

# **Incidência e severidade de estenfiliose em pereira ‘Rocha’ no Oeste e avaliação da eficácia biológica de fungicidas**

**Ricardo Rei Santos**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientador: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

## **Júri**

Presidente:

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

Vogais:

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

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

2019



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Engenheira Cecília Rego, minha orientadora, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho, pela enorme ajuda que me deu ao longo deste tempo, pela disponibilidade e orientação, e pela paciência que teve para comigo.

Em segundo lugar gostaria de agradecer à Mestre Andreia Cabanas, por toda a ajuda que me deu na realização deste trabalho e pela paciência que teve para me ajudar ao longo da realização deste trabalho, por me auxiliar nos trabalhos práticos e na leitura desta dissertação, pelo companheirismo, convívio e apoio.

Ao Centro Operativo Tecnológico Hortofrutícola Nacional (COTHN), coordenador do Grupo Operacional ProtecEstenfilio e às Organizações de Produtos/Associação: Cooperativa Agrícola dos Fruticultores do Cadaval CRL (COOPVAL), Estação Fruteira do Montejunto CRL (FRUTUS), Centro de Produção e Comercialização Hortofrutícola LDA (CPF) Cooperativa Agrícola do Bombarral CRL (CAB), Associação de Produtores da Sobrena (APAS), Cooperativa Agrícola de Hortofruticultores do Oeste CRL (Frutoeste), agradeço a colheita e envio de material vegetal ao longo da campanha de 2018.

Ao Centro de investigação UID/AGR/04129/2013 (LEAF) da Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio dado neste trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Albino e Silvina, e à minha irmã Cristina por todo o apoio que me deram ao longo destes tempos, por terem sempre uma palavra de incentivo, por não me deixarem desistir, nem desanimar, e por me ajudarem sempre que precisei.

À minha namorada, Margarida Loureiro, um agradecimento especial, por tudo, pelo apoio dado, pela paciência e compreensão que sempre demonstrou para comigo, pelo incentivo e disponibilidade de vir ter comigo quando tinha de ficar a acabar o trabalho no laboratório.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” pela colaboração prestada.

À minha prima Carla Rei e ao meu amigo Nuno Dias pelos conselhos que me deram.

A todos os meus colegas e amigos que me ajudaram de alguma forma a chegar até aqui.

## RESUMO

A estenfiliose, doença causada pelo fungo *Stemphylium vesicarium*, tem afetado as áreas de produção de pera da Europa causando prejuízos avultados. Em Portugal, por toda a região do Oeste, tem-se igualmente registado um aumento de estenfiliose em pereira 'Rocha', cujo controle se tem revelado bastante difícil.

Embora os resultados obtidos nesta dissertação sejam preliminares e necessitem de comprovação nos próximos anos apurou-se que, nos seis pomares em ensaio escolhidos pelas organizações de produtores, aparentemente com um histórico de estenfiliose semelhante, existiram diferenças significativas relativamente à incidência e severidade de *S. vesicarium*. Ao longo do ciclo vegetativo foi isolado e identificado *S. vesicarium* a partir de todos os materiais rececionados (flores, frutos e folhas). Relativamente às duas modalidades em ensaio instaladas em cada um dos pomares, concluiu-se que a remoção de material vegetal do solo (M2) conduziu, na maioria das amostras de material vegetal rececionadas, à obtenção de valores inferiores para a incidência e a severidade de *S. vesicarium* quando comparada com a modalidade testemunha, sem remoção de material vegetal (M1).

Avaliou-se a eficácia biológica de oito fungicidas em condições *in vitro* na inibição do crescimento micelial de *S. vesicarium* utilizando-se dois isolados patogénicos de *S. vesicarium* (FR2 e FT5) obtidos de flores e frutos, respetivamente. Os fungicidas que apresentaram maior eficácia biológica foram o Sercadis (fluxapiraxade), o Scala (pirimetanil), o Bellis (boscalide + piraclostrobina) e o BAS 669 01 S (pirimetanil + ditianão). De um modo geral, o isolado FT5 pareceu ser mais sensível aos fungicidas que o isolado FR2, uma vez que os valores  $CE_{50}$  foram menores para o primeiro isolado.

**Palavras-chave:** *Stemphylium vesicarium*, *Pyrus communis*, estenfiliose, eficácia biológica, fungicidas

## ABSTRACT

Brown spot of pear is a disease caused by the fungus *Stemphylium vesicarium*. This disease has been affecting pear production areas in Europe causing high losses. In Portugal, in the Oeste region, pear brown spot incidence has also increased in cv. Rocha and its control has been more difficult to reach.

Although the results obtained in this thesis are preliminary and require confirmation in the next years, it was concluded that in the six experimental orchards chosen by producer organisations, apparently with a similar brown spot disease history, incidence and severity were significantly different along the growing season. *S. vesicarium* was isolated and identified from all analysed organs (flowers, fruit and leaves). Two treatments were tested in each orchard and the results obtained, in almost all samples, revealed that incidence and severity were lower in samples collected from the treatment where plant residues were removed from soil (M2) than in control treatment (without removal of residues from soil).

In this work the biological efficacy of eight fungicides in inhibiting mycelial growth in two isolates pathogenic in pear was evaluated. The fungicides that showed the greatest efficacy in inhibiting mycelial growth were Sercadis (fluxapyroxad), Scala (pyrimethanil), Bellis (boscalid + pyraclostrobin) and BAS 669 01 S (pyrimethanil + dithianon). Generally, EC<sub>50</sub> values calculated for isolate FT5 were lower than EC<sub>50</sub> values for FR2 which suggests a lower sensitivity to fungicides by this last isolate.

**Keywords:** *Stemphylium vesicarium*, *Pyrus communis*, brown spot, biological efficacy, fungicides.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE QUADROS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. História, distribuição e importância económica da estenfiliose.....	3
2.2. Agente causal.....	4
2.3. Sintomatologia.....	7
2.4. Biologia e epidemiologia.....	10
2.5. Condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.....	12
2.6. Meios de luta.....	14
2.6.1. Meios de luta culturais.....	14
2.6.2. Modelos de previsão de infeção de <i>Stemphylium vesicarium</i> .....	16
2.6.3. Meios de luta biológicos.....	18
2.6.4. Meios de luta químicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Avaliação da incidência e severidade de estenfiliose em amostras de material vegetal proveniente de seis pomares de pereira Rocha.....	25
3.1.1. Condições experimentais e delineamento dos ensaios de campo.....	25
3.1.1. Colheita de material vegetal.....	26
3.1.2. Isolamentos microbiológicos.....	29
3.1.3. Análise de resultados da incidência e severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> .....	29
3.2. Avaliação da eficácia de fungicidas.....	29
3.2.1. Isolados em estudo e fungicidas utilizados.....	29
3.2.2. Inibição do crescimento micelial.....	31
3.2.3. Indução da esporulação.....	33
3.2.4. Inibição da germinação de esporos.....	34

3.2.3. Análise de dados .....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Avaliação da incidência e severidade de estenfiliose em seis pomares de pereira Rocha .....	37
4.2. Eficácia biológica de fungicidas .....	48
4.2.1. Ensaios de inibição micelial .....	48
4.2.2. Ensaios de inibição de esporos .....	51
5. DISCUSSÃO .....	52
6. CONCLUSÃO .....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
8. ANEXOS .....	63
Anexo 1. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras das 1 <sup>as</sup> flores .....	64
Anexo 2. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras das 2 <sup>as</sup> flores .....	64
Anexo 3. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 1 <sup>os</sup> frutos .....	64
Anexo 4. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 2 <sup>os</sup> frutos .....	64
Anexo 5. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 3 <sup>os</sup> frutos .....	65
Anexo 6. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras de folhas .....	65
Anexo 7. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas 1 <sup>a</sup> flores dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	66
Anexo 8. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> na 2 <sup>a</sup> flores dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	67
Anexo 8. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos 1 <sup>o</sup> frutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	68
Anexo 9. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos 2 <sup>o</sup> frutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	69

Anexo 10. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> nos 3 <sup>o</sup> frutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	70
Anexo 11. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas folhas dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de uma colónia de <i>Stemphylium vesicarium</i> em meio de PDA (original do autor). .....	5
Figura 2. Colónia de <i>S. vesicarium</i> em PCA (Arzanlou <i>et al.</i> , 2012). .....	5
Figura 3. <i>Stemphylium vesicarium</i> : conidióforos e conídios (Woudenberg <i>et al.</i> , 2017).....	6
Figura 4. <i>Stemphylium vesicarium</i> : ascos e ascósporos (Woudenberg <i>et al.</i> , 2017).....	7
Figura 5. Estenfiliose: sintomas nos ramos e nas folhas (Comporta <i>et al.</i> , 2017).....	8
Figura 6. Estenfiliose: sintoma na fossa apical em fruto jovem. ....	8
Figura 7. Estenfiliose: sintomas nos frutos na fossa apical (a) e na polpa (b). ....	9
Figura 8. Ciclo biológico da estenfiliose (Adaptado de Llorente <i>et al.</i> , 2012).....	10
Figura 9. Grupo Operacional ProtectEstenfilio. ....	25
Figura 10. Esquema das diversas etapas seguidas para a concretização do trabalho .....	28
Figura 11. Esquema de preparação do método do meio tóxico utilizado e respetivas concentrações para 10 mg L <sup>-1</sup> (Adaptado de Farropas (2003)).....	32
Figura 12. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 1 <sup>a</sup> flores.....	37
Figura 13. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 2 <sup>a</sup> flores.....	37
Figura 14. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 1 <sup>o</sup> frutos.....	38
Figura 15. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 2 <sup>o</sup> frutos.....	38
Figura 16. Sintomas de estenfiliose na fossa apical e na polpa observados nos 3 <sup>o</sup> frutos colhidos em diferentes pomares.....	39
Figura 17. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 3 <sup>o</sup> frutos.....	40
Figura 18. Sintomas de estenfiliose observados nas amostras das folhas colhidas em diferentes pomares.....	40
Figura 19. Incidência e severidade média de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das folhas. ....	41
Figura 20. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 1 <sup>a</sup> flores.....	41
Figura 21. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 1 <sup>a</sup> flores.....	42
Figura 22. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 2 <sup>a</sup> flores.....	42
Figura 23. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras das 2 <sup>a</sup> flores.....	43
Figura 24. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 1 <sup>o</sup> frutos.....	43

Figura 25. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 1º frutos.....	44
Figura 26. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 2º frutos.....	44
Figura 27. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 2º frutos.....	45
Figura 28. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 3º frutos.....	45
Figura 29. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras dos 3º frutos.....	46
Figura 30. Incidência de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras de folhas. ....	46
Figura 31. Severidade de <i>Stemphylium vesicarium</i> nas amostras de folhas. ....	47
Figura 32. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de fluxapiroxade no isolado FT5 de <i>Stemphylium vesicarium</i> , com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	49
Figura 33. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de pirimetanil no isolado FT5 de <i>Stemphylium vesicarium</i> , com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	49
Figura 34. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de boscalide + piroclostroquina no isolado FT5 de <i>Stemphylium vesicarium</i> , com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	50
Figura 35. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de pirimetanil + ditianão no isolado FR2 de <i>Stemphylium vesicarium</i> , com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).....	50

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais características dos fungicidas homologados no combate da estenfiliose da pereira em Portugal (DGAV, 2019).....	21
Quadro 2. Mecanismos de ação dos fungicidas (Cavaco, 2016).....	23
Quadro 3. Identificação das Organizações de Produtores envolvidas no GO .....	25
Quadro 4. Protocolo do trabalho desenvolvido pelas OP no âmbito do GO .....	27
Quadro 5. Calendarização da receção das diferentes amostras no ISA.....	27
Quadro 6. Isolados de <i>Stemphylium vesicarium</i> utilizados nos ensaios de eficácia biológica de fungicidas. ....	30
Quadro 7. Principais características dos fungicidas utilizados nos ensaios de eficácia biológica, relativamente a <i>Stemphylium vesicarium</i> .....	30
Quadro 8. Comparação dos resultados obtidos para a incidência e severidade de <i>S. vesicarium</i> nos materiais vegetais analisados e colhidos nas parcelas das modalidades M1 (Testemunha – sem remoção de material vegetal) e M2 (com remoção de material vegetal) do solo dos seis pomares em ensaio. ....	47
Quadro 9. Parâmetros de regressão linear ( $R^2$ e b), valores de $CE_{50}$ e percentagens de inibição, registados nos ensaios <i>in vitro</i> de inibição do crescimento micelial, com os oito fungicidas, para os dois isolados utilizados no estudo. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANP – Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha  
BSPcast – Brown Spot of Pear forecasting system  
CDD- Cumulative degree days (graus dia acumulados)  
COTHN – Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional  
DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária  
EC – Concentrado para emulsão  
FAST – Forecaster of *Alternaria solani* on tomato  
INE – Instituto Nacional de Estatística  
IR – índice de risco diário  
IRA – índice de risco acumulado  
OP – Organização de Produtores  
PAMcast – *Pleospora allii* Maturation forecast  
PCA – Potato Carrot Agar  
PDA – Difco - Potato Dextrose Agar  
s.a. - Substância ativa  
SC – Suspensão concentrada  
STREP – Sistema para el Tratamiento Racional de la Estenfiliosis del Peral  
WG – Grânulos dispersíveis em água  
WP – Pó Molhável

## 1. INTRODUÇÃO

A pera é o terceiro fruto mais produzido para consumo em fresco em Portugal, ficando apenas atrás da maçã e da laranja (INE, 2018). A pereira 'Rocha' é a cultivar mais produzida, representando mais de 90% da produção nacional (Vicente *et al.*, 2017), e é, também, considerada o hortofrutícola com maior saldo positivo na balança comercial portuguesa (Costa, 2017).

A pereira 'Rocha' foi identificada pela primeira vez no Concelho de Sintra, em 1836, tendo sido levada para toda a região Oeste, onde se encontram as condições ideais para a sua produção. Alcobaça, Bombarral, Cadaval, Caldas da Rainha, Lourinhã, Mafra, Óbidos e Torres Vedras são concelhos produtores de pera Rocha (ANP, 2001).

Esta variedade de pereira caracteriza-se por apresentar um vigor médio e um porte ereto com ramos do ano bastante flexíveis (ANP, 1997). A sua produção localiza-se em regiões caracterizadas por microclimas próprios, com plantações em várzeas e em meias encostas com orientação Norte-Sul (Sousa *et al.*, 2001).

A 'Rocha' é uma variedade medianamente exigente em horas de frio acumuladas, necessitando em média 500 a 550 horas de frio, entre 0°C e 7,2°C, durante o período de repouso vegetativo, desde outubro a meados de fevereiro (Couto, 1979; ANP, 1997). Se o inverno for suficientemente frio, mais de 600 horas de frio, a plena floração dá-se nos primeiros dias de abril. Contudo quando os invernos são suaves, poderão existir problemas de falta de frio invernal, e conseqüentemente, a ocorrência de uma plena floração mais tardia, na segunda quinzena de abril, apresentando-se esta muito irregular e prolongada. Os efeitos da falta de frio podem ser atenuados se ocorrerem chuvas abundantes entre dezembro a fevereiro, nestas condições a floração pode ocorrer a meados de abril (Alexandre *et al.*, 2001).

Nos últimos anos a produção de pera tem sofrido um forte decréscimo em Portugal, passando de 210 mil toneladas em 2014 para as 141 mil e 137 mil toneladas nos anos de 2015 e 2016 respetivamente (INE, 2017). Esta diminuição deve-se em grande parte a uma doença fúngica, denominada estenfiliose ou doença das manchas castanhas da pereira, que é causada pelo fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons. Esta micose tem vindo a causar grandes problemas nas principais zonas produtoras de pera da Europa, tendo-se tornado doença-chave em muitos pomares, podendo conduzir a perdas superiores a 50%. (Llorente & Montesinos, 2006; Comporta *et al.*, 2017).

A doença afeta flores, folhas e frutos de pereira e, ocasionalmente, ramos do ano e pecíolos (Llorente & Montesinos, 2006; Comporta *et al.*, 2017). As infeções ocorrem quando

a fruta ainda se encontra no pomar e agravam-se durante a conservação, prejudicando a sua comercialização (Comporta *et al.*, 2017; Diogo *et al.*, 2017).

Em Portugal, a existência de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, sobretudo na região do Oeste, como a temperatura amena e a elevada humidade, fizeram com que esta doença se disseminasse por toda esta região, que é a principal zona de produção de pera em Portugal (Azevedo & Isidoro, 2005a; Comporta *et al.*, 2017).

Esta espécie apresenta uma elevada taxa de germinação de esporos e de crescimento micelial e, devido às suas características, torna-se difícil a utilização de fungicidas curativos no seu controlo. Este facto obriga os produtores a várias intervenções com fungicidas preventivos, entre 15 a 25 aplicações, todos os anos para manter dentro de valores aceitáveis as perdas de produção devido a esta doença (Montesinos & Vilardell, 1992; Llorente *et al.*, 2012). No entanto, muitas vezes estas aplicações mostram-se ineficazes no combate à doença (Silva, 2011).

Estes factos, aliados com a diminuição das substâncias ativas disponíveis no mercado, fizeram com que exista alguma dificuldade na alternância das substâncias ativas aplicadas contra esta doença (Simões, 2005; Gomes, 2015). Assim, o risco de desenvolvimento de isolados resistentes a determinadas substâncias ativas torna-se maior, tendo já sido reportados, em alguns países, isolados resistentes a fungicidas pertencentes às dicarboximidas (Alberoni *et al.*, 2005), ao fludioxonil (Alberoni *et al.*, 2008) e à família das estrobilurinas (Alberoni *et al.*, 2010).

Neste contexto, os objetivos desta tese de mestrado desenvolvida no âmbito do trabalho de investigação do ISA, parceiro de Projeto PDR2020-101-030869, Grupo Operacional (GO) designado por ProtecEstenfilio e coordenado pelo Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional (COTHN), fixaram-se na monitorização da estenfiliose em seis pomares escolhidos pelas organizações de produtores (OP). Pretendeu-se avaliar a incidência e severidade da doença nas amostras rececionadas de flores, frutos e folhas ao longo do ciclo vegetativo, sujeitas a diferentes práticas culturais. Numa das práticas culturais a entrelinha foi triturada e o material vegetal deixado no solo, enquanto que na outra se procedeu à eliminação / remoção do material vegetal antes do abrolhamento. Paralelamente, avaliou-se “*in vitro*” a eficácia biológica de oito fungicidas na inibição do crescimento micelial e na inibição da germinação de esporos em dois isolados agressivos de *S. vesicarium*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. História, distribuição e importância económica da estenfiliose

A estenfiliose ou doença das manchas castanhas da pereira é causada pelo fungo *Stemphylium vesicarium* (Wallroth) Simmons (teleomorfo: *Pleospora allii* (Rabenh.) Ces & De Not). Esta doença afeta folhas e frutos de pereira, bem como ramos do ano e pecíolos (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006), podendo o fungo também ser isolado a partir das suas flores (Comporta *et al.*, 2017). A doença manifesta-se tanto em plantas debilitadas e cloróticas como em plantas vigorosas (Silva, 2011). As infeções podem ocorrer desde o início da floração e ao longo de todo o período de atividade vegetativa da pereira, ocorrendo as infeções no pomar e agravando-se durante o período de conservação (Comporta *et al.*, 2017).

Esta doença tem causado prejuízos avultados nas principais regiões produtoras de pera da Europa, podendo levar a perdas globais de 1% a 10% da produção total, apesar das medidas de controlo aplicadas (Llorente & Montesinos, 2006).

O fungo *S. vesicarium*, que já era conhecido por causar problemas em culturas hortícolas um pouco por todo o mundo, começa a infetar os pomares de pereira da Europa mediterrânica, nas décadas de 70 e 80 (Correia, 2001). Os primeiros ataques foram detetados em 1975, no norte de Itália, na região de Emilia-Romagna, na cultivar Abate Fétel, e descritos em Ponti *et al.* (1982). Nos anos 80 foi considerado o principal problema fitopatológico em algumas regiões de Itália (Azevedo & Isidoro, 2005a).

Llorente e Montesinos (2006) referem que a doença se espalhou rapidamente, tendo sido detetada em Espanha, na região da Catalunha, em 1984, nas cultivares Passe Crassane e Conference, e seguidamente em França (1987), Portugal (1996), Holanda (1997) e Bélgica (2002), aparecendo praticamente em todas as zonas de produção de pera da Europa.

Em Portugal, apesar de anteriormente se terem observado sintomas semelhantes à estenfiliose em pereiras, a doença só foi confirmada na região do Oeste-Estremadura, em 1996, nas cultivares Rocha e Passe Crassane (Azevedo & Isidoro, 2005a). A doença foi inicialmente detetada de forma localizada em alguns pomares dos concelhos de Alcobaça e Bombarral, mas espalhou-se rapidamente, sendo referida por Sousa *et al.* (2004) nos concelhos de Torres Vedras, Bombarral, Cadaval, Lourinhã, Caldas da Rainha, Alcobaça, Nazaré, Porto de Mós, Batalha e Leiria, apresentando uma expansão com severidade a outras regiões do país.

Este fungo, com uma ampla distribuição geográfica, está presente em todos os continentes e causa doenças mais ou menos graves em várias culturas, como alho, cebola, espargo, cevada, tomate, luzerna e girassol, entre outras. Ainda assim, não existem

referências à ocorrência desta doença em pereira fora da Europa (Sousa *et al.*, 2004; Comporta *et al.*, 2017; Diogo *et al.*, 2017).

A estenfiliose é uma doença que causa estragos graves sobretudo nos frutos, inviabilizando a sua comercialização. O fungo infeta os frutos ainda no pomar e os sintomas agravam-se durante conservação (Rossi *et al.*, 2005a; Comporta *et al.*, 2017).

Nos últimos anos a sua incidência tem sido maior, tendo contribuído com prejuízos de 25% na produção de pera em Portugal na campanha de 2015. Para além destes prejuízos há um aumento dos custos de produção devido ao maior número de tratamentos fitossanitários por parte dos fruticultores. A doença implica também um aumento de custos nas centrais fruteiras. Estes devem-se a uma redução do período de conservação, uma vez que nos lotes contaminados existe uma maior produção de etileno, e ao conseqüente amarelecimento e perda de firmeza dos frutos nas câmaras de conservação. Verifica-se também aumento de custos durante o embalamento, devido à necessidade de uma maior escolha no calibrador. Além disto, os frutos podem estar contaminados no ato do embalamento e não apresentarem sinais visíveis, o que leva a maiores encargos por parte das Centrais, devido a reclamações por parte dos clientes que receberam lotes com frutos contaminados (Diogo *et al.*, 2017).

Estima-se ainda que nos três anos anteriores a 2017, “os prejuízos diretos na produção tenham sido de 29,704 milhões de euros e nas Centrais fruteiras de 3,394 milhões de euros” (Diogo *et al.*, 2017).

## 2.2. Agente causal

O agente causal, *S. vesicarium*, é um ascomiceta cujo teleomorfo pertence ao género *Pleospora*, mais precisamente, a espécie *Pleospora allii*. A classificação taxonómica bem como a sinonímia da espécie encontra-se discriminada em Woudenberg *et al.* (2017) e no Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/GSD/GSDspecies.asp?RecordID=339660>).

- **Descrição cultural**

Os fungos do género *Stemphylium* apresentam, regra geral, um micélio difuso constituído por hifas ramificadas e variadamente septadas (Ellis, 1971). Llorente e Montesinos (2006) referem que o micélio de *S. vesicarium* é filamentosos, esparso e hialino.

Em meio de “Potato Dextrose Agar” (PDA) os isolados de *S. vesicarium* apresentam variações nas características das colónias (Nisha, 2013). Alguns isolados apresentam micélio espesso, com uma coloração acinzentada, com zonas esbranquiçadas, divergindo a partir do centro da colónia, mas com uma escassa formação de estruturas reprodutivas. Noutros

isolados, o micélio já se apresenta com uma coloração castanha ou olivácea com algumas semelhanças a fungos do género *Alternaria* (Sousa *et al.*, 2004). Na Figura 1 apresenta-se um exemplo da forma de uma colónia deste fungo em PDA. Contudo, em meio de V8 o micélio já é transparente com pontuações negras, onde se formam os conídios e as pseudotecas (Sousa *et al.*, 2004). Arzanlou *et al.* (2012) referem que as culturas em meio de “Potato Carrot Agar” (PCA) apresentam uma coloração cinzenta a cinzenta acastanhada e formam anéis concêntricos, com o micélio aéreo escasso, imerso e superficial, sub-hialino a castanho claro, ramificado, septado e regular (Figura 2).

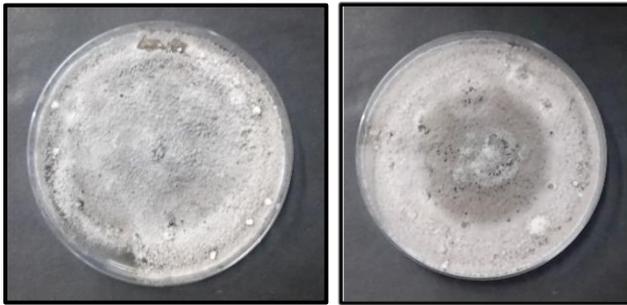


Figura 1. Exemplo de uma colónia de *Stemphylium vesicarium* em meio de PDA (original do autor).

