco. A incidência desta doença deve-se à presença de esporos resistentes no solo, sendo promovida por temperaturas moderadas e altos teores de humidade. O seu controlo passa pela boa gestão de rega, drenagem eficiente dos solos e aplicação de fungicidas. Durante o armazenamento do produto final devem manter-se temperaturas baixas e humidade relativa inferior a 90% (Rubatzky et al., 1999).

Ao nível das pragas, a mosca da cenoura, *Psila rosae*, é a mais importante em Portugal e provoca estragos na cultura no seu estado larvar, abrindo portas de entrada a patogénios do solo. Outras pragas como os nemátodos *Meloidogyne*, e os alfinetes, *Agriotes* spp., podem também causar estragos importantes (Gardé & Gardé, 1988).

2.3.4 Técnicas culturais

A mobilização do solo é uma prática fundamental para a preparação do solo antes de proceder à sementeira, sendo que atua no controlo das infestantes, diminui a compactação, melhora o arejamento e a distribuição de água no solo. Esta técnica é também utilizada para introdução de restos de culturas antecedentes, como forma de introdução de nutrientes no solo e de promoção do nível de matéria orgânica no mesmo. As condições do solo em si ditam a necessidade de recorrer a mobilizações mais ou menos profundas. No caso de existirem problemas de compactação subsuperficial, deve-se mobilizar até 40-50 cm, principalmente no caso de umbelíferas de raízes como a cenoura, de forma a facilitar o crescimento radicular, eliminar a compactação e evitar escassez de drenagem e excessos de humidade ao nível das raízes. A mobilização superficial é necessária de modo a reduzir os agregados do solo, ainda que a completa ausência de agregados possa ter efeitos negativos ao nível da textura do solo, para além de aumentar os custos associados à produção (Rubatzky et al., 1999).

Para além da mobilização convencional, é possível realizar técnicas de mobilização mínima ou não-mobilização do solo, associadas à redução do esforço e custo na implementação da cultura, menores danos estruturais do solo e erosão, e manutenção de teores de matéria orgânica mais altos (Peters et al., 2003); no entanto, estes tipos de técnicas tornam-se difíceis de utilizar devido à fraca capacidade de competição com as infestantes apresentada pela cultura da cenoura, principalmente em fases iniciais do seu desenvolvimento (Rubatzky et al., 1999).

A fumigação dos solos é uma prática utilizada em casos de infestação dos solos com nemátodes, doenças do solo ou pragas, sendo de evitar esta prática em casos de infestação severa. Esta prática, apesar de ser eficaz quando realizada devidamente, é dispendiosa economicamente e nociva para o ambiente (Rubatzky et al., 1999).

A realização de rotações de culturas, utilizando plantas menos suscetíveis a certas pragas ou doenças contribui para o declínio das populações de patogénios devido à mortalidade natural e à atividade antagonista de microrganismos presentes na região radicular. Adicionalmente, esta prática contribui também para a manutenção da estrutura e dos teores de matéria orgânica do solo e diminui a sua erosão. A rotação é principalmente eficaz no controlo de patogénios que requerem tecidos vivos do hospedeiro, ou com baixa capacidade de sobrevivência saprofítica, e menos eficaz no controlo de patogénios com um largo espectro de hospedeiros ou que produzem estruturas de sobrevivência como esclerotos (Peters et al., 2003).

2.3.5 Estratégias de proteção

2.3.5.1 Luta química

A luta química baseia-se na utilização de substâncias químicas naturais ou de síntese com o objetivo de reduzir ou mesmo eliminar as populações de inimigos das culturas, sendo crucial para a produção agrícola em larga escala (Amaro, 2003). No entanto, a sua aplicação pode ter efeitos secundários em casos de aplicações excessivas e/ou erradas do ponto de vista fitotécnico, tendo consequências nos produtos, nos solos e no meio ambiente circundante, mais ou menos severas consoante a toxicidade dos resíduos e a rapidez da sua degradação (Messiaen, 1979).

Segundo Souza & Resende (2006), a aplicação de pesticidas sem alternância da substância ativa promove resistência dos inimigos da cultura, ressurgimento de populações de pragas, diminuição da população de auxiliares e a redução generalizada da diversidade microbiana do solo, podendo também, como afirma Amaro (2003), provocar toxicidade no homem, animais domésticos, fitotoxicidade na cultura, e poluição do ambiente ao nível dos solos, águas superficiais e subterrâneas e efeitos nocivos na macro e micro flora e fauna.

Deste modo é impreterível fomentar a proteção integrada, a luta biológica e luta biotécnica como componentes da produção, implementar medidas que visam a redução de intoxicações com pesticidas, a proibição ou rígida restrição de tratamentos aéreos e defender o ambiente aquático e as áreas ambientais vulneráveis como forma de minimização dos perigos e riscos dos pesticidas (Amaro, 2003).

As substâncias ativas homologadas para a cultura da cenoura para uso com efeito fungicida são: difenoconazol, azoxistrobina, fluopirame, isopirasame, difenoconazol + fluxapiraxade e pirimetanil (DGAV, 2020).

2.3.5.2 Luta biológica

Segundo Amaro (2003), a luta biológica pode ser definida como a utilização de populações de parasitóides, predadores, patogénios, antagonistas ou competidores com o objetivo de reduzir a população de inimigos da cultura, tornando-a menos abundante e prejudicial. Na terminologia portuguesa são designadas três modalidades: limitação natural, luta biológica clássica e tratamento biológico.

A limitação natural refere-se à ação de inimigos naturais ou auxiliares já existentes no ecossistema sobre populações de pragas e patogénios, em especial responsáveis por doenças

do solo, podendo até impedir que se atinja o nível económico de ataque, não justificando desta forma a luta química (Amaro, 2003).

A luta biológica clássica baseia-se no combate de uma espécie exótica através da importação de auxiliares, inimigos naturais geralmente provenientes da região de origem da espécie exótica, com o objetivo de alcançar um equilíbrio entre a sua população e a da espécie a combater (Amaro, 2003).

O tratamento biológico tem como objetivo o aumento das populações de auxiliares indígenas através de um adequado sistema de cultura em massa e posterior distribuição nos ecossistemas, podendo ser utilizado no combate a insetos e ácaros, mas também contra patógenos responsáveis por doenças e infestantes. *T. harzianum* é utilizado como biofungicida em tratamento biológico de doenças, sendo que existem inúmeras estirpes desta espécie disponíveis comercialmente (Amaro, 2003; Kareem & Al-araji, 2017; Patkowska et al., 2020).

2.4 *Trichoderma harzianum*

2.4.1 Taxonomia

Os fungos do género *Trichoderma* dos quais se conhece o seu teleomorfo, ou forma reprodutiva sexuada, pertencem à família Hypocreaceae, ordem Hypocreales e classe Sordariomycetes do filo Ascomycota. Foram descritas várias espécies reconhecidas como agentes de controlo biológico das quais se conhece tanto o anamorfo, ou forma reprodutiva assexuada, como o teleomorfo, sendo uma delas *T. harzianum* (Jorge, 2015).

A nível morfológico, existe um reduzido número de características que permitem diferenciar isolados das espécies de *Trichoderma*, sendo que as mais utilizadas por diversos autores para a caracterização morfológica são o tamanho dos esporos e a presença e o arranjo de clamidósporos. O reduzido número de características morfológicas, associado à elevada variabilidade destas mesmas características entre isolados, torna estes atributos morfológicos pouco fiáveis ao nível da determinação de espécies. A produção de pigmentos de diferentes colorações consoante os meios nutritivos utilizados é também um método utilizado para fins de sistematização (Grondona et al., 1997; Kuçuk & Kivanç, 2003).

2.4.2 Meios de cultura

Conforme afirma Jorge (2015), o fungo *T. harzianum* pode ser cultivado em diferentes meios de cultura, tais como o PDA (Potato Dextrose Agar) ou PDB (Potato Dextrose Broth). De modo a

obter um meio seletivo relativamente a fungos, os meios devem ser suplementados com antibióticos como a ampicilina ou canamicina com o intuito de inibir o crescimento de bactérias.

2.4.3 Controlo biológico

O *T. harzianum* estirpe T22 é utilizado como biofungicida em tratamento biológico de doenças, e que possui vários modos de ação na sua atividade biofungicida, como a antibiose, a competição espacial e nutritiva, o hiperparasitismo e a indução de resistência sistémica no hospedeiro (Amaro, 2003; Patkowska et al., 2018). Esta espécie é utilizada no combate e apresenta efeitos inibitórios em oídio e patogénios do solo de vários géneros como *Pythium*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora* (Amaro, 2003; Kareem & Al-araji, 2017).

A antibiose é um mecanismo específico de antagonismo entre fungos do género *Trichoderma* e outros fungos fitopatogénicos, que se baseia na segregação de metabolitos secundários, como antibióticos voláteis e não voláteis que inibem ou têm um efeito letal no patogénio (Błaszczyk et al., 2014; Ozbay & Newman, 2004).

A competição espacial e nutritiva é um dos mecanismos de controlo biológico associados aos fungos do género *Trichoderma*, que apresenta ritmos elevados de crescimento e colonização de substratos, sendo uma característica relevante, pois a sua capacidade de competição contra agentes fitopatogénicos do solo está dependente do seu crescimento na rizosfera (Ozbay & Newman, 2004).

As várias espécies de *Trichoderma* estão englobadas no grupo de PGPF's (fungos promotores de crescimento de plantas), sendo capazes de exercer efeitos diretos nas plantas, promover o seu potencial de crescimento e absorção de nutrientes, aumentar a eficiência da utilização de fertilizantes e a taxa de germinação, e ainda tornar a planta mais resistente contra problemas bióticos e abióticos (Patkowska et al., 2020).

T. harzianum possui enzimas quitinolíticas que permitem o hiperparasitismo de patogénios como *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp., e também enzimas proteolíticas, que afetam a atividade enzimática através da inibição de enzimas (pectinases, glucanases, quitinases e cutinases) produzidas por patogénios como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, e nemátodes como *Meloidogyne javanica* (Błaszczyk et al., 2014). Este processo limita o

crescimento e atividade de fungos fitopatogénicos. O agente de controlo biológico reconhece sinais do hospedeiro, desencadeando o enrolamento e penetração no hospedeiro utilizando enzimas líticas (Ozbay & Newman, 2004).

A resistência sistémica induzida está relacionada com a formação de proteínas que se demonstram tóxicas para patogénios como *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora infestans*, inibindo a formação e germinação de esporos (Fatima et al., 2015; Patkowska et al., 2020). Adicionalmente, reforçam as paredes celulares do hospedeiro e degradam as paredes celulares dos patogénios (Patkowska et al., 2020). Estirpes específicas do género *Trichoderma* colonizam e penetram tecidos radiculares, provocando alterações morfológicas e bioquímicas em toda a planta hospedeira (Ozbay & Newman, 2004).

O sucesso na colonização das raízes por parte dos fungos de *Trichoderma* está associado à atividade de hidrofobinas que causam a agregação dos seus filamentos miceliais às superfícies radiculares hidrofóbicas, e também à sua resistência aos compostos tóxicos que as plantas produzem em resposta a infeções como forma de prevenção da colonização das suas raízes (Błaszczuk et al., 2014).

2.5 Métodos para avaliação da presença de fungos dos géneros *Trichoderma*, *Pythium* e *Phytophthora*

2.5.1 Meios de cultura seletivos

Para identificar a incidência e severidade de fungos do género *Pythium* e *Phytophthora* no solo, poderá recorrer-se a meios de cultura seletivos. Segundo Conway (1985) o fungicida de largo espetro etaconazole, incorporado em PDA a 2% e alterado com ampicilina de sódio, é tão eficaz como o meio PVP (primaricin-vancomycin-pentachloronitrobenzene) para isolamento de *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. a partir de solos agrícolas com diferentes culturas instaladas.

O isolamento do fungo *T. harzianum* é possível utilizando um meio de cultura contendo os agentes antimicrobianos cloranfenicol, estreptomicina, quintozeno e propamocarbe, possibilitando a recuperação de colónias miceliais compactas (Askew & Laing, 1993; Williams et al., 2003).

