

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
Escola Superior Agrária de Santarém



**POLITÉCNICO
DE SANTARÉM**

**Desenvolvimento de bioformulações para o controlo de doenças
fúngicas na cultura do morango**

Mestrado em Engenharia Agronómica

Leonor da Silva Coelho Borbinha

Orientação:

Doutora Ângela Cristina Brandão Fonseca Oliveira Prazeres (orientadora)
Ana Filipa da Silva Soares (co-orientadora)

Setembro, 2024

Agradecimentos

Quero expressar a minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, pois sem o seu apoio e orientação, este feito não seria possível.

À Doutora Ângela Prazeres, da Escola Superior Agrária de Santarém, e à Doutora Ana Soares da empresa Asfertglobal, agradeço pela orientação perspicaz, paciência e encorajamento ao longo deste percurso académico. Estas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese e para o meu crescimento como profissional.

À equipa da empresa Asfertglobal, onde tive a oportunidade de realizar o estágio, expresso o meu agradecimento por apostarem sempre em mim e permitirem que meu crescimento pessoal e profissional fosse constante nestes 3 anos. Um especial obrigado ao Engenheiro Joel Jerónimo, Engenheiro Pedro Sebastião, à Doutora Patrícia Correia, ao Doutor Luís Carvalho e à Engenheira Cristiana Carvalho que estiveram sempre ligados a este projeto e me ajudaram a concluir o mesmo com sucesso.

Gostaria, também, de agradecer à minha família por todo o apoio dado, especialmente nestes últimos anos e por todo os esforços que fazem diariamente por mim. Apesar de todos terem uma grande importância na minha vida quero destacar um membro, o meu Pai. Foi a principal responsável pela minha procura constante de saber mais e melhor. Para além de despertar o meu lado “curioso” também me motivou e apoiou nas alturas mais críticas deste projeto. É e sempre foi uma inspiração profissional e pessoal.

A execução desta dissertação foi, também, facilitada com o apoio diário dos meus amigos mais chegados e a todos eles agradeço o apoio recebido. Quero agradecer sobretudo aos meus colegas da ESAS que me permitiram concluir com sucesso este projeto, apesar de todas as adversidades.

Abreviaturas/Símbolos

σ - desvio padrão

h- hora

ha- hectare

°C- grau Celsius

L- litros

μm - micrómetro

mL- mililitro

rpm- rotações por minuto

Resumo

Este projeto teve início em dezembro de 2022 e terminou em novembro de 2023. Todo o trabalho foi realizado nas instalações fabris da Asfertglobal, que se situam em Perofilho, Santarém.

Este projeto teve como objetivo realizar bioformulações de origem vegetal e bacteriana com o intuito de avaliar o seu efeito no controlo das doenças Fusariose e Podridão Cinzenta na cultura do morango.

Após a sua formulação, estes produtos foram sujeitos a testes de estabilidade e envelhecimento, sendo seleccionados os que obtiveram melhores resultados para testes de antagonismo *in vitro* contra os fungos *Fusarium incarnatum* e *Botrytis cinerea*. Após serem realizados os testes, as formulações foram testadas nas plantas para avaliar a sua eficácia contra os fungos mencionados.

Os resultados demonstraram que as formulações de origem vegetal e bacterianas tinham potencial para inibir os fungos *Fusarium incarnatum* e *Botrytis cinerea*, contudo, quando aplicadas nos morangueiros infetados, embora tenham tido um impacto positivo no controlo das doenças, não alcançaram a mesma eficácia dos produtos comerciais de referência.

A formulação bacteriana *Whole Broth* (células bacterianas e metabolitos excretados) foi a que mais se destacou quando aplicada aos morangueiros, mostrando resultados semelhantes aos produtos comerciais de referência em termos de frequência e severidade das doenças, bem como na massa seca das plantas infetadas, no entanto, todas as formulações necessitam de ser reformuladas para serem consideradas alternativas viáveis aos produtos comerciais no controlo destas doenças.

Palavras-chave: Microrganismos; óleos essenciais; *Botrytis cinerea*; *Fusarium incarnatum*; sustentabilidade; morangueiro.

Abstract

This project started in December 2022 and concluded in November 2023. All work was carried out at the Asfertglobal facilities located in Perofilho, Santarém.

The objective of this project was to develop plant and bacterial-based bioformulations to assess their effectiveness in controlling *Fusarium* wilt and gray mold diseases in strawberry cultivation.

After formulation, these products underwent stability and aging tests, with the best-performing ones selected for in vitro antagonism tests against the fungi *Fusarium incarnatum* and *Botrytis cinerea*. Following these tests, the formulations were evaluated on plants to assess their efficacy against the mentioned fungi.

The results demonstrated that both plant-based and bacterial formulations had potential to inhibit *Fusarium incarnatum* and *Botrytis cinerea* fungi. Despite the positive effect of the formulations on disease control, they did not achieve the same level of efficacy as the commercial reference products when applied to infected plants.

The bacterial formulation *Whole Broth* (bacterial cells and excreted metabolites) stood out the most when applied to strawberries, showing results comparable to commercial reference products in terms of disease frequency and severity, as well as the dry weight of infected plants. Nonetheless, all formulations need to be reformulated to be considered viable alternatives to commercial products for controlling these diseases.

Keywords: Biofertilizers; microorganisms; essential oils; *Botrytis cinerea*; *Fusarium incarnatum*; sustainability; strawberry; strawberry plant.

Índice

Agradecimentos.....	III
Abreviaturas/Símbolos	V
Resumo	VII
Abstract.....	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de quadros	XIV
Índice de Tabelas	XIV
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos	2
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. O morangueiro.....	3
2.2. Variedades do Morangueiro	4
2.2.1. San Andreas	5
2.3. Doenças do morangueiro	6
2.3.1. Podridão Cinzenta.....	7
2.3.2. Fusariose.....	7
2.3.3. Tratamento e prevenção das doenças.....	8
2.4. Óleos essenciais	9
2.4.1. Extrato de Urtiga.....	9
2.4.2. Timol:	9
2.4.3. Cavalinha.....	10
2.4.4. Saponinas:.....	10
2.4.5. Óleo de Laranja:.....	10
2.4.6. Óleo de Orégão	10
2.5. Biocontrolo	10
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Localização dos ensaios	13

3.2. Formulações	13
3.2.1. Formulações de origem vegetal.....	13
3.2.2. Formulações de base bacteriana	15
3.2.3. Avaliação do potencial inibitório das bioformulações.....	15
3.3. Delineamento experimental.....	17
3.3.1. Instalação da cultura.....	18
3.4. Análise estatística	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1. Formulações	21
4.1.1. Formulações de origem vegetal.....	21
4.1. Avaliação das bioformulações na inibição de fungos fitopatogénicos <i>in vitro</i>	23
4.1.1. Formulações à base de óleos	24
4.1.2. Formulações de base bacteriana	25
4.2. Avaliação das bioformulações no controlo das doenças Fusariose e Podridão cinzenta na cultura do morango	28
4.2.1. Análise da doença Fusariose na cultura do morango	29
4.2.2. Avaliação da doença Podridão Cinzenta na cultura do morango	36
5. Conclusão.....	41
6. Bibliografia.....	45
Anexos	50

Índice de figuras

Figura 1- Representação de um morangueiro.	3
Figura 2- Morangueiro (Lorena Panassolo, n.d.).	4
Figura 3- Morangos <i>San Andreas</i> . (camposgeraisrural.com.b.).....	5
Figura 4- Morango infetado com <i>Botrytis cinerea</i> (yates, n.d.).....	6
Figura 5- Sede da ASFERTGLOBAL.	13
Figura 6- Exemplo do método utilizado para avaliar o potencial inibitório da formulação bacteriana.	16
Figura 7- Instalação da cultura em vaso.....	18
Figura 8- Morangueiro infetados com <i>Botrytis</i>	19
Figura 9- Exemplo de uma formulação cuja diluição não ficou estável	21
Figura 10- Fungo <i>Botrytis</i> à esquerda e fungo <i>Fusarium incarnatum</i> à direita.	23
Figura 11- Percentagens de inibição do fungo <i>Fusarium incarnatum</i> pelas formulações à base de óleos essenciais. As barras representam médias $\pm \sigma$. Diferentes letras por cima das colunas representam diferenças significativas (teste <i>Duncan</i>).....	24
Figura 12- Percentagens de inibição do fungo <i>Botrytis cinerea</i> pelas formulações de origem vegetal. As barras representam médias $\pm \sigma$	25
Figura 13- Representação gráfica das percentagens de inibição dos tratamentos do fungo <i>Fusarium incarnatum</i> com as formulações de base bacteriana. As barras representam médias $\pm \sigma$	26
Figura 14- Representação gráfica das percentagens de inibição dos tratamentos do fungo <i>Botrytis Cinerea</i> com as formulações de base bacteriana. As barras representam médias $\pm \sigma$	26
Figura 15- Morangueiros utilizados no ensaio na altura da floração e desenvolvimento dos primeiros frutos.	28
Figura 16- Ensaio com a doença Podridão cinzenta à esquerda e ensaio com Fusariose à direita.	28
Figura 17- Frequência da doença Fusariose, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio... ..	29
Figura 18- Representação gráfica da severidade da doença Fusariose, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio. As linhas representam médias $\pm \sigma$	30
Figura 19- Gráfico de barras referente ao peso fresco das plantas infetadas pela Fusariose. As barras representam médias $\pm \sigma$	32
Figura 20- Gráfico de barras referente às produções das plantas infetadas pela Fusariose, por tratamento.....	34

Figura 21- Frequência da doença Podridão Cinzenta, com os vários tratamentos, ao logo do ensaio.....	36
Figura 22-Severidade da doença Podridão Cinzenta, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio. As linhas representam médias $\pm \sigma$	37
Figura 23- Gráfico de barras referente ao peso fresco das plantas infetadas pela Podridão Cinzenta. As barras representam médias $\pm \sigma$	39

Índice de quadros

Quadro 1- Compostos utilizados nas formulações e as suas funções.	13
Quadro 2- Composição das formulações à base de óleo, em percentagem e as suas características visíveis.	14
Quadro 3-Tratamentos e número de plantas no ensaio.	17
Quadro 4-Cronologia do ensaio.	19
Quadro 5-Óleos essenciais usados nas várias formulações.....	22

Índice de Tabelas

Tabela 1- Resultados do teste <i>t-student</i> para o <i>Fusarium incarnatum</i> , $\alpha=0,05$	27
Tabela 2- Resultados do teste <i>t-student</i> para o <i>Botrytis Cinerea</i> , $\alpha=0,05$	27
Tabela 3- Percentagem de incremento de peso fresco dos vários tratamentos relativamente ao controlo positivo, da Fusariose.....	33
Tabela 4- Percentagem de incremento da produção com os vários tratamentos na doença Fusariose.....	34
Tabela 5- Percentagem de incremento de peso fresco dos vários tratamentos relativamente ao controlo positivo, da Podridão cinzenta.	40

1. Introdução

A agricultura é uma das atividades mais importantes na evolução humana. A sua prática levou ao sedentarismo e ao aparecimento de comunidades humanas alocadas a um determinado território.

A sua importância nos dias de hoje mantém-se, sendo a sua prática sujeita a desafios como a produtividade e rentabilidade da atividade em si, mas também a diminuição do seu impacto e o caminho para a sustentabilidade ambiental (Pretty, 2008).

Com o aumento populacional a agricultura enfrenta o desafio de maximizar a produção obtida em cada cultura sem baixar a qualidade do produto final. Um dos problemas, desta maximização de produção é o aparecimento de doenças ou pragas nas culturas o que limita a sua comercialização levando a elevadas perdas económicas (Oerke, 2012).

Nas últimas décadas, observou-se que a utilização excessiva de pesticidas químicos para o controlo de doenças tem efeitos nefastos nos diversos ecossistemas. Para mitigar este problema têm-se desenvolvido soluções alternativas, nomeadamente a aplicação de produtos de origem biológica. A necessidade de praticar uma agricultura mais sustentável, assim como os novos regulamentos existentes na união europeia para a diminuição ou mesmo proibição da utilização de alguns compostos químicos, deverá fazer com que os produtos de base biológica dominem o mercado agrícola num futuro próximo (Patel & Singh, 2019).

As doenças em plantas causadas por fungos representam perdas devastadoras na produção agrícola. Considerando as preocupações crescentes sobre o uso excessivo de pesticidas na agricultura, a investigação procurou práticas mais ecológicas e sustentáveis para o controlo de doenças nas culturas.

1.1. Objetivos

Este projeto, teve como principal objetivo testar dois tipos de bioformulações, nomeadamente, formulações de origem vegetal e bacterianas, para avaliar a sua eficácia no combate das doenças podridão cinzenta e da fusariose na cultura do morango.

Na primeira fase deste trabalho, diversas bioformulações pertencentes aos dois tipos foram avaliadas *in vitro*, quanto ao seu potencial inibitório de fungos fitopatogénicos causadores das doenças referidas anteriormente, nomeadamente, a *Botrytis cinerea* e o *Fusarium incarnatum*.

Numa segunda fase, efetuaram-se ensaios de estufa para avaliação da eficácia de algumas bioformulações, na prevenção e controlo das doenças provocadas por *Botrytis cinerea* e *Fusarium incarnatum* em plantas de morangueiro.

2. Revisão bibliográfica

2.1. O morangueiro

O morango era inicialmente uma fruta apenas consumida no verão e durante um curto espaço de tempo, tendo em conta as suas características de sabor e aroma singular, no entanto, era um fruto apenas acessível a classes com maior poder económico (Palha, 2020).

Nos anos 70 e 80 do século passado, este fruto passou a ser cada vez mais consumido pelo consumidor comum, havendo, paralelamente, um crescente aumento de área de produção desta cultura. Desde 2000, que a área de produção nacional do morango estagnou, no entanto, o consumo deste fruto continua a aumentar o que leva a uma necessidade evidente de aumento de rendimento de produção sem que este baixe a qualidade (Palha, 2020).

O morangueiro é uma planta herbácea rasteira pertencente à família Rosaceae e ao género *Fragaria*. Possui caule curto e fibroso, comumente designado por coroa. Botanicamente o morango não é um fruto pois origina-se no desenvolvimento do receptáculo floral de uma única flor com vários ovários e não do ovário como nos frutos. O desenvolvimento desta espécie ocorreu em função da hibridação natural do morango silvestre do Chile que, quando descoberta, gerou alguma atenção pelo tamanho dos seus pseudo-frutos (Malta, 2017).

Um dos grandes obstáculos, para o aumento do rendimento de produção deste fruto é o facto do morangueiro ser bastante suscetível a doenças fúngicas. As soluções que se encontraram para o combate destas doenças fúngicas passam pela utilização de



Figura 1- Representação de um morangueiro.

produtos fitossanitários que impactam o meio ambiente e que podem levar ao aparecimento de resíduos em frutos (Töfoli & Domingues, 2005).