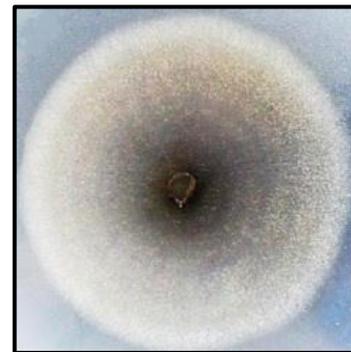


Figura 2. Colónia de *S. vesicarium* em PCA (Arzanlou *et al.*, 2012).

- **Conidióforos e conídios:**

Os conidióforos de *S. vesicarium* que surgem do estroma variam em número (Basallote-Ureba *et al.*, 1999) e apresentam apenas um conídio terminal (Llorente & Montesinos, 2006). Normalmente são eretos, cilíndricos e não ramificados, medindo entre 36-63  $\mu\text{m}$  por 4-8  $\mu\text{m}$  (Rao & Pavgi, 1975). A sua coloração pode variar entre o amarelo acastanhado diluído e o verde acastanhado (Silva, 2011), apresentando-se a zona apical, local de produção do conídio, de um castanho mais escuro (Galvez *et al.*, 2016). As células apicais de maiores dimensões proliferam, frequentemente, pela produção de novos conidióforos a partir dos ápices dos antigos (Basallote-Ureba *et al.*, 1999). Na Figura 3 apresentam-se imagens referentes a conidióforos e conídios de *S. vesicarium*.



Figura 3. *Stemphylium vesicarium*: conidióforos e conídios (Woudenberg *et al.*, 2017)

Os conídios são as estruturas reprodutivas do estado assexuado do fungo e formam-se na extremidade dos conidióforos, à superfície das folhas e dos frutos (Sousa *et al.*, 2004).

Caraterizam-se por apresentarem uma coloração que vai desde um castanho dourado a um verde acastanhado, uma forma oblonga a oval, serem multicelulares e multiseptados, apresentando 1-5 septos transversais e uma ou duas séries de septos longitudinais, com constrições em 1-3 dos maiores septos transversais (Simmons, 1969).

As dimensões dos conídios dependem do meio de crescimento e da estirpe, mas geralmente variam de 21 a 48  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 10 a 22  $\mu\text{m}$  de largura, sendo a relação comprimento largura geralmente de 1,5 a 2,7, podendo atingir 3,0 em meio de crescimento laboratorial (Simmons, 1969).

- **Pseudotecas:**

As pseudotecas são as estruturas sexuais do fungo, normalmente, produzidas em condições adversas à superfície de tecidos vegetais mortos. Apresentam uma coloração que vai do castanho ao negro, a forma é coriácea, globosa, ostiolada, ligeiramente achatada e as dimensões, que dependendo do substrato, podem estar compreendidas entre os 100 e os 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

- **Ascós e ascósporos:**

Os ascós (Figura 4) estão contidos no interior das pseudotecas, apresentam paráfises hialinas filiformes e quando maduros são cilíndricos a clavados, com paredes bitunicadas. Contém oito ascósporos e apresenta uma dimensão média de 170  $\mu\text{m}$  por 35  $\mu\text{m}$  (Sousa *et al.*, 2004; Diogo *et al.*, 2017).

Os ascósporos (Figura 4D) têm uma coloração castanha ou castanha-olivácea, são elipsoidais ou oblongos, pluricelulares, medindo em média 32 a 38  $\mu\text{m}$  de comprimento por 14 a 18  $\mu\text{m}$  de largura. Apresentam ainda 3 a 7 septos transversais, 1 ou nenhum septo

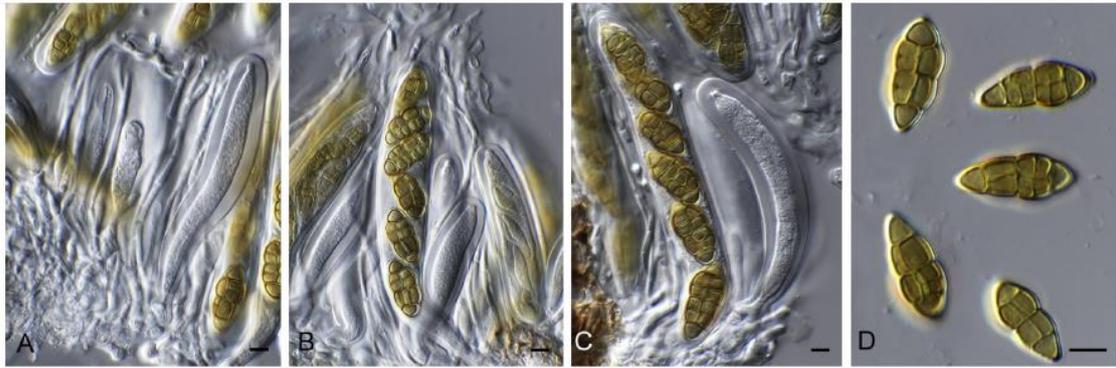


Figura 4. *Stemphylium vesicarium*: ascos e ascósporos (Woudenberg *et al.*, 2017).

longitudinal por septo transversal e 2 a 3 septos no quarto subapical, apresentando uma constrição no septo transversal médio (Sousa *et al.*, 2004; Lorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

A análise apenas de caracteres morfológicos é insuficiente para a identificação das espécies do género *Stemphylium*. *Stemphylium vesicarium* apresenta semelhanças morfológicas com outras espécies do género, como *Stemphylium astragali*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*, *Stemphylium majunsculum*, *Stemphylium gracilariae*, *Stemphylium beticola*, *Stemphylium eturmiunum*, *Stemphylium simmonsii* e *Stemphylium botryosum* (Câmara *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2018). Segundo Woudenberg *et al.* (2017) podem ser distinguidas 28 espécies neste género com base em análises moleculares às sequências ITS (“*internal transcribed spacer*”) e aos genes codificadores da proteína calmodulina e da gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (gapdh). As espécies *S. alfalfae*, *S. herbarum*, *Stemphylium sedicola*, *Stemphylium tomatonis* e *S. vesicarium* são consideradas como sinónimos por alguns autores tendo por base análises moleculares das regiões ITS e das sequências codificadoras da gapdh, entre outras (Câmara *et al.*, 2002; Inderbitzin *et al.*, 2009; Woudenberg *et al.*, 2017; Olsen *et al.*, 2018).

### 2.3. Sintomatologia

Os sintomas da doença podem manifestar-se ao longo de todo o período vegetativo da pereira em folhas, frutos, pedúnculos e pecíolos (Sousa *et al.*, 2004).

Nos ramos herbáceos surgem pequenas manchas circulares acastanhadas que, progressivamente se vão tornando mais enegrecidas, podendo circundar completamente o ramo, necrosando-o (Comporta *et al.*, 2017).

Os primeiros sintomas nas folhas (Figura 5) podem ser observados desde finais de abril a maio, mas mais frequentemente em junho (Lorente & Montesinos, 2006). Estes sintomas consistem em pequenas manchas castanhas, arredondadas ou oblongas com

aproximadamente 1 a 8 mm de diâmetro, podendo por vezes apresentar uma auréola vermelha (Sousa *et al.*, 2004).



Figura 5. Esfenfiliose: sintomas nos ramos e nas folhas (Comporta *et al.*, 2017).

Com o avançar da doença, a parte central da lesão torna-se coalescente, acinzentada e acastanhada com contorno castanho. Se as condições forem favoráveis à doença, desenvolvem-se manchas castanhas ao longo das nervuras principais e secundárias, nas margens e na extremidade do limbo, com a forma triangular ou trapezoidal, sendo a sua progressão nas folhas em forma de cunha (Sousa *et al.*, 2004). Na fase final de vida da folha, ocupa-a na sua totalidade, acabando esta por adquirir uma coloração acastanhada e secar (Azevedo & Isidoro, 2005a), resultando na queda prematura das folhas (Diogo *et al.*, 2017).

Nos frutos jovens (Figura 6) aparecem, inicialmente, manchas castanhas circulares com 1 a 2 mm de diâmetro, por vezes rodeadas por um halo vermelho semelhantes às das folhas (Llorente & Montesinos, 2006). Estas manchas aparecem na superfície do fruto, embora mais frequentemente na fossa apical destes (Azevedo & Isidoro, 2005a).



Figura 6. Esfenfiliose: sintoma na fossa apical em fruto jovem.

Com o avançar do estado de maturação dos frutos, as manchas evoluem rapidamente, aumentando para 10 a 20 mm de diâmetro, sendo que à medida que as manchas progridem, a parte central escurece e adquire uma consistência de podridão seca e deprimida que evolui gradualmente para o interior da polpa, tomando a mancha uma cor cinzenta a castanha escura (Figura 7). As manchas também podem ser colonizadas por fungos saprófitas, como os dos géneros *Alternaria* e, menos frequentemente, *Ulocladium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Phytophthora*, que aceleram a decomposição do fruto, provocando manchas mais extensas e profundas. Com o aproximar da colheita a lesão adquire uma consistência de podridão mole e avança rapidamente, atingindo a cavidade carpelar (Sousa *et al.*, 2004; Azevedo & Isidoro, 2005a; Llorente & Montesinos, 2006). Os frutos infetados amadurecem e caem mais cedo (Sousa *et al.*, 2004).

A doença pode também afetar pecíolos e pedúnculos, sendo que neste caso só se formam pequenas manchas castanhas, ligeiramente alongadas, sem a existência de alterações ao nível da estrutura interna dos tecidos (Sousa *et al.*, 2004). Infecções severas podem levar a uma desfoliação precoce e à queda de frutos antes da colheita (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006; Diogo *et al.*, 2017).

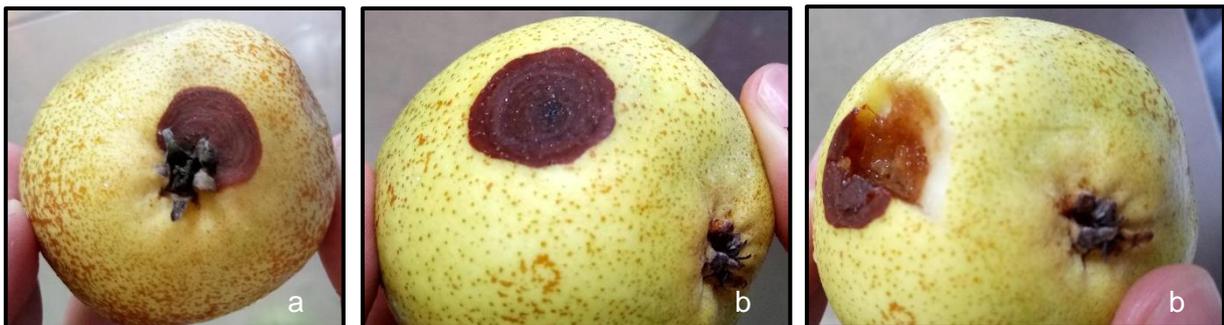


Figura 7. Estenfiliose: sintomas nos frutos na fossa apical (a) e na polpa (b).

## 2.4. Biologia e epidemiologia

O ciclo biológico desta doença (Figura 8), caracteriza-se por apresentar duas fases: uma fase saprófita, em que o fungo coloniza os resíduos de matéria vegetal morta de pereiras e de algumas infestantes presentes no solo dos pomares, e uma fase patogénica, em que o fungo ataca os órgãos aéreos das pereiras (Rossi *et al.*, 2008; Köhl *et al.*, 2009; Llorente *et al.*, 2012). O fungo produz ainda dois tipos de esporos: ascósporos (esporos sexuais) e conídios (esporos assexuais) (Llorente *et al.*, 2012).

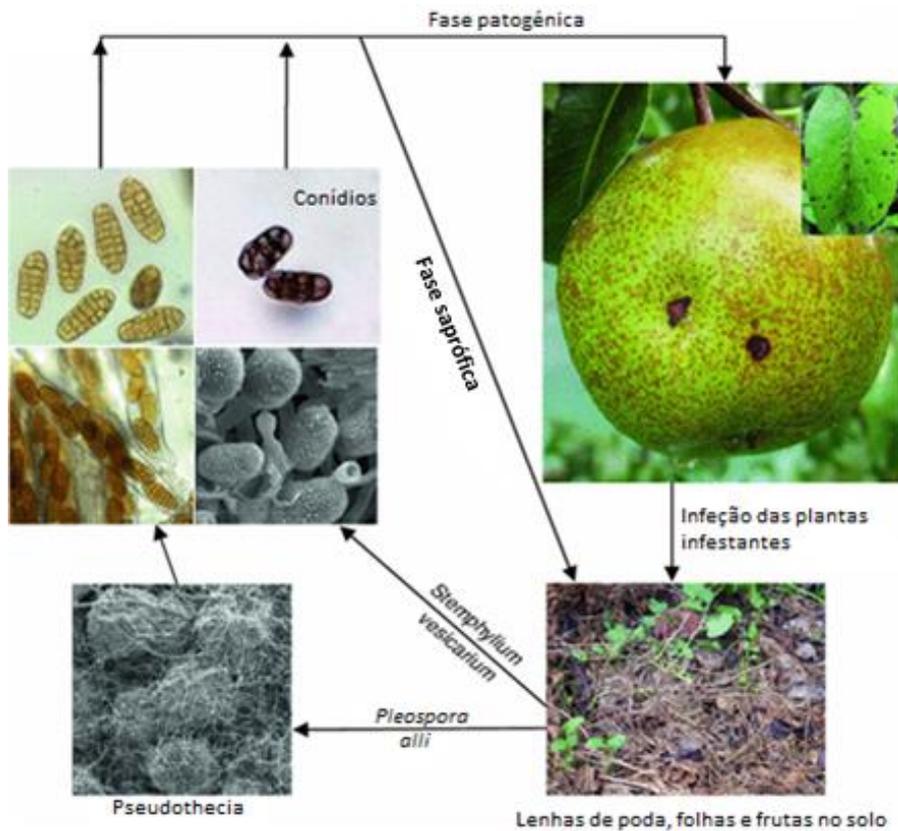


Figura 8. Ciclo biológico da estenfiliose (Adaptado de Llorente *et al.*, 2012).

No outono, em condições adversas como baixas temperaturas, formam-se as pseudotecas nas folhas e frutos caídos no solo do pomar, bem como em órgãos mortos de plantas das famílias Poacea ou Fabacea presentes nos pomares (Rossi *et al.*, 2005b; Llorente & Montesinos, 2006). Segundo Tavares (1990) o fungo pode ainda sobreviver nas lesões do hospedeiro, sob a forma de micélio dormente.

As pseudotecas requerem um período de 1 a 4 meses para a sua maturação, dependendo das condições ambientais, desenvolvem-se a humidades relativas elevadas (>98%) e com uma temperatura ótima de 10°C a 15°C (Llorente & Montesinos, 2006).

As primeiras pseudotecas maduras aparecem de meados de dezembro a finais de janeiro (Llorente *et al.*, 2006; Llorente & Montesinos, 2006), coincidindo a libertação dos ascósporos com o aparecimento das primeiras folhas; no entanto, em anos em que o inverno se apresente com temperaturas suaves e períodos de precipitação elevada, a maturação das pseudotecas pode antecipar-se (Lopez *et al.*, 1992). Quando existem condições favoráveis de humidade e temperatura, as pseudotecas libertam os ascos que se encontram no seu interior, que por sua vez libertam os ascósporos, normalmente, entre fevereiro e maio (Llorente & Montesinos, 2004). Este inóculo é disseminado pela chuva e pelo vento, depositando-se sobre flores, folhas e frutos jovens, mais suscetíveis, originando as chamadas infeções primárias, cujos sintomas se manifestam alguns dias depois (Tavares, 1992; Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006). Rossi *et al.* (2006) referem que as condições para a germinação dos ascósporos apresentam valores semelhantes aos encontrados por Montesinos e Vilardell (1992) para a germinação dos conídios.

Apesar do agente patogénico poder passar o inverno sob a forma de pseudotecas, nos resíduos vegetais de pereiras e de algumas plantas herbáceas e dos ascósporos obtidos de estirpes virulentas de *S. vesicarium* terem a capacidade de infetar diretamente a pereira (Llorente & Montesinos, 2006), *P. allii* foi também descrito como fungo saprófita por Rossi *et al.* (2005b). Além disso, apesar dos primeiros sintomas poderem aparecer em finais de maio, normalmente aparecem em junho quando poucos ou nenhum ascósporos estão presentes na atmosfera circundante ao pomar (Picco *et al.*, 1996; Maccaferri *et al.*, 2003), mas é abundante a presença de conídios (Rossi *et al.*, 2005a). Razões estas que levaram Rossi *et al.* (2005b) a sugerir a hipótese que talvez o contributo dos ascósporos para a doença, fosse o de colonizar saprofiticamente os resíduos vegetais e algumas infestantes suscetíveis, presentes no solo do pomar para, posteriormente, com condições ambientais mais favoráveis, produzir os conídios responsáveis por infetar as pereiras.

Após as infeções primárias, se continuarem a existir condições favoráveis de humidade e temperatura, o fungo desenvolve, sobre os tecidos necrosados e mortos, os conidióforos e os conídios. Estes últimos são dispersos pelo vento, fixam-se sobre novas folhas e frutos e na presença de água germinam dando origem às infeções secundárias (Sousa *et al.*, 2004).

Os conídios começam a ser encontrados desde finais de maio a junho, sendo que o maior número é encontrado no verão, estando os valores mais elevados relacionados com longos períodos de humectação (superiores a 10 horas) e temperaturas entre os 15°C e 25°C (Llorente & Montesinos, 2006). Montesinos e Vilardell (1992) repararam, em estudos realizados em laboratório, que os conídios germinavam rapidamente a temperaturas entre os

20°C e os 30°C, visto que cerca de 50% dos conídios iniciava a formação de tubos germinativos dentro de uma hora.

Segundo Llorente & Montesinos (2006) a fonte primária de conídios durante a fase vegetativa da pereira, também não é totalmente conhecida, pois a produção de conídios é raramente observada em frutos e folhas de pereira infetadas durante o período vegetativo. No entanto, os conídios são produzidos abundantemente em resíduos vegetais inoculados com *S. vesicarium*, e estes conídios obtidos através de crescimentos saprófitos continuam capazes de infetar as pereiras, pelo que, assim sendo, o próprio solo do pomar pode constituir uma possível fonte de inóculo (Rossi *et al.*, 2005b).

O agente patogénico pode invadir as folhas através dos estomas, e passadas 6 a 12 horas, surge a infeção, ou através das paredes celulares, sendo este um processo mais lento (Diener, 1955). Os sintomas surgem como resultado da libertação de duas toxinas específicas (SV-toxina I e II) nas primeiras fases de germinação dos conídios, que atuam nas membranas plasmáticas de células suscetíveis (Ponti & Cavanni, 1983; Cavanni & Ponti, 1994; Singh *et al.*, 1999, 2000). Estas toxinas ditam a patogenicidade e a virulência dos isolados (Singh *et al.*, 1997). Quando o fungo entra através dos estomas, os primeiros sintomas aparecem 48 horas após a inoculação, com temperaturas entre 20°C e 30°C e períodos de humectação de 16 horas, se as temperaturas forem de 16°C os sintomas surgem quatro dias após o início da infeção (Cugier & Humbert, 1991).

O fungo desenvolve o seu ciclo e, quanto mais tempo durarem as condições favoráveis, maior será o inóculo potencial para a primavera seguinte (Rossi *et al.*, 2005a; Llorente & Montesinos, 2006; Rossi *et al.*, 2008; Köhl *et al.*, 2009). Segundo Llorente *et al.* (2012), os conídios e os ascósporos têm um papel fundamental na constante propagação do fungo nos restos de plantas presentes nos solos dos pomares.

## **2.5. Condições favoráveis ao desenvolvimento da doença**

A duração do período de humectação, ou seja, a disponibilidade de água à superfície dos órgãos da planta, e a temperatura são consideradas fatores importantes para a ocorrência de infeções em frutos e folhas de pereira (Montesinos *et al.*, 1995a), uma vez que estes dois fatores influenciam diretamente a germinação, o crescimento e a esporulação do fungo (Sousa *et al.*, 2004). O fungo apresenta uma elevada taxa de germinação dos conídios e de crescimento micelial quando comparados com outros fungos patogénicos, podendo em condições ótimas 50% dos conídios germinar em menos de 1 hora e o micélio crescer cerca de 0.25 mm/ hora (Montesinos & Vilardell, 1992).

- **Temperatura:**

A temperatura ótima para a germinação dos conídios situa-se entre os 15°C e os 32°C, enquanto a temperatura ótima para que a infeção ocorra se situa entre os 20°C e os 25°C, com um máximo a 22,6°C em frutos da variedade Passe Crassane e 21,1°C em folhas da variedade Conference (Llorente & Montesinos; 2006).

Com teores de humidade relativa da ordem dos 100% e temperaturas entre 9,5°C e 41,5°C conseguem-se percentagens de germinação dos conídios próximos de 100%, sendo que para valores de temperatura de 18°C a 32°C a germinação dos conídios pode iniciar-se cerca de 3 h após a incubação (Sousa *et al.*, 2004).

À temperatura de 16°C, os primeiros sintomas podem aparecer decorridos 4 dias após a contaminação, no entanto a temperaturas de 25°C a 30°C e desde que o tempo de humectação seja superior a 16 horas os primeiros sintomas podem aparecer logo após 48 horas da infeção (Sousa *et al.*, 2004).

- **Duração da humectação:**

Mesmo à temperatura ótima são necessárias pelo menos 6 horas de humectação para que a infeção se dê, estando a probabilidade de infeção diretamente relacionada com a duração da humectação (Llorente & Montesinos, 2006); contudo, Sousa *et al.* (2004) referem que as temperaturas entre os 20°C e 25°C são necessárias apenas 4 h de humectação para que a infeção ocorra.

- **Humidade relativa:**

Segundo Llorente e Montesinos (2006) uma humidade relativa elevada é essencial para o desenvolvimento das pseudotecas durante o inverno. Esta interfere, também, no processo de infeção durante os períodos em que a humectação das folhas é interrompida por um período seco de algumas horas (Llorente & Montesinos, 2002).

- **Suscetibilidade das cultivares:**

A suscetibilidade à doença depende de algumas condições inerentes à própria planta como é o caso do estado fisiológico e da variedade em questão (Montesinos *et al.*, 1995b; Sousa *et al.*, 2004). As folhas jovens e cloróticas e os frutos jovens são bastante sensíveis à doença, contudo à medida que envelhecem vão-se tornando menos sensíveis (Sousa *et al.*, 2004). No caso dos frutos quando se inicia a fase de maturação e a firmeza, o teor de ácidos

e de amido vão diminuindo e os açúcares vão aumentando, os frutos voltam a ficar mais sensíveis aos ataques do fungo (Sousa *et al.*, 2004).

A suscetibilidade também varia de variedade para variedade, constatando-se que existem variedades muito sensíveis, medianamente sensíveis e pouco sensíveis ou resistentes (Diogo *et al.*, 2017).

As cultivares Passe Crassane, Abate Fétel, Alexandrine Douillard, Doyenne du Comice e Conference são as mais suscetíveis à doença, sendo as cultivares Rocha, Kaiser e Winter Nellis moderadamente suscetíveis e as cultivares Williams, Blanquilla, Beurré Hardy, Louis Bonne, Grand Champion e Highland são tidas como pouco suscetíveis ou resistentes (Montesinos & Vilardell, 1992; Llorente & Montesinos, 2006).

## **2.6. Meios de luta**

A estenfiliose é uma doença de difícil combate pois desenvolve-se muito rapidamente e, atualmente, não existem fungicidas com ação curativa. A adoção de uma abordagem integrada é fundamental, com medidas culturais com o objetivo de reduzir o inóculo potencial no pomar. Estas devem ser complementadas com luta preventiva química e/ou biológica sempre que se verifiquem condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. Deve proceder-se de igual modo no caso de pomares muito afetados na campanha anterior de forma a evitar surtos epidémicos da doença (Sousa *et al.*, 2004; Diogo *et al.*, 2017).

### **2.6.1. Meios de luta culturais**

As medidas de luta cultural da doença devem assentar sobretudo em dois aspetos: a eliminação da fonte de inóculo no pomar e a redução das condições de infeção (Azevedo & Isidoro, 2005a).

De forma a reduzir o inóculo no pomar, deve proceder-se à recolha e posterior eliminação dos frutos e folhas infetadas ao longo de todo o ciclo, mas em especial após a colheita, e/ou incrementar as práticas culturais que favoreçam a atividade biológica do solo, como a aplicação de ureia à queda das folhas, para acelerar a decomposição das mesmas, reduzindo desta forma o número de pseudotecas do fungo (Sousa *et al.*, 2004; Azevedo & Isidoro, 2005a). Pode ainda proceder-se à destruição ou recolha dos resíduos da cultura através de métodos mecânicos e deve-se fazer o controlo atempado da vegetação espontânea nos pomares (Sousa *et al.*, 2004; Gomes, 2015).