2.5.2 Atividade enzimática da desidrogenase

As desidrogenases são enzimas cruciais para os sistemas enzimáticos de todos os microrganismos, fazendo parte da cadeia de transporte de elétrões que possui a molécula O_2 como aceitador final de elétrões, sendo desta forma parte integrante do mecanismo de oxidação microbiana de substâncias orgânicas em condições aeróbicas. Na ausência de oxigênio, dá-se a redução do cloreto trifeniltetrazólio (TTC) a trifenilformazan (TPF), solúvel em água, formando um produto de cor avermelhada que pode ser medido por espectrofotometria. As desidrogenases funcionam como indicador dos sistemas redox microbiológicos dos solos e como medida da comunidade microbiana viável e fisiologicamente ativa (Camiña et al., 1998; Friedel et al., 1994; Wolinska & Stepniewska, 2012).

A população, composição e função dos microrganismos do solo é afetada positivamente pela fertilização orgânica e mineral, sendo a adição de estrumes ao solo a componente mais importante para o aumento da biomassa microbiana (Chu et al., 2007). Tanto a biomassa microbiana como a atividade desidrogenásica estão intimamente relacionadas com o teor de carbono orgânico do solo, pelo que o estabelecimento de uma relação entre a atividade desidrogenásica e a biomassa microbiana permite avaliar o nível de atividade metabólica microbiana (Chu et al., 2007; Friedel et al., 1994).

2.5.3 Extração e quantificação de ADN a partir do solo

Respeitante ao isolamento de ADN metagenómico de qualidade, recorre-se a métodos manuais ou métodos baseados em *Kits* comerciais, variando na sua produtividade e qualidade do ADN obtido. O isolamento de ADN a partir de ambientes contaminados é um processo complicado, devido à presença abundante de polifenóis e polissacáridos nas amostras, sendo de difícil eliminação recorrendo a protocolos padrão de extração de ADN (Sagar et al., 2014; Tanveer et al., 2016).

A quantificação de ADN é realizada com o objetivo de averiguar a concentração média de ADN e também a sua pureza na solução. Para isto, observa-se a curva de absorvância utilizando um espectrofotómetro com absorção na região do espectro do ultravioleta, tendo em conta que os compostos húmicos absorvem a radiação a 230 nm, as proteínas a 280 nm, e o ADN a 260 nm. A observação dos rácios 260/230 nm e 260/280 nm permite averiguar relativamente à contaminação da amostra com ácidos húmicos e proteínas, respetivamente (Sagar et al., 2014).

Segundo Ross (1970), a refrigeração das amostras de solo num frigorífico a 4 °C é uma boa opção para evitar a diminuição da atividade enzimática nas mesmas, sendo ainda assim impossível evitar alguma redução destes valores após 77 dias de armazenamento. No entanto, conforme afirma Wlodarczyk (2000), este método de armazenamento revelou-se o pior método entre os estudados, referindo que os níveis de atividade enzimática das amostras se mostraram similares às amostras frescas no primeiro mês, a partir do qual se verificou uma redução significativa.

3 Métodos experimentais

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Localização do ensaio experimental

As amostras utilizadas no ensaio foram cultivadas e recolhidas de um terreno (38°41'19.27"N 8°47'53.995"W) localizado em Faias, localidade inserida no concelho de Palmela, distrito de Setúbal (Figura 9). No terreno em questão está instalado um pivot circular que abrange cerca de 45 ha, que são distribuídos para o cultivo de diversas culturas hortícolas e forrageiras. No canto superior direito da parcela (área delimitada a amarelo) foi feita a sementeira da cultura da cenoura numa área de 11 ha, tendo-se realizado a instalação do ensaio a Sul desta zona da parcela.



Figura 9 - Fotografia aérea da área total do terreno de 45 hectares abrangido pela rampa pivotante, onde estiveram instaladas várias culturas hortícolas e forrageiras (Google Earth, 2021).

A recolha de amostras de solo para efeitos de experiências laboratoriais foi realizada em dois terrenos, sendo um deles o terreno do ensaio propriamente dito (Faias - 38°41'19.27"N 8°47'53.995"W), mas também outro terreno (Cartaxo - 38°43'36.023"N 8°58'4.822"W) onde foi

realizada a aplicação de 25 kg.ha⁻¹ (M100) à sementeira de Trianum G © (M100) na totalidade da sua área (Figura 10).

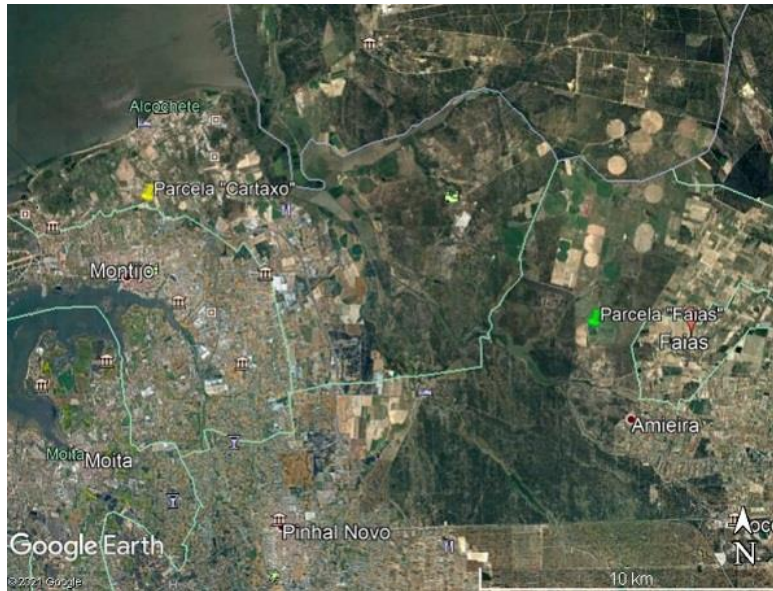


Figura 10 – Localização das parcelas utilizadas na recolha de amostras (Google Earth, 2021).

3.1.2 Tratamentos e esquema experimental

O ensaio foi realizado com o objetivo de estudar o efeito da aplicação do microrganismo *T. harzianum* T22 à instalação da cultura, contido no produto comercial Trianum G[®] da empresa Koppert[®]. Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de aplicação do microrganismo em causa, foram realizadas as seguintes modalidades de tratamentos: M0 (testemunha), M50, M75 e M100, correspondendo a 0%, 50%, 75% e 100% da dose recomendada pelo fabricante do produto, respetivamente (Quadro 1).

Quadro 1 – Elementos do ensaio experimental de campo e sua descrição.

Elemento	Descrição
Data de começo e fim do ensaio	18/11/2020 – 27/04/2021 (Cultura de estação)
Período de recolha de amostras de solo	23/10/2020 – 22/12/2020
Dimensão da totalidade da parcela experimental	Comprimento – 15 m x Largura – 1,6 m x N.º de modalidades – 4 = 96 m ²
Fator estudado	Concentração de <i>T. harzianum</i> T22
Modalidades de tratamento	M0 - Sem aplicação de Trianum G [®]
	M50 - Aplicação de 12,5 kg.ha ⁻¹ de Trianum G [®]
	M75 - Aplicação de 18,75 kg.ha ⁻¹ de Trianum G [®]
	M100 - Aplicação de 25 kg.ha ⁻¹ de Trianum G [®]

O ensaio foi instalado ao longo de um único camalhão do terreno, como se pode verificar no esquema do delineamento do ensaio experimental (Figura 11). Cada modalidade do ensaio teve uma dimensão de aproximadamente 24 m². Este ensaio teve uma única repetição.

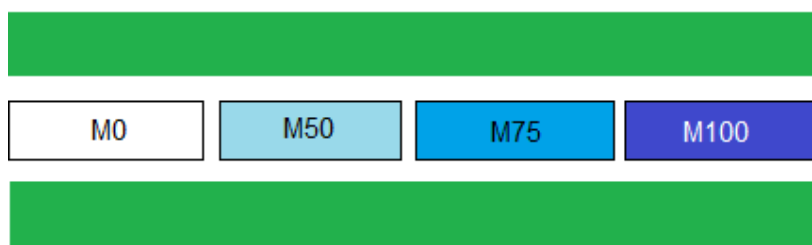


Figura 11 - Esquema do ensaio experimental instalado na parcela Faias.

3.1.3 Caracterização climática

Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, a região a Sul do Tejo onde se localizam as parcelas em estudo possui o tipo de clima Csa, ou seja, clima Temperado com verão quente e seco (IPMA, 2021).

Segundo as normais climatológicas da série 1971 a 2000, com dados recolhidos na estação meteorológica de Setúbal, é possível verificar que o valor médio mais elevado de quantidade total de precipitação ocorre no mês de dezembro com 128,9 mm, e o menor valor médio ocorre no mês de agosto, com apenas 11 mm (Figura 12). No que diz respeito ao maior valor de precipitação diária, este ocorre no mês de dezembro com 74,6 mm.

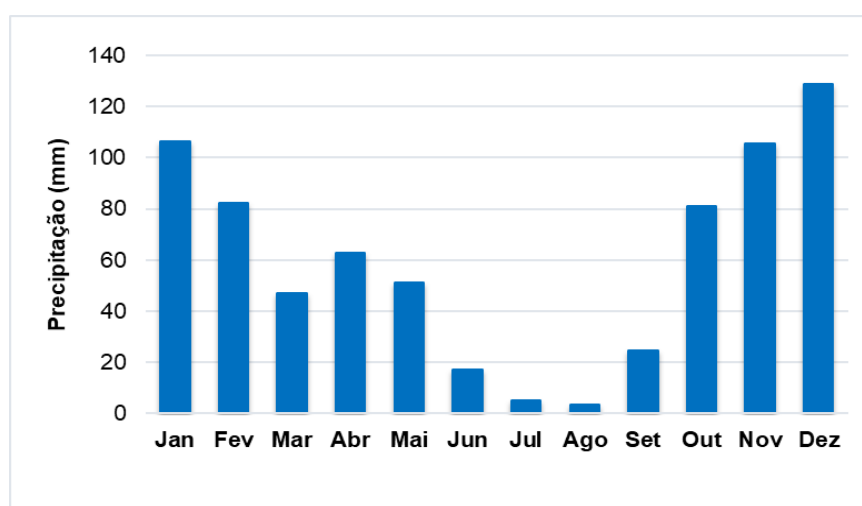


Figura 12 - Média da quantidade total de precipitação da normal climatológica no período 1971 a 2000 (IPMA, 2021).

No que diz respeito à temperatura do ar, atendendo à normal climatológica entre 1971 e 2000 na estação meteorológica de Setúbal, o maior valor de temperatura máxima regista-se no mês de julho com 43,5 °C, enquanto o menor valor de temperatura mínima se verifica no mês de janeiro com -5,1 °C. A temperatura média máxima regista-se em agosto com 29,5 °C, e a temperatura média mínima regista-se em janeiro com 4,7 °C.

Através da observação do Quadro 2, comparativamente com a normal climatológica, é possível aferir a semelhança entre os maiores valores de temperaturas máximas. No entanto, é possível também observar que os menores valores de temperatura mínima são superiores, uma vez que na normal climatológica, entre novembro e abril, os menores valores de temperatura mínima situam-se todos abaixo de 0 °C, enquanto nos valores observados durante o ciclo da cultura de

novembro de 2020 a abril de 2021, esta condição só se verificou em dezembro e janeiro, o que indica um aumento das temperaturas mínimas relativamente ao que se observou entre 1971 e 2000.

Quadro 2 - Evolução da precipitação e das temperaturas mínima e máxima, de novembro de 2020 a abril de 2021, desde a instalação até à colheita da cultura da cenoura na parcela onde se instalou o ensaio experimental (IPMA, 2021).