O morangueiro é uma cultura altamente suscetível a doenças patogénicas, decorrente da elevada taxa respiratória. Estes agentes patogénicos podem causar estragos de menor ou maior intensidade, dependendo das condições a que as plantas estão expostas. Diversos patógenos estão associados às podridões deste fruto, destacando-se *Botrytis cinerea* e o *Fusarium incarnatum* (Malta, 2017).



Figura 2- Morangueiro (Lorena Panassolo, n.d.).

2.2. Variedades do Morangueiro

Os morangueiros apresentam uma vasta diversidade de variedades, cada uma com características distintas em termos de sabor, tamanho, resistência a doenças e adaptabilidade a diferentes climas. Entre as variedades mais conhecidas, destacam-se *Albion* ou toque aqui para introduzir texto.:

Os morangos "*Albion*", reconhecidos pela sua resistência a doenças, produzem frutas grandes, firmes e saborosas, adaptando-se bem a diversas regiões (*Morangos Albion*, n.d.).

Os morangos "*Fragaria vesca*", também designados como morangos silvestres ou alpinos, são mais pequenos, mas extremamente aromáticos, frequentemente encontrados na natureza e apreciados pelo seu sabor excepcional ("*Fragaria Vesca*," n.d.; *Fragaria Vesca L.*, n.d.)

A variedade "*San Andreas*" é conhecida pela sua resistência a doenças, produzindo frutas grandes, suculentas e doces ao longo da temporada de cultivo (*Morangos San Andreas - PLANTAR PORTUGAL*, n.d.).

Os morangos "*Seascape*" são valorizados pela sua capacidade de produzir frutas ao longo de toda a estação de crescimento, sendo reconhecidos pela sua doçura e resistência a doenças (*Fragaria* × *Ananassa* "*Seascape*" - *PictureThis*, n.d.).

Os morangos "*Honeoye*" produzem frutas grandes, vermelhas e brilhantes, sendo reconhecidos pela sua resistência ao frio, ideais para cultivo em climas mais frios (*Variedades* - *MAAE*, n.d.).

Os morangos "*Chandler*" destacam-se pelo tamanho generoso das frutas e pelo sabor doce, sendo populares em plantações comerciais devido à sua elevada produtividade (*Variedades* - *MAAE*, n.d.).

Por fim, os morangos "*Elsanta*" são comuns em supermercados, graças à sua durabilidade, além de apresentarem uma aparência atraente e um sabor equilibrado (*Variedades* - *MAAE*, n.d.).

Ao selecionar uma variedade, é essencial considerar o clima local, preferências de sabor e as condições específicas para o cultivo, visando obter os melhores resultados na produção de morangos.

2.2.1. San Andreas

O morangueiro da variedade *San Andreas* é bastante apreciado por agricultores e entusiastas da jardinagem, graças às suas características particulares. Reconhecidos pelo seu sabor excepcional, os morangos oriundos desta variedade proporcionam uma experiência gustativa doce e suculenta. A sua consistência firme e suculenta faz destes morangos não só ideais para consumo fresco, mas também para diversas aplicações culinárias, como sobremesas, saladas e sumos (*Strawberry Licensing Program*, n.d.).



Figura 3-Morangos *San Andreas*. (camposgeraisrural.com.b.)

Uma das vantagens notáveis desta variedade é a sua elevada produtividade ao longo da época de colheita.

Esta variedade tende a produzir uma quantidade significativa de frutas, tornando-a uma escolha viável tanto para cultivo comercial quanto doméstico. Além disso, a sua resistência a algumas doenças comuns que afetam os morangos é um ponto a favor, reduzindo a necessidade de uso excessivo de pesticidas e facilitando o seu cultivo (*Variedades - MAAE, n.d.*).

No que diz respeito aos cuidados, o morangueiro *San Andreas* prospera em solos bem drenados e requer rega regular para manter a sua saúde e produção. A disponibilidade de luz solar adequada é essencial para o seu crescimento ideal. Esta variedade geralmente adapta-se bem a diferentes condições climáticas, mas é importante considerar as especificidades do local de cultivo para obter os melhores resultados (*Morangos San Andreas - PLANTAR PORTUGAL, n.d.*).

Ao optar por cultivar morangos da variedade mencionada, é recomendável seguir práticas adequadas de manejo, proporcionando o ambiente ideal para o desenvolvimento destas plantas, o que resultará numa colheita abundante e de qualidade superior.

2.3. Doenças do morangueiro



Figura 4- Morango infetado com *Botrytis cinerea* (yates, n.d.).

Os morangueiros são propensos a várias doenças que podem impactar negativamente o seu crescimento e a produção de frutos.

A podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis Cinerea*, é uma das doenças mais comuns e destrutivas para o morangueiro.

A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium* sp., afeta principalmente as raízes e o sistema vascular do morangueiro.

Além destas, o morangueiro também é afetado por outras doenças como o oídio, a antracnose e o míldio. O oídio, causado pelo fungo *Podosphaera aphanis*, apresenta-se como uma camada de pó branco nas folhas e frutos. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum spp.*, resulta em lesões escuras nos frutos. O míldio, causado pelo fungo do género *Peronospora*, manifesta-se com manchas amareladas nas folhas, podendo evoluir para manchas castanhas, com presença de um mofo branco ou cinzento na face inferior das folhas e eventualmente nos frutos (Jacinta Campo, 2007).

Em caso de identificação de sintomas de doenças nos morangueiros, é crucial agir rapidamente, o que pode incluir a aplicação de fungicidas que tem consequências nefastas para o ambiente e é necessário arranjar alternativas económica e ambientalmente sustentáveis. Neste trabalho, concentramo-nos em duas doenças específicas: Podridão Cinzenta e Fusariose (Caroline Luiz, 2018).

2.3.1. Podridão Cinzenta

O fungo *Botrytis cinerea* é responsável pela doença comumente conhecida como podridão cinzenta. Este fungo ataca todos os órgãos do morangueiro em condições favoráveis, como temperaturas entre 18°C e 25°C e com humidade relativa superior a 80%. Esta doença atinge essencialmente frutos em fase de maturação ou já maduros, mas pode começar a desenvolver-se durante a fase de floração. Frutos contaminados apresentam uma massa mole de cor cinzenta (Palha, 2005)

2.3.2. Fusariose

Os fungos do género *Fusarium* são os responsáveis pela fusariose, uma doença que se torna mais ativa durante os meses de verão, devido às condições ideais para sua propagação e desenvolvimento. Os primeiros sintomas muitas vezes passam despercebidos, pois a infeção ocorre no subsolo, provocando danos principalmente nas raízes do morangueiro. Ao infetar as raízes, estas começam a apodrecer, secar e a infeção dissemina-se ao longo da planta através dos vasos condutores. Outro sinal é o murchamento das folhas localizadas na parte inferior. Quando não controlada ou tratada, esta doença pode resultar na morte do morangueiro em 40-50 dias (Pires et al., 2012)

2.3.3. Tratamento e prevenção das doenças

Nos últimos anos, o uso de fitossanitários tem sido progressivamente restringido, especialmente no que diz respeito a produtos químicos que deixam resíduos de pesticidas. Essa restrição envolve limites máximos admissíveis de resíduos pós-colheita e a restrição da utilização de algumas moléculas, como folpete, iprodiona, fenhexamida e pirimetanil (Comissão Europeia, 2011).

Para combater eficazmente a podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, e a fusariose, causada por diversos fungos do género *Fusarium*, é crucial adotar uma série de práticas específicas e direcionadas. É fundamental manter as plantas bem ventiladas e remover regularmente folhas, flores e frutos infetados para permitir a redução de humidade ao redor das plantas, um fator que favorece o desenvolvimento dos fungos (Palha, 2005). Além disso, o uso de microrganismos antagonistas, como *Bacillus*, pode competir com a *Botrytis cinerea* e com o *Fusarium*, bem como a aplicação de extratos de plantas com propriedades antifúngicas (Bettiol et al., 2012).

Medidas preventivas, como inspeções regulares para detetar sinais iniciais de infeção e a remoção imediata de partes afetadas, são igualmente importantes para ambas as doenças. Melhorar a circulação de ar ao redor das plantas e evitar a irrigação excessiva também ajudam a minimizar o risco de desenvolvimento das doenças (Palha, 2005).

No manejo pós-colheita, é essencial manipular frutas, flores e outros produtos agrícolas com cuidado para evitar lesões que possam facilitar a entrada de fungos. Armazenar os produtos colhidos em condições frescas e secas é vital para proteger contra a podridão cinzenta e a fusariose, garantindo assim a qualidade dos produtos (Palha, 2005).

Implementar essas práticas adaptadas às condições específicas do cultivo ajuda a reduzir significativamente os riscos de podridão cinzenta e fusariose, promovendo um ambiente de cultivo mais saudável e produtivo (Fry, 1982).

2.4. Óleos essenciais

Na agricultura, o termo "substância ativa" está frequentemente associado aos pesticidas e produtos agroquímicos. Trata-se da componente do produto que confere a atividade biológica ou química responsável por controlar pragas, doenças ou plantas daninhas das culturas.

Estas substâncias ativas podem encontradas em herbicidas (utilizados para controlar o crescimento de plantas daninhas), inseticidas (para combater insetos indesejados), fungicidas (para prevenir ou eliminar fungos) ou outros agentes de controlo biológico ou químico. São selecionadas pelas suas capacidades específicas de atacar apenas o alvo desejado, mantendo a segurança para as plantas cultivadas e para o ambiente quando aplicadas corretamente e de acordo com as instruções.

Neste trabalho, as substâncias ativas mencionadas são encontradas nos óleos essenciais/extratos vegetais utilizados e também na formulação bacteriana.

Estes extratos vegetais, oferecem alternativas naturais e menos tóxicas para o controle de doenças e pragas na agricultura, mas é fundamental entender suas aplicações específicas e seguir as orientações adequadas para obter resultados eficazes e seguros.

2.4.1. Extrato de Urtiga

O extrato de urtiga é conhecido por conter ácido fórmico e ácido acético, ambos com propriedades antifúngicas. Estes compostos podem ser eficazes no combate a fungos, embora a sua eficácia possa variar dependendo do tipo de fungo e da planta. Aplica-se geralmente por pulverização nas plantas afetadas, mas é importante considerar a severidade da infestação e seguir instruções específicas para cada cultura (Khan, 2020).

2.4.2. Timol:

O timol é reconhecido pelas suas propriedades antifúngicas, agindo na membrana celular dos fungos. Esta substância é geralmente aplicada diluída em água, ou em conjunto com outros compostos para melhorar sua eficácia. A aplicação foliar ou no solo são os métodos comuns de aplicação, porém é fundamental seguir as orientações do fabricante para garantir resultados eficazes e minimizar qualquer efeito adverso nas plantas (Chauhan et al., 2017)).

2.4.3. Cavalinha

A Cavalinha, rica em sílica, pode fortalecer as estruturas das plantas, tornando-as mais resistentes a doenças e pragas. A aplicação do ácido silícico, derivado dessa planta, pode fortalecer as células das plantas, mas a sua eficácia varia de acordo com as culturas e os métodos de aplicação (Trebbi et al., 2021).

2.4.4. Saponinas:

As saponinas são compostos encontrados em plantas que possuem propriedades inseticidas, pesticidas e antifúngicas. Apesar disso, a eficácia das saponinas na agricultura pode variar dependendo da praga ou doença, e seu uso requer cuidados para evitar impactos adversos nas plantas e no meio ambiente (Chapagain & Wiesman, 2007).

2.4.5. Óleo de Laranja:

O óleo de laranja, rico em D-limoneno, é utilizado como inseticida e pode apresentar propriedades fungicidas e herbicidas. A sua aplicação, diluída em água, é comumente utilizada na agricultura biológica para controlar uma variedade de pragas. Contudo, é essencial seguir as recomendações de dosagem e aplicação para garantir a eficácia e minimizar qualquer efeito prejudicial nas plantas (Feng et al., 2020).

2.4.6. Óleo de Orégão

O orégão é reconhecido por conter compostos, como o carvacrol e o timol, que demonstram propriedades inseticidas, pesticidas e antifúngicas. Apesar destas qualidades, a eficácia do orégão na agricultura pode variar consoante a praga específica ou a doença em causa. O seu uso requer uma atenção cuidadosa para evitar possíveis impactos adversos nas plantas e no ambiente circundante. É fundamental, considerar as recomendações de aplicação e dosagem para assegurar tanto a eficácia desejada como a segurança ambiental (Oleynikov, 202).

2.5. Biocontrolo

A regulamentação, cada vez mais rígida, do uso de produtos fitossanitários e a crescente vontade de avanço para uma agricultura sustentável conduz-nos ao desenvolvimento de produtos de origem biológica. No caso das doenças causadas por agentes patogénicos, o controlo biológico tem como objetivo equilibrar o agroecossistema de forma a limitar o potencial do patógeno ou aumentar a resistência do

hospedeiro. O objetivo é diminuir o impacto dos efeitos provocados por fitofármacos e melhorar a qualidade do produto final, razão pela qual se têm vindo a desenvolver produtos que envolvam na sua composição, extratos ou óleos essenciais, caldas e inóculos microbianos (Es-Soufi et al., 2020; Lavras, 2012).

Os agentes de biocontrolo (microrganismos, extratos, óleos essenciais, etc) de doenças agem diretamente nos agentes patogénicos e fortalecem a resistência das culturas a pragas ou doenças. Estes agentes, geralmente possuem péptidos, ácidos gordos, hidratos de carbono, enzimas e proteínas na sua composição (Hashem *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais são compostos naturais extraídos de plantas. Esta extração traduz-se num produto altamente concentrado que tem propriedades bastante importantes para a agricultura, pois estes óleos têm capacidade de repelir insetos e de ajudar no controlo de pragas. Para além dessas propriedades, muitos destes produtos também auxiliam na estimulação do crescimento das plantas, enriquecimento do solo e também são eficazes contra fungos e bactérias. Alguns óleos são também usados para atrair polinizadores para as plantas (a partir do seu aroma), favorecendo a polinização e, conseqüentemente, aumentando a produtividade da cultura (Ootani et al., 2013).

No entanto, a eficácia da utilização dos óleos essenciais varia e requer doses adequadas. No que toca ao controlo de doenças, têm tido resultados positivos tanto como produtos de contacto como indutores de resistência (Lavras, 2012).

Wilson *et al* testaram a eficácia de vários óleos essenciais para o controlo da doença provocada pelo fungo *Botrytis cinerea* e os que apresentaram melhor resultados foram os de palma-rosa, tomilho, canela e cravo-da-índia (1997).

Silva estudou e demonstrou a eficácia do tratamento da doença provocada pelo *Fusarium* spp. utilizando os óleos de cravo-da-índia, gergelim, girassol e erva-doce (2019).