De forma a reduzir as condições de infeção deve diminuir-se a humidade relativa e a humectação no pomar, evitando a rega por aspersão e tendo uma boa drenagem do solo

(Llorente & Montesinos, 2006). Deve efetuar-se podas de inverno que melhorem a drenagem do ar atmosférico no pomar e podas em verde para retirar os rebentos formados no interior da copa que impeçam a circulação do ar, e facilitam a ocorrência de novas infeções (Sousa *et al.*, 2004).

Deve ainda proceder-se a uma nutrição adequada à produção do pomar e baseada em análises regulares, pois uma planta equilibrada nutricionalmente apresenta sempre uma maior resistência aos agentes patogénicos (Sousa *et al.*, 2004; Azevedo & Isidoro, 2005a). Esta situação tem vindo a ser observada na região Oeste. Em pomares com uma fertilização mais equilibrada ao longo do tempo, a intensidade da doença tem vindo a diminuir. Uma fertilização mais equilibrada traduz-se numa relação 2:1:4, ou seja, para unidades de nutriente de 80 unidades de N, 40 de P e 160 de K. Estas unidades de nutrientes estão indicadas para produtividades na ordem de 40 t/ha, e devem ser mantidas anualmente (Gomes, 2015).

Para além disso, existe uma diferente resposta à nutrição entre os parasitas obrigatórios e os facultativos, nomeadamente no que diz respeito ao azoto. Azevedo e Isidoro (2005a) referem que, apesar do aumento das aplicações de azoto levar a um aumento da severidade das doenças causadas por parasitas obrigatórios, tal aplicação parece ter um efeito contrário nos parasitas facultativos, levando a crer, por observações de campo, que haverá uma correlação negativa entre o vigor da árvore e a intensidade da doença. Aconselha-se ainda a correção do pH do solo, de forma a reduzir o risco de cloroses ou outras deficiências e conseqüentemente a predisposição para a doença (Sousa *et al.*, 2004).

Segundo Reuveni e Reuveni (1997) uma aplicação foliar de sais de potássio, para além de fornecer nutrientes às plantas, também as pode proteger contra diferentes agentes patogénicos. Segundo alguns autores esta proteção está relacionada com o aumento da atividade da enzima peroxidase que está associada à indução da resistência sistémica nas plantas contra patogénios (Gomes, 2015).

É conveniente também proceder-se periodicamente à observação do estado de maturação das pseudotecas, nos resíduos vegetais no solo, a partir do outono, mas principalmente no início da primavera, para se determinar o momento em que começam a ocorrer descargas de esporos, o que indicará que se deverá iniciar o tratamento do pomar (Sousa *et al.*, 2004).

## 2.6.2. Modelos de previsão de infecção de *Stemphylium vesicarium*

- **Modelo FAST**

O modelo FAST (“Forecaster of *Alternaria solani* on tomato”) apesar de ter sido desenvolvido por Madden *et al.* (1978) para prever o aparecimento de alternariose na cultura do tomate, foi dos primeiros sistemas de previsão a ser testado para prever os picos de infecção de *S. vesicarium* (Montesinos & Vilardell, 1992). Este sistema foi escolhido por apresentar um método de cálculo relativamente simples, ser fácil de programar, basear-se em parâmetros importantes para a germinação dos esporos na superfície da planta (temperatura e período de humectação). Para além disso os fungos em questão, *Alternaria solani* e *S. vesicarium*, não apresentam diferenças significativas ao nível do efeito da temperatura e humectação na germinação dos esporos e estão taxonomicamente relacionados (Montesinos & Vilardell, 1992).

Contudo, verificou-se experimentalmente que este modelo indicava picos de infecção que não correspondiam aos períodos de maior incidência da doença (Montesinos & Vilardell, 1992) pois, apesar das semelhanças biológicas entre as duas espécies, o processo de infecção é diferente (Sousa *et al.*, 2004). Calcular o risco tendo por base as condições ambientais nos últimos 5 e 7 dias, não é realizável pois trata-se de um período de tempo demasiado longo para um fungo com uma taxa de infecção tão rápida como a de *S. vesicarium* (Llorente & Montesinos, 2006). Assim sendo, foi necessário introduzir componentes biológicas do fungo *S. vesicarium* no modelo (Sousa *et al.*, 2004).

- **Modelo BSPcast ou STREP**

O modelo STREP (“Sistema para el Tratamiento Racional de la Estenfiliosis del Peral”), mais tarde designado BSPcast (“Brown Spot of Pear forecasting system”) foi desenvolvido após se ter comprovado que o modelo FAST não era adequado para diagnosticar o risco de infecção de *S. vesicarium* (Llorente *et al.*, 2000; Correia, 2001). Tendo por base o trabalho de Filajdic e Sutton (1992) para *Alternaria mali*, o modelo BSPcast relaciona a severidade da doença com a duração do período de humectação e com a temperatura média durante o mesmo período (Montesinos *et al.*, 1995a; Correia, 2001). O modelo calcula diariamente um índice de risco diário (IR) e um índice de risco acumulado (IRA), sendo este último o total dos valores de IR nos três dias anteriores (Azevedo & Isidoro, 2005b; Llorente *et al.*, 2011). Normalmente é o valor de IRA que é usado para ajudar na tomada de decisão, sendo que para pressões da doença moderadas usa-se um IRA de 0,4 ou 0,5, valor a partir do qual se deve efetuar um tratamento fitossanitário dentro das 24 a 32 horas seguintes à deteção

(Llorente & Montesinos, 2006; Gomes, 2015). Este modelo foi avaliado e validado durante vários anos em Espanha e na Itália, permitindo uma redução na aplicação de fungicidas entre 20% a 70% dependendo dos anos, tendo especial importância nos anos mais secos em que as condições para o desenvolvimento da doença não são tão favoráveis (Azevedo & Isidoro, 2005b; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2011). Todavia, é aconselhável em pomares com um histórico de elevada pressão da doença, fazer aplicações de fungicidas a cada 7 a 14 dias, pois neste caso o modelo revelou piores resultados (Llorente & Montesinos, 2006).

- **PAMcast**

O modelo PAMcast (*Pleospora allii* Maturation forecast) foi desenvolvido para prever a percentagem de pseudotecas maduras com base nas condições ambientais ocorridas durante o inverno, nomeadamente humidade relativa e temperatura (Llorente *et al.*, 2012).

Segundo Llorente e Montesinos (2004) a humidade relativa e a temperatura são fatores importantes no desenvolvimento das pseudotecas de *P. allii*, pois estas só se desenvolvem quando a humidade relativa está próxima do ponto de saturação e quando isso acontece o desenvolvimento é dependente da temperatura.

O modelo quantifica o efeito dos graus dia acumulados (CDD – “cumulative degree days” ou graus-dia acumulados) no processo de maturação das pseudotecas, assumindo que a humidade relativa está perto da saturação (Llorente *et al.*, 2012) e pressupõe que as pseudotecas estão maduras quando a maioria dos ascos apresenta oito ascósporos e que o CDD base é igual a zero (Llorente & Montesinos, 2006). De acordo com o modelo são necessários poucos CDD, quando comparado com outros fungos que afetam as pereiras, para que a maturação das pseudotecas se dê, sendo que aproximadamente 98% das pseudotecas estão completamente maduras após 750 CDD (Llorente & Montesinos, 2004).

O PAMcast foi avaliado e validado em condições de campo em vários pomares de pereiras durante vários anos (Llorente *et al.*, 2012), podendo ser usado para determinar a altura em que as pseudotecas e os ascósporos estão maduros. Desta forma, é possível prever quando os ascósporos irão ser libertados para o campo, servindo de sinal para começar a usar o sistema BSPcast, para a calendarização da aplicação de fungicidas e iniciar as medidas de prevenção das infeções primárias (Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012).

Os modelos de previsão implicam a monitorização do inóculo de *S. vesicarium* que é feita através da captação dos esporos seguida da identificação das várias espécies, com base nas características morfo-biométricas (Simmons, 1969). No entanto, muitas destas

características são comuns entre as diferentes espécies do género *Stemphylium*, o que dificulta a distinção da espécie *S. vesicarium* das restantes. Em 2014, foram realizados estudos para tentar identificar as diferentes *Stemphylium* spp. em pomares de pereira (Puig *et al.*, 2015). Os resultados obtidos demonstraram que a identificação das diferentes espécies do género *Stemphylium*, quando baseadas apenas no tamanho dos conídios conduz a uma incorreta identificação das mesmas. Na realidade, este facto já tinha sido referido em outros estudos, o que levou à inclusão de características morfológicas adicionais baseadas nos conidióforos ou meios de cultura para se conseguir a correta identificação das diferentes espécies de *Stemphylium* (Simmons 1967, 1969, 2001, 2004). Para além desta dificuldade, Puig *et al.* (2015) referiram que podem encontrar-se nos pomares isolados de *S. vesicarium* com diferente agressividade para a pera. A presença de diferentes isolados, patogénicos e não patogénicos, no pomar leva a uma sobrevalorização da presença de inóculo.

Köhl (2009) demonstrou que isolados de *S. vesicarium* provenientes de espargos e cebolas afetados não causavam sintomas da doença na pera. Também Patteri *et al.* (2006) referiu que apesar da ampla diversidade de espécies de *Stemphylium*, existia uma grande especificidade com o hospedeiro em termos de patogenicidade e virulência.

### **2.6.3. Meios de luta biológicos**

Devido à necessidade de aplicar frequentemente fungicidas para controlar a doença, os agentes de controlo biológico são vistos como possíveis alternativas ou como métodos complementares para controlar a estenfiliose (Montesinos *et al.*, 1996).

Em 1993, Ponti *et al.* testaram a aplicação de suspensões de esporos de *Trichoderma koningii* e de *T. viride* diretamente nas árvores. No entanto, a eficácia do método foi bastante baixa e não foram observadas reduções na severidade da doença (Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012).

Montesinos *et al.* (1996) avaliaram 410 estirpes de bactérias não patogénicas, pertencentes às espécies *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas fluorescens*, isoladas de amostras de diferentes órgãos aéreos e raízes de várias plantas, em várias regiões do nordeste de Espanha, na expectativa de encontrar alguma que pudesse ser útil como agente de controlo biológico contra *S. vesicarium*. Após ensaios *in vitro* em meio de cultura e em folhas destacadas, selecionaram a estirpe de *P. fluorescens* EPS288, por ter sido a que apresentou melhor eficácia na inibição do crescimento micelial e da geminação dos esporos de *S. vesicarium*, para testar a sua eficácia no controlo da doença sobre plantas inteiras em ambiente controlado em estufa. Nestas condições, apesar de ter demonstrado uma eficácia menor do que nos outros ensaios, houve um decréscimo de 57% na incidência da doença e

de 88% na severidade da mesma. No entanto, quando foi testada em ambiente de campo, no pomar, a mesma estirpe apresentou uma eficácia muito baixa, possivelmente devido a uma baixa taxa de sobrevivência, a uma fraca colonização das folhas de pera e a uma menor capacidade competitiva com outros microrganismos mais adaptados à filosfera da pereira, uma vez que esta estirpe tinha sido isolada do sistema radicular do milho (Montesinos *et al.*, 1996; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2010).

Para além destas abordagens, que visavam efetuar o controlo biológico da estenfiliose, aplicando o agente de controlo diretamente nos órgãos aéreos das pereiras, investigou-se, também, a aplicação deste tipo de agentes de forma a interferir no ciclo da doença na fase sexual do fungo durante o inverno e na fase saprófita durante o verão (Llorente & Montesinos, 2006; Rossi & Pattori, 2009).

Llorente *et al.* (2006) observaram que, com a aplicação de uma formulação líquida com uma mistura de estirpes de *Trichoderma harzianum* e de *T. viride*, quando as primeiras pseudotecas maduras eram observadas, se conseguia reduzir (entre 57% e 97%) o número de ascósporos capturados.

*Trichoderma sp.* cresce e produz abundantes conídios em folhas mortas de pereira e de *Digitaria sanguinalis*, ambas fontes de inóculo de *S. vesicarium* (Rossi *et al.*, 2005b; Rossi & Pattori, 2009). Rossi e Pattori (2009) demonstraram que, em ambiente controlado, *Trichoderma sp.* inibia a produção de conídios de *S. vesicarium*, sobretudo em folhas de *Digitaria sanguinalis*, sendo a supressão próxima de 99%, seis semanas após a aplicação do fungo às folhas. Os mesmos autores referem também que, quando testados em ensaios de campo, os produtos à base de *Trichoderma sp.* conseguiam reduzir em 50% o número total de conídios de *S. vesicarium* dispersos pela flora infestante.

A aplicação de produtos à base de *Trichoderma sp.* pode ser usada para complementar a remoção dos resíduos foliares do pomar e desta forma melhorar a sua eficácia contra a estenfiliose (Rossi & Pattori, 2009; Llorente *et al.*, 2010).

#### **2.6.4. Meios de luta químicos**

A luta química contra esta doença baseia-se na aplicação de fungicidas preventivamente, sempre que as condições sejam favoráveis ao desenvolvimento da doença e houver risco de contaminação (Sousa *et al.*, 2004; Llorente *et al.*, 2012). Os modelos de previsão, como o BSPcast, têm sido validados e utilizados para prever o momento ótimo para a aplicação dos fungicidas, embora em pomares com elevada pressão da doença seja aconselhada a aplicação preventiva de fungicidas a cada 7 a 14 dias, desde o abrolhamento

até próximo da colheita (Sousa *et al.*, 2004; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente *et al.*, 2012).

Segundo Llorente e Montesinos (2006) os fungicidas mais utilizados no combate a esta doença são: ditiocarbamatos (como o tirame e o mancozebe), dicarboximidas (procimidona) e estrobilurinas (cresoxime-metilo e trifloxistrobina), seguidos de outros fungicidas com captana, clorotalonil, tolifluanida, tebuconazol, fludioxinil e difenoconazol. Contudo a eficiência destes no controlo da doença é limitada, em especial quando a pressão da doença é muito elevada.

A aplicação de fungicidas deverá sempre ocorrer preventivamente antes da produção das toxinas hospedeiras específicas (SV-toxina I e II) pelos conídios logo após a sua germinação. Assim sendo, uma vez que a infeção ocorra, a ação fungicida já será tardia, pois a toxina já foi libertada e as necroses irão surgir nos órgãos infetados (Llorente & Montesinos, 2006).

Em suma, na região do Oeste, o controlo químico da estenfiliose passa por aplicações preventivas de fungicidas durante o desenvolvimento vegetativo da cultura, com base nas previsões do risco potencial de infeção obtido através do modelo de previsão BSPcast (Montesinos *et al.*, 1995a; Llorente *et al.*, 2000). Para esta região adotou-se o índice de risco acumulado (IRA) de valor 0,4 (Azevedo & Isidoro, 2005b), a partir deste valor procede-se a um tratamento fitossanitário dentro das 24 a 32 horas seguintes à deteção. Os autores referem também, que nesta região, ao longo dos anos, têm ocorrido diversos e repetidos eventos que ultrapassam este limiar, o que conduziu à necessidade de proteção regular através da aplicação de produtos fitofarmacêuticos desde a floração até próximo da colheita (5 a 6 meses nas cultivares mais tardias).

Esta necessidade faz com que se tenha de proceder à aplicação de fungicidas muitas vezes por campanha (15 – 25 aplicações), de forma a manter economicamente aceitáveis as perdas por causa da doença. Isto, para além das implicações que tem no aumento dos custos de produção e no ambiente, pode levar ao aparecimento de fenómenos de resistência do fungo a determinados fungicidas, devendo por isso aplicar-se alternadamente substâncias ativas com diferentes modos de ação (Sousa *et al.*, 2004).

Contudo, é importante salientar que a utilização do modelo BSPcast com o IRA igual a 0,4, permite uma redução em média de 55% do número de tratamentos face à estratégia de tratamentos semanais ou quinzenais (Azevedo & Isidoro, 2005b).

### 2.6.4.1. Substâncias ativas homologadas para o controlo de estenfiliose em Portugal

As substâncias ativas homologadas para o controlo da doença em Portugal encontram-se enumeradas no Quadro 1.

Quadro 1. Principais características dos fungicidas homologados no combate da estenfiliose da pereira em Portugal (DGAV, 2019).

Substância ativa	Nome comercial	Empresa	Grupo químico	Mobilidade na planta	Concentração da s. a.	Tipo de Formulação (código internacional)
boscalide + piraclostrobina	BELLIS	BASF	carboximida + estrobilurina	Sistémico	25,2%+12,8% (p/p)	WG <sup>1</sup>
captana + trifloxistrobina	FLINT PLUS	BAYER	ftalimida + estrobilurina	Misto	60% + 4% (p/p)	WG
ciprodinil + fludioxonil	SWITCH 62,5 WG	SYNGENTA	anilino pirimidina + fenilpirrole	Sistémico e de superfície	37,5% + 25% (p/p)	WG
ciprodinil + tebuconazol	BENELUS	ADAMA	anilino pirimidina + triazol	Sistémico	16,6% + 11,1% (p/p)	EC <sup>2</sup>
crexoxime-metilo	STROBY WG	BASF	estrobilurina	Sistémico, com mobilidade translaminar e ação de vapor	50% (p/p)	WG
crexoxime-metilo + difenoconazol	KSAR MAX	SAPEC	estrobilurina + azol	Sistémico com movimento translaminar	25,0% + 12,5% (p/p)	WG
fluaziname	BANJO	ADAMA	dinitroanilinas	De superfície	39,9% (p/p)	SC <sup>3</sup>
fluopirame + tebuconazol	LUNA EXPERIENCE	BAYER	benzamida-piridina + triazol	Sistémico	17,7% + 17,7%(p/p)	SC
fluxapiraxade	SERCADIS 30 SC	BASF	pirazol-carboximida	Sistémico	26,5% (p/p)	SC
metirame	POLYRAM DF	BASF	ditiocarbamato	De superfície	70% (p/p)	WG
pentiopirade	FONTELIS	DUPONT	carboxamida	Sistémico	20,4% (p/p)	SC
piraclostrobina	CABRIO WG	BASF	estrobilurina	Sistémico, com mobilidade translaminar	20% (p/p)	WG
tebuconazol	LIBERO TOP;	BAYER	triazol	Sistémico	25%	WG
	FOX WG	SAPEC			25%	WG
	ADVANCE;	HELM AG			25%	WG
	TEBUTOP;	NUFARM_P			25%	WG
MYSTIC 25 WG;	SELECTIS	25%	WG			
TEBUTOP WG;	SAPEC	25% (p/p)	WG			
FOX PLUS						
tirame	FERNIDE WG;	SIPCAM	ditiocarbamato	Superfície	80%	WG
	THIANOSAN;	TAMINCO			80%	WG
	TM-80;	SAPEC			80%	WG
	TIDORA G;	NUFARM_P			80%	WG
POMARSOL	BAYER	80% (p/p)	WG			
ULTRA D						
trifloxistrobina	FLINT;	BAYER	estrobilurina	Sistémico, com mobilidade lateral e translaminar	50%	WG
	CONSIST	BAYER			50% (p/p)	WG
zirame	ZIDORA AG;	NUFARM_P	ditiocarbamato	superfície	76%	WG
	ZICO;	SELECTIS			76%	WG
	THIONIC WG	TAMINCO			76%	WG

1 – Grânulos dispersáveis em água; 2 – Concentrado para emulsão; 3 – Suspensão concentrada.

No tratamento desta, bem como de outras doenças deve-se, de forma a evitar o aparecimento de isolados resistentes, alternar a substância a aplicar em cada tratamento de forma a não aplicar duas vezes seguidas a mesma substância ou outra com o mesmo modo de atuação (Sousa *et al.*, 2004).

No caso de se aplicarem fungicidas de contacto/ superfície deve repetir-se a aplicação quando ocorrerem precipitações, regas por aspersão ou neblinas (Sousa *et al.*, 2004).

#### **2.6.4.2. Vias de penetração**

Os fungicidas podem variar na forma como se posicionam na superfície vegetal, podendo com base nesse posicionamento ser classificados em fungicidas de superfície (ou de contacto), penetrantes, sistémicos ou mesostémicos. Os de superfície são aqueles que quando aplicados na planta mantêm-se na sua superfície, impedindo a germinação dos esporos ou a contaminação das plantas pelo fungo, sem, contudo, atravessarem a epiderme dos tecidos vegetais ou protegerem os crescimentos efetuados após a aplicação (Farropas, 2003). Já os considerados como penetrantes após a sua aplicação atravessam a epiderme foliar, podendo apresentar alguma ação translaminar e alguma difusão na folha, ou seja, o fungicida entra na folha através da página onde foi colocado e atravessa-a para a face contrária, acabando por proteger toda a folha. Contudo, estes fungicidas não são transportados no sistema vascular da planta, nem protegem os crescimentos ocorridos posteriormente à sua aplicação. No caso dos sistémicos após serem aplicados à planta atravessam os tecidos vegetais e são translocados no sistema vascular da planta, distribuindo-se ao longo dos tecidos, onde permanecem por tempo variado, protegendo a planta dos organismos alvo, incluindo os crescimentos que se processem após a aplicação. Os mesostémicos são aqueles que atuam na superfície das plantas e são absorvidos pela camada cerosa, e seguem um movimento de reposição por fase de vapor, penetrando nos tecidos e tendo mobilidade translaminar (Simões, 2005).

Os fungicidas também se diferenciam na forma como atuam no organismo alvo podendo impedir a germinação dos esporos e evitar a contaminação das plantas, sendo por isso chamados de preventivos (protetores ou profiláticos); atuar no fungo após a contaminação se ter dado, parando ou retardando o desenvolvimento do fungo, designando-se de curativos (ou terapêuticos); ou erradicantes (ou anti-esporulantes) se destruírem os esporos já formados e impedirem a formação de mais esporos (Cavaco, 2016).

### 2.6.4.3. Modos de Ação

No que aos fungicidas diz respeito é ainda fundamental compreender o seu mecanismo de atuação fisiológica e bioquímica no metabolismo celular do patógeno, de forma a compreender e evitar fenómenos de resistência. Em particular, deve conhecer-se se o fungicida atua em vários mecanismos vitais do fungo ou se afeta apenas um local específico de um determinado processo fisiológico do fungo, uma vez que se deve usar estes últimos com menor frequência, visto ser mais suscetíveis de desencadear processos de resistência (Amaro, 2003; Simões, 2005).

Fungicidas como o enxofre, os cúpricos, as ftalimidas e os ditiocarbamatos, são exemplos de fungicidas que inibem numerosos mecanismos vitais ao nível da respiração, precipitação de proteínas ou integridade da célula (Amaro, 2003).

Normalmente, os processos fisiológicos e bioquímicos que se visam alterar estão relacionados com a membrana celular, afetando algumas enzimas que interferem na biossíntese do ergosterol ou na permeabilidade, composição da membrana e inibição da respiração; com o núcleo, afetando enzimas e proteínas que interferem na reprodução e regulação celular; com a respiração, afetando certos enzimas provocando a inibição dos transportes de eletrões na mitocôndria; ou com a indução de resistência da planta (Simões, 2005; Cavaco 2016). No Quadro 2 estão resumidos alguns mecanismos de ação dos fungicidas bem como as siglas a que estão associados.

Devido a haver um maior risco de aparecimento de fenómenos de resistência nos fungicidas com um modo de ação seletivo, o conhecimento destes mecanismos é importante para ajudar a definir estratégias que a evitem (Simões, 2005).

Quadro 2. Mecanismos de ação dos fungicidas (Cavaco, 2016).

<b>Sigla</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
IBE (IBS)	Inibidores da biossíntese de esteróis.
DMI- IBE Classe I	Inibidores da biossíntese de esteróis na demetilação.
IBE classe II	Inibidores da biossíntese de esteróis na $\Delta_{14}$ redutase e $\Delta_8 \rightarrow \Delta_7$ isomerase.
IBE classe III	Inibidores da biossíntese de esteróis na 3 cetoreductase e $C_4$ demetilação.
CAA	Inibidor de amidas do ácido carboxílico.
Q <sub>o</sub> I	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face externa do citocromo b ("quinone outside inhibitors").
Q <sub>o</sub> SI	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face externa do citocromo b ("quinone outside inhibitors"), mais precisamente na estigmatelina.
Q <sub>i</sub> I	Inibidor da respiração no complexo III (citocromo bc1), fixando-se na face interna do citocromo b ("quinone inside inhibitors").
MBI-R	Inibidor da biossíntese da melanina redutase.
SDHI	Inibidor da succinato desidrogenase.

#### **2.6.4.3. Eficácia biológica**

Face aos problemas que o fungo *S. vesicarium* tem causado não só nas pereiras, mas também noutras culturas, muito se tem feito para se conhecer melhor o seu ciclo de vida e se desenvolverem estratégias eficazes no combate a esta doença que incluam, de forma integrada, os diferentes meios de luta. No que aos meios de luta química diz respeito alguns trabalhos têm sido feitos sobre a eficácia biológica e o desenvolvimento de resistência do fungo a fungicidas, destacando-se os trabalhos de Alberoni *et al.* (2005, 2008, 2010) sobre o desenvolvimento de resistências a fungicidas em Itália, os de Collina *et al.* (2006) e Correia (2001) ambos com isolados patogénicos em pereira e os trabalhos de Basallote-Ureba *et al.* (1998) e Gálvez *et al.* (2016) com isolados patogénicos na cultura do alho e de Bizarro (2012) em couve.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Avaliação da incidência e severidade de estenfiliose em amostras de material vegetal proveniente de seis pomares de pereira Rocha

##### 3.1.1. Condições experimentais e delineamento dos ensaios de campo

Tal como já referimos anteriormente, este trabalho de mestrado desenvolveu-se no âmbito do trabalho de investigação desenvolvido pelo ISA, parceiro do GO ProtectEstenfilio, coordenado pelo COTHN e com seis Organizações de Produtores/associações de Produtores (Figura 9).