Meses	Precipitação (mm)	Temperatura do ar (°C)	
		Mínima	Máxima
Nov	25,6	4,6	25,7
Dez	77,2	-1,8	20,1
Jan	69,3	-4,1	18,7
Fev	143,2	3,5	22,5
Mar	25,9	3,5	26,2
Abr	22,0	5,3	28,0

3.1.4 Caracterização edáfica

Segundo Cardoso (1965), os solos de ambos os terrenos classificam-se como Regossolo dos climas sub-húmidos e semiáridos, pertencente ao sub-grupo dos Regossolos Psamíticos não húmidos (Rg). Estes solos caracterizam-se por serem arenosos, soltos, mais ou menos ácidos e apresentam um grau reduzido de diferenciação. Assim, na melhor das hipóteses estes solos possuem um delgado horizonte superficial com pequena acumulação de matéria orgânica. Caracterizam-se por possuir uma textura extremamente grosseira, sendo constituídos maioritariamente por areia grossa, apresentando níveis baixos de matéria orgânica, e uma razão C/N geralmente elevada devido ao baixo teor de azoto. Uma vez que estes solos apresentam escassez no que diz respeito aos coloides, detêm uma capacidade de troca catiónica extremamente baixa. No Quadro 3 pode-se observar vários parâmetros obtidos através de análise físico-química do solo da parcela Faias.

Quadro 3 – Análise físico-química de dezembro de 2010 do solo da parcela Faias, onde se realizou o ensaio experimental.

Variável	Valor	Nível
Textura	Arenosa	-
pH (H₂O)	7,3	Neutro
Matéria orgânica (%)	0,68	Baixo
Fósforo (mg.kg⁻¹)	21	Muito baixo
Potássio (mg.kg⁻¹)	119	Alto

3.2 Instalação e acompanhamento da cultura

3.2.1 Preparação da cama para a sementeira

A preparação da cama para a semente foi realizada com uma gradagem a 17 de outubro de 2020 na parcela Cartaxo, e a 16 de novembro de 2020 na parcela Faias, incorporando também desta forma o adubo de fundo espalhado previamente, recorrendo a uma grade de discos Galucho® montada num trator Valtra T154® de 162 cv. Após a homogeneização do solo e incorporação do adubo, realizou-se a armação dos camalhões recorrendo a uma alfaia da marca Machio®, montada num trator Valtra T121® de 133 cv.

3.2.2 Sementeira e instalação do ensaio experimental

A parcela Cartaxo foi semeada a 20 de outubro de 2020, utilizando um semeador mecânico de precisão. A densidade de sementeira utilizada foi de 125 sementes.m⁻², ou seja, 1,25 milhões de sementes.ha⁻¹ sendo as sementes de cenoura tipo 'Nantes', cultivar Exelso, que possuem um calibre de 1,6-1,8 mm. Esta cultivar é tipicamente utilizada em sementeiras entre setembro e janeiro, de modo a satisfazer a procura do mercado no período de março a

junho. Esta cultivar caracteriza-se pela elevada precocidade, resistência ao espigamento, homogeneidade, firmeza e cor intensa.

A sementeira da parcela Faias, na qual se instalou o ensaio experimental, foi realizada a 20 de novembro de 2020, tendo-se semeado 7 ha de cultivar Exelso, onde se instalou o ensaio experimental, e os restantes 4 ha de cultivar Speedo, recorrendo a um semeador mecânico de precisão. A densidade de sementeira utilizada foi de 120 sementes.m⁻², ou seja, 1,2 milhões de sementes.ha⁻¹. As sementes calibradas de ambas as cultivares possuem calibre de 1,6-1,8 mm.

A cenoura, como todas as apiáceas, apresenta normalmente problemas de germinação devido ao facto de o embrião ocupar menos de 5% do volume da semente e estar frequentemente imaturo quando a semente é colhida, sendo desta forma fundamental recorrer a sementes calibradas, e se possível peletizadas, uma vez que existe uma correlação positiva entre o tamanho das sementes e a faculdade germinativa.

A aplicação do agente antagonista na parcela Cartaxo foi feita com 100% da dose recomendada pelo fabricante (M100), enquanto na parcela Faias, onde se realizou o ensaio experimental, foram realizadas diferentes modalidades de modo a estudar possíveis efeitos ao nível da atividade microbiológica associados a diferentes concentrações de aplicação de *T. harzianum* T22.

A sementeira e aplicação do produto Triatum G[®] foi realizada pela mesma alfaia e em simultâneo, constituindo 3 bandas de 3 linhas e totalizando 9 linhas em cada camalhão, colocando o produto juntamente com a semente. A operação cultural realizou-se recorrendo a um semeador da marca Stanhay[®], montado num trator Valtra 6350[®] de 100 cv.

3.2.3 Tratamentos fitossanitários e fertilização

Em relação à distribuição do adubo, foi utilizada uma alfaia da marca comercial Vicon[®] e Gaspardo[®], montadas num trator Valtra T121[®]. Já nos tratamentos fitossanitários, utilizou-se um pulverizador de barra da marca Kverland[®] e um trator Valtra 6350[®].

Nos Quadros 4, 5 e 6 pode observar-se a lista de fertilizantes, fungicidas, inseticidas e herbicidas utilizados na parcela Faias, respetivamente. Nos Quadros 7, 8 e 9, verificam-se as adubações e tratamentos realizados na parcela Cartaxo.

Quadro 4 – Lista dos fertilizantes utilizados durante o ciclo cultural da cenoura na parcela Faias, onde foi instalado o ensaio experimental.

Marca Comercial	Data	Tipo de aplicação	Unidades aplicadas por hectare (kg.ha ⁻¹)								Total
			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	B	Mg	Zn	S	Ca	
Solan	16/11/2020	Fundo	60	90	120	0	0	0	0	70	600
Patentkali	16/11/2020	Fundo	0	0	60	0	20	0	120	0	200
Corbigran	23/12/2020	Cobertura	12,5	0	0	0	0	0	0	100	250
Complex	06/01/2021	Cobertura	25,3	27,6	41,4	0,07	0	0	0	12	230
Energetic	27/01/2021	Cobertura	57,6	0	0	0	0	0	0	0	240
nergeticK	27/01/2021	Cobertura	0	18	90	0	12	0	24	0	300
Complex	18/02/2021	Cobertura	27,5	30	45	0,08	0	0	0	12	250
NitratoK	17/03/2021	Cobertura	15,6	0	51,6	0	0	0	0	0	120
			246	165,6	408	0,15	32	0	144	194	Total

Quadro 5 – Lista de fungicidas e inseticidas utilizados no combate a pragas e doenças da cultura da cenoura na parcela Faias.

Marca Comercial	Substância ativa	Data de tratamento	Praga/Doença	Dose (L.ha ⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)
Influx	fludioxonil	-	-	-	-
Dithane	mancozebe	24/12/2020	Alternariose	2,1	28
Dithane	mancozebe	11/01/2021	Alternariose	2,1	28
Score	difenoconazol	21/01/2021	Alternariose	0,5	14
Ortiva	azoxistrobina	12/02/2021	Alternariose	0,8	10
Movento gold	espirotetramato	12/02/2021	Mosca da cenoura (<i>Psila rosae</i>)	0,7	21
Score	difenoconazol	12/03/2021	Alternariose	0,5	14
Ortiva	azoxistrobina	05/04/2021	Alternariose	0,8	10
Score	difenoconazol	23/04/2021	Alternariose	0,5	14

Quadro 6 – Lista de herbicidas utilizados para o controlo de infestantes na parcela Faias.

Marca comercial	Substância ativa	Data de tratamento	Dose (L.ha ⁻¹)
Stomp	pendimetalina	24/11/2020	1,0
Challenge	aclonifena	24/11/2020	1,5
Centium	clomazona	24/11/2020	0,15

Quadro 7 - Lista dos fertilizantes utilizados durante o ciclo cultural da cenoura na parcela Cartaxo, de onde foram recolhidas amostras de solo para análise laboratorial.

Marca Comercial	Data	Tipo de aplicação	Unidades aplicadas por hectare (kg.ha ⁻¹)								Total
			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	B	Mg	Zn	S	Ca	
Solan	02/10/2020	Fundo	78	66	126	0	0	0	0	0	600
Patentkali	02/10/2020	Fundo	0	0	81	0	27	0	0	0	270
Corbigran	18/11/2020	Cobertura	12	0	0	0	0	0	0	180	300
Complex	05/01/2021	Cobertura	16,5	18	27	0,045	0	0	0	12	150
Complex	17/02/2021	Cobertura	16,5	18	27	0,045	0	0	0	12	150
			123	102	261	0,09	27	0	0	204	Total

Quadro 8 - Lista de fungicidas e inseticidas utilizados no combate a pragas e doenças na parcela Cartaxo.

Marca Comercial	Substância ativa	Data de tratamento	Praga/Doença	Dose (l.ha ⁻¹)	Intervalo de segurança (dias)
Influx	fludioxonil	-	-	-	-
Score	difenoconazol	07/12/2020	Alternariose	0,5	14
Movento gold	espirotetramato	07/12/2020	Mosca da cenoura (<i>Psila rosae</i>)	0,7	21
Ortiva	azoxistrobina	11/01/2021	Alternariose	0,8	10
Signum	boscalide + piraclostrobina	22/01/2021	Alternariose	0,75	14
Scala	pirimetanil	05/02/2021	Alternariose	2	21
Signum	boscalide + piraclostrobina	05/03/2021	Alternariose	0,75	14

Quadro 9 - Lista de herbicidas utilizados para o controlo de infestantes na parcela Cartaxo.

Marca comercial	Substância ativa	Data de tratamento	Dose (l.ha ⁻¹)
Stomp Aqua	pendimetalina	23/10/2020	2,5

3.2.4 Colheita e transporte

A colheita das amostras para posterior análise foi realizada manualmente a 27 de abril de 2021. Foram realizadas três colheitas de 30 cenouras em cada modalidade, totalizando 90 cenouras por modalidade, ou seja, 90 cenouras x 4 modalidades = 360 cenouras no total, não existindo blocos casualizados.

A colheita final da parcela foi realizada de forma mecanizada a 6 de maio de 2021, recorrendo à alfaia Asa Lift[®], montada no trator Valtra T154[®] de 165 cv. Após a colheita, o transporte do produto final foi realizado num reboque agrícola da marca Herculano[®], montado num trator Valtra N163[®] de 165 cv.

3.2.5 Observações e registos no campo

Foram realizadas deslocações semanais ao campo, com vista à colheita de amostras de solo (\pm 200 g) para análise laboratorial. As recolhas de amostras de solo foram realizadas sempre junto às raízes das plantas, acompanhando desta forma o seu crescimento. Sempre que se realizou uma recolha de amostra nas diferentes modalidades do ensaio, a amostra consistiu em várias porções de solo da mesma modalidade de modo a aumentar a representatividade de cada amostra individual.

No que diz respeito à sanidade, foram feitas observações de periodicidade semanal com o objetivo de averiguar pontos de ocorrência de doenças causadas por fungos do solo e da parte aérea das plantas, assim como possíveis estragos causados por insetos inimigos da cultura e manchas causadas por desequilíbrios nutricionais. As deslocações ao campo foram interrompidas devido ao reinício do confinamento pandémico, em meados de janeiro de 2021.

3.2.6 Registos laboratoriais nas cenouras

No laboratório, em cada cenoura recolhida quantificou-se: o peso, o diâmetro e o comprimento da raiz. Foi também realizada a análise de qualidade, consistindo na observação de

características impeditivas à comercialização do produto final, tais como: diâmetro menor que 23 mm, comprimento menor que 12 cm, deformações, presença de raízes secundárias, bifurcações da raiz principal, fendilhamento, cheiros estranhos, humidade exterior anormal, espigamento e lenhificação (Figura 13).

Para a determinação do diâmetro e do comprimento foi utilizado um paquímetro, medindo o diâmetro junto ao colo/ombro na zona de maior diâmetro da raiz, e o comprimento determinado através da medição desde a zona do colo até à extremidade oposta (Figura 13).



Figura 13 - Balança de precisão e paquímetro utilizados para efetuar as medições.

Foi também realizada a determinação da cor de todas as cenouras, com o auxílio de um colorímetro portátil (Figura 14). Foram realizadas duas medições no terço médio de cada amostra, em lados opostos, para obtenção da saturação, tonalidade e luminosidade.



Figura 14 - Colorímetro portátil utilizado para efetuar medições de saturação, tonalidade e luminosidade de cada amostra colhida.

Para a determinação do Brix, foram escolhidas ao acaso cinco cenouras de cada lote, cortou-se uma porção do terço médio de cada uma e levou-se a uma centrífuga para extração do sumo, o qual foi então usado para a medição do Brix utilizando um refratômetro (Figura 15, A).