Além de óleos essenciais têm sido muito estudados produtos à base de microrganismos com bactérias pertencentes ao género *Bacillus* e estes têm mostrado resultados bastante promissores no controlo de doenças.

Rababe Es-Soufi *et al* demonstraram que *Bacillus amyloliquefaciens* Bc2 é eficaz no tratamento da doença Antracnose, maioritariamente provocada por patógenos do género *Colletotrichum* (Es-Soufi et al., 2020).

Leconte *et al* utilizaram lipopéptidos produzidos por *Bacillus subtilis* para combater a sarna da macieira e os resultados foram mais uma vez bastante positivos. (2022).

Hong *et al* realizam um estudo que demonstrou que a utilização de *Bacillus velezensis CE100* é eficaz no controle das doenças Podridão e Fusariose na cultura dos morangos. Além de inibir o crescimento desses fungos, a bactéria aumentou a biomassa radicular e o rendimento dos frutos, mostrando ser uma alternativa segura e ecológica aos adubos químicos (2022).

O estudo feito por Toral *et al*, demonstra que a bateria *Bacillus Velezensis XT1*, aplicada preventivamente, melhora o crescimento e protege a cultura do tomate e do morango contra o fungo *Botrytis cinerea*. Foram feitas aplicações radiculares, que reduziram a incidência e a severidade da doença mais de 50%. Além disso, houve um aumento notório da biomassa na cultura (2020).

3. Material e Métodos

3.1. Localização dos ensaios

Este trabalho foi realizado em dois laboratórios (um de microbiologia e um de química) e numa estufa pertencentes à empresa Asfertglobal, localizada na Várzea, Santarém.



Figura 5- Sede da ASFERTGLOBAL.

3.2. Formulações

Neste trabalho foram formulados vários produtos de base vegetal, no laboratório de química da empresa, e de base bacteriana, no laboratório de microbiologia. Estas formulações foram testadas de forma preventiva na cultura do morangueiro.

3.2.1. Formulações de origem vegetal

As formulações à base de essências foram feitas no laboratório de química da empresa ASFERTGLOBAL.

A formulação corresponde a uma mistura de óleos essenciais, quer corresponda apenas a um óleo ou a vários podendo incluir outros compostos para garantir estabilidade física e química (Quadro 1).

Quadro 1- Compostos utilizados nas formulações e as suas funções.

Compostos	Produto	Compostos	Função
Extrato de Urtiga	Óleo essencial	<i>Atlas G-5000</i>	Agente Tensoativo
Timol		<i>Tween 80</i>	Surfactante
Óleo de laranja		Álcool Gordo	Surfactante
Cola de Cavalo		Óleo de girassol	Solvente
Saponinas		Água	Solvente
Óleo de Orégão		Álcool isopropílico	Emulsionante

A seleção desses óleos baseou-se em estudos prévios que demonstraram eficácia no tratamento de doenças fúngicas.

Quadro 2- Composição das formulações à base de óleo, em percentagem e as suas características visíveis.

Composto	1	2	3	4	5
Extrato de Urtiga spp.	0,2%				
Saponinas	3%				
Cola de cavalo			2%	2%	2%
água	96,8%	85%	80%	28%	
Tween 80					
Óleo de orégão e Timol		5%	8%	50%	8%
Atlas		10%		10%	
Timol					
Álcool Gordo				10%	10%
Óleo de girassol					80%
Classificação da mistura	Homogénea	Bifásica	Bifásica	Bifásica	Homogénea
Composto	6	7	8	9	10
Cola de cavalo	2%	2%	2%	2 %	2%
Água		56%	20%	50%	25%
Óleo de orégão e Timol		15%	8%		25%
Atlas		12%	20%	10%	15%
Timol	98%		50%	30%	13%
Álcool Gordo		15%		8%	20%
Classificação da mistura	Matéria não solúvel	Bifásica	Bifásica	Bifásica	Bifásica
Composto	11		12		13
Saponinas	10%		10%		2%
Cola de cavalo	10%				
Água	30%		40%		30%
Álcool Gordo	30%		50%		
Álcool isopropílico					8%
Óleo laranja	20%				60%
Classificação da mistura	Matéria não solúvel		Homogénea		Bifásica

As formulações foram submetidas a testes de estabilidade baseados na observação do número de fases aparentes, incluindo bifásicas, homogéneas, entre outras. Para formulações bifásicas, a estabilidade foi avaliada agitando a mistura e observando se a mesma se mantinha homogénea pelo menos 30 minutos.

Testou-se também a estabilidade da diluição em água, retirando 5 mL da amostra e misturando com água numa proveta de 50 mL, verificando se permanecia como uma única fase por 30 minutos, após agitação.

Posteriormente, as formulações foram submetidas a três testes de envelhecimento: na estufa a 54°C, num frigorífico a 4°C e à temperatura ambiente, ao longo de aproximadamente um mês.

O teste de 54°C, simulou a degradação acelerada para garantir a manutenção do poder surfactante das formulações. A 4°C, garantiu-se que não havia precipitação ou congelamento, enquanto o teste à temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) avaliou a estabilidade em condições normais ao longo do tempo.

3.2.2. Formulações de base bacteriana

A partir do crescimento de uma estirpe de *Bacillus* sp. foram obtidas duas bioformulações de origem bacteriana. A estirpe foi inoculada em meio nutritivo (*nutrient broth*) e foi incubada a 28°C e 160 rpm, durante 24h.

A bioformulação bacteriana *whole broth* consiste na cultura resultante do crescimento descrito anteriormente (células bacterianas e metabolitos excretados).

A bioformulação *cell free*, consiste apenas nos metabolitos excretados. Para este processo após o crescimento da cultura, esta foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e o processo foi repetido novamente. O sobrenadante foi posteriormente filtrado com membrana de 0,22 µm, obtendo-se assim um filtrado livre de células.

3.2.3. Avaliação do potencial inibitório das bioformulações

No ensaio de inibição fúngica, foi avaliada a atividade inibitória de cada formulação contra os fungos fitopatogénicos *Botrytis cinerea* e *Fusarium incarnatum* *in vitro*. Cada fungo foi inoculado e mantido em placas de *Potato dextrose agar* (PDA) e incubado a 28 °C durante 5-7 dias.

3.2.3.1. Avaliação do potencial inibitório das formulações de base vegetal

As bioformulações vegetais foram diluídas 1/10 em água destilada estéril.

Foram adicionados 5 µl de cada bioformulação vegetal a 4 discos de papel de filtro esterilizados e estes foram colocados perpendicularmente na periferia das caixas de *petri* contendo meio PDA. Posteriormente, foram inoculados discos de micélio fúngico de 6 mm no centro das placas de PDA.

3.2.3.2. Avaliação do potencial inibitório da formulação bacteriana Whole broth

Foi utilizado o método de cultura dupla, onde foram colocados discos de micélio fúngico de 6 mm no centro de placas de Petri com meio PDA.

Posteriormente, foram aplicadas 4 gotas de 5 µl da formulação whole broth na periferia das placas, de forma perpendicular (como podemos observar na Figura 6).

As placas foram incubadas a 28 °C durante 5-7 dias.

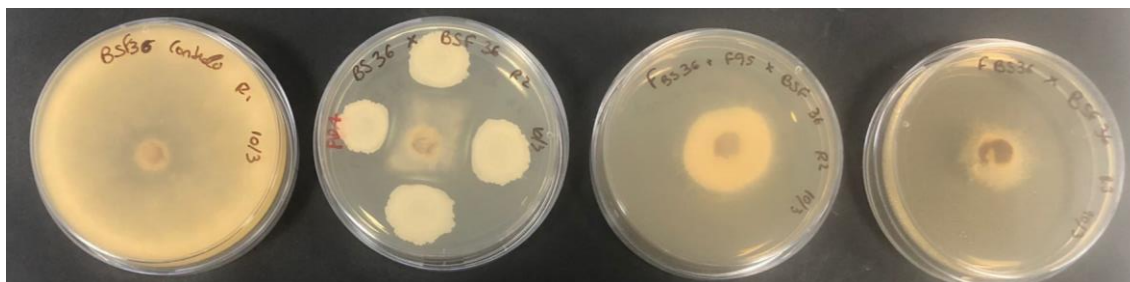


Figura 6- Exemplo do método utilizado para avaliar o potencial inibitório da formulação bacteriana.

3.2.3.3. Avaliação do potencial inibitório da formulação bacteriana Cell free

Foi utilizado o método de incorporação, onde as placas de PDA foram suplementadas com 10% da formulação *cell free*. Posteriormente, cada fungo foi então inoculado no centro das placas como descrito anteriormente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Após o período de incubação, mediu-se a expansão do micélio (4 medidas perpendiculares do crescimento radial do fungo, em centímetros) e calculou-se a percentagem de inibição em relação ao controle, que consistia no crescimento dos fungos sem qualquer bioformulação na placa, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\bar{x}Rn \times 100}{\left(\frac{\bar{x}R_{\text{controle1}} + \bar{x}R_{\text{controle2}} + \bar{x}R_{\text{controle3}}}{3} \right)} \right)$$

Sendo $\bar{x}Rn$ a média do tamanho do raio do crescimento do fungo, n o número da repetição (1, 2 ou 3)

3.3. Delineamento experimental

Após análise dos resultados obtidos dos testes *in vitro* escolheram-se duas formulações de origem vegetal e uma formulação de base bacteriana que foram posteriormente aplicadas aos ensaios de vaso com morangueiros para combater as doenças (Quadro3).

Para todos os tratamentos testados foram utilizadas sete réplicas. No Quadro 3 podemos observar o número de plantas existentes em cada tratamento e doença.

As réplicas usadas em cada tratamento foram escolhidas individual e aleatoriamente.

Quadro 3-Tratamentos e número de plantas no ensaio.

	Sem fungo Patogénico	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Sem aplicação de produto	7 plantas	7 plantas	7 plantas
Controlo Positivo (químico)			
<i>whole brothe</i>			
Formulação 5			7 plantas
Formulação 12			
Formulação 13			

3.3.1. Instalação da cultura

A cultura dos morangos começou a ser instalada no mês de janeiro. Todas as plantas foram colocadas em vasos de 5 Lt.



Figura 7- Instalação da cultura em vaso.

Após a instalação do ensaio, as plantas foram fertilizadas com um adubo NPK de 11-40-11 (25kg/ha, considerando 77500 plantas de morangueiro/ha) e com um bio estimulante à base de algas (200ml/100L).

Posteriormente, as plantas foram infetadas com os fungos fitopatogénicos. O fungo *Fusarium incarnatum* foi aplicado no substrato, enquanto o fungo *Botrytis cinerea* foi aplicado de forma foliar. Os dois ensaios, foram tratados individualmente em compartimentos separados da estufa.

No ensaio referente à doença Podridão cinzenta, provocada pelo fungo *Botrytis*, as plantas foram isoladas de forma a não deixar o fungo se espalhar pelo restante ensaio utilizando-se sacos com uma membrana, que permitia à planta respirar sem deixar o fungo disseminar.



Figura 8- Morangueiro infetados com *Botrytis*.

Fez-se uma aplicação preventiva contra os fungos em estudo dia 10 de abril, uma semana antes de inoculação dos fungos patogênicos. Depois de se inocular a doença (início da floração) começou a tratar-se a cultura com as formulações escolhidas anteriormente.

Quadro 4-Cronologia do ensaio.

Data	Ação
Janeiro	Plantação dos morangueiros
4-14/04	Adubação do ensaio
17/04	Aplicação do fungo <i>Fusarium incarnatum</i>
21/04 a 26/05	Aplicação dos tratamentos (7 aplicações)
9/05	Aplicação de <i>Botrytis</i>
12/05	Avaliação da doença
22 /05 a 9/06	Análise da produção da cultura
23/06	Cálculo Biomassa, peso fresco

A avaliação da progressão da doença foi registrada durante sete semanas após a inoculação do fungo patogênico. Ao longo do ensaio, foram registrados os valores de severidade e frequência das doenças Fusariose e Podridão cinzenta.

A frequência é o número de plantas com sintomas da doença aplicada;

A severidade é o grau de extensão da doença em cada planta;

Para a Fusariose calculamos uma percentagem do número de folhas apresentando sintomas pelo total de folhas por planta e, no caso da Podridão cinzenta, foi efetuada uma

avaliação visual com base dos sintomas externos, atribuindo uma escala com base no grau de sintoma entre 1-10.

A severidade foi avaliada através das seguintes classes, correspondentes a área de planta afetado particularmente flores e frutos: 1) 0-10%; 2) 11-20%; 3) 21-30%; 4) 31-40%; 5) 41%-50%; 6) 51-60%; 7) 61-70% 8) 71-80%; 9) 81-90%;10) 91 100%.

Durante o ensaio foi também calculada a produção de morangos com a doença Fusariose, retirando-se semanalmente todos os frutos da planta e pesando-se os mesmos; somaram-se os valores obtidos ao longo do ensaio e retirámos o valor da produção em cada tratamento.

Para a Podridão cinzenta não se calculou a produção, pois esta doença faz com que o fruto fique podre, devido ao uso de sacos protetores (com filtro) para diminuir a propagação da doença no resto da estufa.

No final do ensaio, calculou-se o peso fresco em todos os tratamentos, pesando todas as plantas do ensaio e obtendo uma média para cada tratamento. Desta forma podemos analisar se as doenças influenciaram a produtividade da planta e o seu desenvolvimento.

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância de um fator (ANOVA), com um nível de significância de 0,05, para avaliar as diferenças entre os tratamentos. As análises foram realizadas separadamente para os dados *in vitro* e para os dados das plantas.

Para os resultados *in vitro*, foi também aplicado o Teste T para verificar a significância das diferenças observadas. Já para os resultados das plantas, após a ANOVA, foram realizados testes a posteriori de *Duncan* para identificar as discrepâncias entre as médias dos tratamentos.

Todas as análises foram conduzidas utilizando o software IBM SPSS, versão 27, estando os resultados destas análises nos Anexos deste trabalho.

4. Resultados e Discussão

4.1. Formulações

4.1.1. Formulações de origem vegetal

Algumas formulações eram totalmente compostas por óleos essenciais, outras formulações, por conterem também uma fase aquosa, eram bifásicas. Esta separação visível deve-se ao facto de os óleos não serem solúveis em água.

Para eliminar a separação de fases foi adicionado um surfactante (*Tween 80* ou *Atlas*) a todas as misturas bifásicas. Este composto atuava de forma a manter a formulação homogénea durante, no mínimo, 30 minutos, após ser agitada.

Outro aspeto relevante nas formulações foi a diluição das mesmas em água. O surfactante adicionado, não só ajuda na possibilidade de se obter uma mistura temporariamente homogénea, como permite que a diluição em água seja também temporariamente homogénea.

Houve duas formulações (6 e 11) que não seguiram para testes de estabilidade e envelhecimento visto que continham matéria visivelmente não solúvel, não tendo as características para prosseguir.