Figura 9. Grupo Operacional ProtectEstenfilio.

Os seis ensaios de campo instalados pelas OP (Quadro 3) em pomares de pereira 'Rocha' pretendem avaliar a presença de *Stemphylium vesicarium* em flores, frutos e folhas de pereira sujeitas a duas diferentes práticas culturais.

Quadro 3. Identificação das Organizações de Produtores envolvidas no GO

<b>Sigla</b>	<b>Designação</b>
COOPVAL	COOPERATIVA AGRÍCOLA DOS FRUTICULTORES DO CADAVAL CRL
APAS	ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES AGRÍCOLAS DA SOBRENA
FRUTOESTE	FRUTOESTE-COOPERATIVA AGRICOLA DE HORTOFRUTICULTORES DO OESTE-CRL
FRUTUS	ESTAÇÃO FRUTEIRA DO MONTEJUNTO CRL
CPF	CPF - CENTRO DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO HORTOFRUTÍCOLA LDA
CAB	COOPERATIVA AGRICOLA DO BOMBARRAL CRL

As duas modalidades ensaiadas nos pomares selecionados foram:

- **M1** – Testemunha, entrelinha triturada deixando o material vegetal no solo.
- **M2** – Eliminação / Remoção física do material foliar, frutos e/ou material lenhoso.

A modalidade M2, eliminação/ remoção física do material foliar, frutos e/ou material lenhoso do solo do pomar, realizou-se antes do abrolhamento e, conseqüentemente, tem como objetivo eliminar o inóculo potencial no solo do pomar reduzindo as infeções das flores, frutos e folhas ao longo do ciclo vegetativo.

As condições experimentais dos ensaios de campo para redução de inóculo de estenfiliose em pomares comerciais foram as seguintes:

Compasso: 4,0 x 1,5 m

Tipo de solo: Franco

Regime hídrico: Regadio/sequeiro

Doença: pomar com média incidência da doença

Tratamentos fitossanitários e fertilizações: decisão do técnico e do agricultor.

O delineamento experimental escolhido foi blocos casualizados com a largura mínima da parcela: 18 filas (18 x 4 m = 72m), a área por modalidade mínima de 2 880 m<sup>2</sup> e número de árvores/modalidade foi de 480 árvores. As amostras de material para análise foram recolhidas em 8 árvores por modalidade de ambos os lados da copa.

### **3.1.1. Colheita de material vegetal**

A colheita e envio das amostras de material vegetal para o ISA foi realizada pelas diferentes OP envolvidas. No Quadro 4 apresentam-se as épocas de colheita das amostras, a designação de cada amostra, a presença ou ausência de sintomas e observações que serviram de base a todo o trabalho desenvolvido pelas seis OP.

A colheita do material vegetal foi o mais homogéneo possível, sendo realizada sempre, dos dois lados da copa da árvore. As primeiras quatro colheitas de flores e frutos, respetivamente, foram feitas aleatoriamente em flores e frutos sem sintomas. Na última colheita de frutos e na colheita de folhas, as amostras apresentavam sintomas típicos de estenfiliose. Apresenta-se um esquema das diversas etapas seguidas para concretização do trabalho (Figura 10).

Quadro 4. Protocolo do trabalho desenvolvido pelas OP no âmbito do GO

<b>Época de colheita</b>	<b>Designação da amostra</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Observações (escala BBCH)</b>
Início da Floração	1ª flores	Não	16 Flores/modalidade, 2 por árvore, uma de cada lado da copa, no total de 8 árvores. (estado 62)
Fim da Floração	2ª flores	Não	16 Flores/modalidade, 2 por árvore, uma de cada lado da copa, no total de 8 árvores. (estado 65)
Frutos Vingados e pequenos	1º frutos	Não	16 Frutos/modalidade, 2 por árvore, um de cada lado da copa, no total de 8 árvores. (estado 72)
Frutos de Julho	2º frutos	Não	16 Frutos/modalidade, 2 por árvore, um de cada lado da copa, no total de 8 árvores (estado 74).
Frutos antes da colheita	3º frutos	Sim	16 Frutos/modalidade, 2 por árvore, um de cada lado da copa, no total de 8 árvores (estado 87).
Folhas		Sim	16 folhas/modalidade, 2 por árvore, um de cada lado da copa, no total de 8 árvores.

Ao longo da campanha de 2018, as amostras dos diferentes órgãos vegetais colhidas nos pomares em ensaio, foram rececionadas no ISA. No Quadro 5 estão discriminadas, a data de receção das amostras, o tipo de material e os pomares onde se realizaram as colheitas que conduziram à obtenção dos resultados que a seguir se apresentam.

Quadro 5. Calendarização da receção das diferentes amostras no ISA.

<b>Data de receções de material vegetal</b>	<b>Tipo de material</b>	<b>Pomares das OP</b>					
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
16 a 21 de abril	1ª Flores	x	x	x	x	x	x
23 a 27 de abril	2ª Flores	x	x	x		x	
30 de abril a 04 de maio	2ª Flores				x		x
14 a 18 de maio	1º Frutos vingados	x	x	x			x
21 a 25 de maio	1º Frutos vingados				x		
27 de maio a 1 de junho	1º Frutos vingados					x	
	2º Frutos		x	x			x
9 a 13 de julho	Folhas		x	x			x
16 a 20 de julho	2º Frutos				x		
23 a 27 de julho	2º Frutos	x				x	
	Folhas	x			x	x	
20 a 24 de agosto	3º Frutos (colheita)	x	x	x			x
27 a 31 de agosto	3º Frutos (colheita)				x	x	

## Trabalho de campo (OPs) e laboratório (ISA)

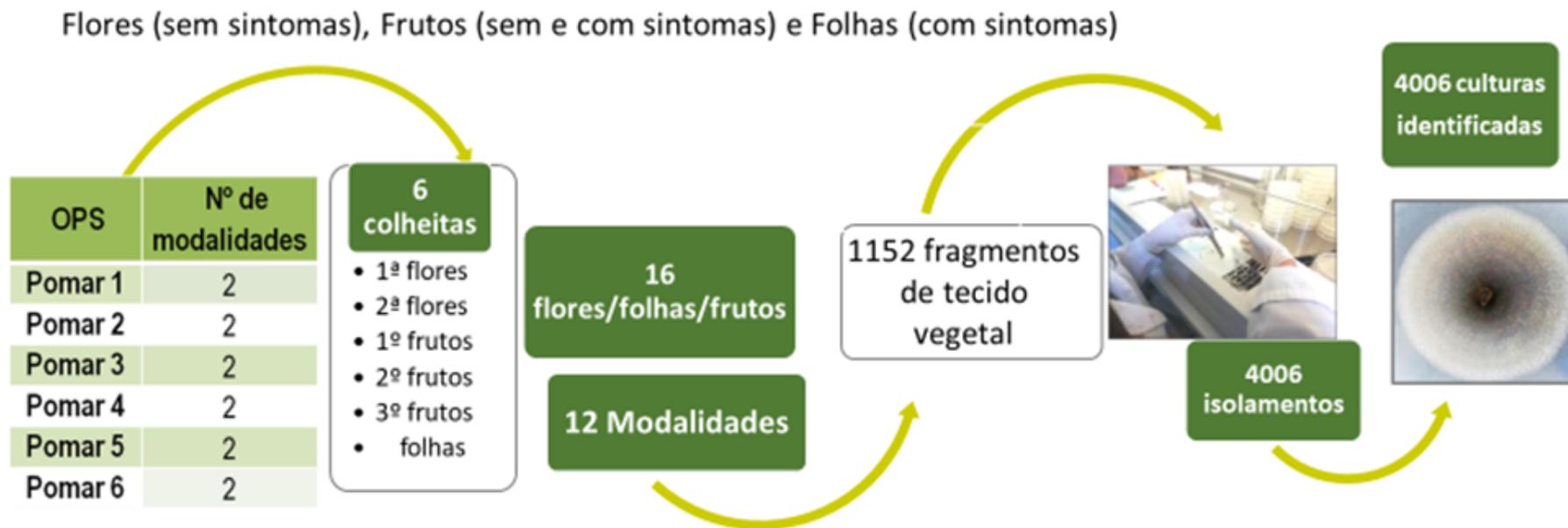


Figura 10. Esquema das diversas etapas seguidas para a concretização do trabalho

### **3.1.2. Isolamentos microbiológicos**

Os diferentes materiais vegetais analisados (flores, frutos e folhas) foram seccionados em 4 fragmentos por amostra e transferidos para placas de Petri contendo 15 mL de gelose de batata dextrosada (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), suplementado com 250 mg de cloranfenicol por cada litro de meio, após autoclavagem e arrefecimento a 45°C.

Na última colheita de frutos e folhas, os fragmentos foram retirados da zona com sintoma e ainda desinfetados em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% durante um minuto e passados por água destilada esterilizada. De seguida, os fragmentos foram secos em papel de filtro e transferidos placas com meio de cultura igual ao anterior.

Após a inoculação, as placas foram colocadas à temperatura de 25±1°C e, após um período de 12 a 15 dias, procedeu-se à repicagem das colónias dos fungos isolados, para placas de Petri contendo PDA. Decorrido o período de incubação, necessário ao desenvolvimento das culturas e à esporulação, purificaram-se as culturas e procedeu-se à identificação dos isolados. A identificação de *Stemphylium vesicarium* baseou-se no estudo das características morfológicas e culturais (Simmons, 1967, 1969).

### **3.1.3. Análise de resultados da incidência e severidade de *Stemphylium vesicarium***

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

## **3.2. Avaliação da eficácia de fungicidas**

### **3.2.1. Isolados em estudo e fungicidas utilizados**

Da coleção de isolados de *Stemphylium vesicarium*, existente no ISA, foram selecionados os isolados FR2 e FT5 que haviam sido obtidos a partir de flores e frutos de pereiras com sintomatologia típica de estenfiliose recolhidos no âmbito de outro trabalho. No Quadro 6 são referidos dados sobre o local de colheita do material vegetal, data de isolamento e o órgão afetado de onde foi colhido, assim como a designação que lhes foi atribuída.

Quadro 6. Isolados de *Stemphylium vesicarium* utilizados nos ensaios de eficácia biológica de fungicidas.

Isolados	Origem (Região)	Data	Órgão afetado	Mobilização do solo	Histórico da parcela	Período de colheita de amostras
FT5	Bombarral	2016	Fruto (com sintomas)	Com mobilização	Incidência média	3ª colheita
FR2	Bombarral	2016	Flores (sem sintomas)	Com mobilização	Incidência baixa	2ª colheita das flores

O critério usado na seleção dos referidos isolados foi a indicação de se tratarem de isolados muito virulentos e terem sido obtidos de órgãos diferentes, flor e fruto (Comporta, 2016). Os isolados em estudo (culturas monospóricas) encontravam-se conservados na micoteca do ISA/Patologia em tubos de ensaio contendo gelose de batata dextrosada (Potato Dextrose Agar - PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), à temperatura aproximada de 5°C e na obscuridade. As culturas usadas nos ensaios foram obtidas por repicagem para placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de gelose de batata dextrosada, após incubação em estufa regulada para a temperatura de 25°C±1°C, em condições de obscuridade. Quanto aos fungicidas apresentam-se, no Quadro 7, as suas principais características.

Quadro 7. Principais características dos fungicidas utilizados nos ensaios de eficácia biológica, relativamente a *Stemphylium vesicarium*.

Substância ativa	Nome comercial	Empresa	Grupo químico	Mobilidade na planta	Conc. da s.a.	Tipo de formulação
ácido fosforoso	BAS 181 02 S	BASF	fosfonatos	-	504 g/L	SC <sup>1</sup>
boscalide + piraclostrobina	Bellis®	BASF	carboximida + estrobilurina	sistémico	25.2% + 12.8% (p/p)	WG <sup>2</sup>
ditianão	Delan® 70 WG	BASF	quinona	de superfície/contacto	70% (p/p)	WG
ditianão + ácido fosforoso	BAS 643 01 S	BASF	quinona + fosfonatos	de superfície/contacto	125 + 375 (g/L)	SC
fluxapiraxade	Sercadis	BASF	carboximida	sistémico	26.5% (p/p)	SC
metirame	Polyram® DF	BASF	ditiocarbamato	de superfície/contacto	70%	WG
pirimetanil	Scala	BASF	anilinopirimidina	mobilidade translaminar	400 g/L	SC
pirimetanil + ditianão	BAS 669 01 F	BASF	anilinopirimidina + quinona	mobilidade translaminar + de superfície	250 + 250 (g/L)	SC

<sup>1</sup> – Suspensão concentrada; <sup>2</sup> – Grânulos dispersíveis em água

### 3.2.2. Inibição do crescimento micelial

Na realização deste estudo de inibição do crescimento micelial de *S. vesicarium* recorreu-se à utilização da técnica do meio tóxico de Tomaz (1958), habitualmente referenciada para a avaliação da eficácia de fungicidas (Farropas, 2003; Vaz, 2008; Bizarro, 2012; Cabanas, 2013). Esta técnica baseia-se na existência de uma relação linear entre o crescimento do fungo e o tempo, sendo a avaliação da eficácia do fungicida efetuada através da comparação do crescimento do fungo em meio geloso na presença de fungicida com o seu crescimento em meio equivalente, mas na ausência de fungicida (Farropas, 2003; Bizarro, 2012).

Os ensaios foram realizados em meio de cultura de PDA (Potato Dextrose Agar - PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), por ser o meio usualmente utilizado em estudos semelhantes (Montesinos & Vilardell, 1992; Farropas, 2003; Vaz, 2008; Bizarro, 2012; Cabanas, 2013).

Em cada ensaio testou-se a eficácia de um fungicida em dois isolados de *S. vesicarium* (FT5 e FR2), utilizando-se seis concentrações distintas de fungicida, reportadas à concentração de substância ativa, e uma testemunha por isolado em que foi apenas adicionada água destilada ao meio de cultura sem fungicida, fazendo-se seis repetições por tratamento.

O ensaio iniciava-se com a preparação de uma suspensão-mãe de fungicida, com uma concentração de 10 mg de s. a. por L, num balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida, através do método das diluições sucessivas (Figura 11) obtiveram-se as seguintes concentrações: 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/L.

Cada uma das diluições foi adicionada e homogeneizada ao meio de cultura, previamente esterilizado e arrefecido em banho-maria, à temperatura de 45 – 50°C. Este meio foi preparado de maneira a que se obtivessem as concentrações de fungicidas pretendidas e que a concentração de PDA se mantivesse constante: 3,9 g por 100 mL de meio. Em seguida, a mistura foi assepticamente distribuída por seis placas de Petri de poliestireno, com 90 mm de diâmetro, num total de seis repetições por tratamento, contendo cada placa aproximadamente 15 mL da mistura. Após a solidificação do meio procedeu-se à inoculação das placas com os respetivos isolados, colocando-se no centro de cada placa um disco micelial, retirado da periferia de culturas dos isolados em questão, em crescimento numa estufa à temperatura de 25±1°C na obscuridade. Após a inoculação das placas, estas foram colocadas em condições semelhantes às anteriores durante aproximadamente 10 dias ou até se atingir um diâmetro considerável na placa, após os quais se procedeu à medição do crescimento micelial do fungo.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (I) através da fórmula de Bateman e Vicent,  $I = 100 \times (C-T) / C$ , em que C representa o crescimento micelial da testemunha, em mm e o T, o crescimento micelial nas placas tratadas, em mm (Horsfall, 1956).

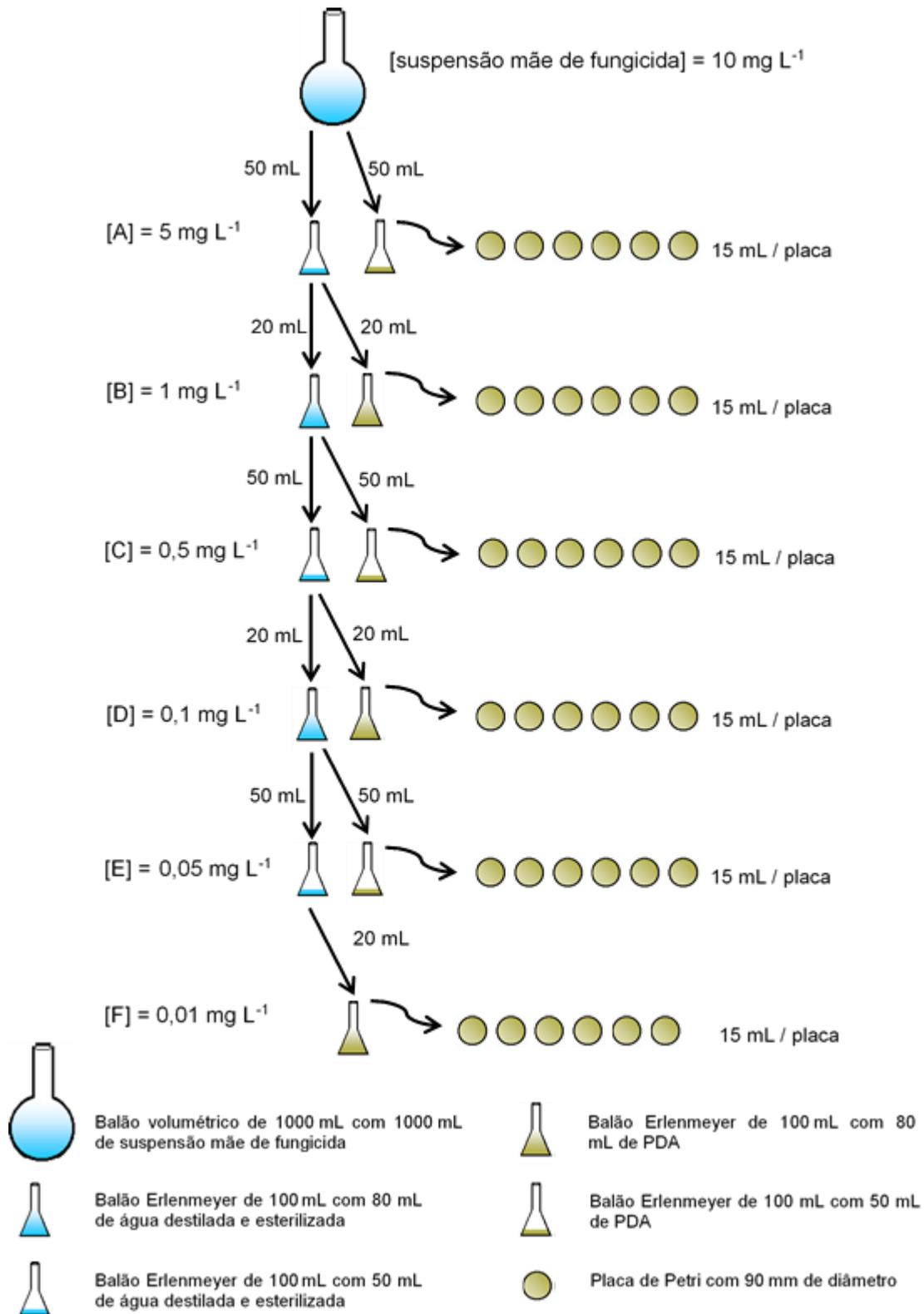


Figura 11. Esquema de preparação do método do meio tóxico utilizado e respetivas concentrações para 10 mg L<sup>-1</sup> (Adaptado de Farropas (2003)).

### 3.2.3. Indução da esporulação

Uma vez que em meio de PDA o fungo não apresentou esporos em número suficiente para a elaboração dos ensaios de inibição da germinação de esporos, recorreremos a diferentes métodos/técnicas de esporulação de forma a obter-se os esporos necessários.

Numa primeira abordagem experimentou-se usar o meio de cultura V8 em vez de PDA, uma vez que também é um meio normalmente utilizado em ensaios para a obtenção de esporos de *S. vesicarium* (Montesinos *et al.*, 1996; Basallote-Ureba *et al.* 1999; Sousa *et al.*, 2004; Alberoni *et al.*, 2005).

O segundo método experimentado baseou-se no método usado por Silva (2011), que tinha sido adaptado do trabalho de Chairisook *et al.* (1995), para obtenção de conídios de *Stemphylium sp.* para estudos de morfologia e biometria. Neste ensaio utilizaram-se caules e folhas de luzerna (*Medicago sativa* L.) previamente esterilizados por autoclavagem e posteriormente colocados com o auxílio de uma pinça esterilizada em placas de Petri de poliestireno, com 90 mm de diâmetro e 12 mL de PDA, previamente solidificado. Sobre estes colocaram-se discos invertidos de micélio retirados da periferia de colónias dos isolados em estudo, com a ajuda de um bisturi esterilizado. As placas foram seguidamente colocadas na estufa a uma temperatura de 25°C durante dez dias, na obscuridade. Após estes dias as placas foram observadas à lupa binocular (Leica MZ 12) para deteção de conídios.

Num outro ensaio puseram-se fragmentos de colónias dos isolados de *S. vesicarium* em estudo em água das chuvas tendo por base o trabalho de Dos Santos *et al.* (2018).

Para a realização deste trabalho procedeu-se à recolha de água da chuva, nas semanas anteriores ao trabalho. A água recolhida foi posteriormente filtrada duas vezes, a primeira em gaze 1L para remover os detritos maiores e a segunda em papel de filtro. 1L desta água foi levada à autoclave de forma a ser esterilizada e foi colocada no dia seguinte em balões de Erlenmeyer de 100 mL, no total de 40 mL de água da chuva por balão. Estes balões são levados outra vez à autoclave de forma a diminuir os riscos de contaminações.

De colónias dos isolados em estudo foram removidos fragmentos (com dimensões de aproximadamente 4x4 cm), que foram colocados numa placa de Petri esterilizada e esmagados com recurso a um pilão, até resultarem fragmentos de tamanho inferior a 2 mm.

Após o arrefecimento dos balões até a temperatura ambiente, os fragmentos de micélio foram colocados nos balões de Erlenmeyer que continham 40 mL de água da chuva esterilizada e deixados num agitador Orbital a 80 rpm, com a sala a uma temperatura entre 22 e 25°C durante 7 dias, a um regime de luz continua.

O delineamento da experiência foi realizado com 3 réplicas por isolado, usando-se apenas água da chuva esterilizada como controlo.

Após os 7 dias, a suspensão em cada balão foi filtrada através de duas camadas de gaze, e foi estimada a concentração conidial (conídios/mL) medindo quatro vezes a partir de um hemocítmetro.

De forma a avaliar-se a germinação dos conídios, obtidos a partir da experiência, foram colocadas 4 gotas com 50 µL de uma suspensão conidial de 10<sup>4</sup> conídios/ mL, numa placa de Petri e incubadas a 25 °C, com um fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas.

A percentagem foi calculada com base na contagem do número de esporos germinados em 100 conídios, visualizados ao microscópio, considerando-se os esporos com germinados, se o tubo germinativo atingisse um tamanho superior ou igual à metade do comprimento do conídio.

### **3.2.4. Inibição da germinação de esporos**

Na realização destes ensaios utilizou-se uma técnica baseada no método das diluições sucessivas em tubos de ensaio, descrita por Tomaz (1958), com algumas alterações que têm por base os ensaios elaborados por Olaya e Koller (1999) (Farropas, 2003; Bizarro, 2012; Cabanas, 2013).

Neste método os esporos são incorporados em várias diluições de fungicidas, de onde se retira 4 gotas, que são colocadas numa placa de Petri e postas a uma temperatura de 25°C na obscuridade durante o período de incubação. Observando-se depois a percentagem de esporos germinados.

Antes da aplicação da técnica, foi necessário fazer uma placa teste, com 4 gotas de uma suspensão conidial de 30 µL, para se determinar o período de incubação para a ocorrência de germinação dos esporos, em que se considerou que a germinação foi atingida quando 80% dos esporos apresentarem tubo germinativo.

Em cada ensaio foi testado um fungicida, sendo as concentrações iguais as referidas para a inibição do crescimento micelial.

No início de cada ensaio foi preparada uma suspensão mãe de fungicida com o dobro da concentração pretendida, utilizando-se, posteriormente, o método das suspensões-diluições para obter as restantes concentrações, também com o dobro da concentração pretendida, visto haver uma diluição de 1:2 quando se adicionar a suspensão conidial (150µL da diluição do fungicida mais 150 µL da suspensão conidial, perfazendo um total de 300 µL).

As suspensões conidiais foram preparadas de modo a que apresentem entre 35 e 50 esporos por campo microscópico, à ampliação de 100X, através da realização de diluições sucessivas das suspensões conidiais obtidas e filtradas no ensaio de indução de esporulação.