No que diz respeito à determinação da matéria seca, foram escolhidas cinco cenouras de cada lote, cortou-se 5 fatias de aproximadamente 1 mm de espessura do terço médio de cada amostra, tendo sido de seguida pesadas utilizando a balança de precisão. Estas amostras foram então colocadas na estufa para secagem, a 100 °C. Foram realizadas pesagens periódicas de modo a averiguar se os pesos das várias amostras tinham estabilizado, garantindo que a secagem estivesse completa. Foi feita uma pesagem final após 7 dias na estufa e estabilização dos pesos, e de seguida determinada a matéria seca (Figura 15, B).

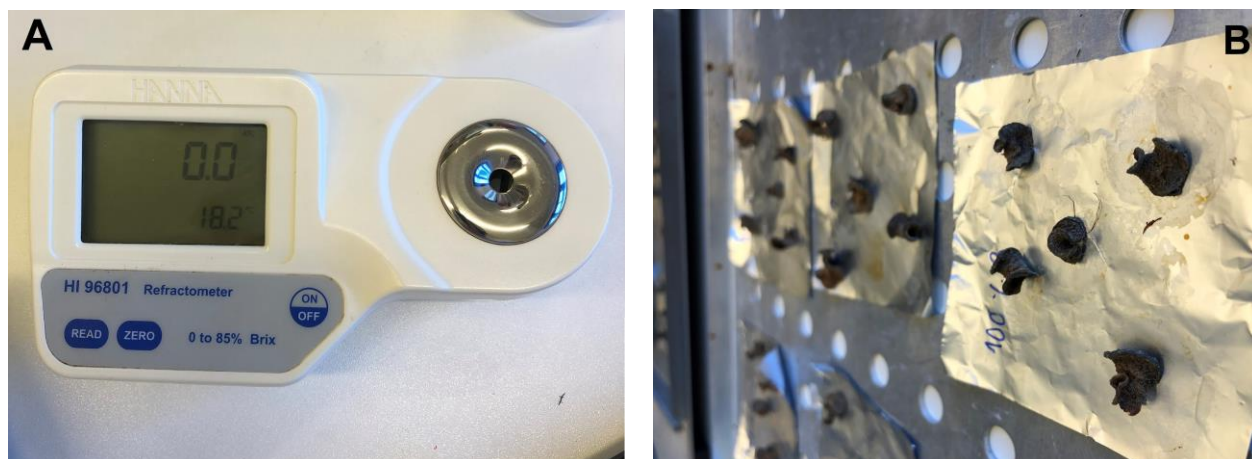


Figura 15 - Refratômetro utilizado na medição do Brix (A) e fatias de cenoura utilizadas na determinação da matéria seca, após secagem na estufa a 100 °C durante 7 dias (B).

3.2.7 Análise estatística

Para o tratamento de resultados foi realizada a análise de variância para as seguintes variáveis: peso, diâmetro, comprimento, saturação, tonalidade, luminosidade, ° Brix, matéria seca e taxa de refugo, sendo esta última a razão entre o número de cenouras consideradas como refugo, tendo em conta vários parâmetros de qualidade utilizados na empresa, e o número total de cenouras. Foram realizadas mudanças de variável sempre que necessário.

Para resultados significativos (definidos através da análise de variância, para $p\text{-value} \leq 0,05$), efetuou-se o teste de comparações múltiplas de médias de Tukey. O programa utilizado para a análise estatística foi o R 4.0.5 (<https://www.r-project.org/>).

3.3 Métodos laboratoriais

3.3.1 Preparação do meio de cultura para plaqueamento de extratos de solo

Para o plaqueamento das amostras de solo recolhidas foi necessário proceder à preparação de meio de cultura com o objetivo de realizar o crescimento dos microrganismos de interesse. Para tal, foi preparado o meio de cultura de batata dextrosada (PDA) para fungos. Na preparação do PDA usou-se 39 g de Potato Dextrose Agar em 1 L de água esterilizada, tendo o meio sido autoclavado a 1,5 bar e 120 °C, durante 20 minutos. Após a autoclavagem, os meios de cultura foram arrefecidos à temperatura ambiente, tendo-se acrescentado 500 μl de canamicina (50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ por cada litro de meio, de modo a impedir o crescimento de bactérias nas placas de

Petri. Uma vez que o meio arrefeceu o suficiente para ser distribuído e não danificar as placas, este foi distribuído, e esperou-se que solidificasse por arrefecimento nas placas. As placas foram seladas com Parafilm e colocadas no frigorífico (4°C) até ao momento da sua utilização.

3.3.2 Inoculação e incubação de fungos

O extrato de solo para a inoculação foi preparado a partir de uma amostra de solo à temperatura ambiente, moída com ajuda de um almofariz e pilão. Utilizou-se 0,2 g de amostra moída, à qual se adicionou 500 µl de água desionizada num tubo de Eppendorf. Após uma breve agitação, os tubos foram colocados numa centrífuga durante 5 minutos à velocidade de 13000 rpm.

Tendo o meio de cultura sólido nas placas de Petri e o extrato de solo preparado, iniciou-se o plaqueamento propriamente dito. Este processo foi realizado ao abrigo de uma câmara de fluxo laminar, devidamente desinfetada, onde foram necessários, para além das placas com meio de cultura sólido e dos extratos de solo, os seguintes materiais: lamparina, espalhador, etanol e material de pipetagem.

Cada extrato de solo foi inoculado, pipetando-se cuidadosamente 100 µl do sobrenadante resultante da centrifugação para o centro das placas de Petri que continham os meios de cultura. Após distribuir os extratos pelas placas, com o auxílio de um espalhador devidamente esterilizado com etanol e passagem na chama da lamparina, espalhou-se cuidadosamente o extrato ao longo de toda a placa, de modo a não danificar a superfície do meio de cultura. Este processo foi repetido o número de vezes necessárias à análise de todas as amostras de extratos de solo em estudo.

Terminado o processo, as placas de Petri foram seladas colocadas à temperatura ambiente, tendo-se procedido à observação e contagem do número de colónias após 7 dias de incubação.

3.3.3 Atividade enzimática da desidrogenase

A determinação da atividade enzimática da desidrogenase foi efetuada nas amostras de solo recolhidas com um intervalo temporal de uma semana entre si. Estas amostras foram armazenadas a 4 °C, desde o momento da sua recolha até à sua análise, de modo a evitar a diminuição da viabilidade dos microrganismos.

As amostras em estudo foram armazenadas a 4 °C ao longo de aproximadamente 120 dias, dada a situação pandémica e as restrições que daí decorreram.

A solução de TTC (1% em Tris 0,1 M, pH = 7,6) é adicionada à amostra de solo previamente crivada (1 g), agitada suavemente, e incubada durante 48 horas a 30°C, no escuro. Juntamente com a solução de TTC (666 µl), e a amostra de solo, foi colocada solução de glucose (333 µl de solução a 0,1%) de modo a garantir que as enzimas dispõem de uma fonte de energia para realizar a sua atividade. Após a incubação, o TPF libertado foi extraído adicionando 3 ml de metanol, procedendo-se então à filtragem da solução recorrendo a papéis de filtro e funis. Após a filtragem, pipetou-se 1 ml de cada amostra para cuvetes, e por fim determinou-se a absorvância espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 485 nm (Figura 16) (Chander & Brookes, 1991; Friedel et al., 1994).

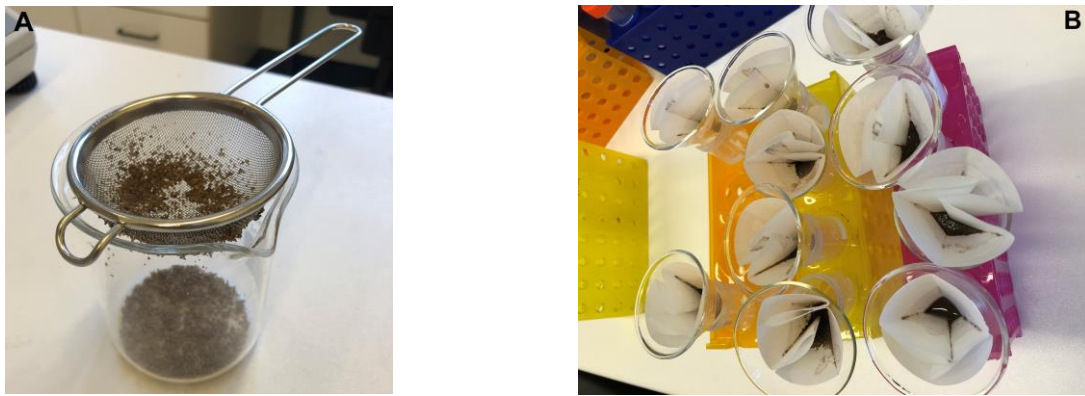


Figura 16 - Crivagem do solo (A) e filtragem após incubação das amostras para posterior medição no espectrofotómetro (B).

De modo a avaliar a atividade enzimática da desidrogenase *in vivo* foi também realizada a avaliação em placa, consistindo na inoculação e incubação de fungos como referido em 3.3.2, tendo-se posteriormente utilizado um espalhador para espalhar cuidadosamente 200 µl, em cada placa, uma solução com um rácio de 1:2 de glucose (0,1%) : TTC (1%). As placas foram incubadas no escuro, a 30 °C durante 3 dias.

3.3.4 Extração de ADN

Para o isolamento do ADN foram utilizadas amostras de solo recolhidas após a instalação do ensaio, pertencentes às diferentes parcelas. Para a extração do ADN foi utilizado o método de extração recorrendo ao Kit DNeasy PowerSoil. Neste método de extração de ADN, procedeu-se conforme as instruções e recomendações do protocolo dos fabricantes (cf. Anexo A). A extração foi realizada a partir de 250 mg de amostra de solo.

3.3.5 Quantificação do ADN

A análise do ADN presente nas extrações foi realizada recorrendo ao espectrofotómetro (GeneQuant pro – RNA/ADN Calculator) utilizando 50 µl da amostra pura. Para além das curvas de absorvância, foram também analisadas as absorvâncias a 230 e 280 nm de modo a averiguar o nível de contaminações com polissacáridos e polifenóis, respetivamente.



Figura 17 - Kit de extração de ADN do solo utilizado.

3.3.6 Preparação de meios de cultura seletivos

3.3.6.1 Meio de cultura seletivo para plaqueamento de fungos do género *Trichoderma* spp.

Foi realizado um meio de cultura com o objetivo de isolar fungos do género *Trichoderma* a partir do solo recorrendo ao método anteriormente utilizado por Williams et al. (2003). Relativamente ao plaqueamento, seguiu-se o protocolo utilizado por Askew & Laing (1993), mas em contraste com o protocolo referido para o plaqueamento, não foram realizadas diluições consecutivas devido ao possível efeito redutor do armazenamento na biomassa de microrganismos que se encontram nas amostras de solo. As placas utilizadas no plaqueamento foram colocadas na estufa a 30 °C durante 6 dias, tendo-se posteriormente observado o crescimento de colónias e procedeu-se à sua contagem.

3.3.6.2 Meio de cultura seletivo para plaqueamento de fungos do género *Pythium* e *Phytophthora* spp.

De modo a isolar colónias dos géneros *Pythium* e *Phytophthora*, recorreu-se ao protocolo realizado por Conway (1985). Este protocolo foi seguido tanto para a realização do meio seletivo como para o plaqueamento a partir das amostras de solo. As placas foram colocadas a 25 °C durante 5 dias, e posteriormente observou-se o crescimento de colónias e procedeu-se à sua contagem.

4 Resultados e discussão

4.1 Enquadramento dos resultados obtidos

As restrições derivadas da situação pandémica, as elevadas precipitações juntamente com problemas relacionados com o veículo que possibilitava as visitas ao terreno e o acompanhamento do ensaio experimental, impossibilitaram a recolha de um maior número de amostras de solo e conseqüente prolongamento do ensaio de campo.

Respeitante à precipitação (Figura 11), pode verificar-se que se tratou de um ano atípico, uma vez que os valores de precipitação mensais que se observaram durante o ciclo da cultura foram na sua maioria mais baixos do que os valores da normal climatológica em estudo, sendo o mês de fevereiro a única exceção, no qual se observou uma quantidade total de precipitação de 143,2 mm, 60 mm acima do que se verifica através da normal climatológica.