As restantes formulações passaram por testes visuais (aspeto, opacidade, etc) e de estabilidade. Nesta primeira fase descartaram-se as misturas 3 e 4, pois não aparentavam ter apenas uma fase, após agitação durante 30 minutos.

Na Figura 9, podemos observar a formulação 3, que não se manteve homogénea durante 30 minutos, pois é visível uma separação na parte superior da proveta. Caso a formulação não obtivesse os resultados pretendidos não prosseguia para mais nenhum teste.



Figura 9- Exemplo de uma formulação cuja diluição não ficou estável

Nos testes de envelhecimento, a formulação 7 foi descartada, pois ao longo do tempo era visível matéria não solúvel no fundo do frasco da amostra.

Após se realizarem todos os testes, as formulações 1, 2, 5, 8, 9, 10, 12 e 13 foram testadas *in vitro* para avaliar o seu potencial inibitório de fungos fitopatogénicos.

O Quadro 5, resume os óleos essenciais utilizados nas formulações de origem vegetal escolhidas para prosseguir.

Quadro 5-Óleos essenciais usados nas várias formulações.

Nº	Óleo usado	Nº	Óleo usado
1	Extrato de Urtiga e Saponinas	9	Timol
2	Junção de Óleo de orégão e timol (5 %)	10	Cola de cavalo e junção de Óleo de orégão e timol (15 %)
5	Cola de cavalo e junção de Óleo de orégão e Timol (8 %)	12	Saponinas
8	Junção de Óleo de orégão e timol (8 %)	13	Óleo de laranja e Saponinas

Ao longo deste trabalho, as formulações vão ser mencionadas com o número indicado na tabela 5.

4.1. Avaliação das bioformulações na inibição de fungos fitopatogénicos *in vitro*

Usando as fórmulas anteriormente mencionadas, bem como as de origem bacteriana, avaliamos os seus efeitos inibitórios nos fungos fitopatogénicos *Botrytis cinerea* e *Fusarium incarnatum*.



Figura 10- Fungo *Botrytis* à esquerda e fungo *Fusarium incarnatum* à direita.

Medimos a expansão do micélio obtendo-se os valores da percentagem de inibição de cada tratamento, para cada doença (método descrito no capítulo anterior).

4.1.1. Formulações à base de óleos

4.1.1.1. *Fusarium incarnatum*

Foi observado um efeito das formulações na inibição do fungo *Fusarium incarnatum* (ANOVA, $F = 2,503$, $p = 0,068$). Observando a Figura 11 podemos verificar que o óleo essencial 13 é o que se destaca, mostrando ser significativamente diferente dos restantes. Foi por isso o escolhido como o mais promissor no tratamento da doença fusariose.

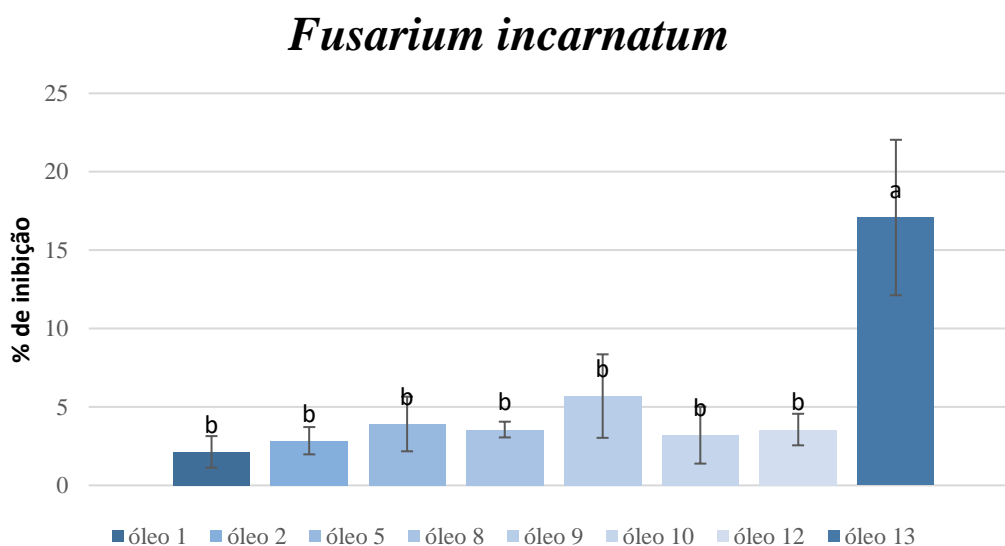


Figura 11- Percentagens de inibição do fungo *Fusarium incarnatum* pelas formulações à base de óleos essenciais. As barras representam médias $\pm \sigma$. Diferentes letras por cima das colunas representam diferenças significativas (teste *Duncan*)

No entanto, neste trabalho decidiu-se utilizar duas formulações de origem vegetal por doença e os óleos 5, 9 e 12 apresentavam os segundos melhores resultados. Apesar de não terem diferenças entre si, foi escolhido o óleo essencial 12, pois mostrou a melhor capacidade de inibição do fungo *Botrytis cinerea*.

Nas restantes formulações não se observaram diferenças na capacidade inibitória.

4.1.1.2. *Botrytis Cinerea*

Foi observado um efeito significativo das formulações na inibição do fungo *Botrytis cinerea*, presente na Figura 12 (ANOVA, $F = 4,046$, $p = 0,011$).

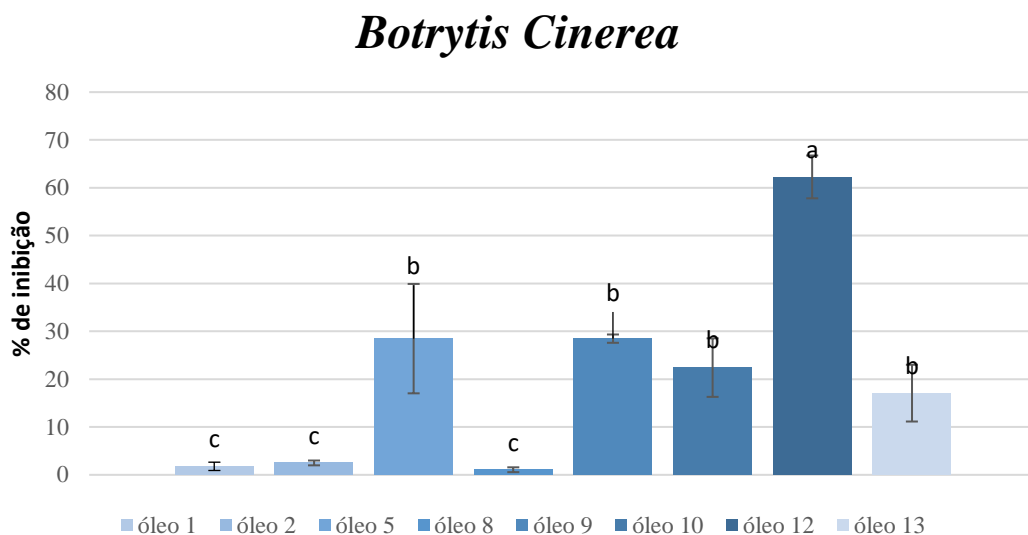


Figura 12- Percentagens de inibição do fungo *Botrytis cinerea* pelas formulações de origem vegetal. As barras representam médias $\pm \sigma$

Na Figura 12, observamos que o óleo essencial 12 apresentou melhor desempenho, seguido pelos óleos 5 e 9. Estes resultados indicam a existência de três grupos distintos, sendo que a formulação 12 se diferencia significativamente das demais, conforme evidenciado na própria Figura 12. Em contraste, como mostrado na Figura 12, as formulações 5, 9 e 10 não apresentaram diferenças significativas entre si.

Foi escolhido o óleo 5 devido à sua composição específica, que inclui tanto timol quanto óleo de orégão, permitindo avaliar a eficácia da combinação de dois óleos distintos, em comparação ao óleo 9, que contém apenas timol.

4.1.2. Formulações de base bacteriana

Relativamente à eficácia das formulações de base bacteriana (Figura 13 e Figura 14), observou-se uma maior inibição de *Fusarium incarnatum* pela formulação *whole broth* relativamente à formulação *Cell free* (73,74% e 50,72%, respectivamente). Quanto à inibição de *Botrytis cinerea*, apesar da formulação *Cell free* ser ligeiramente superior à formulação *Whole broth* (83,70% e 71,38%, respectivamente) ambas mostraram elevadas percentagens de inibição (Figura 14).

Fusarium incarnatum

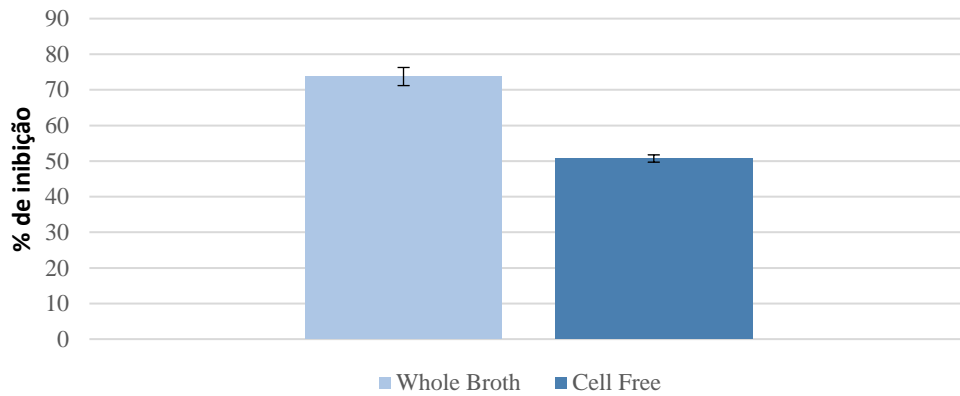


Figura 13- Representação gráfica das percentagens de inibição dos tratamentos do fungo *Fusarium incarnatum* com as formulações de base bacteriana. As barras representam médias $\pm \sigma$

Botrytis Cinerea

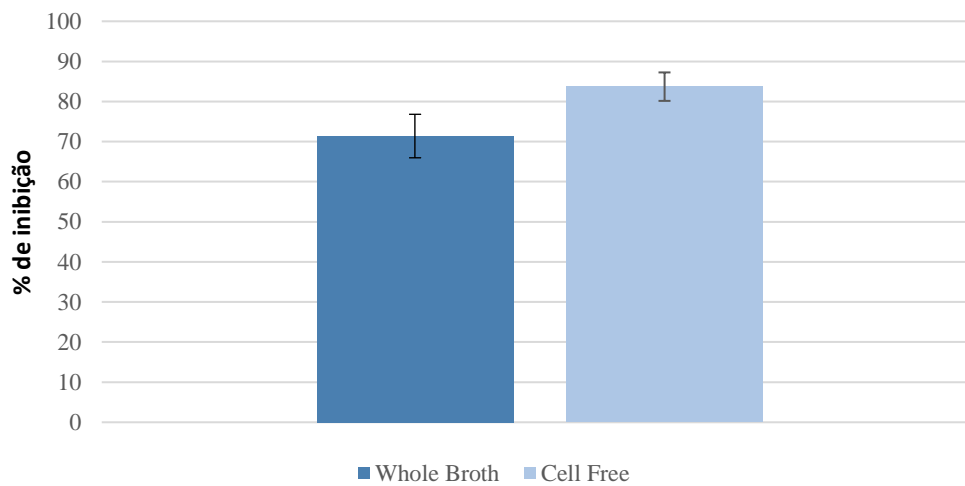


Figura 14- Representação gráfica das percentagens de inibição dos tratamentos do fungo *Botrytis Cinerea* com as formulações de base bacteriana. As barras representam médias $\pm \sigma$

Recorreu-se ao teste *t-student* para aferir se os valores das médias eram significativamente diferentes entre si.

Tabela 1- Resultados do teste t-student para o *Fusarium incarnatum*, $\alpha=0,05$.

Teste T-student	
T	11,874
p-value	<0,001

Tabela 2- Resultados do teste t-student para o *Botrytis Cinerea*, $\alpha=0,05$.

Teste T-student	
T	-2,689
p-value	0,055

Observando os resultados presentes na Tabela 1 e na Tabela 2 concluímos que para o *Fusarium incarnatum* há diferenças significativas entre as médias (visto que o p-value é inferior a α) e para o *Botrytis cinerea* não há (visto que o p-value é superior a α).

Por esse motivo, como industrialmente é mais dispendioso a produção de formulações livres de células, foi testada apenas a formulação *Whole Broth* na avaliação de eficácia nos ensaios em estufa.

4.2. Avaliação das bioformulações no controlo das doenças Fusariose e Podridão cinzenta na cultura do morango

Como mencionado no subcapítulo anterior (4.1.1. Formulações à base de óleos), após a análise dos resultados obtidos dos testes *in vitro* escolheram-se 3 formulações de origem vegetal (formulações 5, 12 e 13) e uma com base bacteriana para testar no controlo da doença Fusariose, provocada pelo fungo *Fusarium incarnatum* e podridão cinzenta provocada pelo fungo *Botrytis* sp., em plantas de morangueiro.



Figura 15- Morangueiros utilizados no ensaio na altura da floração e desenvolvimento dos primeiros frutos.

De forma a comparar os resultados obtidos nos tratamentos com produtos comerciais cuja eficácia já era conhecida, utilizámos como referência positiva biológica, o *Senerade*, e um produto como referência positiva química, o *Switch*.



Figura 16- Ensaio com a doença Podridão cinzenta à esquerda e ensaio com Fusariose à direita.

4.2.1. Análise da doença Fusariose na cultura do morango

4.2.1.1. Análise da frequência da doença Fusariose

Esta análise foi feita a partir da contagem do número de plantas com sintomas das doenças ao longo do ensaio, e os resultados estão presentes na Figura 17.