Após isto, foram retirados 150 µL de cada uma das suspensões conidiais e 150 µL de cada concentração do fungicida e colocados num Eppendorf de 1 mL, de forma a perfazerem 300 µL. No caso da testemunha, usou-se 150 µL de água destilada, em vez do fungicida. Os tubos foram, em seguida, agitados num Vortex e retiram-se 4 gotas de 30 µL da solução para uma placa de poliestireno, em zonas opostas. Seguidamente, colocou-se uma lamela de vidro em cima de cada gota. Após o período de incubação, foram contados o número de esporos germinados num total de 25 esporos por lamela. A percentagem corrigida de inibição da germinação foi posteriormente calculada através da fórmula de ABBOT (Horsfall, 1956),  $I = 100 - (E - T) / (T - A) \times 100$ , em que I é a percentagem da inibição corrigida; A, o número de esporos germinados antes da incubação na testemunha; T, o número de esporos germinados depois da incubação na testemunha e E, o número de esporos germinados depois da incubação, em cada concentração de fungicida ensaiado.

### 3.2.3. Análise de dados

Para analisar os valores obtidos nos ensaios de inibição do crescimento micelial e de inibição da germinação de esporos, procedeu-se à transformação da variável resposta, percentagem de inibição, em “probits”. Estes são unidades de probabilidade dispostas numa escala de 10, derivadas de desvios equivalentes normais e que tem por unidade o desvio padrão, tendo a escala sido imaginada por Bliss (1934) (Farropas, 2003). Os “probits” são calculados para que a sua probabilidade corresponda à percentagem de inibição. Os valores das concentrações também foram transformados, no entanto neste caso nos seus logaritmos decimais, para que desta forma se consiga estabelecer uma relação linear entre os parâmetros referidos.

Para evitar que o resultado da função logarítmica da concentração tomasse valores negativos, algo que ocorre quando os valores a que é aplicada a função logarítmica se encontram entre 0 e 1, como é o caso dos valores de concentração que estão em g/mL, optou-se então por multiplicar os valores da concentração por uma constante ( $10^8$ ) (Farropas, 2003).

A análise foi realizada com o auxílio do programa EXCEL (Office 365 MSO). Para cada ensaio de fungicida foi calculada a respetiva reta de regressão e foi determinado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), bem como a equação da reta ( $Y=a+bX$ ) e o valor de  $CE_{50}$ .

O cálculo do coeficiente de determinação serve para verificar o ajustamento do modelo aos dados obtidos experimentalmente, sendo o ajustamento melhor quanto mais próximo da unidade estiver o valor de  $R^2$ . Já os valores  $CE_{50}$  e b permitem comparar os fungicidas. O valor de  $CE_{50}$  corresponde à concentração para a qual o fungicida apresenta 50% de inibição, ou seja, para a qual o “probit” é igual a 5, este valor é utilizado para comparar a eficácia.

O valor de  $b$  corresponde ao declive da reta de regressão e indica-nos a variação que ocorre nos valores das ordenadas, “probits”, quando se aumenta uma unidade no valor das abcissas, logaritmo da concentração. Deste modo, valores baixos de  $b$  sugerem uma escassa variação na suscetibilidade do fungo ao fungicida, enquanto que valores altos sugerem uma grande variação na suscetibilidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da incidência e severidade de estenfiliose em seis pomares de pereira Rocha

A maioria dos resultados obtidos quer para a incidência quer para a severidade revelaram diferenças significativas entre os pomares escolhidos pelas diferentes OP. Assim sendo, são apresentados primeiramente, os valores médios de incidência e de severidade (M2 - com remoção de material vegetal e M1 - Testemunha – sem remoção de material vegetal) para cada um dos pomares e, em seguida, apresenta-se para cada pomar a comparação entre as duas modalidades em estudo.

Relativamente às amostras de **1ª flores** e **2ª flores**, a análise da incidência e severidade médias revelou existirem diferenças significativas entre os pomares escolhidos. O valor mais elevado ocorreu nas flores do pomar 2 e o menor nas flores do pomar 3 (Figura 12 e Figura 13).

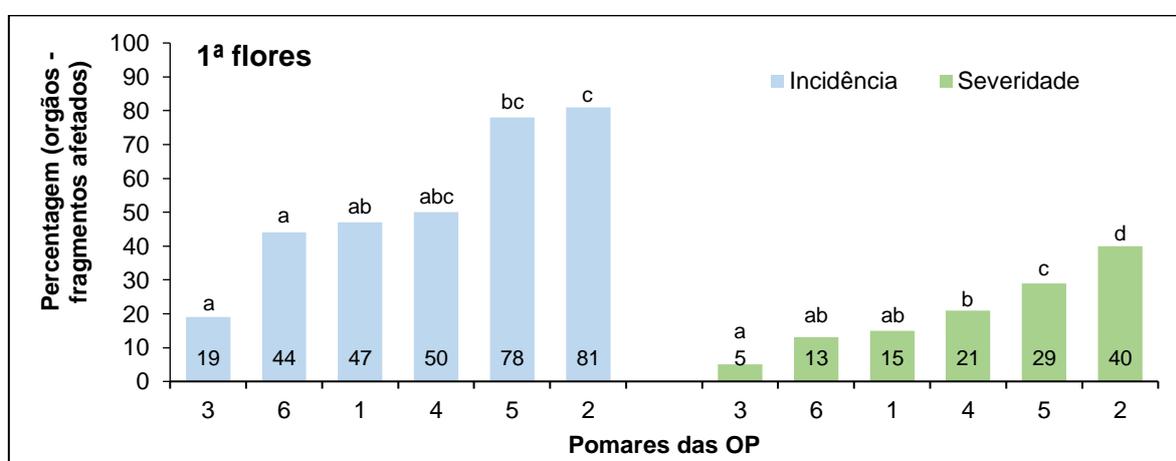


Figura 12. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 1ª flores. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

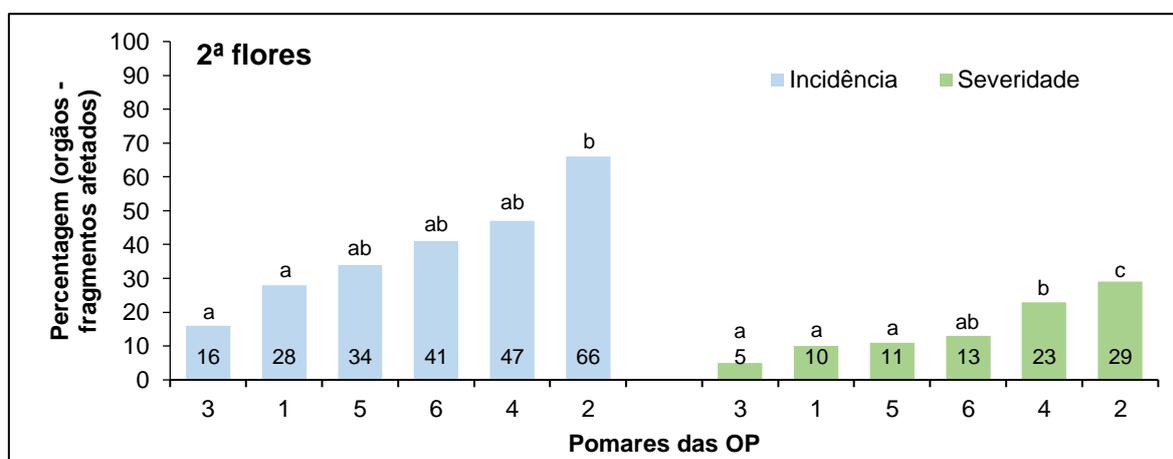


Figura 13. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 2ª flores. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

Quanto aos valores obtidos para a incidência e severidade médias nos **1º frutos**, verificou-se não existirem diferenças significativas entre os pomares (Figura 14). No que diz respeito aos **2º frutos**, ocorreram diferenças significativas entre os valores obtidos para a incidência e severidade médias, com o valor mais elevado no pomar 6 e o menor no pomar 3 (Figura 15). Quanto aos **3º frutos** (com sintomas), ocorreram sintomas tanto na polpa como na fossa apical (Figura 16); verificou-se existirem diferenças significativas entre os pomares, tendo ocorrido os valores mais elevados de incidência e severidade no pomar 5 e os mais baixos no pomar 3 (Figura 17).

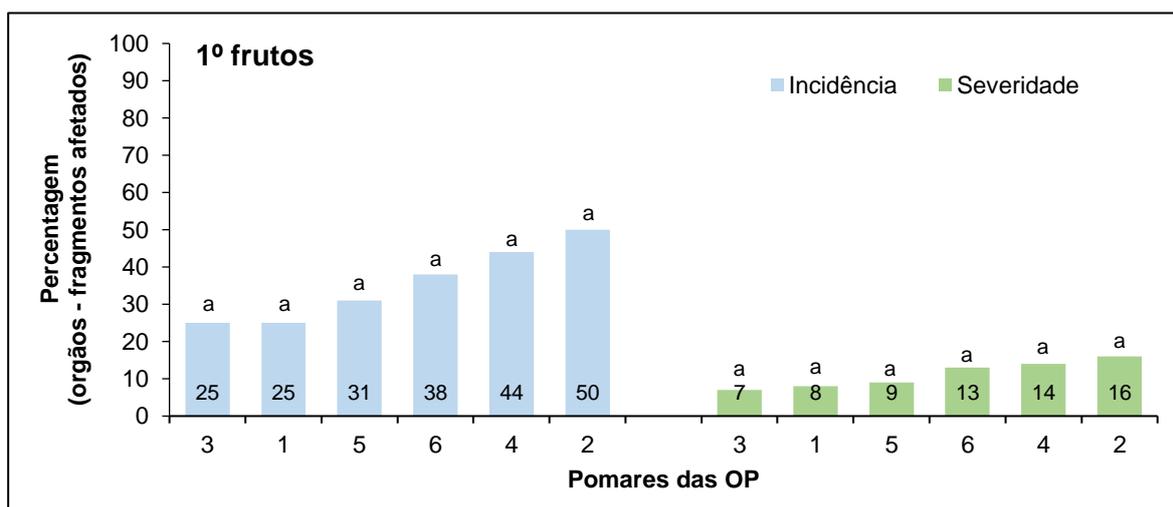


Figura 14. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 1º frutos. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

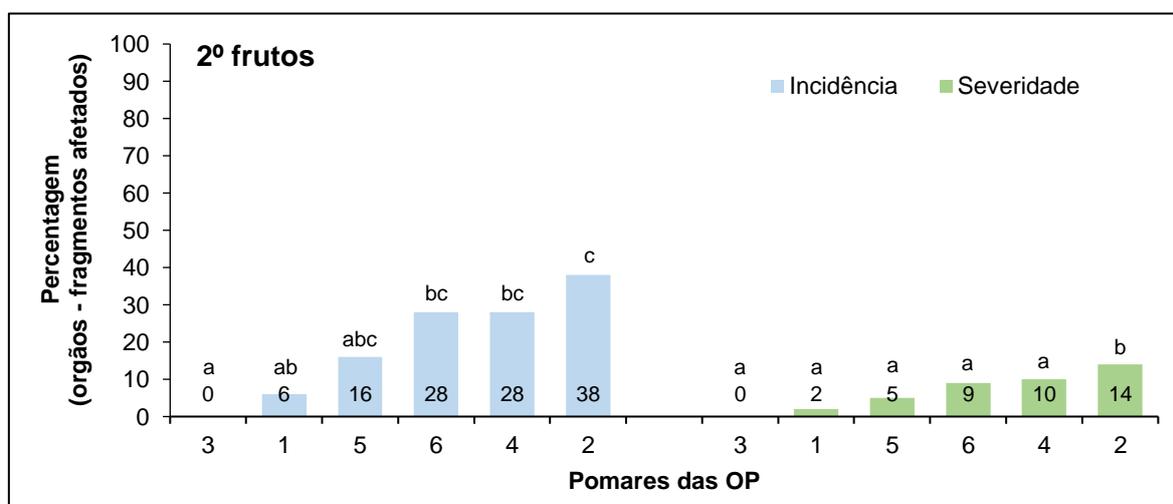


Figura 15. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 2º frutos. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

### 1. FOSSA APICAL



### 2. POLPA



Figura 16. Sintomas de estenfiliose na fossa apical e na polpa observados nos 3º frutos colhidos em diferentes pomares.

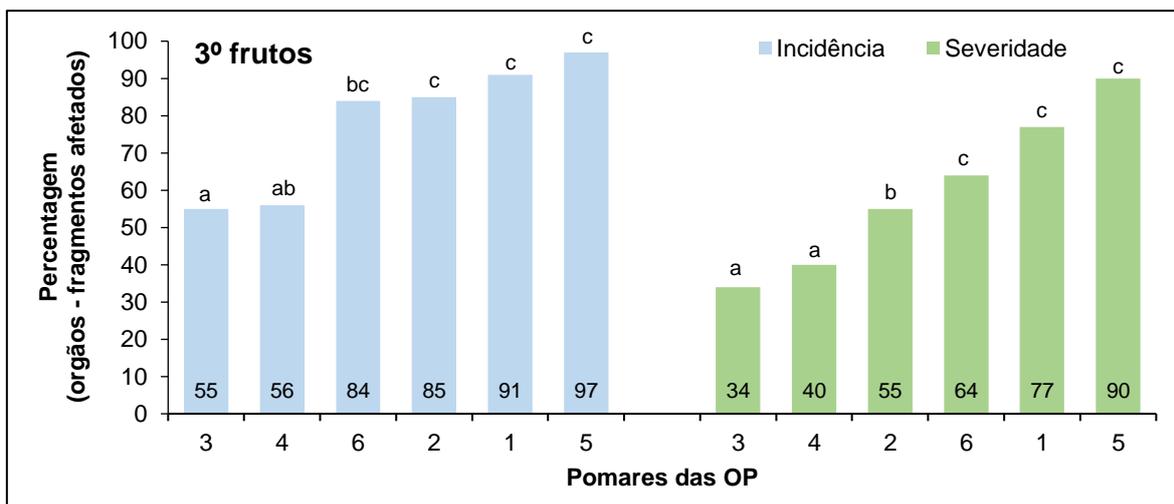


Figura 17. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 3º frutos. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

Finalmente, relativamente às infeções nas folhas (Figura 18) verificaram-se diferenças significativas entre os pomares, tendo o valor mais elevado de incidência ocorrido no pomar 2 e o menor no pomar 3. Quanto à severidade, o valor mais elevado ocorreu nas folhas provenientes do pomar 6 e o menor nas folhas provenientes do pomar 2 (Figura 19).

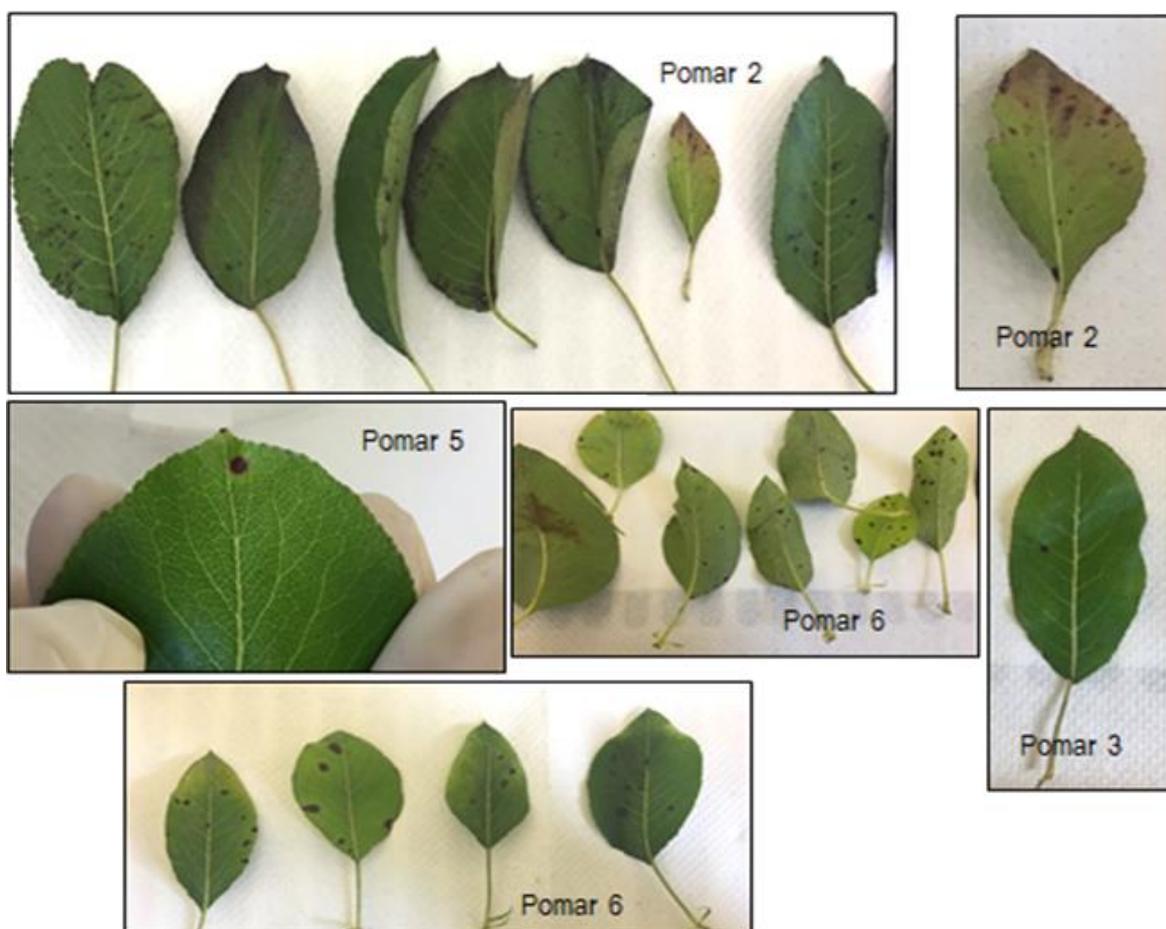


Figura 18. Sintomas de estenfiliose observados nas amostras das folhas colhidas em diferentes pomares.

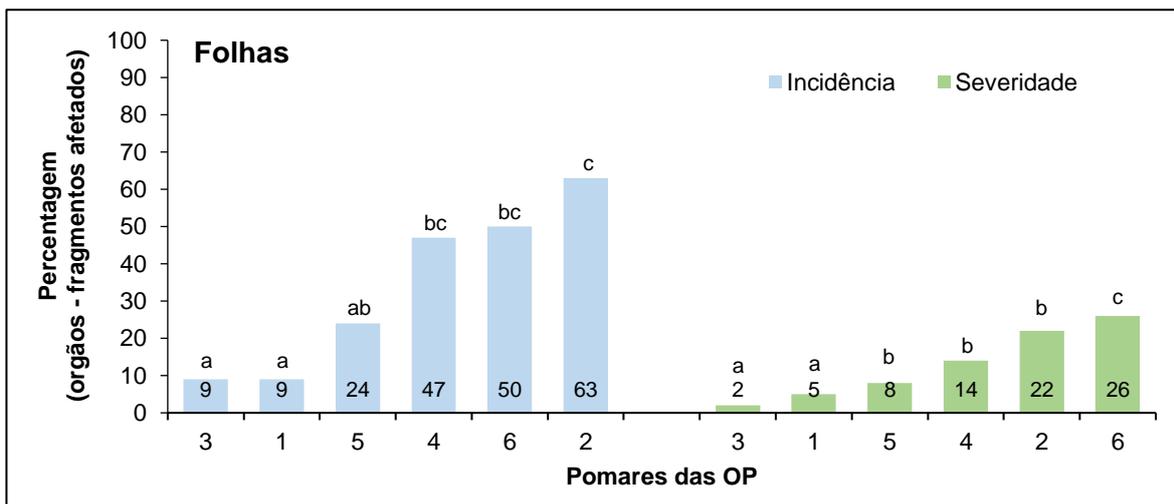


Figura 19. Incidência e severidade média de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das folhas. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

Quanto à comparação das duas modalidades em estudo para cada um dos pomares verificamos que relativamente às amostras de 1ª flores, a incidência de *S. vesicarium* nos diferentes pomares variou entre 13% e 94%. Em dois pomares (1 e 5), a modalidade M2 (com remoção de material vegetal) revelou valores inferiores à modalidade M1 (Testemunha – sem remoção de material vegetal). No que diz respeito à severidade de *S. vesicarium*, os valores variaram entre 5% e 50%. Três pomares (1, 5 e 6) apresentaram valores de severidade na modalidade M2 inferiores à modalidade M1, apesar de nos pomares 5 e 6 os valores estarem muito próximos. Os pomares com valores médios de incidência e severidade mais elevados foram os pomares 2 e 5 (Figura 20 e Figura 21). A análise estatística dos resultados não permitiu estabelecer diferenças significativas entre modalidades para cada pomar exceto para a severidade no pomar 2.

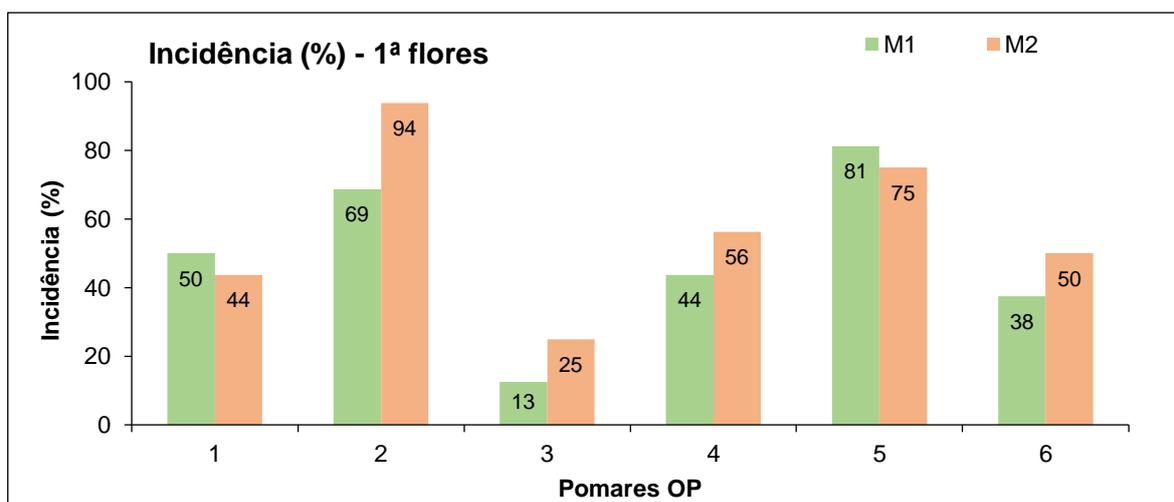


Figura 20. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 1ª flores.

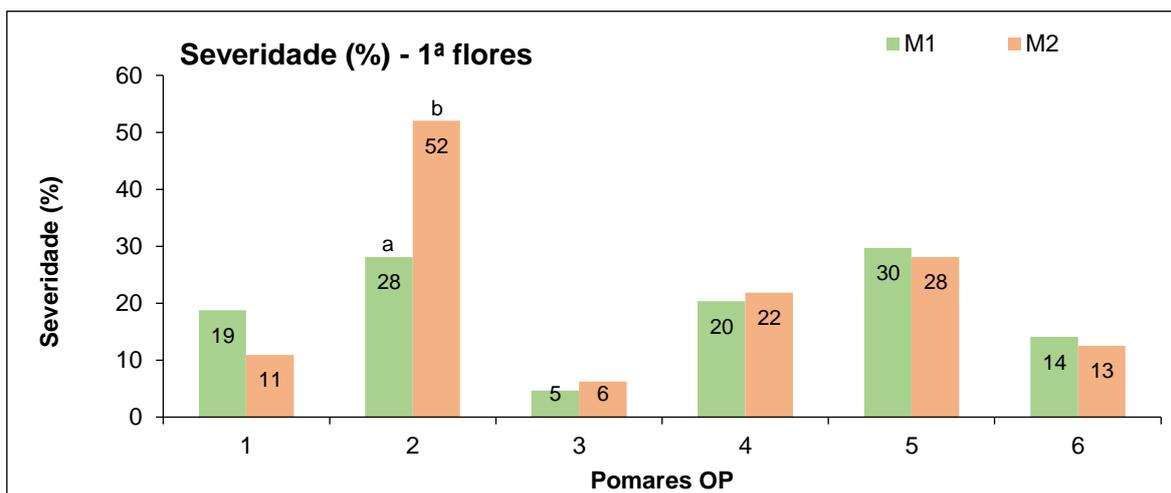


Figura 21. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 1ª flores.

Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

Quanto às amostras correspondentes às 2ª flores, verificamos que, globalmente, a incidência de *S. vesicarium* foi inferior à detetada nas 1ª flores, tendo os valores variado entre 6% e 75%. Nas amostras provenientes de três pomares em ensaio (2, 3 e 5), a modalidade M2 revelou valores de incidência inferiores à modalidade M1. No que diz respeito à severidade de *S. vesicarium*, os valores variaram entre 2% e 36% com três pomares (2, 3 e 5) a apresentarem valores inferiores na modalidade M2 e um pomar (6) igual à modalidade M1. Os pomares com valores médios de incidência e severidade mais elevados foram os pomares 2 e 4 (Figura 22 e Figura 23). A análise estatística dos resultados, quer da severidade como da incidência não permitiu estabelecer diferenças significativas entre as modalidades.