Através da observação do Quadro 2, comparativamente com a normal climatológica, é possível aferir a semelhança entre os maiores valores de temperaturas máximas. No entanto, é possível também observar que os menores valores de temperatura mínima são superiores, uma vez que na normal climatológica, entre novembro e abril, os menores valores de temperatura mínima situam-se todos abaixo de 0 °C, enquanto nos valores observados durante o ciclo da cultura de novembro de 2020 a abril de 2021, esta condição só se verificou em dezembro e janeiro, o que indica um aumento das temperaturas mínimas relativamente ao que se observou entre 1971 e 2000.

4.2 Efeito do tratamento com *Trichoderma harzianum* na presença de microrganismos nas amostras de solo

A inoculação de fungos a partir dos extratos de solo recolhidos na parcela “Cartaxo” foi realizada a 5 de novembro (Figura 18), com sucesso, verificando-se um maior número de colónias na amostra de solo recolhida a 23 de outubro, comparativamente com as amostras recolhidas posteriormente. Todas as colónias apresentam formação de micélio branco, denso, de textura de algodão na parte superior, sendo possível verificar que existem colónias vermelhas e outras amarelas, mais nítido no reverso das placas. Nas colónias vermelhas é possível também observar um anel vermelho que envolve o micélio, constituído por conídios.

Na placa de 23 de outubro foi possível contar 7 colónias amarelas e 10 vermelhas. A 28 de outubro e 4 de novembro contabilizou-se 3 colónias vermelhas e 4 colónias amarelas, respetivamente.

A amostra recolhida a 23 de outubro dista 3 dias da sementeira e inoculação do solo com *T. harzianum* T22, o que pode explicar o maior número de colónias contabilizadas. Já nas restantes placas, o número de colónias é significativamente menor, o que pode estar associado à ação antagonista do fungo em estudo ao longo do tempo, reduzindo a biomassa microbiana de fungos fitopatogénicos para a cultura da cenoura.

A inoculação de fungos a partir de extratos de solo demonstra-se robusta, e ainda que não tenha sido realizado um controlo positivo com suspensões de culturas puras, apresenta resultados interessantes em termos comparativos. Este método é relativamente expedito, e demonstra-se útil na medida em que permite averiguar relativamente à presença e intensidade da colonização do solo com os microrganismos de interesse. Ainda assim, requer o conhecimento da morfologia dos fungos em estudo, de modo a proceder à sua distinção, e uma vez que o meio de cultura não é seletivo, o crescimento de colónias que não pertencem ao género de interesse no estudo é igualmente promovido. Por outro lado, o crescimento de outras colónias pode ser interessante pelo facto de ser possível observar o efeito do biofungicida *T. harzianum* ao longo do tempo ao nível do número de colónias de fungos fitopatogénicos.

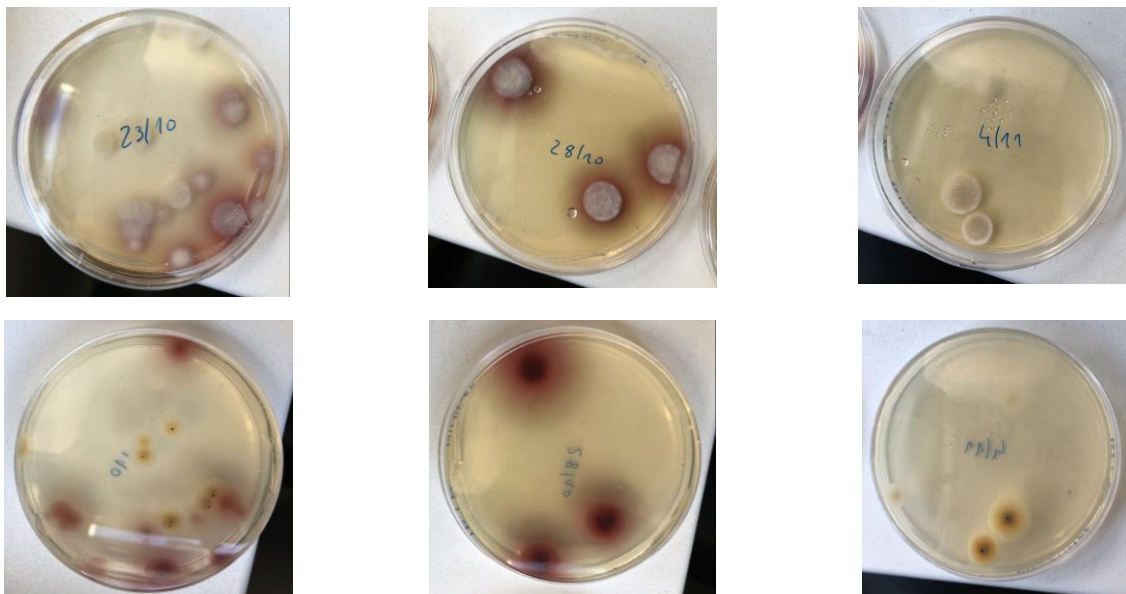


Figura 18 – Placas de Petri inoculadas com extratos de solo da parcela Cartaxo, após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente.

4.3 Efeito do tratamento com *Trichoderma harzianum* na atividade enzimática da desidrogenase nas amostras de solo

A enzima desidrogenase é uma das mais importantes ao nível do solo, sendo utilizada como indicador de atividade microbiana, uma vez que existe no interior das células de qualquer organismo microbiano. O facto destas enzimas utilizarem O_2 e outros compostos como aceitadores finais de eletrões, indica que a atividade da desidrogenase reflete a atividade metabólica do solo, sendo a sua atividade considerada proporcional à biomassa de microrganismos no solo (Wolinska & Stepniewska, 2012).

Como afirma Patkowska et al. (2020), *T. harzianum* atua como antagonista em relação a fungos fitopatogénicos e possui também a capacidade de promover o crescimento de outros fungos antagonistas, tendo desta forma um efeito redutor ao nível da população de microrganismos fitopatogénicos presentes no solo.

No Quadro 10 é possível verificar que os valores de atividade enzimática obtidos para as amostras de solo da parcela Cartaxo são reduzidos, o que pode estar associado à redução das populações de microrganismos fitopatogénicos no solo.

Quadro 10 - Atividade enzimática [AE ((u.a).(g MS)⁻¹)] das amostras de solo recolhidas na parcela Cartaxo.

Modalidade	Data	AE [(u.a).(g MS) ⁻¹]
M100	23/10/2020	0,07
	28/10/2020	0,10
	4/11/2020	0,14
	11/11/2020	0,073
	17/11/2020	0,11
	27/11/2020	0,11
	4/12/2020	0,10
	9/12/2020	0,08
	16/12/2020	0,09
	22/12/2020	0,07

Como é possível observar na figura 19, a cuvete da direita em (B) apresenta uma coloração vermelha intensa, o que significa que existiu uma elevada formação de TPF na reação. Em (A) encontram-se as cuvetes das amostras de solo recolhidas semanalmente na modalidade testemunha M0 ao longo de 5 semanas, nas quais se verifica uma ligeira coloração vermelha, o que indica à partida uma menor atividade enzimática em qualquer uma das cuvetes em (A) quando comparadas com a cuvete em (B). Para exemplificar a diferença entre as duas medições realizadas e atividades enzimáticas dos solos, nas cuvetes em (A), o valor de absorvância mais alta foi de 0,25, registando-se uma absorvância de 1,17 para as amostras de solo frescas em (B). Ainda que se trate de solos diferentes, é notória a diferença entre amostras de solos ao nível da atividade enzimática presente nas mesmas.

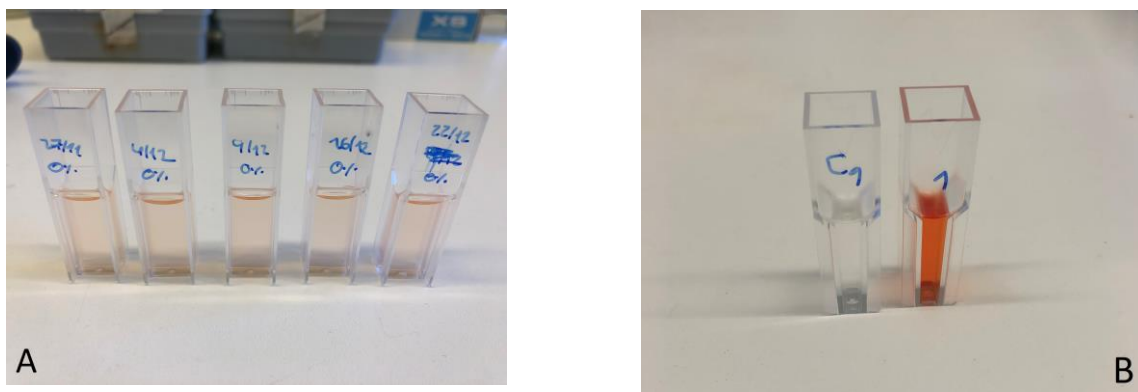


Figura 19 - Cuvetes utilizadas na medição da absorvância para posterior cálculo da atividade enzimática. Cuvetes associadas ao solo do ensaio experimental em estudo (A) e cuvetes de amostra de solo fresca do ISA (B).

A partir dos solos recolhidos da parcela Cartaxo obtiveram-se valores de AE semelhantes aos que se verificaram em M100 do ensaio experimental na parcela Faias, e de igual modo estes valores demonstram-se menores do que o que se observou no caso da modalidade de controlo.

Relativamente ao Quadro 11, todas as amostras apresentam atividades enzimáticas reduzidas. Ainda assim, a atividade enzimática revelou-se mais elevada nas amostras de solo recolhidas na modalidade de controlo (M0) do ensaio. Na modalidade com maior concentração de aplicação do produto em estudo (M100) verificaram-se atividades enzimáticas superiores aos valores em M50 e M75, observando-se o valor máximo no dia 16 de dezembro [(0,147059 (u.a).(g MS)⁻¹], valor este ainda assim inferior a qualquer valor obtido para a modalidade de controlo. Os maiores valores de M100 relativamente a M50/M75 podem refletir a presença em

maior quantidade do próprio fungo antagonista *T. harzianum*, compensando esta a maior redução de outros microrganismos.

Este método apresenta resultados mais concretos relativamente aos níveis de atividade enzimática dos solos comparativamente com os restantes métodos, mas requer um investimento elevado em equipamentos de laboratório, para além de ser pouco expedito, o que o torna pouco adequado para o contexto empresarial.

Quadro 11 - Atividade enzimática [AE ((u.a).(g MS)⁻¹)] das amostras de solo recolhidas das diferentes modalidades do ensaio experimental realizada na parcela Faias.

Modalidade	Data	AE [(u.a).(g MS) ⁻¹]	Modalidade	Data	AE [(u.a).(g MS) ⁻¹]
M0	27/11/2020	0,18	M75	27/11/2020	0,04
	4/12/2020	0,24		4/12/2020	0,03
	9/12/2020	0,22		9/12/2020	0,07
	16/12/2020	0,21		16/12/2020	0,05
	22/12/2020	0,24		22/12/2020	0,03
M50	27/11/2020	0,03	M100	27/11/2020	0,13
	4/12/2020	0,07		4/12/2020	0,08
	9/12/2020	0,09		9/12/2020	0,10
	16/12/2020	0,09		16/12/2020	0,15
	22/12/2020	0,05		22/12/2020	0,10

Foi também realizado o plaqueamento de extratos de solo a partir de amostras de solo recolhidas na parcela Cartaxo e também com solo do Instituto Superior de Agronomia (ISA) para o estudo da atividade enzimática em placa. Ao observar a Figura 20, é possível verificar que as amostras mais antigas, ou seja, mais próximas da aplicação do fungo no solo, apresentam sinais de maior atividade enzimática, que se associa a uma maior intensidade da cor vermelha resultante da redução do TTC a TPF. Por outro lado, verifica-se também que o solo do ISA (solo fresco, não armazenado) apresenta o maior nível de atividade enzimática de todas as placas. A frescura da amostra de solo recolhida no ISA pode ser um fator importante,

uma vez que, como refere Wlodarczyk (2000), o armazenamento das amostras tende a reduzir os níveis de atividade enzimática e que as amostras em estudo foram armazenadas durante 120 dias até ao momento da sua análise no laboratório.