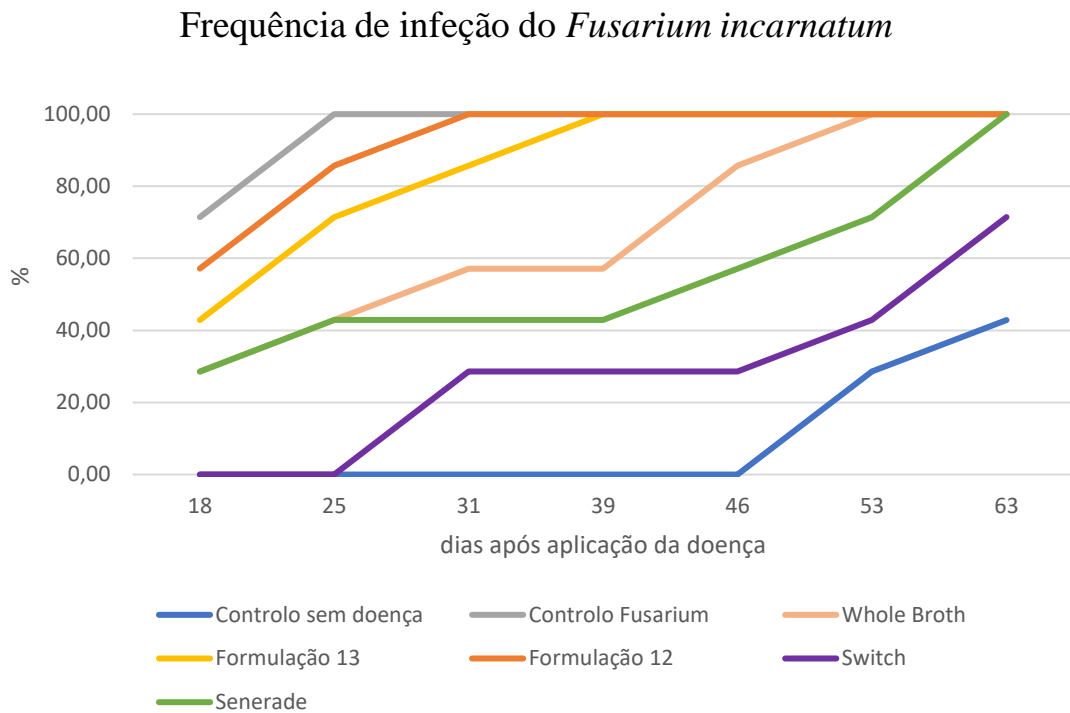


Figura 17- Frequência da doença Fusariose, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio.

Como era expectável as plantas onde não se aplicou a doença foram as que obtiveram os valores menores de frequência das doenças. O facto de os valores obtidos da frequência das doenças não serem nulos, pode ser atribuído a uma possível contaminação cruzada.

O gráfico da Figura 17, mostra que as referências positivas testadas, *Senerade* e *Switch* (linha verde e roxa, respetivamente), conseguiram retardar a doença durante mais tempo, obtendo com estes produtos os melhores resultados no tratamento destas plantas.

De referir que nos primeiros 25 dias após aplicação da doença, a formulação de base bacteriana conseguiu atingir os mesmos resultados que a referência positiva biológica. No entanto, após esta data, os valores da formulação *Whole broth* (linha laranja-claro) demonstram que esta formulação não consegue retardar a evolução da doença da mesma forma que a referência positiva biológica, *Senerade*.

Comparando as 3 formulações utilizadas neste projeto com o objetivo de controlo da doença, concluímos que a formulação 12 (linha laranja-escuro) atrasa a propagação

geral da doença em 6 dias, a formulação 13 (linha amarela) em 14 dias e a *Whole Broth* em 28 dias.

Estes resultados mostram que, ao aplicar as formulações em teste, o agricultor consegue atrasar a contaminação total da cultura. Este atraso, permite ao agricultor retirar a plantas infetadas e tratar o solo de forma a conseguir que a doença não se propague, evitando assim uma perda total da cultura.

4.2.1.2. Avaliação da Severidade da doença Fusariose

Esta análise tem como base o grau de extensão da doença, e os resultados estão presentes na Figura 18.

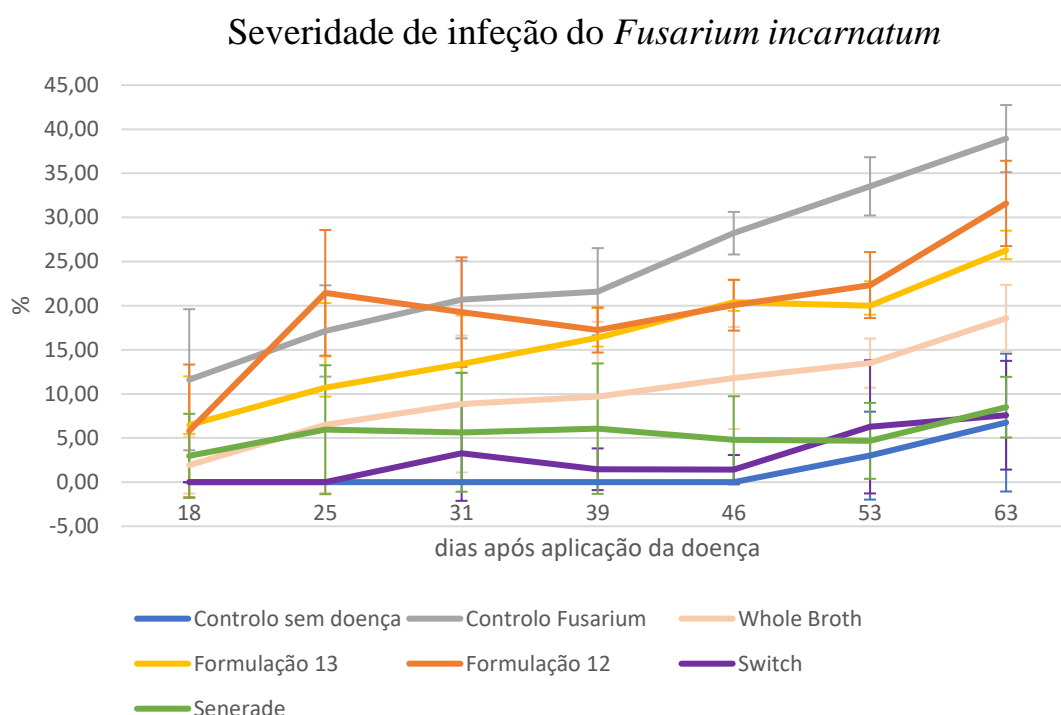


Figura 18- Representação gráfica da severidade da doença Fusariose, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio. As linhas representam médias $\pm \sigma$.

A Figura 18 representa a evolução da severidade da infeção com a doença Fusariose em morangueiros, considerando diferentes tratamentos ao longo de 63 dias após a aplicação do fungo *Fusarium incarnatum*.

O Controlo *Fusarium* (linha cinzenta) refere-se ao controle da doença em que o fungo *Fusarium* foi inoculado, mas nenhum tratamento foi aplicado. Como esperado, este grupo mostrou uma tendência claramente crescente ao longo do tempo, atingindo os

níveis mais elevados de severidade entre todos os grupos analisados. Este resultado confirma a previsão de que, sem tratamento, a severidade da doença aumenta significativamente.

Por outro lado, os tratamentos efetuados com as referências positivas, *Serenade* (linha verde) e *Switch* (linha roxa) demonstraram melhores resultados, mantendo a severidade da doença em níveis baixos durante todo o período de estudo.

A formulação bacteriana Whole Broth (linha laranja-clara) demonstrou uma eficácia moderada. Embora não tenha alcançado o desempenho dos tratamentos comerciais (*Serenade* e *Switch*), apresentou níveis de severidade menores em comparação com as Formulações 12 e 13 (linhas laranja e amarela, respetivamente). Este comportamento sugere que Whole Broth possui uma capacidade de inibição da doença relativamente maior do que as outras formulações experimentais.

As Formulações 12 e 13 (linhas laranja e amarela, respetivamente) mostraram uma eficácia intermediária, com a Formulação 12 a ter um desempenho levemente melhor que a 13. No entanto, ambas ainda precisam de ser aprimoradas para alcançarem níveis de inibição da doença comparáveis aos dos produtos comerciais.

Estes resultados destacam a necessidade de otimização das bioformulações desenvolvidas, mas também indicam que existe um potencial considerável para o uso destas formulações como parte de uma estratégia de manejo integrado de doenças. Combinadas com outros métodos de controlo, essas bioformulações podem desempenhar um papel importante na proteção de culturas contra a Fusariose.

4.2.1.3. Análise do peso fresco da cultura do morango infetada pela doença *Fusariose*

A biomassa das plantas foi analisada em todos os tratamentos, pesando as plantas e obtendo uma média por tratamento e doença.

Analisando a Figura 19, observa-se que todos os tratamentos aplicados resultaram em pesos frescos superiores aos do controlo com doença, indicando um impacto positivo no controlo da fusariose. Estatisticamente, não foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos, o que sugere que nenhum dos tratamentos se destaca em relação ao controlo com doença. No entanto é necessário salientar que as condições deste trabalho, naturalmente, não são as mesmas condições que a cultura teria em campo, pelo que não podemos garantir que os resultados sejam os mesmos.

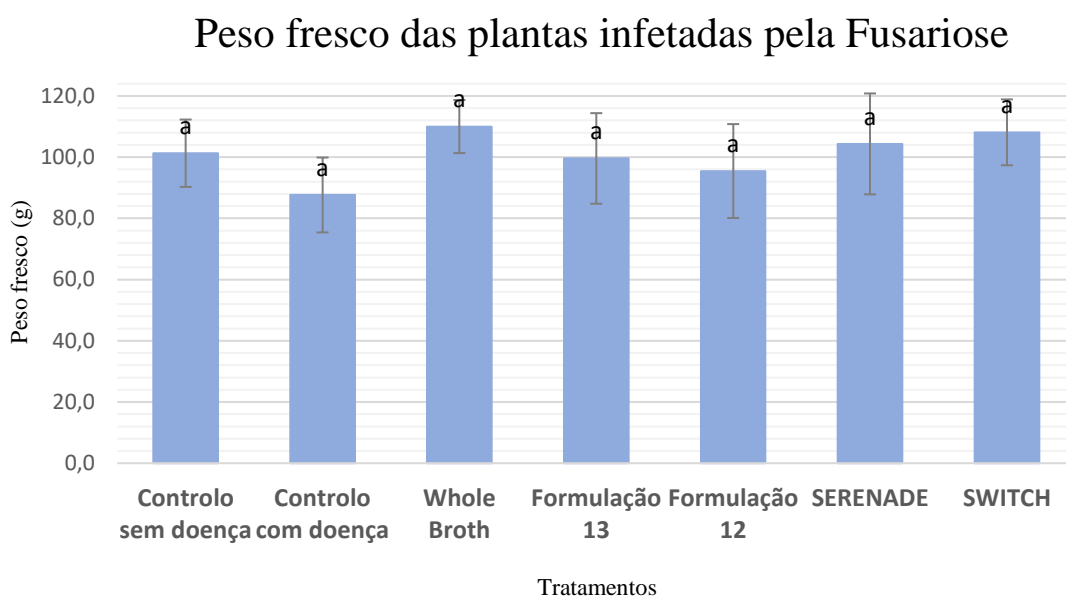


Figura 19- Gráfico de barras referente ao peso fresco das plantas infetadas pela Fusariose. As barras representam médias $\pm \sigma$.

A Tabela 3 apresenta as percentagens de incremento de peso fresco dos diversos tratamentos em comparação com o controlo positivo.

Tabela 3- Percentagem de incremento de peso fresco dos vários tratamentos relativamente ao controlo positivo, da Fusariose.

% de incrementos relativos ao controlo positivo	
Controlo sem doença	16 %
Whole Broth	25 %
Formulação 12	14 %
Formulação 13	9 %
Serenade	19 %
Switch	23 %

O produto *Whole Broth* mostrou um incremento de 25%, valor semelhante ao obtido com o *Switch* (23%), que é uma das nossas referências positivas.

A Formulação 12 apresentou um incremento de 14%, ligeiramente superior ao da Formulação 13, que alcançou 9%. Apesar disso, nenhuma das formulações de base vegetal superou os resultados das referências positivas.

De salientar que os tratamentos formulados neste projeto permitiram que as plantas atingissem pesos próximos aos observados no controlo sem doença, sugerindo que o uso desses produtos ajudou a mitigar os efeitos negativos da Fusariose no desenvolvimento das plantas. A relação entre o peso fresco das plantas e a severidade da doença, indica que os tratamentos foram eficazes em reduzir o impacto da Fusariose, mesmo que as diferenças entre os tratamentos não sejam estatisticamente significativas.

4.2.1.4. Análise da produção da cultura do morango infetada pela doença *Fusariose*

A produção demonstra-nos o peso fresco da quantidade de morangos que houve, por tratamento, ao longo do ensaio.

Analisando o gráfico presente na Figura 20, podemos concluir que o tratamento que obteve melhores resultados de produção foi a referência positiva química *Switch*.

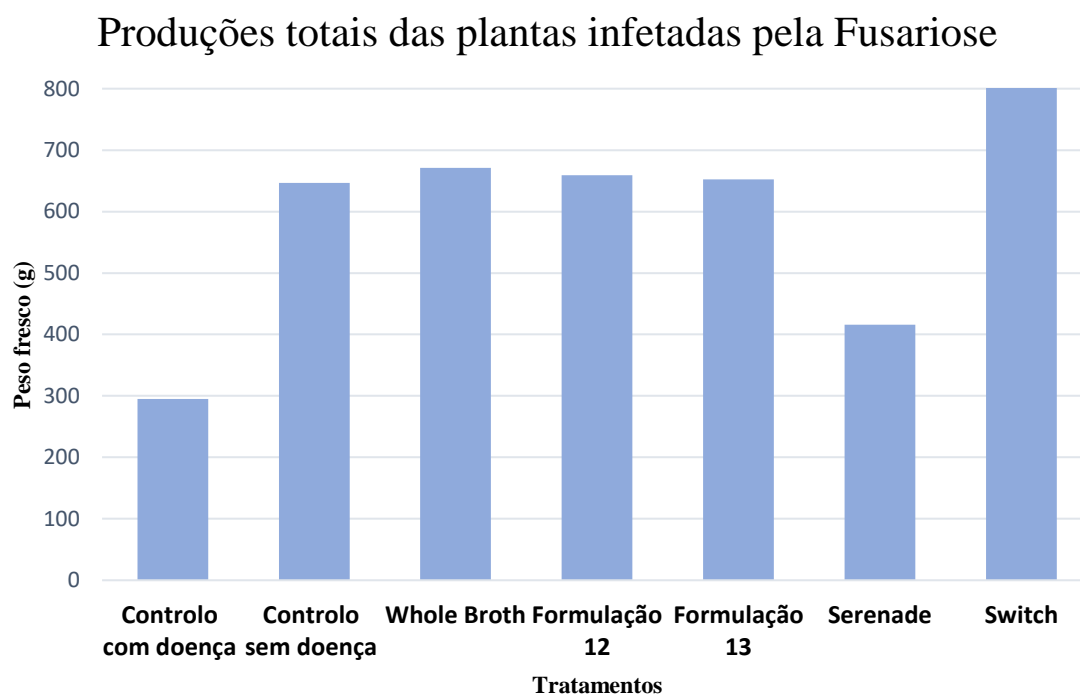


Figura 20- Gráfico de barras referente às produções das plantas infetadas pela Fusariose, por tratamento.

Todos os tratamentos obtiveram produções bastante superiores (Tabela 4) ao controlo com doença, o que nos prova que os produtos formulados têm um impacto positivo na produção de plantas já infetadas.

Tabela 4- Percentagem de incremento da produção com os vários tratamentos na doença Fusariose.