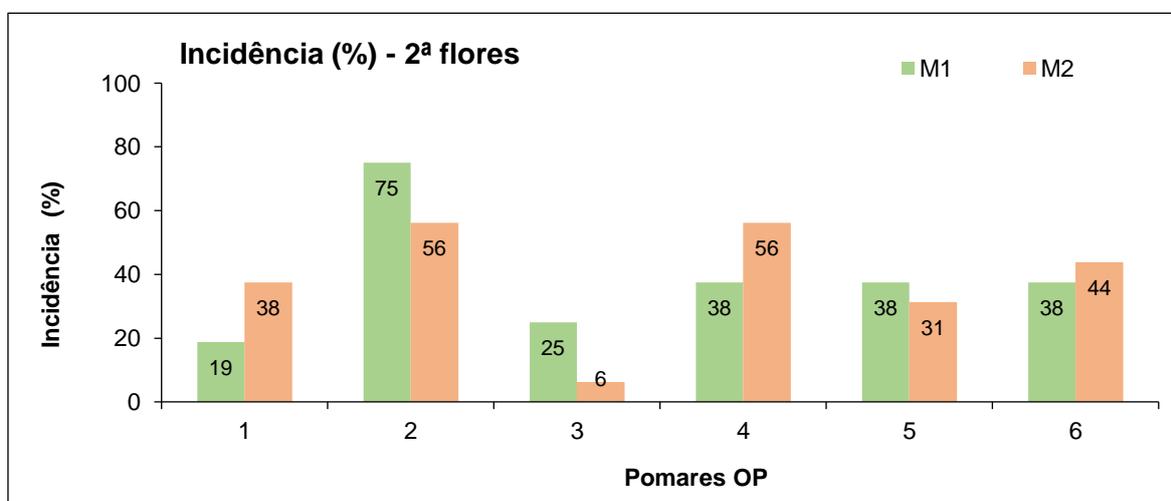


Figura 22. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 2ª flores.

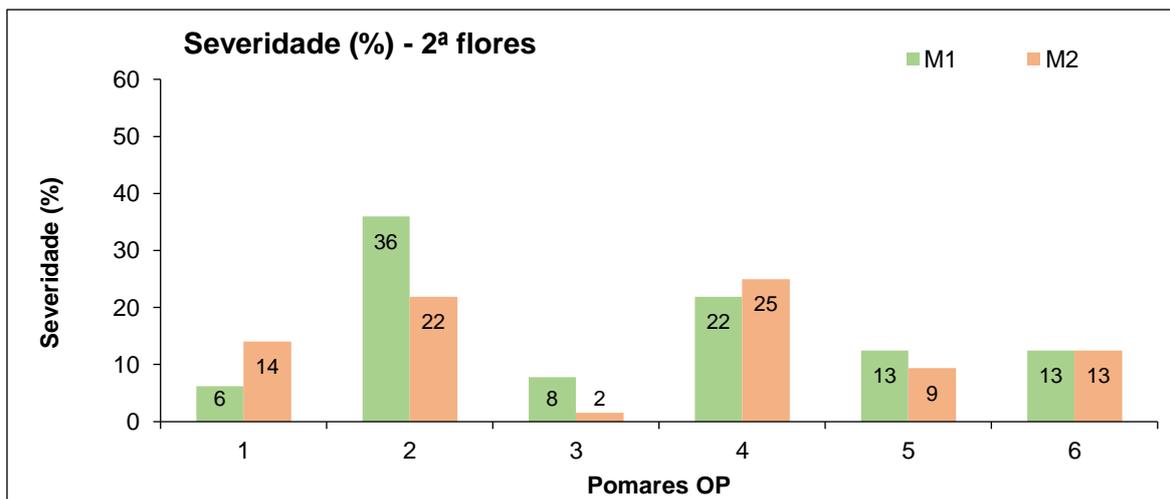


Figura 23. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras das 2ª flores.

As amostras correspondentes aos 1º frutos assintomáticos colhidos apresentaram uma incidência que variou entre 19% e 63%. Nos pomares 4, 5 e 6, os valores de incidência para a modalidade M2 foram inferiores aos obtidos para a modalidade M1. Semelhantes resultados foram obtidos para a severidade que variou entre 5% e 20%. Os pomares com valores médios de incidência e severidade mais elevados foram os pomares 2 e 6 (Figura 24 e Figura 25). A análise estatística dos resultados não permitiu estabelecer diferenças significativas entre as modalidades.

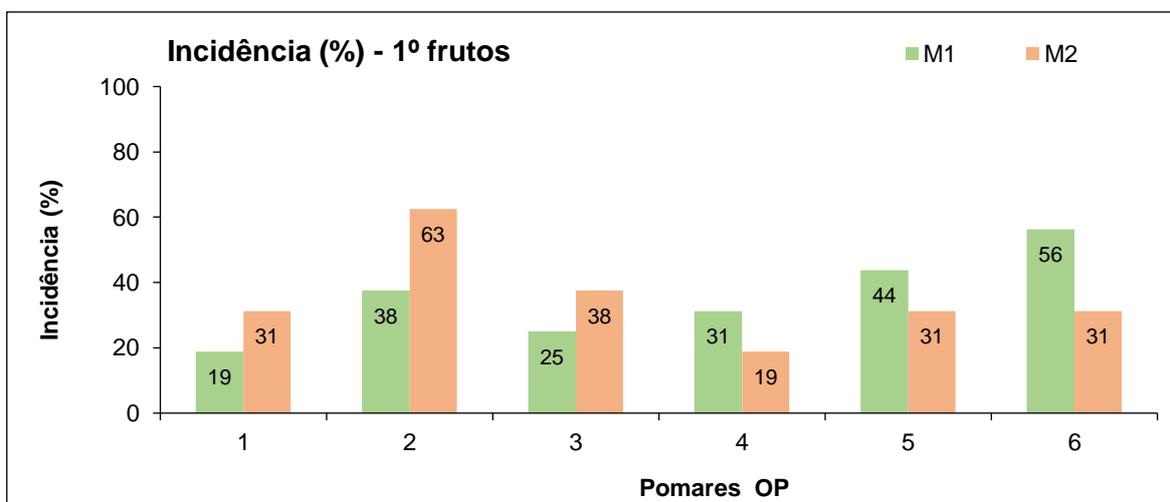


Figura 24. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 1º frutos.

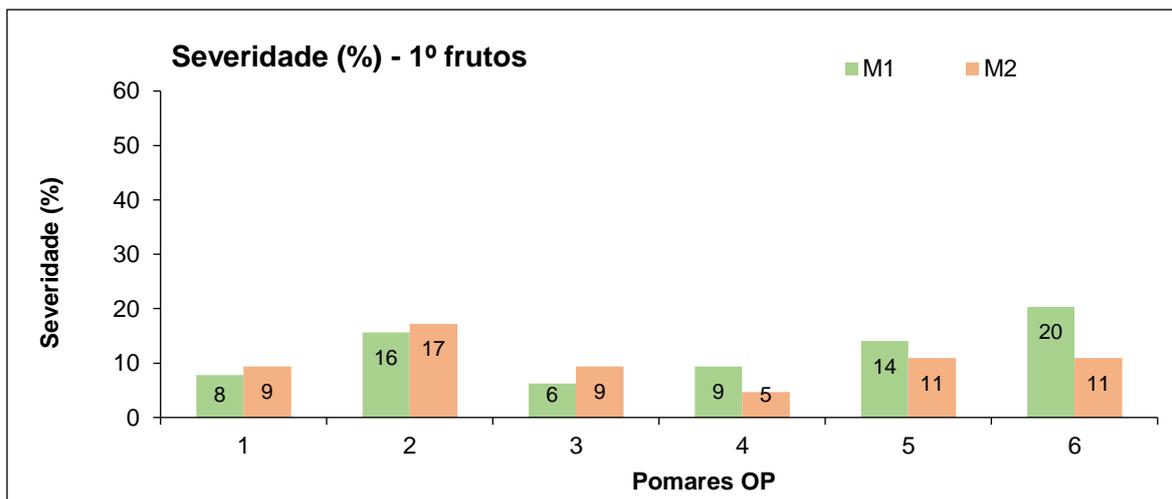


Figura 25. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 1º frutos.

As amostras correspondentes aos 2º frutos assintomáticos colhidos apresentaram uma incidência que variou entre 0% e 44%. Nos pomares 1, 2, 5 e 6, os valores de incidência para a modalidade M2 foram inferiores aos obtidos para a modalidade M1 e nos pomares 3 e 4 iguais. Os resultados obtidos para a severidade variaram entre 0% e 19% e foram semelhantes aos obtidos para a incidência com exceção do pomar 1 em que situação se inverteu, sendo a severidade na Testemunha inferior à da modalidade M2. Os pomares com valores médios de incidência e severidade mais elevados foram os pomares 1 e 6 (Figura 26 e Figura 27). A análise estatística dos resultados não permitiu estabelecer diferenças significativas entre as modalidades.

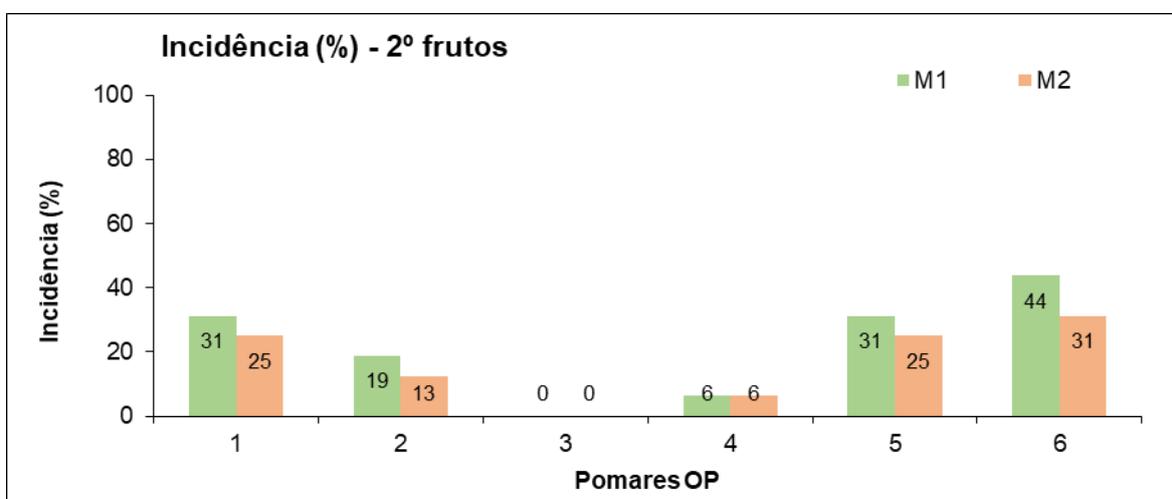


Figura 26. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 2º frutos.

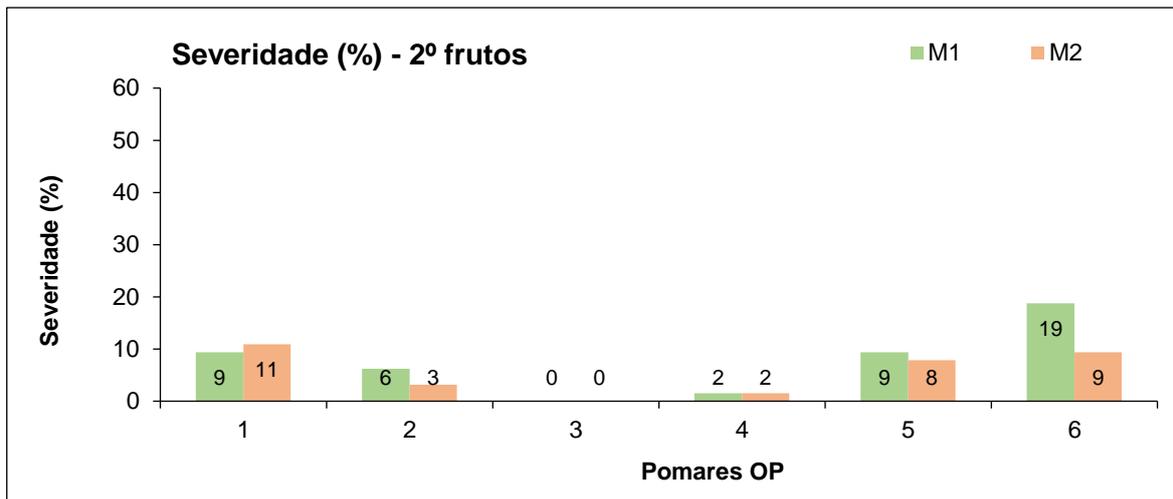


Figura 27. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 2º frutos.

As amostras correspondentes aos 3º frutos colhidos com sintomas característicos de estenfiliose exibiram uma incidência que variou entre 50% e 100%. Nos pomares 1, 3 e 6, os valores de incidência para a modalidade M2 foram inferiores aos obtidos para a modalidade M1. Os resultados obtidos para a severidade variaram entre 29 e 94% e, nos pomares 1 e 6, a severidade na modalidade M1 foi superior à da modalidade M2. O pomar com valores médios de incidência e de severidade mais elevados foi o pomar 5 (Figura 28 e Figura 29). A análise dos resultados não permitiu estabelecer diferenças significativas entre as modalidades nos diferentes pomares em ensaio.

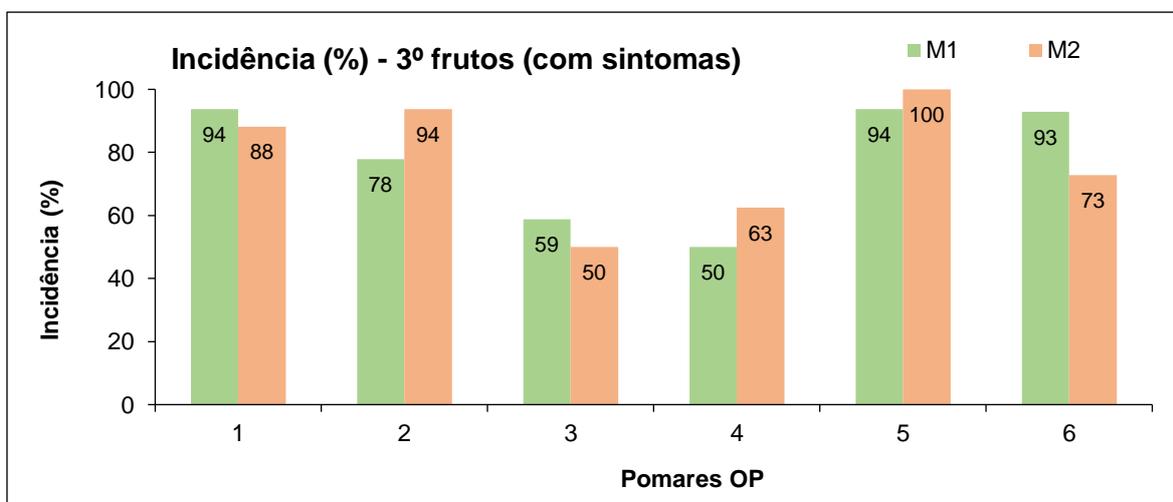


Figura 28. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 3º frutos.

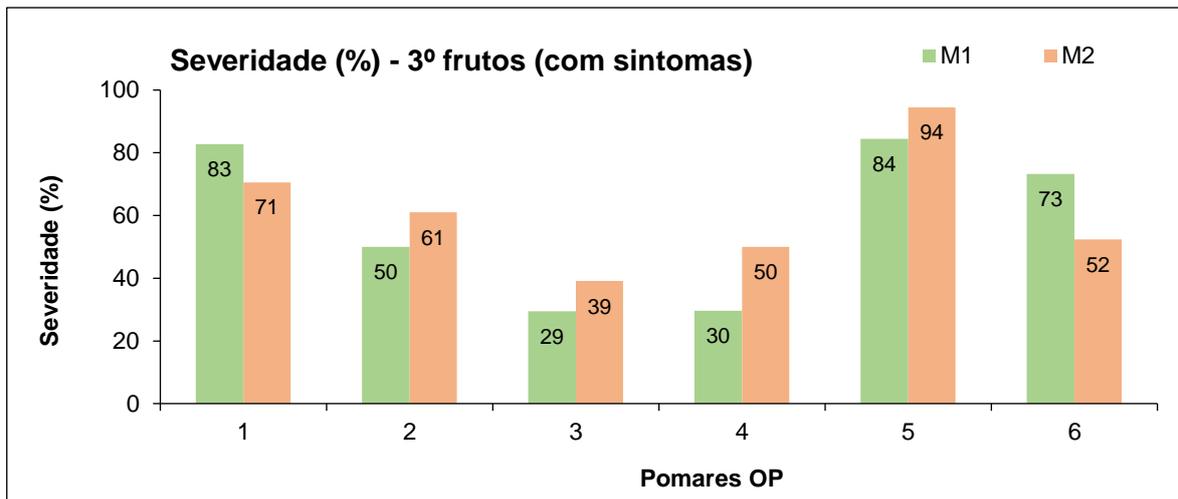


Figura 29. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras dos 3º frutos.

Relativamente às amostras de folhas com sintomas típicos, a incidência de *S. vesicarium* nos diferentes pomares variou entre 0 e 63%. Em cinco dos seis pomares em estudo, a modalidade M2 revelou valores inferiores à modalidade M1 e no pomar 2, os valores foram iguais. No que diz respeito à severidade de *S. vesicarium*, os valores variaram entre 0% e 31%. Na totalidade dos pomares os valores de severidade na modalidade M2 foram inferiores à modalidade M1. O pomar com valor médio de incidência mais elevado foi o pomar 2 e de severidade o pomar 6 (Figura 30 e Figura 31).

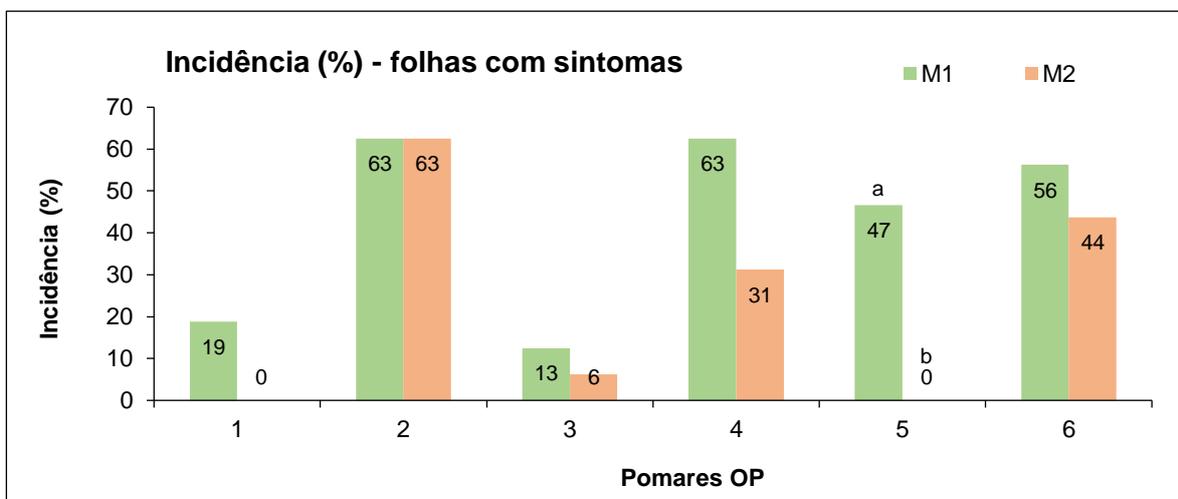


Figura 30. Incidência de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas.

Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

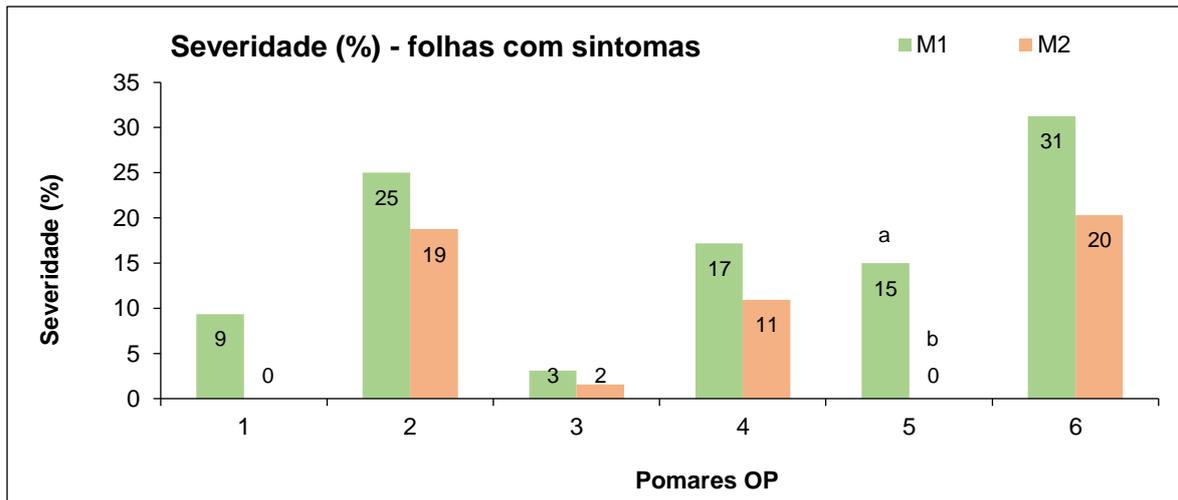


Figura 31. Severidade de *Stemphylium vesicarium* nas amostras de folhas.

Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para  $\alpha=0,05$  (teste de Tuckey).

No Quadro 8 apresenta-se a comparação dos resultados obtidos para a incidência e severidade de *S. vesicarium* nas amostras de diferentes materiais vegetais analisadas ao longo da campanha. Verifica-se que em 56% das amostras a incidência e a severidade de *S. vesicarium* foi inferior na modalidade M2 (com remoção de material vegetal do solo), em 8% foi igual. Nas restantes amostras a incidência e a severidade de *S. vesicarium* foi inferior na M1 (Testemunha – sem remoção de material vegetal).

Quadro 8. Comparação dos resultados obtidos para a incidência e severidade de *S. vesicarium* nos materiais vegetais analisados e colhidos nas parcelas das modalidades M1 (Testemunha – sem remoção de material vegetal) e M2 (com remoção de material vegetal) do solo dos seis pomares em ensaio.

Tipo de material	Pomares das OP											
	Incidência						Severidade					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1ª Flores	Red	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Red	Light Blue	Red	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Red	Red
2ª Flores	Light Blue	Red	Red	Light Blue	Red	Light Blue	Light Blue	Red	Red	Light Blue	Red	Light Blue
1º Frutos vingados	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Red	Red	Red	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Red	Red	Red
2º Frutos	Red	Red	Light Blue	Light Blue	Red	Red	Light Blue	Red	Light Blue	Light Blue	Red	Red
3º Frutos (colheita)	Red	Light Blue	Red	Light Blue	Light Blue	Red	Red	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Red
Folhas	Red	Light Blue	Red									

■ M2<M1     ■ M2>M1     ■ M2=M1

## 4.2. Eficácia biológica de fungicidas

### 4.2.1. Ensaios de inibição micelial

Os parâmetros  $R^2$  e  $b$ , bem como os valores de  $CE_{50}$  e as percentagens de inibição máximas obtidas para cada fungicida e isolado de *S. vesicarium* ensaiado encontram-se representados no Quadro 9.

Quadro 9. Parâmetros de regressão linear ( $R^2$  e  $b$ ), valores de  $CE_{50}$  e percentagens de inibição, registados nos ensaios *in vitro* de inibição do crescimento micelial, com os oito fungicidas, para os dois isolados utilizados no estudo.

Nome da s.a. (Nome comercial)	Isolado	$R^2$	$b$	$CE_{50}$ (mg. L <sup>-1</sup> )	Percentagem de inibição máxima
ácido fosforoso (BAS 181 02 S)	FR2	0,37	1,17	-	48,12
	FT5	0,46	0,85	-	2,18
ditianão (Delan <sup>®</sup> 70 WG)	FR2	0,77	0,46	30,46	66,07
	FT5	0,58	0,34	-	40,91
fluxapiraxade (Sercadis)	FR2	0,58	0,36	0,28	67,12
	FT5	0,88	0,86	0,07	91,77
metirame (Polyram <sup>®</sup> DF)	FR2	0,46	1,44	-	51,46
	FT5	0,19	-0,96	-	-24,53
pirimetanil (Scala)	FR2	0,77	1,65	-	44,68
	FT5	0,93	1,12	0,24	86,61
boscalide + piraclostrobina (Bellis <sup>®</sup> )	FR2	0,51	0,52	4,02	57,54
	FT5	0,91	0,87	1,81	69,18
ditianão + ácido fosforoso (BAS 643 01 S)	FR2	0,06	-0,57	-	22,42
	FT5	0,63	1,83	-	25,26
pirimetanil + ditianão (BAS 669 01 F)	FR2	0,96	0,96	9,07	82,05
	FT5	0,77	2,30	2,41	98,55

Regra geral as retas de regressão apresentaram coeficientes de determinação muito baixos ( $R^2$ ), revelando um mau ajustamento das retas aos valores determinados experimentalmente. As exceções foram as retas obtidas para as substâncias ativas fluxapiraxade (Figura 32) e pirimetanil (Figura 33) no isolado FT5, e as misturas de substâncias boscalide + piraclostrobina (Figura 34) e pirimetanil + ditianão (Figura 35) para os isolados FT5 e FR2 respetivamente, que revelaram valores altos de  $R^2$  entre 0,88 e 0,96.