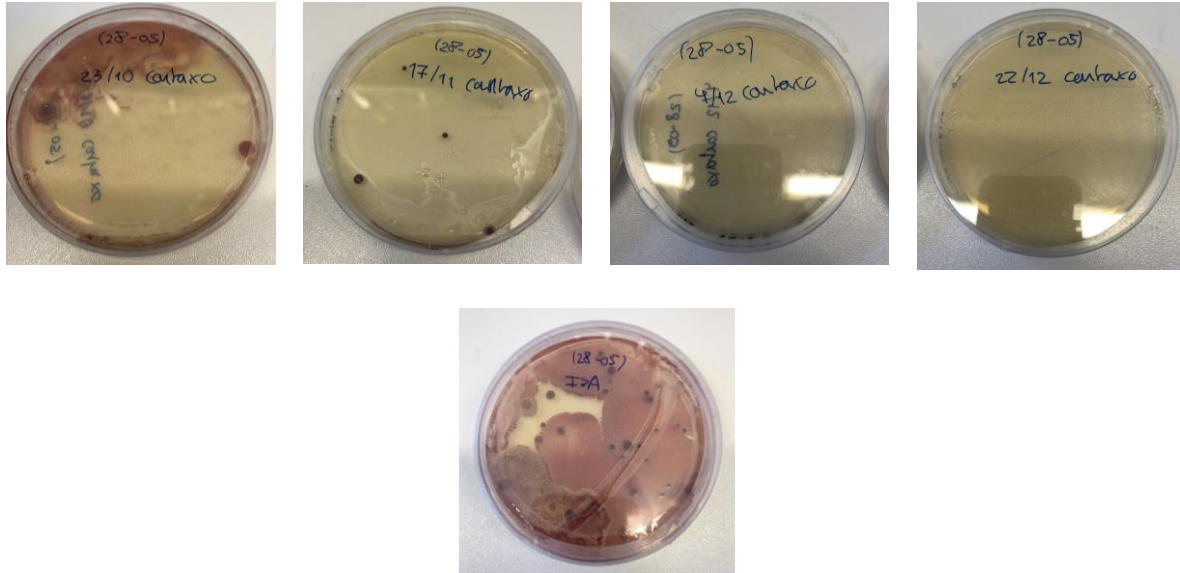


Figura 20 - Placas inoculadas com fungos a partir de extratos de solo e com glucose e TTC para o estudo da atividade enzimática *in vivo*.

A partir dos resultados, é possível aferir que a não aplicação do fungo antagonista está associada a valores de atividade enzimática mais elevados nas amostras estudadas, sugerindo maior presença global de microrganismos. No entanto, uma maior concentração de aplicação não resultou em atividades enzimáticas menores comparativamente com as modalidades em que existiu aplicação.

Existem ainda vários fatores ambientais e culturais que podem fazer variar os níveis de atividade enzimática dos solos, tais como a humidade do solo, disponibilidade de oxigénio, potencial de oxidação-redução, pH, teor de matéria orgânica, profundidade do perfil do solo, temperatura do solo, estação do ano, contaminação com metais pesados, e a fertilização e utilização de fitofármacos (Wolinska & Stepniewska, 2012). Adicionalmente, conforme afirma Beyer et al. (1993), a atividade enzimática pode diferir significativamente em solos com as mesmas propriedades principais, como o tipo de solo, exposição, textura, pH e carbono orgânico total.

4.4 Avaliação do efeito do tratamento com *Trichoderma harzianum* na biomassa microbiana do solo recorrendo a meios de cultura seletivos

Após a incubação das placas na estufa, realizou-se a contagem das colónias de modo a perceber se existem diferenças entre modalidades. Para isto, foi necessário conseguir identificar possíveis colónias de *Trichoderma* spp. e distingui-las de outras colónias. O MST (meio seletivo para *Trichoderma* spp.) demonstrou-se útil na promoção do crescimento dos fungos pretendidos, mas não impediu o crescimento de outros fungos que existem naturalmente no solo, exigindo desta forma o conhecimento de características morfológicas dos fungos do género *Trichoderma* para ser possível proceder à sua contagem (Błaszczyk et al., 2014; Contreras-Cornejo et al., 2016).

Através do Quadro 12 é possível verificar que M50 e M100 são as modalidades em que se verificam os maiores números de possíveis colónias de *Trichoderma* spp., com 54 e 55, respetivamente, sendo M0 a modalidade em que se registou a menor presença de fungos deste género, com apenas 6 colónias, e também a única modalidade com várias placas sem colónias que se assemelhem a fungos do género *Trichoderma*. Em M100, na placa de 22 de dezembro de 2020, registou-se o número mais elevado de colónias. Tanto em 27 de novembro como em 22 de dezembro de 2020 se verifica um maior número de colónias associadas à maior concentração de aplicação de *Trichoderma*.

De modo geral, a modalidade M50 demonstra uma maior consistência ao nível do número de colónias obtidas a partir das amostras recolhidas ao longo do tempo.

Quadro 12 - Contagem de colónias das placas de meio seletivo para o género *Trichoderma* obtidas a partir do plaqueamento das amostras de solo recolhidas do ensaio experimental.

	Data	M0	M50	M75	M100
<i>Trichoderma</i> spp.	27/11/2020	0	5	12	14
	4/12/2020	0	14	7	8
	9/12/2020	3	13	8	7
	16/12/2020	0	12	4	2
	22/12/2020	3	10	5	24
	Total		6	54	36

Relativamente às colónias de *Pythium* e *Phytophthora* (Quadro 13), a modalidade M0 apresentou o número total de colónias mais elevado, com 72 colónias, mais do dobro de M75, a modalidade com o menor número total, com apenas 32 colónias, e M50 e M100 apresentam resultados semelhantes, com 42 e 46 colónias, respetivamente. Assim, é possível aferir através dos resultados que existe uma diferença importante entre a aplicação e a não aplicação ao nível da contagem de colónias, mas que a diferença entre M50, M75 e M100 não é tão importante.

Quadro 13 - Contagem de colónias das placas de Petri contendo meio seletivo para os géneros *Pythium* e *Phytophthora* obtidas a partir do plaqueamento das amostras de solo recolhidas do ensaio experimental.

	Data	M0	M50	M75	M100
<i>Pythium</i> e <i>Phytophthora</i> spp.	27/11/2020	12	6	6	7
	4/12/2020	19	12	5	10
	9/12/2020	13	10	4	10
	16/12/2020	10	6	8	12
	22/12/2020	18	8	9	7
	Total		72	42	32

A inoculação do solo com o fungo antagonista demonstra-se desta forma promissora no que diz respeito ao aumento da população ativa do mesmo na rizosfera das plantas. Em oposição, a não aplicação do fungo no solo (M0) resulta numa menor presença do mesmo nas amostras de solo recolhidas. Verifica-se ainda que existe uma convergência entre a baixa incidência de colónias do género *Trichoderma* e a maior incidência de colónias de fungos fitopatogénicos associada à não aplicação do fungo antagonista.

Ainda que se tenham utilizado meios seletivos que, à partida, favorecem o crescimento de determinados fungos em detrimento de outros, de modo garantir que estamos perante colónias de fungos do género *Trichoderma*, *Pythium* e *Phytophthora* seria necessário realizar testes PCR ou proceder ao estudo morfológico e fisiológico das colónias, ao invés de depender apenas da observação visual das características das colónias resultantes do plaqueamento. É importante referir que, embora seja relativamente fácil identificar fungos do género *Trichoderma*, a identificação das espécies e das estirpes que as compõem é uma tarefa de maior complexidade, exigindo o estudo de características fisiológicas e efeitos bioquímicos de

isolados destes fungos quando confrontados com fungos fitopatogénicos (Kuçuk & Kivanç, 2003).

Os resultados apresentados, ainda que careçam de um maior número de repetições para ser possível realizar o tratamento estatístico a fim de averiguar se existem influências ao nível do tratamento, servem como indicativo do efeito provocado pela inoculação do fungo na população de microrganismos presentes nas amostras de solo recolhidas.

Contrariamente ao que se verifica no método de inoculação de fungos em placas a partir de extratos de solo, em 4.2, no qual se vê uma tendência para a diminuição do número de colónias ao longo do tempo, neste método isto apenas se verifica em M75 relativamente às possíveis colónias de *Trichoderma*. Uma vez que os meios são seletivos, a ação biofúngica que os fungos de *Trichoderma* poderiam ter, em placa, contra fungos do género *Pythium* e *Phytophthora*, é reduzida ou totalmente eliminada uma vez que o seu crescimento não é promovido.

Este método permite, com maior precisão, isolar colónias de fungos dos géneros de interesse de modo a verificar a sua presença e também servir como indicador para o grau de colonização do solo por parte dos mesmos. Devido à necessária obtenção dos meios seletivos, é um método mais dispendioso, mas que permite resultados de maior fiabilidade no que diz respeito à identificação dos fungos.

No contexto empresarial este método pode ser interessante na medida em que é rápido e não exige investimentos avultados em material de laboratório para a sua realização. No entanto, ainda que em menor grau, tal como na inoculação de fungos em placas, exige o conhecimento da morfologia dos fungos de modo a conseguir distinguir colónias de *Trichoderma* de outras colónias não pertencentes a este género, uma vez que os meios não impedem por completo o crescimento de outros fungos. Por outro lado, a identificação dos fungos não é tão precisa sem proceder à sua observação ao microscópio.

4.5 Avaliação da presença de microrganismos no solo

4.5.1 Avaliação da qualidade e quantidade de ADN do solo

Como passo preliminar para uma posterior análise molecular dos microrganismos presentes no solo, tentou estabelecer-se um método expedito de extração de ADN de microrganismos do solo.

A extração realizada a partir da amostra de solo da parcela Cartaxo, a 28 de outubro de 2020, apresenta boa quantidade de ADN, ainda que os rácios de contaminação com polissacáridos e polifenóis não sejam os ideais, verificando-se alguma contaminação nos dois níveis. Ainda assim, foi possível utilizar o Kit DNeasy PowerSoil® para extrair o ADN das amostras recolhidas nos campos monitorizados. A curva obtida permitiu perceber a qualidade da extração de ADN sendo que a curva ideal teria valores mais baixos nas gamas de absorvâncias de 230 e 280 nm. Na Figura 21 apresenta-se o gráfico da curva de absorvância com a respetiva leitura de absorvância.

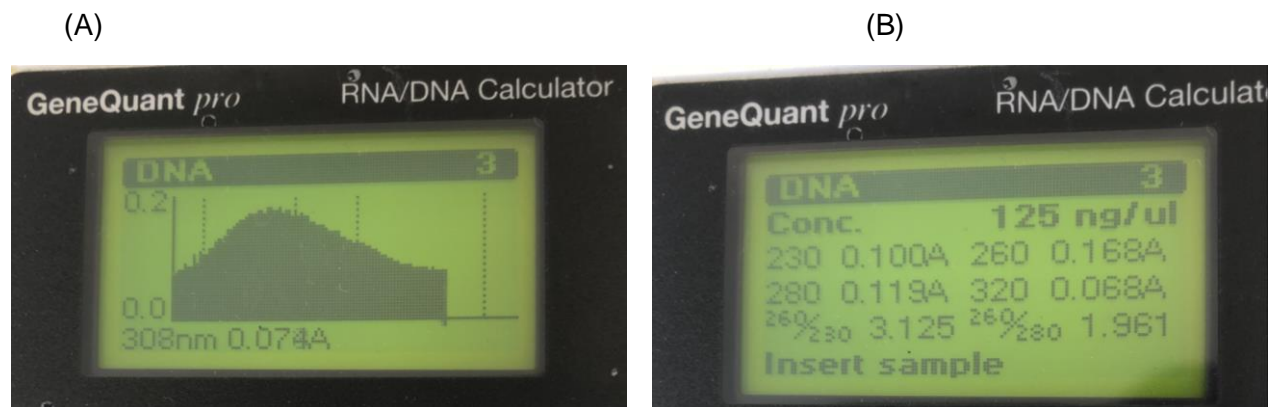


Figura 21 - Gráfico da curva de absorvância (A) com a sua respetiva leitura de absorvância (B), em análise espectrofotométrica.