Controlo sem doença	119 %
Whole Broth	127 %
Formulação 12	123 %
Formulação 13	120 %
Serenade	41 %
Switch	242 %

As formulações realizadas neste projeto obtiveram melhores resultados que a referência positiva biológica e muito próximos do controlo sem doença, resultado bastante interessante visto que a produção de uma cultura é um ponto muito importante e determinante para os agricultores.

4.2.2. Avaliação da doença Podridão Cinzenta na cultura do morango

4.2.2.1. Análise da Frequência da doença Podridão Cinzenta

Esta análise foi feita a partir da contagem do número de plantas com sintomas da doença ao longo do ensaio e os resultados estão presentes na Figura 21.

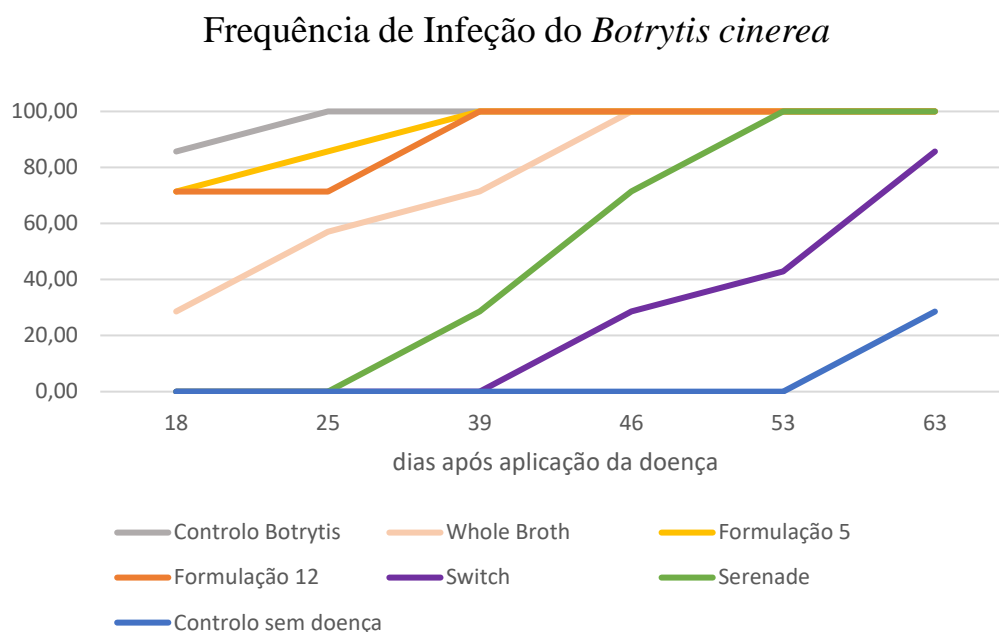


Figura 21- Frequência da doença Podridão Cinzenta, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio.

Comparando as formulações desenvolvidas neste projeto para o controlo *Botrytis*, podemos concluir que essas formulações foram capazes de controlar e retardar o progresso da doença por períodos limitados.

Como era esperado, o controlo *Botrytis* atingiu rapidamente os 100% de infecção por volta dos 25 dias após a aplicação da doença, indicando a alta agressividade de *Botrytis cinerea* na ausência de tratamento.

Entre as formulações testadas, a *Whole Broth* (linha laranja-claro), de base bacteriana, retardou a infecção mais eficazmente, mantendo-a abaixo de 80% até aproximadamente 53 dias após infecção.

A Formulação 5 (linha amarela), começaram a mostrar sinais de infecção por volta dos 25 dias após infecção, atingindo cerca de 80% após 46 dias e 100% 63 dias após aplicação da doença.

A Formulação 12 (linha laranja-escura), mostrou um desempenho semelhante, mas com uma progressão um pouco mais rápida, alcançando cerca de 60% de infecção aos 53 dias e 100% aos 63 dias após infecção.

Ao observarmos a Figura 21, verificamos que o tratamento com *Switch* (linha roxa) demonstrou ser o mais eficaz, mantendo a frequência de infecção consistentemente baixa ao longo de todo o ensaio, chegando a apenas 20% de infecção até os 63 dias.

A Podridão Cinzenta é uma doença que se propaga por meio de esporos que podem ser transportados pelo vento, água, insetos, etc. Estes resultados são muito promissores no sentido preventivo pois, ao aplicar as formulações testadas neste projeto, o agricultor conseguia retirar as plantas infetadas antes de a doença se propagar por toda a cultura.

4.2.2.1. Avaliação da Severidade da doença Podridão Cinzenta

Foi analisada a severidade da doença que é baseada no grau de extensão da doença e os resultados estão presentes na Figura 22.

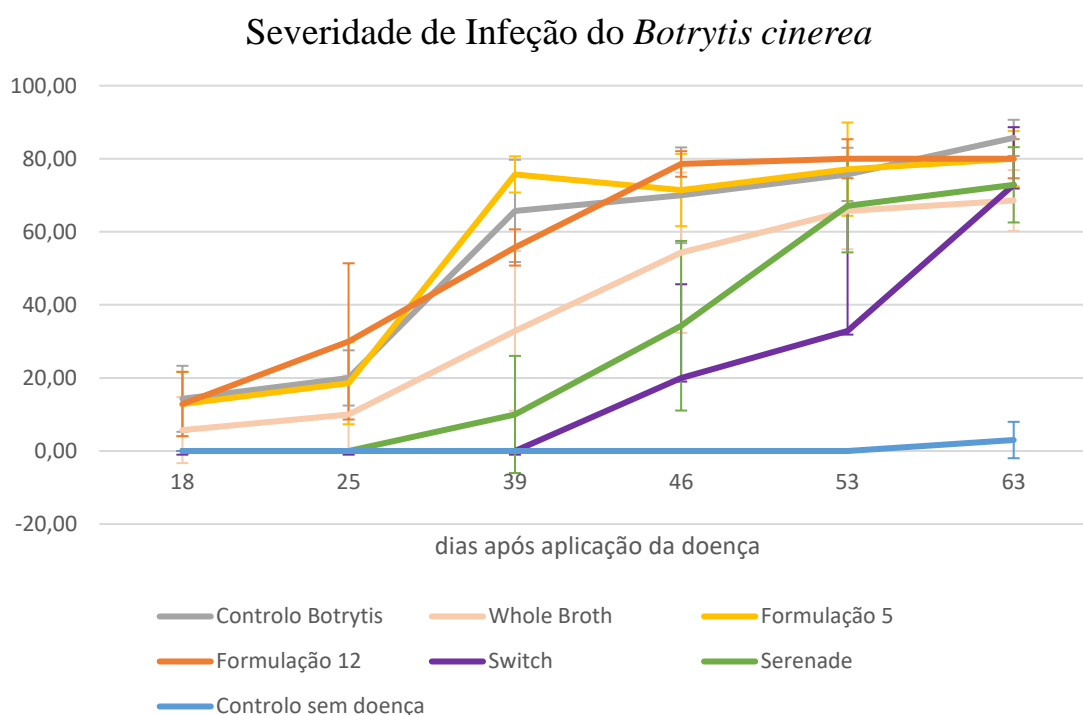


Figura 22-Severidade da doença Podridão Cinzenta, com os vários tratamentos, ao longo do ensaio. As linhas representam médias $\pm \sigma$.

A Figura 22 apresenta a evolução da severidade da infecção com a doença Podridão Cinzenta ao longo de 63 dias após a aplicação do fungo, comparando diferentes tratamentos aplicados.

O grupo de Controlo sem doença (linha azul-clara) mantém consistentemente uma severidade de 0% durante todo o período de estudo, confirmando a ausência de *Botrytis cinerea* neste grupo, como esperado. Em contrapartida, o Controlo *Botrytis* (linha cinzenta), que não recebeu tratamento, revela uma tendência crescente na severidade da doença, atingindo aproximadamente 80% entre os dias 39 e 63 após infecção. Este resultado confirma que a infecção se desenvolve de forma progressiva e intensa na ausência de medidas de controlo, servindo como referência para avaliar a eficácia dos tratamentos aplicados.

O tratamento com *Switch* (linha roxa) destaca-se por ser o mais eficaz entre os testados, mantendo a severidade da doença baixa durante a maior parte do estudo. Nos primeiros 39 dias, a severidade permanece abaixo de 20%, e mesmo no final do período de observação, não ultrapassa os 80%. Este desempenho sugere que o *Switch* proporciona um efeito protetor prolongado, retardando significativamente o avanço da infecção em comparação com outros tratamentos.

O tratamento com o Serenade (linha verde) também demonstra uma eficácia notável, especialmente nos primeiros 46 dias, onde a severidade é mantida em níveis baixos, similares aos do *Switch*. No entanto, a partir do dia 53, observa-se um aumento menos acentuado, atingindo aproximadamente 70% ao final do período. Na fase final do estudo, ambos os tratamentos com produtos comerciais demonstram uma capacidade significativa de controlar a infecção.

A Formulação *Whole Broth* (linha laranja-clara) apresenta uma eficácia moderada. A severidade da infecção aumenta progressivamente, mas de forma mais contida em comparação com o Controlo *Botrytis*, sugerindo algum nível de proteção. Este tratamento não é tão eficaz quanto o Serenade ou o *Switch*, mas ainda assim consegue limitar o progresso da doença em relação às outras formulações testadas.

As Formulações 5 e 12 (linhas amarela e laranja-escura, respetivamente) mostram resultados menos promissores. A Formulação 5, inicialmente apresenta uma pior capacidade de inibição da doença, atingindo um pico ao redor dos 80% por volta do dia 39 após infecção, e permanece com valores elevados de severidade até o final do estudo. A Formulação 12, segue um padrão semelhante, embora com um aumento mais gradual,

estabilizando em torno de 80% nos últimos dias. Esses resultados indicam uma eficácia limitada destas formulações no controlo da infeção.

No geral, os resultados indicam que, embora o Serenade e o Switch continuem as opções mais eficazes para o tratamento de *Botrytis cinerea*, há um potencial promissor para o desenvolvimento de novos produtos biológicos, como o *Whole Broth*.

No entanto, as Formulações 5 e 12 precisam de melhorias significativas para serem consideradas alternativas viáveis. A combinação, ou sequenciamento de diferentes tratamentos pode ser uma abordagem promissora para melhorar a gestão da doença a longo prazo, especialmente em sistemas de manejo integrado.

4.2.2.2. Análise do peso fresco da cultura do morango infetada pela doença Podridão cinzenta

Na figura Figura 23 podemos analisar o peso fresco das plantas de todos os tratamentos, pesando as mesmas e obtendo uma média por tratamento.

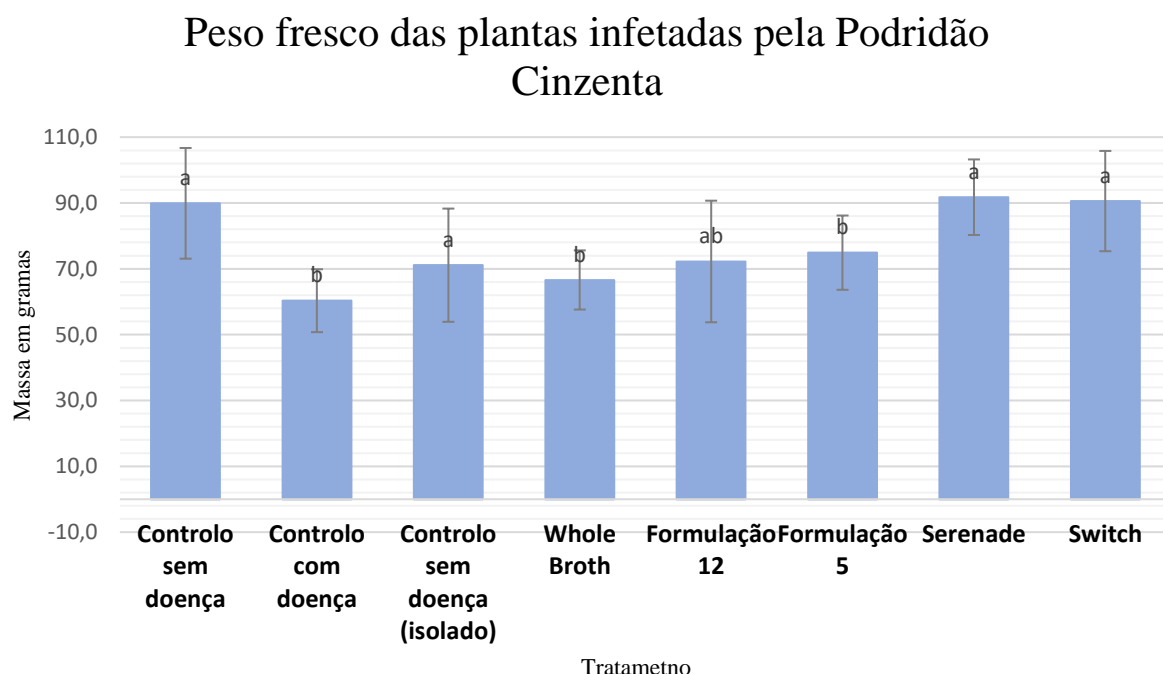


Figura 23- Gráfico de barras referente ao peso fresco das plantas infetadas pela Podridão Cinzenta. As barras representam médias $\pm \sigma$.

Observando a Figura 23, vemos que todos os tratamentos alcançaram massas superiores ao controlo com doença. No entanto, a partir da análise estatística (ANOVA $F=4.046$, $p=0.011$) conseguimos ver que a formulação 5, 12 e a *Whole Broth* não diferem significativamente do controlo com doença.

Os melhores resultados obtidos foram com o tratamento *Serenade* e *Switch*, que não diferem significativamente entre si e que também não diferem, significativamente, das plantas sem doença.

A Tabela 5 detalha as percentagens de incremento de peso fresco dos diversos tratamentos em comparação com o controlo positivo que é o controlo com doença.

Tabela 5- Percentagem de incremento de peso fresco dos vários tratamentos relativamente ao controlo positivo, da Podridão cinzenta.

% de incrementos relativos ao controlo positivo	
Controlo sem doença	49
Controlo sem doença (isolado)	18
Whole Broth	10
Formulação 12	20
Formulação 5	24
Serenade	52
Switch	50

Os tratamentos *Serenade* e *Switch* destacaram-se com os maiores incrementos de peso fresco, alcançando 52% e 50%, respetivamente, e não diferem significativamente entre si, nem em relação ao controlo sem doença. Por outro lado, a Formulação 5 apresentou um incremento de 24%, ligeiramente superior ao da Formulação 12 (20%) e ao do *Whole Broth* (10%).

Todos os tratamentos demonstraram pesos frescos superiores ao controlo com doença, evidenciando um impacto positivo na produtividade das plantas. Contudo, nenhum dos tratamentos alcançou os níveis de produção do controlo sem doença, indicando que a Podridão Cinzenta ainda afetou o desenvolvimento das plantas, apesar do aumento de peso fresco observado.