No que diz respeito ao ácido fosforoso, além das retas de regressão apresentarem um  $R^2$  baixo, a percentagem de inibição foi inferior a 50%, mesmo para a concentração máxima (Quadro 9). Com o fungicida ditianão passou-se algo semelhante ao ácido fosforoso, no entanto no ensaio com o isolado FR2, este fungicida apresentou uma eficácia de 67,12% e um  $R^2$  de 0,77 (Quadro 9).

Apesar de ter apresentado um valor de  $R^2$  baixo para o isolado FR2, a substância ativa fluxapiraxade foi das que apresentou taxas de inibição maiores, sobretudo para o isolado FT5, em que apresentou uma reta de regressão com um  $R^2$  de 0,88 e com o valor de inibição máxima de 91,77% (Figura 32).

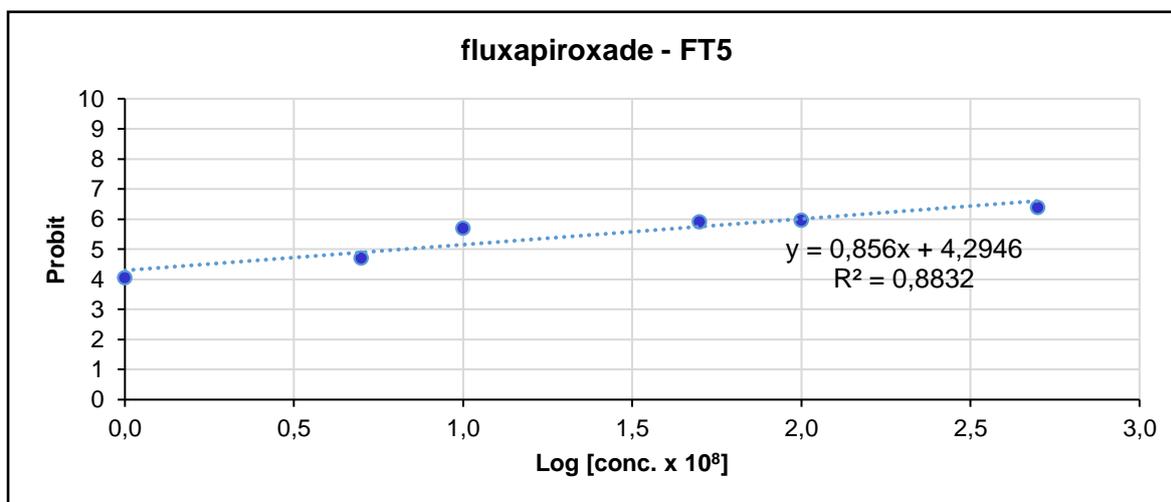


Figura 32. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de fluxapiraxade no isolado FT5 de *Stemphylium vesicarium*, com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

O metirame foi das substâncias ativas que apresentou valores de  $R^2$  inferiores e percentagens de inibição máxima menores, sobretudo no isolado FT5, apesar de ter conseguido inibir em cerca de 50% o isolado FR2 (Quadro 9). O pirimetanil revelou resultados interessantes para o isolado FT5, com um  $R^2$  de 0,93 (Figura 33) e uma percentagem de inibição a rondar os 85%. Contudo, para o isolado FR2 revelou uma percentagem de inibição inferiores a 50 e um  $R^2$  relativamente baixo (Quadro 9).

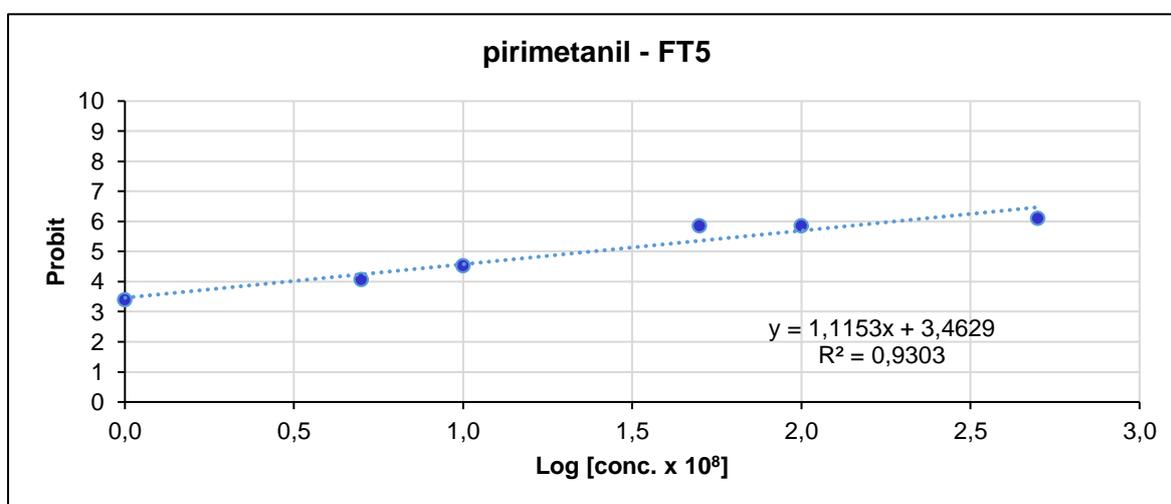


Figura 33. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de pirimetanil no isolado FT5 de *Stemphylium vesicarium*, com indicação da respectiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

A mistura de substâncias boscalide + piraclostrobina foi das que obteve um melhor ajustamento na reta de regressão do isolado FT5 (Figura 34), apesar de a eficácia ser semelhante nos dois isolados.

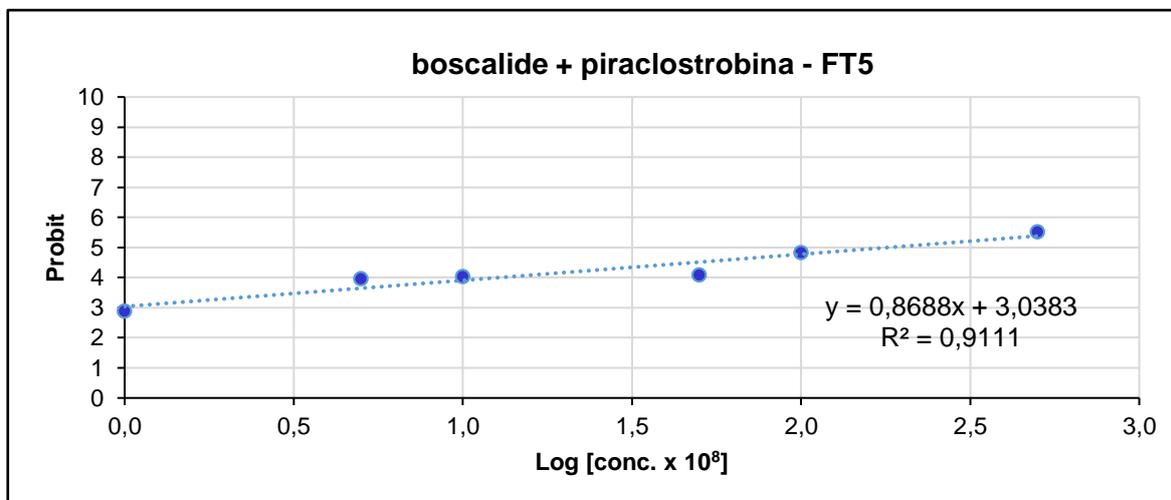


Figura 34. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de boscalide + piraclostrobina no isolado FT5 de *Stemphylium vesicarium*, com indicação da respetiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

A mistura de ditianão + ácido fosforoso apresentou em ambos os isolado uma baixa eficácia na inibição do crescimento micelial, sendo inferior a 30% de inibição (Quadro 9).

A mistura pirimetanil + ditianão revelou-se a que apresentou o melhor ajuste da reta aos dados obtidos experimentalmente para o isolado FR2 (Figura 35), mas apresentando percentagens de inibição superiores a 80% para os dois isolados (Quadro 9).

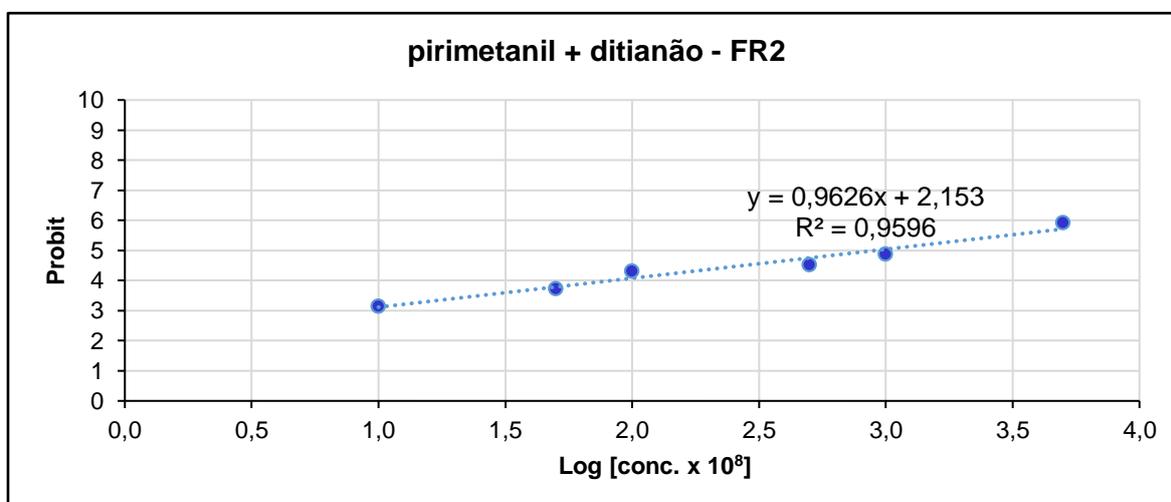


Figura 35. Regressão linear relativa ao efeito de diferentes concentrações de pirimetanil + ditianão no isolado FR2 de *Stemphylium vesicarium*, com indicação da respetiva equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

No que aos valores de  $CE_{50}$  diz respeito, verificou-se que para as concentrações ensaiadas não foi possível calcular este valor para as substâncias ativas ácido fosforoso e metirame e a mistura de substâncias ditianão + ácido fosforoso para os dois isolados e para a substância ditianão no caso do isolado FT5 e pirimetanil no FR2. Importa ainda salientar que, para a maioria dos fungicidas ensaiados, o valor de  $CE_{50}$  é maior para o isolado FR2 do que para o isolado FT5, tirando o caso do ditianão em que só foi possível calcular o valor para o isolado FR2.

#### **4.2.2. Ensaio de inibição de esporos**

Durante o tempo que decorreu este trabalho não foi possível a obtenção de esporos em número suficiente para a realização dos ensaios de inibição da germinação de esporos, apesar de todos os métodos de indução da esporulação testados durante o trabalho.

## 5. DISCUSSÃO

Tal como outros patógenos necrotróficos, o *S. vesicarium* alterna o seu ciclo de vida entre a fase patogénica e a fase saprófita. A colonização dos diferentes tecidos dos órgãos do hospedeiro e a manutenção nos resíduos e infestantes garantem o futuro do inóculo no solo do pomar (Kohl *et al.*, 2009). A incidência de estenfiliose foi detetada em todos os órgãos desde o início da floração (Llorente *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente à incidência e severidade de estenfiliose nos materiais vegetais analisados confirmaram que o inóculo disponível no pomar e, disseminado pela chuva e pelo vento, deposita-se sobre flores, folhas e frutos jovens, tendo-se isolado ao longo do trabalho laboratorial *S. vesicarium* das flores, dos frutos jovens e dos imediatamente antes da colheita e das folhas.

Tendo os pomares sido escolhidos com base num histórico semelhante relativamente à estenfiliose, seria de esperar que os resultados apurados para a incidência e severidade de estenfiliose não diferissem muito entre si. Contudo tal não sucedeu, o que corrobora a ideia de que as condições meteorológicas que ocorrem anualmente em cada pomar são determinantes para o desenvolvimento anual da doença. A duração do período de humectação e a temperatura são considerados fatores importantes para a ocorrência de infeções em frutos e folhas de pereira (Montesinos & Vilardell, 1992; Montesinos *et al.*, 1995a; Sousa *et al.*, 2004), assim como uma humidade relativa elevada que interfere no processo de infeção durante os períodos em que a humectação das folhas é interrompida por um período seco de algumas horas (Llorente & Montesinos, 2002).

Relativamente às 1ª flores onde seria de espera que a modalidade M2 conduzisse a percentagens de incidência e severidade menores que na modalidade M1, pois uma das fontes de inóculo para as primeiras infeções seria os resíduos da cultura do ano anterior, tal não foi observado. A única diferença significativa observada nas 1ª flores foi na severidade do pomar 2, com a modalidade M2 a apresentar um valor significativamente mais elevado que a M1. Além disso, a modalidade M2 apresenta na sua globalidade valores maiores de incidência. Apesar de estes resultados carecerem de confirmação nos próximos anos, podemos suspeitar que as primeiras infeções possam ser asseguradas pelos esporos produzidos em frutificações existentes na flora infestante presente no enrelvamento e na proximidade dos pomares, o que corrobora os resultados dos trabalhos de Rossi *et al.* (2005b; 2008) que indicam que a flora infestante no meio envolvente poderia ser uma importante fonte de inóculo.

Relativamente aos resultados obtidos para a incidência e severidade de *S. vesicarium* nas folhas verificou-se que, globalmente, foram inferiores para a modalidade M2 ao contrário do que sucedeu para a incidência e severidade das flores. Tal ocorrência poderá relacionar-

se com o facto das infeções das folhas serem resultado de infeções provenientes de esporulação de inóculo presente em infestantes colonizadas que na M2 foram reduzidas (corte de enrelvamento) ao longo da campanha.

Os valores de incidência e a severidade obtidos nas folhas e nos 3<sup>o</sup> frutos com sintomas típicos de estenfiliose foram inferiores aos previstos, que deveriam aproximar-se dos 90-100%. É sabido que as manchas de estenfiliose também podem ser colonizadas por outros fungos saprófitas, como os dos géneros: *Alternaria Ulocladium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Phytophthora* (Sousa *et al.*, 2004; Azevedo & Isidoro, 2005a; Llorente & Montesinos, 2006). Neste contexto, será interessante investigar se outras espécies (fase patogénica) se associam ao *S. vesicarium* e modificam a etiologia da estenfiliose podendo transformá-la numa doença complexa causada por diversas espécies. Para além desta dificuldade, uma investigação desenvolvida em Espanha com base em técnicas moleculares e focada na patogenicidade/agressividade dos isolados de *S. vesicarium*, concluiu existirem populações compostas por isolados patogénicos e não patogénicos (Puig *et al.*, 2015). Tal ocorrência foi verificada anteriormente para isolados de *S. vesicarium* obtidos na região do Oeste (Reis *et al.*, 2018). Paralelamente a este trabalho, teste de patogenicidade em plântulas de pereira validaram estes pressupostos, tornando a estenfiliose uma doença ainda mais complexa na sua gestão.

A elevada incidência de estenfiliose que tem sido constatada na região Oeste pode decorrer de vários fatores, tais como a ausência de práticas culturais que visem a redução do inóculo, o controlo de infestantes potenciais hospedeiros alternativos, as mobilizações, a nutrição, a aplicação de reguladores de crescimento das plantas e outros problemas fitossanitários.

Nos seis pomares escolhidos pelas diferentes OP, ensaiaram-se duas modalidades que visaram avaliar o impacto da redução de inóculo de estenfiliose no solo. Os resultados obtidos relativamente às modalidades em estudo são ainda muito incipientes e necessitam de repetição nos próximos anos. No entanto, verificou-se que, na maioria dos pomares, os valores de incidência e severidade não apresentaram diferenças significativas entre as duas modalidades. Estes resultados parecem indicar que, apesar da opinião de Köhl *et al.* (2013) que detetaram *S. vesicarium* em folhas e frutos caídos no solo e consideraram estes como a mais importante fonte de inóculo de estenfiliose nos pomares, existam outras fontes de inóculo também muito importantes que asseguram a disseminação da doença na ausência de folhas e frutos caídos. Outra hipótese é que ao triturar o material vegetal na entrelinha, no caso da modalidade 1, se acelere o processo de decomposição natural do mesmo e contribua também para a redução da incidência da doença, algo referido por Llorente e Montesinos (2006) como

um dos métodos que reduz a quantidade de ascósporos capturados em aproximadamente 90%.

Os resultados apurados nos ensaios de eficácia biológica *in vitro* permitiram selecionar quatro produtos, 3 produtos comerciais e um em código, duas misturas e dois produtos simples. O Scala e o Sercadis pertencem aos grupos químicos anilino pirimidina e carboxamidas, respetivamente, e o Bellis e o BAS 669 01 S, sendo misturas pertencem ao grupo das carboxamidas + estrobilurinas e anilino pirimidina + quinona.

Os valores negativos de b podem ser resultado de algum dos produtos que compõem a formulação do produto comercial (substância ativa + adjuvantes) estimularem o crescimento micelial do fungo. Os valores baixos de  $R^2$  traduzem um fraco ajustamento entre os resultados apurados e os resultados calculados. Esta ocorrência pode ter origem nas características intrínsecas do isolados ou em erros de procedimento laboratorial.

Estes produtos/grupos químicos são referidos como os mais eficazes no controlo da estenfiliose (Llorente & Montesinos, 2006) contudo, o que se tem verificado nas últimas campanhas é que, apesar das muitas aplicações ao longo da campanha com estes ou outros fungicidas, não tem sido possível controlar a doença. Esta doença tem estranhamente continuado a aumentar, alterando o seu desenvolvimento, que normalmente alternava, entre um ano com forte incidência de estenfiliose e outro ano com baixa incidência. Salieta-se que a impossibilidade de realizar ensaios de eficácia biológica relativamente à inibição de germinação de esporos por falta de esporulação das culturas, limita muito a discussão dos resultados e, simultaneamente, as ilações que se poderiam retirar quanto aos produtos a selecionar para futuros ensaios de campo. Na verdade, utilizámos diversos métodos referidos na bibliografia para estimular a esporulação tais como os descritos por Chaisrisook *et al.*, (1995) e Santos *et al.*, (2017) e os resultados obtidos foram sempre negativos.

Importa ainda ter em atenção que os fungicidas que apresentem uma melhor eficácia nos ensaios de eficácia biológica *in vitro*, podem não manter o comportamento *in vivo* devido à interferência das condições ambientais.

## 6. CONCLUSÃO

Embora os resultados sejam preliminares e necessitem de comprovação nos próximos anos, foi possível retirar as seguintes conclusões prévias:

- A maioria dos resultados obtidos quer para a incidência quer para a severidade revelaram diferenças significativas entre os pomares escolhidas pelas diferentes OP, o que nos permite concluir que a proteção relativamente à estenfiliose deverá ser delineada em função do histórico do pomar relativamente à doença e, não de forma generalizada.
- A modalidade em que se procedeu à remoção de material vegetal do solo conduziu, na maioria das amostras rececionadas, à obtenção de valores semelhantes para a incidência e a severidade de *S. vesicarium* quando comparada com a modalidade testemunha (sem remoção de material vegetal). Apesar disto, a redução do inóculo potencial existente no pomar, através remoção de material vegetal do solo ou da sua trituração, são práticas culturais recomendáveis para o controlo da estenfiliose.
- Os pomares que revelaram valores mais elevados para a incidência e severidade nas 1ª flores mantiveram esta tendência nos outros materiais vegetais colhidos ao longo da campanha. Assim sendo, a proteção relativamente à estenfiliose deve iniciar-se aquando da floração e prolongar-se até à colheita.

Em relação à inibição do crescimento micelial, os fungicidas que pareceram apresentar-se como os mais eficazes foram o Sercadis (fluxapiraxade), o Scala (pirimetanil), o Bellis (boscalide + piraclostrobina) e o BAS 669 01 S (pirimetanil + ditianão). De um modo geral, o isolado FT5 pareceu ser mais sensível aos fungicidas que o isolado FR2, uma vez que os valores  $CE_{50}$  são menores para o primeiro isolado.

Este trabalho de laboratório terá de ser complementado com a realização de ensaios eficácia biológica na inibição da germinação de esporos, que apesar de ter sido um dos objetivos iniciais deste trabalho, não foi possível realizar, pois não se conseguiu obter esporulação com os isolados em ensaio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D. & Brunelli, A. (2005). Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 113: 211-219.
- Alberoni, G., Collina, M., Cavallini, D. & Brunelli, A. (2008). *Stemphylium vesicarium* resistance to fungicides on pear in Italy. In: 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Modern Fungicides and Antifungal Compounds V. Friedrichroda, Germany, 167–172.
- Alberoni, G., Cavallini, D., Collina, M. & Brunelli, A. (2010). Characterisation of the first *Stemphylium vesicarium* isolates resistant to strobilurins in Italian pear orchards *European Journal of Plant Pathology* 126: 453-457.
- Alexandre, J., Soares, J. E Silva, A. (2001). A pera Rocha. In: ANP (eds.) O livro da pera Rocha, Volume Primeiro: 27-42.
- Amaro P (2003) A Protecção Integrada. ISA/Press.
- ANP (Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha) (1997) Caderno de Especificações Pera Rocha do Oeste – Denominação de Origem. ANP. Cadaval: 29p.
- ANP (Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha) (2001). O livro da pera Rocha. Volume Primeiro. ANP. Cadaval: 183p. (cit. Gomes, 2015).
- Arzanlou, M., Khodaei, S. & Babai-Ahari, A. (2012). *Helianthus annulus* as a natural host for *Stemphylium vesicarium* in Iran. *Australasian Plant Dis. Notes* 7:167–170.
- Azevedo, J., Isidoro, N. (2005a) Estenfiliose (*Stemphylium vesicarium vesicarium*) da Pereira Rocha, na região do Oeste. Em: *Manual técnico de produção integrada de pera 'Rocha'*. Projecto AGRO nº 1. Cadaval. P. 87-98.
- Azevedo, J., Isidoro, N. (2005b) Avaliação do controlo de Estenfiliose (*Stemphylium vesicarium*) em Pereira cv. Rocha, através de estratégias convencionais e de um modelo (BSPcast), na região do Oeste. Em: *Manual técnico de produção integrada de pera 'Rocha'*. Projeto AGRO nº 1. Caravel. P. 99-105.
- Basallote-Ureba, M. J., Prados-Ligero, A. M. & Melero-Vara, J. M. (1998). Effectiveness of tebuconazole and procymidone in the control of *Stemphylium* leaf spots in garlic. *Crop Protection* 17: 491-495.
- Basallote-Ureba, M. J., Prados-Ligero, A. M. & Melero-Vara, J. M. (1999). Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *Plant Pathology* 48: 139–145.

- Bizarro, P.M.D.B. (2012). Estenfiliose na couve coração-de-boi. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica, Ramo Hortofruticultura e Viticultura. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Cabanas, A.S.P. (2013). Avaliação da atividade antifúngica de quitinasas de macieira. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Cavaco, M. (coordenação). (2016) Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos – Lista dos Produtos com Autorização de Venda. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. Lisboa: pp 244.
- Cavanni, P. & Ponti, I. (1994). Maculatura bruna del pero: una micopatia sempre d'attualità. *Rivista di Frutticoltura* 12: 37-42.
- Chaisrisook, C., Stuteville, D. & Skinner, D. (1995) Five *Stemphylium* spp. pathogenic to alfafa: occurrence in the United States and time requirements for ascospore production. *Plant Dis.* 79: 369-372.
- Collina, M., Alberoni, G. & Brunelli A. (2006) Sensitivity in vitro of *Stemphylium vesicarium* to fungicides. *Pome Fruit Diseases* 29: 155 – 161.
- Comporta, T., Reis, P., Mota, M., Oliveira, C. & Rego C. (2017) Estenfiliose da pêra Rocha (parte I). *Frutas, Legumes e Flores* 173: 44-45.
- Compota T., Reis P., Mota M., Oliveira C. e Rego C. (2016). Estenfiliose da Pêra Rocha. *Frutas, Legumes e Flores*, 173, 44-45.
- Correia, R. P. A. (2001) Estudo da eficácia biológica de fungicidas em relação a *Stemphylium vesicarium* Wall. (Simmons) da pereira. Relatório de Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Costa, A. (2017). Pera rocha é o “hortofrutícola com maior saldo positivo na balança comercial”. *Vida Rural*. Acedido em 04-06-2018. Disponível em: <https://www.vidarural.pt/producao/pera-rocha-hortofruticola-maior-saldo-positivo-na-balanca-comercial/>
- Couto, A. A. (1979). Aspetos Pomológicos da pereira Rocha. Série de Divulgação nº1/79. Ministério da Agricultura. Lisboa.
- Cugier, J. & Humbert, W. (1991). Stemphyliose du Poirier. Etude de la biologie du parasite et recherches dès fungicides actifs. *Phytoma* 431: 47-50.
- Diener, V. L. (1955). Host penetration and pathological histology in gray leaf spot of tomato. *Phytopathology* 45: 654-658.