4.6 Efeito do tratamento com *Trichoderma harzianum*

4.6.1 No peso da raiz

A modalidade M50 destaca-se com o valor médio de peso mais alto de 81,1 g seguindo-se M100, M75 e por fim M0 com 64,14 g, sendo muito semelhantes os resultados obtidos para M75 e M0 (Quadro 14). Como se pode verificar, a aplicação de maior quantidade do produto em causa não resultou em valores de pesos mais elevados. Verificou-se que existem diferenças significativas entre as médias dos pesos da modalidade M50 e das modalidades M0 e M75 ($p\text{-value} = 5,2 \times 10^{-5} < 0,05$).

Quadro 14 – Peso médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Peso médio (g)	Grupo
0	64,14	b
50	81,10	a
75	65,51	b
100	70,73	ab

4.6.2 No comprimento da raiz

Existem diferenças significativas entre as médias dos comprimentos das modalidades ($p\text{-value} = 2,13 \times 10^{-8} < 0,05$). M0 foi a modalidade com o valor mais baixo (12,5 cm) e significativamente diferente das restantes modalidades (Quadro 15). A aplicação de uma maior quantidade do produto em estudo não resultou em comprimentos maiores das raízes.

Quadro 15 – Comprimento médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Comprimento médio (cm)	Grupo
0	12,49	b
50	15,30	a
75	14,18	a
100	14,62	a

4.6.3 No diâmetro da raiz

É possível observar no Quadro 16 que M50 é significativamente diferente de M75 médio no que diz respeito ao diâmetro das amostras. A aplicação de mais quantidade do produto em estudo não resultou em raízes de maior diâmetro. Existem diferenças significativas entre as médias dos diâmetros das modalidades M50 e M75 ($p\text{-value} = 0,0144 < 0,05$).

Quadro 16 – Diâmetro médio das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Diâmetro médio (cm)	Grupo
0	2,73	ab
50	2,81	a
75	2,56	b
100	2,64	ab

4.6.4 Na taxa de refugo

No Quadro 17, verifica-se que existem diferenças significativas entre modalidades do ensaio (p -value = 0,024 < 0,05). A maior taxa de refugo verificou-se ao nível da modalidade do ensaio em que não existiu qualquer aplicação de *T. harzianum* T22 (M0), verificando-se também que a menor taxa de refugo está associada à modalidade com maior concentração de aplicação do fungo (M100), existindo diferenças significativas entre M0 e M100. A aplicação de uma maior concentração do produto (M100) demonstrou-se significativamente diferente da não aplicação (M0).

Quadro 17 – Taxa de refugo média das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Taxa de refugo média (%)	Grupo
0	0,72	a
50	0,50	ab
75	0,55	ab
100	0,45	b

Ao nível da representatividade das causas de refugo do produto final nas diferentes modalidades do ensaio, como se pode observar na Figura 22, os múltiplos defeitos (casos em que existe uma ou mais causas de refugo em simultâneo na amostra) predominam em todas as modalidades. É possível também averiguar que M100 é a modalidade com maior diversidade

de causas de refugo (5), encontrando-se M50 no extremo oposto com apenas 3 causas de refugo associadas.

A percentagem de amostras categorizadas como refugo devido a diâmetro insuficiente (diâmetro < 2,3 cm) é mais elevada na modalidade M75, em que representa 21%. Nas modalidades M0 e M75 esta causa representou 11 e 12%, respetivamente, sendo que na modalidade M50 nenhuma amostra apresentou diâmetro insuficiente para comercialização.

Relativamente ao refugo por comprimento insuficiente (comprimento < 12 cm), a maior representatividade desta causa de refugo está associada à modalidade M100 em que se verifica o valor de 23%, seguindo-se M0 com 17%, M75 com apenas 4%, e M50 destacou-se novamente, em semelhança ao diâmetro da raiz, por não possuir nenhuma amostra com estas limitações.

Apesar da modalidade M0 deter o maior número de amostras deformadas (inclui deformação e/ou bifurcação da raiz principal) e maior taxa de refugo em geral, é na modalidade M50 que se verifica maior representatividade desta causa de refugo, com 38% do total.

Respeitante às raízes secundárias, esta causa de refugo apresentou baixa incidência em todo o produto colhido no ensaio, representando apenas 5% e 6% da totalidade do refugo nas modalidades M50 e M100, respetivamente.

É possível observar na Figura 23, cenouras categorizadas como refugo e assim inviáveis para comercialização.

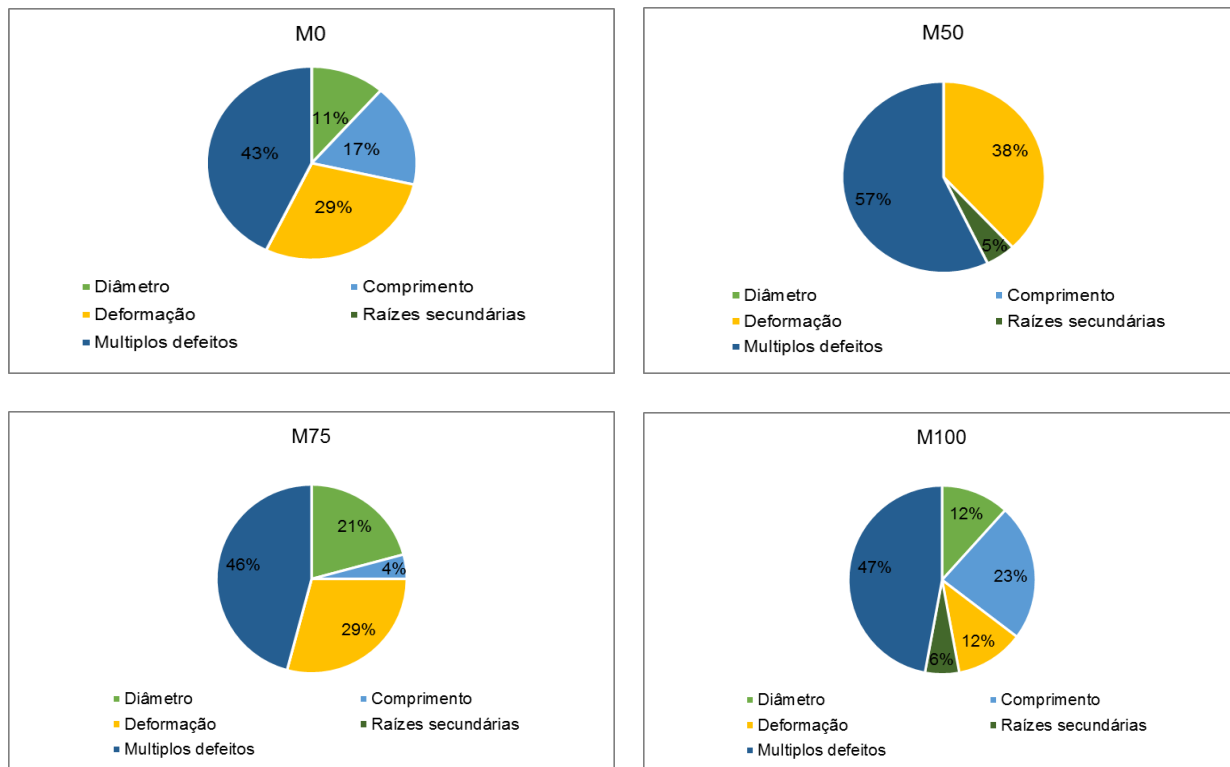


Figura 22 - Representatividade das várias causas de refugo nas modalidades M0, M50, M75 e M100 do ensaio experimental.

(A)



(B)



Figura 23 - Cenouras categorizadas como refugo por (A) múltiplos defeitos e (B) bifurcação da raiz principal.

4.6.5 Na coloração da raiz

No que diz respeito à coloração das amostras, a análise de variância revelou que não existem diferenças significativas ao nível da tonalidade ($p\text{-value} = 0,981 > 0,05$) e da saturação ($p\text{-value}$

= 0,101 > 0,05), mas sim no caso da luminosidade ($p\text{-value} = 0,00214 < 0,05$) (Quadro 18). O tratamento evidencia efeitos ao nível deste parâmetro de qualidade do produto entre M50 e as restantes modalidades.

Quadro 18 - Saturação, tonalidade e luminosidade médias das diferentes amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Média	Grupo	Média	Grupo	Média	Grupo
	Tonalidade		Saturação		Luminosidade	
0	1,75	a	45,24	a	50,35	b
50	1,74	a	45,17	a	50,95	a
75	1,75	a	44,47	a	50,22	b
100	1,75	a	44,74	a	50,21	b

4.6.6 Nos valores de Brix e produção

No que diz respeito ao Brix (Quadro 19), foi possível averiguar que existem diferenças significativas entre M0 e M75 e M100 ($p\text{-value} = 0,006 < 0,05$). Neste caso, uma menor aplicação do produto em estudo está associada a amostras com maior teor de sólidos solúveis.

Quadro 19 – Grau Brix médio das amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	Média do Brix (º Brix)	Grupo
0	8,10	a
50	7,07	ab
75	6,33	b
100	6,90	b

No que diz respeito à produção de cada modalidade (Quadro 20), obtiveram-se os seguintes resultados:

Quadro 20 – Produção associada a 90 cenouras de cada modalidade do ensaio experimental.

Modalidade	Produção (kg)
0	5,77
50	7,21
75	5,89
100	6,37

Como se pode observar através dos Quadros 19 e 20, M0 foi a modalidade com menor produção (5,77 kg) e maior valor de Brix (8,10 ° Brix), o que pode estar relacionado com menores teores de água das cenouras, e conseqüentemente uma maior concentração de sólidos solúveis. No entanto, a modalidade M75 apresentou a segunda produção mais reduzida, logo após M0, mas apresentou o menor valor de Brix (6,33 ° Brix) entre todas as modalidades. M50 destaca-se por apresentar a produção mais elevada (7,21 kg) e o segundo valor de Brix mais elevado (7,07 ° Brix) do ensaio experimental.

4.6.7 Na matéria seca

No que diz respeito à matéria seca, não existem diferenças significativas ao nível estatístico (p -value = 0,211 > 0,05).

Quadro 21 - Matéria seca média das amostras de cada modalidade do ensaio através do tratamento estatístico, assim como o grupo associado.

Modalidade	MS média (%)	Grupo
0	0,31	a
50	0,30	a
75	0,30	a
100	0,29	a

5 Conclusões e perspectivas

Este trabalho visou avaliar o efeito da aplicação de *T. harzianum* na população microbiana do solo, nomeadamente na abundância de fungos do género *Pythium* e *Phytophthora*, bem como procurar métodos expeditos para essa avaliação. Procurou igualmente avaliar o efeito da ação deste antagonista na produção e qualidade da cultura da cenoura. Para o primeiro objetivo referido, tentou-se analisar o interesse da inoculação de extratos de solo em meios genéricos e em meios seletivos, da avaliação da atividade enzimática em amostras de solo, e da extração de ADN de amostras de solo para futura análise molecular.

Verificou-se que o método de inoculação de fungos a partir de extratos de solo originou resultados interessantes, notando-se uma tendência para a diminuição do número de colónias de fungos em placa ao longo do tempo. Este método apresenta-se robusto e passível de ser realizado em contexto empresarial, requerendo baixo investimento e sendo um método rápido, apresentando ainda assim limitações no que diz respeito à identificação dos fungos de interesse.

Relativamente ao estudo da atividade enzimática da desidrogenase (AE), a não aplicação do fungo antagonista está associada a valores de AE mais elevados nas amostras estudadas. Este método, devido ao equipamento necessário para a sua realização e por ser pouco discriminativo, não se demonstra adequado para a realização no contexto de uma empresa.

O estudo da AE *in vivo* em placa permitiu observar de forma rápida os efeitos do tratamento na AE, e sugere que amostras de solo mais antigas, ou seja, mais próximas da data de aplicação do agente antagonista, possuem maiores níveis de AE, sendo este método adequado à utilização em ambiente empresarial uma vez que não requer investimentos avultados em material de laboratório e se demonstra expedito.