Não se calculou a produção no caso da doença Podridão Cinzenta pois, como mencionámos anteriormente, quando infetada, a planta fica com frutos podres, logo não é possível contabilizar como frutos para consumo.

5. Conclusão

Este projeto teve como foco principal o desenvolvimento de bioformulações à base de compostos vegetais e bacterianos com o objetivo de controlar duas das doenças fúngicas mais destrutivas na cultura do morango: a Fusariose, causada por *Fusarium incarnatum*, e a Podridão Cinzenta, causada por *Botrytis cinerea*. O estudo foi realizado no âmbito de uma colaboração entre a Escola Superior Agrária de Santarém e a empresa Asfertglobal, onde todas as etapas experimentais foram conduzidas.

O trabalho desenvolvido ao longo de um ano, entre dezembro de 2022 e novembro de 2023, incluíram a formulação de vários produtos compostos por extratos vegetais e de culturas bacterianas, seguidos por testes de estabilidade e envelhecimento para selecionar as formulações mais promissoras. Essas formulações foram posteriormente submetidas a ensaios de antagonismo *in vitro* contra os fungos alvo e, na fase final, testadas diretamente em morangueiro para avaliar sua eficácia no controlo das doenças.

Os resultados obtidos mostraram que tanto as formulações de base vegetais quanto as de base bacterianas, *in vitro*, possuem um potencial significativo para inibir o crescimento de *Fusarium incarnatum* e *Botrytis cinerea*. No entanto, quando aplicadas em morangueiros infetados, as formulações não atingiram a mesma eficácia observada nos testes *in vitro*. Apesar de terem contribuído para a redução da frequência e severidade das doenças, os níveis de controlo alcançados ficaram abaixo dos proporcionados pelos produtos comerciais de referência atualmente disponíveis no mercado.

Entre as formulações testadas, a formulação bacteriana denominada *Whole Broth*, que consiste em células bacterianas e seus metabolitos excretados, destacou-se significativamente. Este produto mostrou-se particularmente eficaz, apresentando resultados que se aproximaram dos produtos comerciais de referência em termos de controlo das doenças Fusariose e Podridão cinzenta. Estes resultados indicam que a formulação *Whole Broth* tem um grande potencial para ser desenvolvida como uma alternativa viável e sustentável aos fungicidas químicos tradicionais.

Contudo, os resultados obtidos sugerem que, para que essas bioformulações possam competir de igual para igual com os produtos comerciais existentes, nomeadamente *Serenade* e *Switch*, ainda são necessárias melhorias nas suas composições. A eficácia das formulações quando aplicadas em condições reais de campo precisa ser otimizada, e estudos adicionais sobre a dose e a frequência da aplicação podem contribuir para a obtenção de melhores resultados. Além disso, a estabilidade e a

durabilidade dos produtos sob diferentes condições climáticas e de armazenamento devem ser avaliadas em estudos futuros.

Em um estudo semelhante, Iqbal *et al.* testaram o potencial de biocontrole de *Aureobasidium pullulans* contra o fungo *Botrytis cinerea* e *Phytophthora cactorum* em morangueiros, tanto *in vitro* em condições semelhantes às utilizadas neste trabalho. Os resultados mostraram uma maior eficácia do agente biológico quando aplicado de forma preventiva. O estudo sugere que a pré-aplicação do biocontrolador pode maximizar o seu efeito, evidenciando a necessidade de otimização para alcançar um bom desempenho em campo. Ambos os estudos demonstraram que, embora os biocontroladores mostrem potencial significativo *in vitro*, ambos os estudos indicam que ainda há desafios para alcançar a mesma eficácia em condições reais de campo, quando comparados aos fungicidas comerciais. Portanto, há necessidade de aprimorar as formulações biológicas e as suas aplicações (Iqbal *et al.*, 2021).

Outro ponto crucial que emergiu deste estudo é a importância de desenvolver soluções fitossanitárias que sejam, não apenas eficazes, mas também economicamente viáveis para os agricultores. Considerando as tendências atuais de mercado e as crescentes restrições regulatórias quanto ao uso de produtos químicos na agricultura, há uma oportunidade significativa para a inserção de produtos biológicos, como os desenvolvidos neste projeto, no mercado agrícola. No entanto, para que essas soluções sejam adotadas em larga escala, é fundamental que se demonstre não apenas a eficácia biológica, mas também a viabilidade econômica.

Este projeto, ao explorar e validar o potencial de bioformulações para o controle de doenças fúngicas em morangueiros, contribui de forma significativa para o avanço da agricultura sustentável, proporcionando uma base sólida para futuras pesquisas que podem se concentrar em aprimorar as formulações existentes, bem como em desenvolver novas combinações de compostos bioativos que possam atuar sinergicamente para aumentar a eficácia dos tratamentos. Além disso, a integração de estudos sobre o impacto ambiental destas bioformulações será essencial para garantir que os produtos desenvolvidos ofereçam uma solução realmente sustentável e segura para o meio ambiente e para a continuidade da atividade.

Em suma, o trabalho realizado pretende salientar a importância e urgência no desenvolvimento de alternativas biológicas para o controle de doenças fúngicas em culturas agrícolas. Embora os resultados até agora sejam promissores, eles também ressaltam a necessidade contínua de pesquisa e desenvolvimento para superar os desafios

remanescentes. Com a crescente demanda por práticas agrícolas sustentáveis, o sucesso de projetos como este poderá ter um impacto significativo na forma como as doenças das plantas são geridas no futuro, promovendo uma agricultura que é ao mesmo tempo produtiva e responsável do ponto de vista ambiental.

6. Bibliografia

- Lorena Panassolo. (n.d.). *7 frutas que devemos plantar na primavera - CicloVivo*. Retrieved November 18, 2024, from <https://ciclovivo.com.br/mao-na-massa/horta/7-frutas-que-devemos-plantar-na-primavera/>
- Bettiol, W., Augusto, M., Morandi, B., Vegette, Z., Trazilbo, P., De, J., Élide, P. J., Corrêa, B., Bittencourt, A., Cleusa, M., Lucon, M. M., De Cássia, J., Costa, B., & Bezerra, J. L. (2012). *Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas*. <http://www.cnpma.embrapa.br>
- Bishnu P. Chapagain, & Zeev Wiesman. (2007). *In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi*.
- C. L. Wilson, R. P. P. J. M. S. C. A. E. G. V. S. (1997). *Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against Botrytis cinerea*.
- Caroline Luiz. (2018). *Fungos no morangueiro - Como controlar doenças fúngicas em morangueiro - Maneje Bem - Fitocon*. <https://www.manejebem.com.br/publicacao/novidades/fungos-no-morangueiro-como-controlar-doencas-fungicas-em-morangueiro>
- Comercialização de morango cresce entre agosto e janeiro, época de colheita do fruto*. (n.d.). Retrieved November 18, 2024, from <https://camposgeraisrural.com.br/noticia/88/comercializacao-de-morango-cresce-entre-agosto-e-janeiro-epoca-de-colheita-do-fruto>
- Comissão Europeia. (2011). *Regulamento(UE) N.o 508/2011 da comissão de 24 de Maio de 2011*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0508&from=PT>
- Es-Soufi, R., Tahiri, H., Azaroual, L., El Oualkadi, A., Martin, P., Badoc, A., & Lamarti, A. (2020). Biocontrol Potential of Bacillus amyloliquefaciens Bc2 and Trichoderma harzianum TR against Strawberry Anthracnose under Laboratory and Field Conditions. In *Agricultural Sciences* (Vol. 11, Issue 03). Scientific Research Publishing, Inc. <https://doi.org/10.4236/as.2020.113017>
- Fragaria × ananassa “Seascape” - PictureThis*. (n.d.). Retrieved December 13, 2023, from https://www.picturethisai.com/pt/wiki/Fragaria_%C3%97_ananassa__Seascape_.html

- Fragaria vesca. (n.d.). *Tropicos.Org. Missouri Botanical Garden*. Retrieved December 13, 2023, from <http://www.tropicos.org/Name/27800061>
- Fragaria vesca L. (n.d.). Jardim Botânico Utad. Retrieved December 13, 2023, from https://jb.utad.pt/especie/Fragaria_vesca_subesp_vesca
- Grazia Trebbi, Lorenzo negri, & Sara Bosi. (2021). Evaluation of Equisetum arvense (Horsetail Macerate) as a Copper Substitute for Pathogen Management in Field-Grown Organic Tomato and Durum Wheat Cultivations. *MDPI*.
- Hong, S., Kim, T. Y., Won, S. J., Moon, J. H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S. (2022). Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using Bacillus velezensis CE 100. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>
- Iqbal, M., Jamshaid, M., Zahid, M. A., Andreasson, E., Vetukuri, R. R., & Stenberg, J. A. (2021). Biological control of strawberry crown rot, root rot and grey mould by the beneficial fungus Aureobasidium pullulans. *BioControl*, 66(4), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10083-w>
- Jacinta Campo. (2007). *Ocorrência dos diversos inimigos das culturas de morangueiro e de framboesa*.
- Jianguo Feng, Rong Wang, Zhiyang Chen, & Shengwei Zhang. (2020). *Formulation optimization of D-limonene-loaded nanoemulsions as a natural and efficient biopesticide*.
- Kamlesh R. Chauhan, Thanh C. Le, Praveen Kumar Chintakunta, & Dilip K. Lakshman. (2017). Phyto-Fungicides: Structure Activity Relationships of the Thymol Derivatives against Rhizoctonia solani. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*.
- Khan, A. B. , et al. (2020). *Antifungal Activity of Nettle (Urtica dioica L.) Extracts*.
- Lavras, M. (2012). *Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e Trichoderma spp.*
- Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., & Coutte, F. (2022). Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by Bacillus subtilis as Biocontrol Products against Apple Scab (Venturia inaequalis). In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>
- Malta, B. M. (2017). *Epidemiologia e manejo do mofo cinzento no morango*.

- Morangos Albion*. (n.d.). Retrieved December 13, 2023, from <https://www.plantarportugal.org/horticolas/morangos-albion>
- Morangos San Andreas - PLANTAR PORTUGAL*. (n.d.). Retrieved December 13, 2023, from <https://www.plantarportugal.org/index.php/horticolas/morangos-san-andreas.html>
- Oerke, E. C. (2012). Global Crop Losses Due to Diseases and Pests. *Food Security*.
- Ootani, M. A., Wagner Aguiar, R., Carlos, A., Ramos, C., Rocha Brito, D., Batista Da Silva, J., João, E., & Cajazeira, P. (2013). Journal of Biotechnology and Biodiversity Use of Essential Oils in Agriculture. *J. Biotec. Biodivers.* v, 4(2), 162–174.
- Palha, M. da G. (2005). *Manual do Morangueiro*.
- Palha, M. da G. (2020). Apostar na competitividade e na sustentabilidade do morango em Portugal. In *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P)*. <http://www.fao.org/>
- Patel, J., & Singh, D. (2019). Pesticide Residues and Their Impact on Ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Pires, A., Matos, D. E., Zilton, ;, Maciel Cordeiro, J., & Haddad, ; Fernando. (2012). *FUSARIOSE EM FRUTÍFERAS*.
- Pretty, J. (2008). *Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2163>
- Silva, S. (2019). *Óleos essenciais no controle de Fusarium sp. na cultura do Coentro*.
- Strawberry Licensing Program*. (n.d.). Retrieved November 8, 2023, from <https://itc.ucdavis.edu/strawberry-licensing-program/#toggle-id-15>
- Töfoli, J. G., & Domingues, R. J. (2005). Morango, controle adequado. In *Revista Cultivar-out*.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2020). Crop protection against botrytis cinerea by rhizosphere biological control agent bacillus velezensis XT1. *Microorganisms*, 8(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070992>
- Variedades - MAAE*. (n.d.). Retrieved November 7, 2023, from <https://www.maae.pt/pt/variedades>
- Vladislav V. Oleynikov. (2020). *Antioxidant and antimicrobial properties of oregano extract (Origanum vulgare L.)*.
- William E. Fry. (1982). *Principles of Plant Disease Management*. 1982.
- yates. (n.d.). *How to Get Rid of Grey Mould in Your Garden | Yates Australia*. Retrieved November 18, 2024, from <https://www.yates.com.au/garden-hub/grey-mould/>

Anexos

Tabela A 1-1- Dados para realizar a avaliação da frequência do *Fusarium* in vivo.

Frequencia							
	05/mai/23	12/mai/23	18/mai/23	26/mai/23	02/jun/23	09/jun/23	19/jun/23
17/abr							
DATA							
	18	25	31	39	46	53	63
Controlo sem doença	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,57	42,86
Controlo <i>Fusarium</i>	71,43	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Whole Broth</i>	28,57	42,86	57,14	57,14	85,71	100,00	100,00
Formulação 13	42,86	71,43	85,71	100,00	100,00	100,00	100,00
Formulação 12	57,14	85,71	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Switch	0,00	0,00	28,57	28,57	28,57	42,90	71,43
Senerade	28,57	42,86	42,86	42,86	57,14	71,43	100,00

Tabela A 2- Dados para realizar a avaliação da Severidade do *Fusarium* in vivo

Severidade							
	05/mai/23	12/mai/23	18/mai/23	26/mai/23	02/jun/23	09/jun/23	19/jun/23
DATA							
	18	25	31	39	46	53	63
Controlo sem doença	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	6,75
Controlo <i>Fusarium</i>	11,61	17,13	20,70	21,59	28,22	33,53	38,94
<i>Whole Broth</i>	1,92	6,51	8,85	9,71	11,80	13,49	18,57
Formulação 13	6,47	10,69	13,41	16,36	20,41	19,98	26,27
Formulação 12	5,81	21,46	19,27	17,25	20,06	22,34	31,59
Switch	0,00	0,00	3,28	1,46	1,42	6,27	7,58
Senerade	2,98	5,94	5,65	6,07	4,79	4,68	8,50

Tabela A 3- 1- Dados para realizar os gráficos relativos à severidade do *Fusarium* in vivo.