- Diogo, E., Sánchez, C., Leão, M. & Sousa R. (2017) A estenfiliose da pereira rocha em Portugal. *AGROTEC* 24: 46-48.
- DGAV (2019) [www.dgav.pt](http://www.dgav.pt) (acedido em 24/01/19).
- Dos Santos, R. F., Sposito, M. B., Ayres, M.; Sosnowski, M. (2018). In vitro production of conidia of *Elsinoe ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 152, n. 3, p. 815-821.
- Ellis, M. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey 608pp. (cit. Silva, 2011).
- Farropas, L.M.T. (2003) Estudo de meios de protecção em relação ao pé-negro da videira causado por *Cylindrocarpon destructans*, Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Filajdic, N. & Sulton, T. B. (1992). Influence of temperature and wetness duration on infection of apple leaves and virulence of different isolates of *Alternaria mali*. *Phytopathology* 82: 1279-1283. (cit. Montesinos *et al.*, 1995a)
- Gálvez, L., Gil-Serna, J., García, M., Iglesias, C. & Palmero, D. (2016). *Stemphylium* Leaf Blight of Garlic (*Allium sativum*) in Spain: Taxonomy and In Vitro Fungicide Response. *Plant Pathol. J.* 32: 388-395.
- Gomes, P. M. E. (2015). Contributo para o estudo da influência da fertilização na incidência de Estenfiliose em pereira 'Rocha'. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Horsfall, J.C. (1956). *Principles of Fungicidal Action*. Waltham, Mass. Chronica Botanica Co., 279 pp.
- INE (2018) <http://www.ine.pt> (acedido em 02-01-2018).
- INE (2017) Boletim Mensal da Agricultura e Pescas – novembro 2017. INE, Lisboa: 20pp.
- Köhl, J., Groenrnboom-de Haas, B. H., Goossen-van de Geijn, H. M., Speksnijder, A., Kastelein, P., De Hoog, S. & Gerrits Van Der Ende, B. (2009). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124: 151-162.
- Köhl, J., Jong P.F., Kastelein, P., Groenenboom-de Haas B.H., Anbergen R.H.N., Balkhoven H., Wubben J.P. (2013). Dynamics of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in necrotic plant residues in Dutch pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 137: 609-619.

- Llorente I & Montesinos E (2002) Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99-104.
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gerardi, I. & Montesinos, E. (2000) Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot pear. *Plant Disease* 84: 631-637.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2004) Development and field evaluation of a model to estimate the maturity of pseudothecia of *Pleospora allii* on pear. *Plant Dis.* 88: 215-219.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006) Brown Spot of Pear: An Emerging Disease of Economic Importance in Europe. *Plant Disease.* 90: 1368-1375
- Llorente, I., Vilardell, A. & Montesinos, E. (2006) Infection potential of *Pleospora allii* and evaluation of methods for reduction of the overwintering inoculum of brown spot of pear. *Plant Dis.* 90: 1511-1516.
- Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P., Pattori, E., Bugiani, R., Rossi, V. & Montesinos, E. (2010). Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *Eur. J. Plant. Pathol.* 128:127–141.
- Llorente, I., Vilardell, A. & Montesinos, E. (2011) Evaluation of a revision of the BSPcast decision support system for control of brown spot of pear. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 139–149.
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz.L. & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees* 26: 239–245.
- Lopez, J., Torres, J., Marquilles, R. & Solsona, M. (1992). *Peral. Control Integrado de Plagas y Enfermedades*. Agro Latino, Barcelona, 311 p.
- Maccaferri, E., Collina, M. & Brunelli, A. (2003) Studies on the epidemiology of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Journal of Plant Pathology* 85: 310.
- Madden, L., Pennypacker, S. P., & MacNab, A. A. (1978) FAST, a forecasting system for *Alternaria solani* on tomato. *Phytopathology* 68: 1354-1358. (cit. Montesinos & Vilardell, 1992).
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P. & Brunelli, A. (1995a) Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85: 586-592.

- Montesinos, E., Moragrega, C. Llorente, I. & Vilardell, P. (1995b) Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant Dis.* 79: 471-473.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. & Beer, S. V. (1996). Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environmental conditions. *Phytopathology* 86: 856-863.
- Montesinos, E. & Vilardell, P. (1992). Evaluation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* 76: 1221-1226.
- Nisha, H. A. C. (2013). Cultural, morphological and molecular characterization of *Stemphylium vesicarium* causing white blotch of onion. Master of Science in Plant Pathology. Sher-e-Bangla Agricultural University, Dhaka.
- Pattori, E., Rossi, V., Bugiani, R., Giosuè, S. (2006) Virulence of *Stemphylium vesicarium* isolates from pear and other host species. *Pome Fruit Diseases* 195-205.
- Picco, A. M., Betto, A. & Porri, A. (1996): *Stemphyllium*, *Pleospora* and *Alternaria* airspores in a pear tree orchard: a three year quantitative monitoring in Italy. *In: 1st European Symposium on Aerobiology*, Santiago de Compostela, Spain: 156-157.
- Ponti, I., Cavani, P., Brunelli, A. (1982) "Maculatura bruna" delle pere: eziologia e difesa. *Inform. Fitopatol.* 32:35-40. (cit. Llorente e Montesinos, 2006).
- Ponti, I. & Cavanni, P. (1983). Indagine preliminare sulla fitotossicità di filtrati colturali di *Stemphylium vesicarium* agente della "maculatura bruna" del pero. *Informa. Fitopatol.* 9: 55-57. (cit. Gomes 2015).
- Ponti, I., Brunelli, A., Tosi, C., Basaglia, M., Bevilacqua, T., Emiliani, G., Cont, C., and Viccinelli, R. (1993). Verifica dell'attività di diversi preparati contro la maculatura bruna del pero. *Inform. Fitopatol.* 43:45-52. (cit. Llorente e Montesinos, 2006).
- Puig, M., Ruz, L., Montesinos, E., Moragrega, C. e Llorente, I. (2015) Combined morphological and molecular approach for identification of *Stemphylium vesicarium* inoculum in pear orchards. *Fungal Biologia* 119: 136-144
- Rao, N. N. R. & Pavgi, M. S. (1975). *Stemphylium* leaf blight of onion. *Mycopathologia* 56: 113-118.
- Reis P., Comporta T., Mota M., Rego C. and Oliveira C. (2018). Occurrence and pathogenicity of brown spot disease in 'Rocha' pear Portuguese orchards. Abstracts of XIII International Pear Symposium, 4 - 7 December, Montevideu, Uruguai, 118.

- Reuveni, R. & Reuveni, M. (1997) Foliar fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop Protect.* 17: 111-118. (cit. Gomes, 2015).
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S. & Natali, P. (2005a). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. *Aerobiologia* 21: 203-216.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosue, S. & Bugiani, R. (2005b). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology* 111: 361-370.
- Rossi, V., Patteri, E. & Giosuè S. (2006) Temperature and humidity requirements for germination and infection by ascospores of *Pleospora allii*, the teleomorph of *Stemphylium vesicarium*. *Pome Fruit Diseases* 29: 223-230.
- Rossi, V., Patteri, E. & Bugiani, R. (2008). Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear. *European Journal of Plant Pathology* 121: 147-159.
- Rossi, V., & Patteri, E. (2009). Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biological Control* 49: 52-57.
- Silva, S. C. L. (2011) Caracterização de fungos do género *Stemphylium* associados a pomóideas em Portugal. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Simmons, E. (1967). Typication of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
- Simmons, E. G. (1969). Perfect stages of *Stemphylium* IV. *Mycologia* 61: 1-26.
- Simmons, E. G. (2001). Perfect stages of *Stemphylium*. *Harvard Papers in Botany* 6: 199-208.
- Simmons, E. G. (2004). Novel dematiaceous hyphomycetes. *Studies in Mycology* 50: 109-118.
- Simões, J. S. (2005). *Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura*. 1ª Edição ed. Pr. Principia, Publicações Universitárias e Científicas, Porto: 104 pp.
- Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K. (1997). Production of host-specific toxin by *Stemphylium vesicarium* causing brown spot of European pear. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 63: 232.
- Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K. (1999). Purification and biological characterization of hostspecific SV-toxins from *Stemphylium vesicarium* causing brown spot of European pear. *Phytopathology* 89: 947-953.

- Singh, P., Park P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K. (2000). Effects of host-selective SV-Toxin from *Stemphylium vesicarium*, the cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. *J. Phytopathology* 148: 87-93.
- Sousa, R., Rodrigues, A. C. & Dias Pablo, J. F. (2001). Estudo Comparativo de Porta-enxertos de Pereira 'Rocha' com a cultivar 'Rocha'. INIA, ENFVN. Alcobaça. (cit. Gomes, 2015).
- Sousa, A. J. T., Pina, A. M., Sousa, A. L. M. (2004) A *Stemphyliose* da pereira Rocha em Portugal – Perspectivas para o seu controlo (1ª Edição). Alcobaça: Tipografia Alcobacense, Lda.
- Tavares, C. (1992). Estudo comparativo de isolamentos de dois fungos do género *Stemphylium*: *S. botryosum* e *S. vesicarium*. Relatório de estágio do curso de engenheiro agrónomo. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Tavares, C. M. S. R. (1990). *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons: agente da “maculatura bruna” na pereira. Trabalho da disciplina de Patologia Vegetal. ISA. Lisboa. 31p.
- Tomaz IL (1958) Características fitofarmacêuticas de alguns fungicidas. Métodos de análise, Relatório de Estágio do Curso de Engenheiro Agrónomo: Relatório de Estágio do Curso de Engenheiro Agrónomo, ISA, UTL, Lisboa, p. 175 pp. (cit. Farropas, 2003)
- Vaz A (2008) Doenças causadas por fungos Botryosphaeria em videira: Caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas., Dissertação de Mestrado: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Vicente, P., Pereira, J.H., e Sousa, R.M.M. (2017) Influência do ponto de enxertia no vigor e na produção da pereira 'Rocha'/Sydo. *Vida Rural*, 1824, 36-39.
- Woudenberg, J.H.C., Hanse, B., van Leeuwen, G.C.M., Groenewald, J.Z. e Crous, P.W. (2017). *Stemphylium* revisited. *Studies in Mycology* 87: 77–103.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras das 1<sup>as</sup> flores

<b>Severidade</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	80399,97	1	80399,97	190,1709	0,000000
"Pomares"	23402,66	5	4680,53	11,0709	0,000000
Error	78213,84	185	422,78		

<b>Incidência</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	536933,8	1	536933,8	254,5283	0,000000
"Pomares"	85654,1	5	17130,8	8,1207	0,000001
Error	390262,1	185	2109,5		

Anexo 2. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras das 2<sup>as</sup> flores

<b>Severidade</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	43802,08	1	43802,08	94,07668	0,000000
"Pomares"	13346,35	5	2669,27	5,73297	0,000060
Error	86601,56	186	465,60		

<b>Incidência</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	285208,3	1	285208,3	129,9816	0,000000
"Pomares"	46666,7	5	9333,3	4,2536	0,001099
Error	408125,0	186	2194,2		

Anexo 3. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 1<sup>os</sup> frutos

<b>Severidade</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	23518,88	1	23518,88	90,13078	0,000000
"Pomares"	2320,96	5	464,19	1,77891	0,119114
Error	48535,16	186	260,94		

<b>Incidência</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	240833,3	1	240833,3	106,0237	0,000000
"Pomares"	16666,7	5	3333,3	1,4675	0,202430
Error	422500,0	186	2271,5		

Anexo 4. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 2<sup>os</sup> frutos

<b>Severidade</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	8138,02	1	8138,021	39,34010	0,000000
"Pomares"	4635,42	5	927,083	4,48162	0,000703
Error	38476,56	186	206,863		

<b>Incidência</b>	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Intercept	71302,1	1	71302,08	49,98704	0,000000
"Pomares"	33385,4	5	6677,08	4,68104	0,000475
Error	265312,5	186	1426,41		

Anexo 5. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras dos 3<sup>os</sup> frutos

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	677044,0	1	677044,0	554,8496	0,000000
"Pomares"	75357,0	5	15071,4	12,3513	0,000000
Error	225742,5	185	1220,2		

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1148932	1	1148932	776,3226	0,000000
"Pomares"	53850	5	10770	7,2772	0,000003
Error	273794	185	1480		

Anexo 6. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as amostras de folhas

Severidade	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	30689,90	1	30689,90	80,12886	0,000000
"Pomares"	14420,33	5	2884,07	7,53007	0,000002
Error	70090,25	183	383,01		

Incidência	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	21449,01	1	214490,12	114,7154	0,000000
"Pomares"	81114,48	5	16222,89	8,6765	0,000000
Error	34216,59	183	1869,75		

Anexo 7. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* nas 1ª flores dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	7050,78	1	7050,78	26,16	0,0000
	Modalidades	488,28	1	488,28	1,81	0,1884
	Error	8085,94	30,00	269,53		
<b>Pomar 1</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	70312,50	1	70312,50	26,57	0,0000
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,12	0,7335
	Error	79375,00	30,00	2645,83		
<b>Pomar 2</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	49290,66	1	49290,66	69,98	0,0000
	Modalidades	4290,66	1	4290,66	6,09	0,0197
	Error	20427,08	29,00	704,38		
<b>Pomar 2</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	203388,44	1	203388,44	134,95	0,0000
	Modalidades	4678,76	1	4678,76	3,10	0,0886
	Error	43708,33	29	1507,18		
<b>Pomar 3</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	11250,00	1	11250,00	7,11	0,0123
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,79	0,3813
	Error	47500,00	30	1583,33		
<b>Pomar 3</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	957,03	1	957,03	6,18	0,0187
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,13	0,7250
	Error	4648,44	30	154,95		
<b>Pomar 4</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	80000,00	1	80000,00	30,48	0,0000
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,48	0,4955
	Error	78750,00	30	2625,00		
<b>Pomar 4</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	14238,28	1	14238,28	21,23	0,0001
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,03	0,8656
	Error	20117,19	30	670,57		
<b>Pomar 5</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	195312,50	1	195312,50	107,76	0,0000
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,17	0,6809
	Error	54375,00	30	1812,50		
<b>Pomar 5</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	26738,28	1	26738,28	70,57	0,0000
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,05	0,8219
	Error	11367,19	30	378,91		
<b>Pomar 6</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	61250,00	1	61250,00	23,71	0,0000
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,48	0,4920
	Error	77500,00	30	2583,33		
<b>Pomar 6</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	5644,53	1	5644,53	19	0,0001
	Modalidades	19,53	1	19,53	0	0,7971
	Error	8710,94	30	290,36		

Anexo 8. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* na 2ª flores dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	52812,50	1	52812,50	20,61	0,0001
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,12	0,7294
	Error	76875,00	30	2562,50		
<b>Pomar 1</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	5000,00	1	5000,00	15,00000	0,000541
	Modalidades	0,00	1	0,00	0,00000	1,000000
	Error	10000,00	30	333,33		
<b>Pomar 2</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	137812,50	1	137812,50	59,59	0,000000
	Modalidades	2812,50	1	2812,50	1,22	0,278873
	Error	69375,00	30	2312,50		
<b>Pomar 2</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	26738,28	1	26738,28	40,50296	0,000001
	Modalidades	1582,03	1	1582,03	2,39645	0,132097
	Error	19804,69	30	660,16		
<b>Pomar 3</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	7812,50	1	7812,50	5,95	0,02
	Modalidades	2812,50	1	2812,50	2,14	0,15
	Error	39375,00	30	1312,50		
<b>Pomar 3</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	703,13	1	703,13	5,29	0,0285
	Modalidades	312,50	1	312,50	2,35	0,1355
	Error	3984,38	30	132,81		
<b>Pomar 5</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	37812,50	1	37812,50	15,78	0,0004
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,13	0,7205
	Error	71875,00	30	2395,83		
<b>Pomar 5</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	3828,13	1	3828,13	11,67	0,0018
	Modalidades	78,12	1	78,12	0,24	0,6291
	Error	9843,75	30	328,13		
<b>Pomar 4</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	70312,50	1	70312,50	27,44	0,0000
	Modalidades	2812,50	1	2812,50	1,10	0,3032
	Error	76875,00	30	2562,50		
<b>Pomar 4</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	17578,13	1	17578,13	16,96	0,0003
	Modalidades	78,12	1	78,12	0,08	0,7855
	Error	31093,75	30	1036,46		
<b>Pomar 6</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	52812,50	1	52812,50	20,61	0,0001
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,12	0,7294
	Error	76875,00	30	2562,50		
<b>Pomar 6</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	5000,00	1	5000,00	15,00	0,0005
	Modalidades	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
	Error	10000,00	30	333,33		

Anexo 8. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* nos 1º frutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	20000,00	1	20000,00	10,21	0,0033
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,64	0,4306
	Error	58750,00	30	1958,33		
<b>Pomar 1</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	2363,28	1	2363,28	8,60	0,0064
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,07	0,7916
	Error	8242,19	30	274,74		
<b>Pomar 2</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	80000,00	1	80000,00	32,00	0,0000
	Modalidades	5000,00	1	5000,00	2,00	0,1676
	Error	75000,00	30	2500,00		
<b>Pomar 2</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	8613,28	1	8613,28	24,05	0,0000
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,05	0,8169
	Error	10742,19	30	358,07		
<b>Pomar 3</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	31250,00	1	31250,00	13,89	0,0008
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,56	0,4619
	Error	67500,00	30	2250,00		
<b>Pomar 3</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	1953,13	1	1953,13	13,89	0,0008
	Modalidades	78,13	1	78,13	0,56	0,4619
	Error	4218,75	30	140,63		
<b>Pomar 4</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	20000,00	1	20000,00	10,21	0,0033
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,64	0,4306
	Error	58750,00	30	1958,33		
<b>Pomar 4</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	1582,03	1	1582,03	9,2748	0,0048
	Modalidades	175,78	1	175,78	1,0305	0,3182
	Error	5117,19	30	170,57		
<b>Pomar 5</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	45000,00	1	45000,00	18,31	0,0002
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,51	0,4813
	Error	73750,00	30	2458,33		
<b>Pomar 5</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	5000,00	1	5000,00	15,1181	0,0005
	Modalidades	78,13	1	78,13	0,2362	0,6305
	Error	9921,88	30	330,73		
<b>Pomar 6</b>	<b>Severidade</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	61250,00	1	61250,00	24,92	0,0000
	Modalidades	5000,00	1	5000,00	2,03	0,1641
	Error	73750,00	30	2458,33		
<b>Pomar 6</b>	<b>Incidência</b>					
		SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	6328,13	1	6328,13	19,76	0,0001
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,98	0,3312
	Error	9609,38	30	320,31		

Anexo 9. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* nos 2º frutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	25312,50	1	25312,50	11,7961	0,0018
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,1456	0,7054
	Error	64375,00	30	2145,83		
<b>Pomar 1</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	3300,78	1	3300,78	8,96	0,0055
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,05	0,8195
	Error	11054,69	30	368,49		
<b>Pomar 2</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	7812,50	1	7812,50	5,60	0,0246
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,22	0,6395
	Error	41875,00	30	1395,83		
<b>Pomar 2</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	703,13	1	703,13	5,00	0,0329
	Modalidades	78,13	1	78,13	0,56	0,4619
	Error	4218,75	30	140,63		
<b>Pomar 3</b>	<b>Severidade</b>	Valores nulos				
<b>Pomar 3</b>	<b>Incidência</b>	Valores nulos				
<b>Pomar 4</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	1250,00	1	1250,00	2,00	0,1676
	Modalidades	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
	Error	18750,00	30	625,00		
<b>Pomar 4</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	78,13	1	78,13	2,00	0,1676
	Modalidades	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
	Error	1171,88	30	39,06		
<b>Pomar 5</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	25312,50	1	25312,50	11,80	0,0018
	Modalidades	312,50	1	312,50	0,15	0,7054
	Error	64375,00	30	2145,83		
<b>Pomar 5</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	2363,28	1	2363,28	10,14	0,0034
	Modalidades	19,53	1	19,53	0,08	0,7742
	Error	6992,19	30	233,07		
<b>Pomar 6</b>	<b>Severidade</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	45000,00	1	45000,00	18,31	0,0002
	Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,51	0,4813
	Error	73750,00	30	2458,33		
<b>Pomar 6</b>	<b>Incidência</b>	SS	Degr. of	MS	F	p
	Intercept	6328,13	1	6328,13	13,35	0,0010
	Modalidades	703,13	1	703,13	1,48	0,2327
	Error	14218,75	30	473,96		

Anexo 10. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* nos 3ºfrutos dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	272977,94	1	272977,94	313,16	0,0000		
Modalidades	250,67	1	250,67	0,29	0,5956		
Error	27022,06	31	871,68				

<b>Pomar 1</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	193958,96	1	193958,96	185,33	0,0000		
Modalidades	1231,69	1	1231,69	1,18	0,2863		
Error	32442,56	31	1046,53				

<b>Pomar 2</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	249219,77	1	249219,77	196,98	0,0000		
Modalidades	2160,95	1	2160,95	1,71	0,2006		
Error	40486,11	32	1265,19				

<b>Pomar 2</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	104248,62	1	104248,62	89,05	0,0000		
Modalidades	1013,33	1	1013,33	0,87	0,3591		
Error	37460,94	32	1170,65				

<b>Pomar 3</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	97611,41	1	97611,41	37,2762	0,0000		
Modalidades	641,71	1	641,71	0,2451	0,6241		
Error	81176,47	31	2618,60				

<b>Pomar 3</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	38646,46	1	38646,46	26,47307	0,000014		
Modalidades	767,67	1	767,67	0,52586	0,473791		
Error	45255,06	31	1459,84				

<b>Pomar 5</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	317977,94	1	317977,94	1085,36	0,0000		
Modalidades	330,88	1	330,88	1,13	0,2959		
Error	9375,00	32	292,97				

<b>Pomar 5</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	270858,86	1	270858,86	480,51	0,0000		
Modalidades	858,86	1	858,86	1,52	0,2261		
Error	18038,19	32	563,69				

<b>Pomar 4</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	101250,00	1	101250,00	39,19	0,0000		
Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,48	0,4920		
Error	77500,00	30	2583,33				

<b>Pomar 4</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	50800,78	1	50800,78	30,31	0,0000		
Modalidades	3300,78	1	3300,78	1,97	0,1707		
Error	50273,44	30	1675,78				

<b>Pomar 6</b>		<b>Severidade</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	168896,10	1	168896,10	124,89	0,0000		
Modalidades	2496,10	1	2496,10	1,85	0,1875		
Error	31103,90	23	1352,34				

<b>Pomar 6</b>		<b>Incidência</b>					
	SS	Degr. of	MS	F	p		
Intercept	97001,46	1	97001,46	68,86	0,0000		
Modalidades	2701,46	1	2701,46	1,92	0,1794		
Error	32398,54	23	1408,63				

Anexo 11. ANOVA a um fator da incidência e severidade (%) de *Stemphylium vesicarium* nas folhas dos seis pomares ( $\alpha=0,05$ ) e comparação das médias (Teste Tukey) obtidas para as duas modalidades em ensaio

<b>Pomar 1</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	2812,50	1	2812,50	3,46	0,0726	
Modalidades	2812,50	1	2812,50	3,46	0,0726	
Error	24375,00	30	812,50			

<b>Pomar 1</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	703,13	1	703,13	2,87	0,1005	
Modalidades	703,13	1	703,13	2,87	0,1005	
Error	7343,75	30	244,79			

<b>Pomar 2</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	125000,00	1	125000,00	50,00	0,0000	
Modalidades	0,00	1	0,00	0,00	1,0000	
Error	75000,00	30	2500,00			

<b>Pomar 2</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	15312,50	1	15312,50	31,96	0,0000	
Modalidades	312,50	1	312,50	0,65	0,4257	
Error	14375,00	30	479,17			

<b>Pomar 3</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	2812,50	1	2812,50	3,14	0,0866	
Modalidades	312,50	1	312,50	0,35	0,5592	
Error	26875,00	30	895,83			

<b>Pomar 3</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	175,78	1	175,78	3,14	0,0866	
Modalidades	19,53	1	19,53	0,35	0,5592	
Error	1679,69	30	55,99			

<b>Pomar 4</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	70312,50	1	70312,50	29,35	0,0000	
Modalidades	7812,50	1	7812,50	3,26	0,0810	
Error	71875,00	30	2395,83			

<b>Pomar 4</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	6328,13	1	6328,13	22,71	0,0000	
Modalidades	312,50	1	312,50	1,12	0,2980	
Error	8359,38	30	278,65			

<b>Pomar 5</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	15770,11	1	15770,11	11,41	0,0022	
Modalidades	15770,11	1	15770,11	11,41	0,0022	
Error	37333,33	27	1382,72			

<b>Pomar 5</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	1629,31	1	1629,310	9,26	0,005166	
Modalidades	1629,31	1	1629,310	9,26	0,005166	
Error	4750,000	27	175,926			

<b>Pomar 6</b>		<b>Severidade</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	80000,00	1	80000,00	30,48	0,0000	
Modalidades	1250,00	1	1250,00	0,48	0,4955	
Error	78750,00	30	2625,00			

<b>Pomar 6</b>		<b>Incidência</b>				
	SS	Degr. of	MS	F	p	
Intercept	21269,53	1	21269,53	21,52	0,0001	
Modalidades	957,03	1	957,03	0,97	0,3330	
Error	29648,44	30	988,28			