A avaliação do efeito da aplicação de *T. harzianum* na biomassa microbiana do solo recorrendo a meios seletivos, por sua vez, demonstra que o número de colónias (6) de *Trichoderma* é significativamente superior em qualquer modalidade do ensaio comparativamente com M0. Adicionalmente, é em M0 que se verifica o maior número de colónias (72) nas placas com meio seletivo para *Pythium* e *Phytophthora*. Este método revelou-se expedito e possível de ser implementado em contexto empresarial com baixos custos em material de laboratório.

Foi possível extrair uma boa quantidade de ADN a partir das amostras de solo, ainda que a sua qualidade não seja a ideal devido a contaminações com polissacáridos e fenóis. Este método

precisa de ser melhorado para dar resultados úteis, mas servirá sempre apenas como controlo dos métodos expeditos a implementar na empresa, não sendo ele próprio adequado a essa abordagem.

Em resumo, este trabalho permitiu estudar métodos expeditos para avaliar a presença e a quantidade de biomassa microbiana no solo, com o objetivo de implementação no contexto empresarial como ajuda à tomada de decisão, apontando para a avaliação da atividade enzimática *in vivo* e a utilização de meios seletivos como ferramentas úteis.

Os resultados obtidos permitiram verificar que uma maior aplicação de *T. harzianum* (M100) não resultou em peso e diâmetro médios significativamente diferentes das restantes modalidades. Existiram diferenças significativas entre M0 e as restantes modalidades no que diz respeito ao comprimento médio das cenouras.

No que diz respeito à taxa de refugo, M0 apresenta a maior taxa de refugo (72%), existindo diferenças significativas ao nível estatístico entre M0 e M100. M100 é a modalidade com menor taxa de refugo (45%), aspeto com grande interesse agronómico e económico.

Ao nível da cor das raízes, M50 é significativamente diferente das restantes modalidades no parâmetro da luminosidade. Ao nível da matéria seca, não existem diferenças significativas.

No que diz respeito ao ° Brix e produção das cenouras, M0 possui o valor Brix mais elevado e significativamente diferente de M75 e M100 e simultaneamente o menor valor de produção.

Os resultados deste trabalho têm de ter em conta o contexto em que foram obtidos. Durante o processo de recolha das amostras de solo, teria sido importante ter ao dispor os reagentes necessários e os meios seletivos de forma a que fosse possível trabalhar com amostras frescas. O armazenamento prolongado das amostras, consequência inevitável da situação pandémica, terá tido certamente influência nos resultados obtidos.

O reforço do tratamento respeitando as modalidades aqui referidas, teria permitido prolongar a duração do ensaio de campo, obter uma maior amostragem, e realizar um tratamento estatístico mais robusto dos resultados obtidos. Adicionalmente, seria importante realizar repetições do ensaio, de modo a aumentar a dimensão da amostragem, tendo em conta o elevado coeficiente de variação do peso das raízes das cenouras, e verificar se certas tendências se mantêm ou não. Ainda assim, os resultados obtidos mostram que o tratamento com o agente antagonista contribuiu para controlar a população de *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp. e permitiu menores taxas de refugo, aspeto muito importante em termos empresariais.

6 Referências Bibliográficas

- Almeida, D. (2006). *Manual de culturas hortícolas* [1.^a ed.][1.º Vol.]. Lisboa, Portugal. Editorial Presença: 79-97.
- Amaro, P. (2003). *A proteção integrada*. Lisboa. Portugal. ISA/Press: 129-214.
- Askew, D. J., & Laing, M. D. (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42(5), 686–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01553.x>
- Beyer, L., Wachendorf, C., Elsner, D. C., & Knabe, R. (1993). Suitability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. *Biology and Fertility of Soils*, 16(1), 52–56. <https://doi.org/10.1007/BF00336515>
- Błaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., & Jędrzycka, M. (2014). *Trichoderma* spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 309–317. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- Camiña, F., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., & Leirós, C. (1998). Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8–9), 1005–1011. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00010-8)
- Cardoso, J. (1965). *Os solos de Portugal. Sua classificação, caracterização e génese* [1.º Vol.]. Direção Geral dos Serviços Agrícolas: 67-70.
- Chander, K., & Brookes, P. C. (1991). Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils? *Soil Biology and Biochemistry*, 23(10), 909–915. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90170-O](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90170-O)
- Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. (2007). Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2971–2976. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.031>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw036.

<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>

- Conway, K. (1985). A selective medium for isolation of *Pythium* spp. from soil. *Plant Disease*, 69(5), 393–395. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.46.542>
- DGAV. (2020). *Autorizações de venda em vigor*. <https://sifito.dgav.pt/divulgacao/produtos>
- Dias, J.S. (2014). Nutritional and health benefits of carrots and their seed extracts. *Food and Nutrition Sciences* 5(22): 2147–2156. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.522227>
- Dias, J.S. (2022). 7. Nutritional and health benefits of carrots and its seed extracts: A Review. In Chittoria, R.V (Ed.). *Emerging Trends in Disease and Health Research Vol 4*. London. Book Publisher International: 84-98.
- FAO. (2021). *Estatísticas de produção*. Estatísticas de Produção. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Fatima, K., Noureddine, K., Henni, J. E., & Mabrouk, K. (2015). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Phytophthora infestans* in the North-west of Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 6(4), 44–53.
- Friedel, J. ., Molter, K., & Fischer, W. . (1994). Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and idonitrotetrazolium chloride. *Biol Fertil Soils*, 18, 291–296.
- Gardé, A., & Gardé, N. (1988). *Culturas hortícolas*. [6.^a ed.]. Lisboa, Portugal. Clássica: 45-57.
- GPP. (2021). *Informação sobre produtos*. Consultado em <https://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos>
- GPPAA. (2007). Diagnóstico Sectorial. *Frutas, Hortícolas e Flores*. (pp. 28–38).
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3189–3198. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3189-3198.1997>

- INE. (2018). *Estatísticas Agrícolas - 2018*. Consultado em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358629204&PUBLICACOESmodo=2
- INE. (2021). *Estatísticas Agrícolas 2020*. Consultado em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=437147278&PUBLICACOESmodo=2
- IPMA. (2021). *Normal climatológica no período de 1971 a 2010*. Consultado em <https://doi.org/https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1971-2000/#535>
- Jorge, M. (2015). *Contribución al estudio del sistema de lipasas de Trichoderma harzianum*. (tese de Doutoramento). Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Kareem, H. J., & Al-araji, A. M. (2017). Evaluation of *Trichoderma harzianum* biological control against *Fusarium oxysporum* F. sp. *Melongenae*. *Iraqi Journal of Science*, 58(4B), 2051–2060. <https://doi.org/10.24996/ij.s.2017.58.4b.7>
- Kuçuk, Ç., & Kivanç, M. (2003). Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 247–253.
- Maroto, J. V. (1986). *Horticultura herbácea especial*. [5.ª ed.]. Valência, Espanha. Mundi-Prensa: 147.
- Messiaen, C. M. (1979). *Las hortalizas*. [1.ª ed.]. Cidade do México. México. Blume.
- Ozbay, N., & Newman, S. (2004). Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4), 478–484. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.478.484>
- Patkowska, E., Jamiolkowska, A., & Błażewicz-Woźniak, M. (2018). Antagonistic activity of selected fungi of the soil environment of carrot. *Plant, Soil and Environment*, 64(2), 58–63. <https://doi.org/10.17221/792/2017-PSE>
- Patkowska, E., Mielniczuk, E., Jamiolkowska, A., Skwaryło-Bednarz, B., & Błażewicz-Woźniak, M. (2020). The influence of *Trichoderma harzianum* rifai T-22 and other biostimulants on rhizosphere beneficial microorganisms of carrot. *Agronomy*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/agronomy10111637>

- Peters, R. D., Sturz, A. V., Carter, M. R., & Sanderson, J. B. (2003). Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil and Tillage Research*, 72(2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00087-4)
- Que, F., Hou, X. L., Wang, G. L., Xu, Z. S., Tan, G. F., Li, T., Wang, Y. H., Khadr, A., & Xiong, A. S. (2019). Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family. *Horticulture Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0150-6>
- Ross, D. J. (1970). Effects of storage on dehydrogenase activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(70\)90026-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(70)90026-X)
- Rubatzky, V. ., Quiros, C. ., & Simon, P. . (1999). *Crop Production Science in Horticulture series*. CABI.
- Sagar, K., Singh, S. P., Goutam, K. K., & Konwar, B. K. (2014). Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction. *Journal of Microbiological Methods*, 97(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.008>
- Souza, J. L., & Resende, P. (2006). *Manual de horticultura orgânica*. [2.^a ed.]. Viçosa, Brasil. Aprenda Fácil: 25-53.
- Suffert, F., & Guibert, M. (2007). The ecology of a *Pythium* community in relation to the epidemiology of carrot cavity spot. *Applied Soil Ecology*, 35(3), 488–501. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.10.003>
- Tanveer, A., Yadav, S., & Yadav, D. (2016). Comparative assessment of methods for metagenomic DNA isolation from soils of different crop growing fields. *3 Biotech*, 6(2), 6–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0543-2>
- Turner, S. D., Ellison, S. L., Senalik, D. A., Simon, P. W., Spalding, E. P., & Miller, N. D. (2018). An automated image analysis pipeline enables genetic studies of shoot and root morphology in carrot (*Daucus carota* L.). *Frontiers in Plant Science*, 871(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01703>
- Williams, J., Clarkson, J. M., Mills, P. R., & Cooper, R. M. (2003). A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4190–4191.

<https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4190-4191.2003>

- Włodarczyk, T. (2000). Some of aspects of dehydrogenase activity in soils. *International Agrophysics*, 14(3), 365–376.
- Wolinska, A., & Stepniewska, Z. (2012). Dehydrogenase activity in the soil environment. *Intech*, 8, 185–210. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/48294>

7 Anexos

7.1 Anexo A: Protocolo de Extração de DNA – Kit DNeasy PowerSoil

O isolamento de DNA procedeu-se do modo de seguida apresentado, sendo que o Kit de extração utilizado é constituído por 6 soluções (C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ e C₆), tubos vazios de 2 ml, tubos PowerBead e colunas MB Spincolumn.

Após a moenda da amostra de solo, pesou-se 250 mg de cada amostra e adicionou-se ao tubo PowerBead, tendo-se adicionado de seguida 60 µl de solução C₁, e de seguida procedeu-se à sua agitação no vortex durante 15 minutos e centrifugado a 10.000 g durante 30 s. Após centrifugação, o sobrenadante é retirado para um tubo de 2 ml, ao qual se adiciona 250 µl de C₂. A nova mistura é agitada no vortex durante 20 segundos, para ser incubada durante 5 minutos a uma temperatura entre 2 a 8 °C (Frigorífico). Após a incubação, procedeu-se à centrifugação durante 1 minuto a 10.000 g, tendo-se transferido o 600 µl do sobrenadante para um novo tubo de 2 ml, ao qual se adicionou 200 µl de C₃. O tubo foi agitado em vortex e de seguido incubado novamente no frigorífico durante 5 minutos, após o qual foi centrifugado durante 1 minuto a 10.000g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi movido para outro tubo de recolha, ao qual se adicionou 1.200 µl de C₄. A solução foi homogeneizada no vortex, tendo-se carregado 675 µl para uma coluna de separação MB Spincolumn com o objetivo de reter o ADN. Esta coluna é centrifugada durante 1 minuto a 10.000g, de modo a eliminar o excesso de fase líquida, tendo sido necessário repetir este passo 3 vezes para que toda a amostra fosse processada.

De modo a realizar uma lavagem à coluna onde ficou retido o ADN, adicionou-se 500 µl de C₅ à coluna previamente transferida para um tubo de 2 ml. Centrifugou-se durante 30 s a 10.000 g, eliminando-se a fase líquida, e submeteu-se o tubo a uma nova centrifugação de 1 minuto a 10.000g de modo a eliminar por completo tudo o que esteja retido na coluna após lavagem do ADN.

Por fim, a coluna MB Spincolumn onde está retido o ADN é transferida para um tubo de 2 ml, ao qual se adicionou cuidadosamente para o centro da membrana, no filtro branco, 100 µl de C₆ (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5). De seguida centrifugou-se durante 20 s a 10.000g e recolheu-se a solução C₆, onde se encontra o ADN, e foi armazenado no congelador.