Controlo sem doença	Grau	Grau	Grau	Grau	Grau	Grau	Grau
1	0	0	0	0	0	13	15
2	0	0	0	0	0	8	16
3	0	0	0	0	0	0	17
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
média	0	0	0	0	0	3	7
Desvio padrão	0	0	0	0	0	5	8

Controlo Fusarium							
1	13	28	25	21	26	33	40
2	20	18	26	19	27	32	33
3	18	13	25	33	32	36	35
4	11	21	17	19	30	40	38
5	20	13	18	18	24	29	45
6	0	14	20	22	28	31	40
7	0	13	14	19	30	33	42
média	12	17	21	22	28	34	39
Desvio padrão	8	5	4	5	2	3	4
Bacillus							
1	0	19	14	19	12	16	23
2	0	13	14	16	19	18	22
3	0	14	17	15	15	10	22
4	0	0	17	17	17	14	13
5	0	0	0	0	10	15	14
6	5	0	0	0	10	12	17
7	9	0	0	0	0	10	20
média	2	7	9	10	12	13	19
Desvio padrão	3	8	8	8	6	3	4
Formulação 12							
1	15	13	13	15	25	16	26
2	17	17	18	13	20	24	37
3	14	11	14	21	19	24	22
4	0	18	19	17	21	24	26
5	0	17	19	14	16	17	28
6	0	0	11	17	24	15	24
7	0	0	0	18	19	21	21
média	6	11	13	16	20	20	26
Desvio padrão	8	7	6	3	3	4	5
Formulação 13							
1	10	21	17	17	21	20	33
2	14	27	23	20	22	27	31
3	11	24	16	19	24	25	30
4	6	31	29	14	18	23	29
5	0	19	16	22	19	21	36
6	0	29	24	17	21	21	30
7	0	0	11	12	16	19	32
média	6	21	19	17	20	22	32
Desvio padrão	6	10	5	3	2	3	2
Switch							
1	0	0	14	0	0	0	11
2	0	0	9	0	4	15	15
3	0	0	0	6	3	0	5
4	0	0	0	0	0	19	16
5	0	0	0	0	0	11	6
6	0	0	0	4	4	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0

média	0	0	3	1	1	6	8
Desvio padrão	0	0	5	2	2	8	6
Serenade							
1	9	10	10	9	3	12	9
2	12	12	15	16	9	3	6
3	0	19	15	17	13	4	16
4	0	0	0	0	8	11	7
5	0	0	0	0	0	3	5
6	0	0	0	0	0	0	11
7	0	0	0	0	0	0	7
Média	3	6	6	6	5	5	8
Desvio padrão	5	7	7	7	5	4	3

Tabela A 4-Dados para realizar a avaliação da frequência do *Botrytis* in vivo.

Frequencia							
	17/04/2023	05/mar/23	12/mar/23	26/mar/23	02/abr/23	09/abr/23	19/abr/23
DATA							
	18	25	39	46	53	63	
Controlo <i>Botrytis</i>	85,70	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Whole Broth</i>	28,60	57,10	71,40	100,00	100,00	100,00	100,00
Formulação 5	71,40	85,70	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Formulação 12	71,40	71,40	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Switch	0,00	0,00	0,00	28,60	42,90	85,70	
Serenade	0,00	0,00	28,60	71,40	100,00	100,00	100,00
Controlo sem doença	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,57

Tabela A 5- Dados para realizar a avaliação da severidade do *Botrytis* in vivo.

Severidade							
	18	25	39	46	53	63	
DATA							
	14,29	20,00	65,71	70,00	75,71	85,71	
Controlo <i>Botrytis</i>	14,29	20,00	65,71	70,00	75,71	85,71	
<i>Whole Broth</i>	5,71	10,00	32,86	54,29	65,71	68,57	
Formulação 5	12,86	18,57	75,71	71,43	77,14	80,00	
Formulação 12	12,86	30,00	55,71	78,57	80,00	80,00	
Switch	0	0	0	20	32,85714	72,85714	
Serenade	0	0	10	34,28571	67,14286	72,85714	
Controlo sem doença	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	

Tabela A 6- Dados para realizar os gráficos relativos à severidade do *Botrytis in vivo*

Controlo <i>Botrytis</i>	Grau	Grau	Grau	Grau	Grau	Grau
1	2	3	8	5	8	9
2	2	2	5	8	8	9
3	3	1	8	8	8	9
4	1	3	5	7	8	9
5	1	2	7	8	8	8
6	1	2	8	5	7	8
7	0	1	5	8	6	8
média	1	2	7	7	8	9
Desvio padrão	8	5	4	5	2	3
Bacillus						
1	0	2	5	8	8	8
2	0	1	3	8	8	8
3	2	3	5	6	6	6
4	2	1	5	7	7	7
5	0	0	5	3	6	6
6	0	0	0	3	6	6
7	0	0	0	3	5	7
média	1	1	3	5	7	7
Desvio padrão	1	1	2	2	1	1
Formulação 12						
1	2	5	6	8	8	8
2	2	5	6	8	8	8
3	2	5	6	8	8	8
4	1	4	6	8	8	8
5	0	2	5	8	8	9
6	2	0	5	8	9	8
7	0	0	5	7	7	7
média	1	3	6	8	8	8
Desvio padrão	1	2	0	0	1	1
Formulação 5						
1	2	2	8	7	9	9
2	2	1	8	7	9	9
3	2	1	8	8	8	8
4	2	0	7	8	8	8
5	0	3	7	8	8	8
6	0	3	7	5	5	7
7	2	2	8	7	9	9
média	1	2	8	7	8	8
Desvio padrão	1	1	0	1	1	1
Switch	0	0	0	6	8	9
1	0	0	0	6	8	9

2	0	0	0	1	4	7
3	0	0	0	1	3	8
4	0	0	0	0	0	8
5	0	0	0	0	0	5
6	0	0	0	0	0	5
7	0	0	0	6	8	9
média	0	0	0	2	3	7
Desvio padrão	0	0	0	3	3	2
Serenade						
1	0	0	4	4	6	7
2	0	0	3	4	7	7
3	0	0	0	4	8	8
4	0	0	0	6	8	9
5	0	0	0	6	8	8
6	0	0	0	0	5	6
7	0	0	0	0	5	6
Média	0	0	1	3	7	7
Desvio padrão	0	0	2	2	1	1

Tabela A 7- Produções diárias dos morangueiros com *Fusarium*.

PRODUÇÕES DIÁRIAS								
Tratamento	17/mai	22/mai	26/mai	30/mai	02/jun	06/jun	09/jun	23/jun
ø C/ DOENÇA	112,3	54,3	31,1	22,2	8,6	39,7	27	0
ø S/ DOENÇA	147,7	132,9	68,6	52,7	80,2	30,5	75,6	58,6
BS36	73,2	118	163,8	93,3	25,7	41,9	43,7	111,4
Formulação 13	276,1	111	77,9	53,9	37,5	44,2	31,9	26,8
Formulação 12	210,8	75,8	99,4	82	35,4	69,3	23,5	56

Tabela A 8-Dados dos ensaios de antagonismo para tratamento estatístico

Antagonismo	<i>Fusarium</i>	<i>Botrytis</i>
BS36	77,34	77,17
BS36	71,94	72,83
BS36	71,94	64,13
Whole Broth	51,44	83,70
Whole Broth	49,28	79,35
Whole Broth	51,44	88,04
Oleo1	0,71	2,85
Oleo1	2,85	0,71
Oleo1	2,85	1,78
Oleo2	1,78	2,85
Oleo2	3,91	1,78
Oleo2	2,85	2,85
Oleo5	3,91	43,42
Oleo5	6,05	15,66
Oleo5	1,78	26,33
Oleo8	3,91	0,71
Oleo8	3,91	1,78
Oleo8	2,85	0,71
oleo9	4,98	29,54
oleo9	9,25	28,47
oleo9	2,85	27,40
oleo10	4,98	29,54
oleo10	0,71	23,13
oleo10	3,91	14,59
oleo12	2,85	56,23
oleo12	4,98	66,90
oleo12	2,85	63,70
Oleo13	10,32	14,59
Oleo13	18,86	25,27
Oleo13	22,06	11,39

Tabela A 9-Resultados do teste T-student para os ensaios de antagonismo com Bacillus.

<i>Fusarium</i>	
Teste <i>T-student</i>	D
T	11,874
P	<0,001
Teste <i>T-student</i>	D
T	-2,689
P	0,055

Tabela A 10-Resultados da ANOVA e do teste à posteriori de Duncan para os ensaios de antagonismo com os óleos.

Antagonismo contra <i>Fusarium</i>	
ANOVA	
F	9,329
P	<0,001
Teste a posteriori <i>Duncan</i>	
Formulação 1	b
Formulação 2	b
Formulação 5	b
Formulação 8	b
Formulação 9	b
Formulação 10	b
Formulação 12	b
Formulação 13	a
ANOVA	
F	29,805
P	<0,001
Teste a posteriori <i>Duncan</i>	
Formulação 1	c
Formulação 2	c
Formulação 5	b
Formulação 8	c
Formulação 9	b
Formulação 10	b
Formulação 12	a
Formulação 13	b

Tabela A 11-Dados dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Fusariose.

	Pes o fres co	Severid ade 1	Severid ade 2	Severid ade 3	Severid ade 4	Severid ade 5	Severid ade 6	Severid ade 7
Controlo sem doença	114	0	0	0	0	0	13	15
Controlo sem doença	101	0	0	0	0	0	8	16
Controlo sem doença	81,7	0	0	0	0	0	0	17
Controlo sem doença	99,5	0	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença	102, 8	0	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença	108, 7	0	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença		0	0	0	0	0	0	0
Controlo com doença	90	13	28	25	21	26	33	40
Controlo com doença	91,2	20	18	26	19	27	32	33
Controlo com doença	65,9	18	13	25	33	32	36	35
Controlo com doença	82,3	11	21	17	19	30	40	38
Controlo com doença	96,7	20	13	18	18	24	29	45
Controlo com doença		0	14	20	22	28	31	40
Controlo com doença	99,8	0	13	14	19	30	33	42
Bacillus		0	19	14	19	12	16	23
Bacillus	109, 7	0	13	14	16	19	18	22

Bacillus	119,5	0	14	17	15	15	10	22
Bacillus	120,0	0	0	17	17	17	14	13
Bacillus	105,0	0	0	0	0	10	15	14
Bacillus	97,4	5	0	0	0	10	12	17
Bacillus	108,3	9	0	0	0	0	10	20
Formulação 12	78,7	10	21	17	17	21	20	33
Formulação 12	89,8	14	27	23	20	22	27	31
Formulação 12	105,4	11	24	16	19	24	25	30
Formulação 12	78,4	6	31	29	14	18	23	29
Formulação 12	114,5	0	19	16	22	19	21	36
Formulação 12		0	29	24	17	21	21	30
Formulação 12	106,0	0	0	11	12	16	19	32
Formulação 13	85,3	15	13	13	15	25	16	26
Formulação 13		17	17	18	13	20	24	37
Formulação 13	109,2	14	11	14	21	19	24	22
Formulação 13	95,1	0	18	19	17	21	24	26
Formulação 13	82,3	0	17	19	14	16	17	28
Formulação 13	120,9	0	0	11	17	24	15	24
Formulação 13	104,7	0	0	0	18	19	21	21

Tabela A 12-Resultados da ANOVA e do teste à posteriori de Duncan dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Fusariose

Peso Fresco		
ANOVA - Tratamento		
F	2,503	
P	0,068	
Teste a posteriori <i>Duncan</i>		
Controlo sem doença	a	
Controlo com doença	a	
Bacillus	a	
Formulação 12	a	
Formulação 13	a	
Severidade		
ANOVA análises repetidas		
	F	P
Tempo	54,350	<0,001
Tempo x Tratamento	3,224	<0,001
Tratamento	58,932	<0,001

Tabela A 13-Resultados da ANOVA por cada tratamento de amostragem e do teste à posteriori de Duncan dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Fusariose.

		Sever. T1	Sever. T2	Sever. T3	Sever. T4	Sever. T5	Sever. T6	Sever. T7
Tratamento	F	3,738	9,295	14,324	19,423	63,308	58,627	37,857
	P	0,014	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Teste a posteriori <i>Duncan</i>								
Controlo sem doença		b	d	d	c	d	d	d
Controlo com doença		a	ab	a	b	a	a	a
Bacillus		b	cd	c	a	c	c	c
Formulação 12		ab	a	ab	a	b	b	b
Formulação 13		ab	bc	bc	a	b	b	b

Tabela A 14-Dados dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Podridão cinzenta.

	Peso fresco	Severidade 1	Severidade 2	Severidade 3	Severidade 4	Severidade 5	Severidade 6
Controlo sem doença	83	0	0	0	0	13	15
Controlo sem doença		0	0	0	0	8	16
Controlo sem doença	81,7	0	0	0	0	0	17
Controlo sem doença	99,5	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença	102,8	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença	108,7	0	0	0	0	0	0
Controlo sem doença	63,7	0	0	0	0	0	0
Controlo com doença	74	2	3	8	5	8	9
Controlo com doença	60,8	2	2	5	8	8	9
Controlo com doença	69,4	3	1	8	8	8	9
Controlo com doença	52,4	1	3	5	7	8	9
Controlo com doença		1	2	7	8	8	8
Controlo com doença	54,3	1	2	8	5	7	8
Controlo com doença	51	0	1	5	8	6	8
Bacillus	66,4	0	2	5	8	8	8
Bacillus	77,8	0	1	3	8	8	8
Bacillus	51,1	2	3	5	6	6	6
Bacillus	63,7	2	1	5	7	7	7
Bacillus		0	0	5	3	6	6
Bacillus	71,2	0	0	0	3	6	6
Bacillus	69,5	0	0	0	3	5	7
Formulação 5	105,6	1	3	8	7	7	7
Formulação 5	66,3	2	2	8	7	9	9
Formulação 5	50,9	2	1	8	7	9	9
Formulação 5	68,7	2	1	8	8	8	8
Formulação 5	64,4	2	0	7	8	8	8
Formulação 5		0	3	7	8	8	8
Formulação 5	77,5	0	3	7	5	5	7
Formulação 12	57,5	2	5	6	8	8	8
Formulação 12	72,3	2	5	6	8	8	8

Formulação 12	70,1	2	5	6	8	8	8
Formulação 12	77	1	4	6	8	8	8
Formulação 12	78,1	0	2	5	8	8	9
Formulação 12	74,1	2	0	5	8	9	8
Formulação 12	95,3	0	0	5	7	7	7

Tabela A 15-Resultados da ANOVA e do teste à posteriori de Duncan dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Podridão cinzenta.

Peso Fresco		
ANOVA - Tratamento		
F	4,046	
P	0,011	
Teste a posteriori <i>Duncan</i>		
Controlo sem doença	a	
Controlo com doença	b	
Bacillus	b	
Formulação 5	b	
Formulação 12	ab	
Severidade		
ANOVA análises repetidas		
	F	P
Tempo	66,033	<0,001
Tempo x Tratamento	2,846	0,009
Tratamento	15,413	<0,001

Tabela A 16-- Resultados da ANOVA por cada tratamento de amostragem e do teste à posteriori de Duncan dos ensaios in vivo para tratamento estatístico para a doença Podridão Ciznenta.

		Sever. T1	Sever. T2	Sever. T3	Sever. T4	Sever. T5	Sever. T6
Tratamento	3,519	5,068	37,941	40,051	4,608	0,272	3,519
	0,018	0,003	<0,001	<0,001	0,005	0,894	0,018
Teste a posteriori <i>Duncan</i>							
Controlo sem doença	b	c	d	c	b	a	
Controlo com doença	a	ab	ab	a	a	a	
Bacillus	ab	bc	c	b	a	a	
Formulação 12	a	ab	a	a	a	a	
Formulação 13	a	a	b	a	a	a	