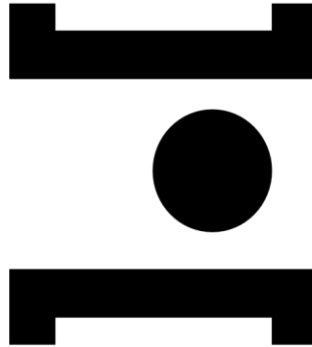


**INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM**

**Escola Superior Agrária**



**POLITÉCNICO  
DE SANTARÉM**

**Influência do declínio amarelo das Apiáceas sobre diferentes  
variedades de cenoura**

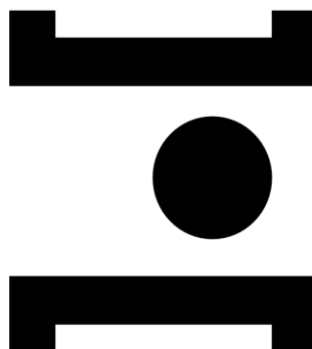
**Dissertação para obtenção de grau Mestre em  
Engenharia Agrónómica**

**Cristiana dos Santos Marques**

**Santarém  
2025**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM**

**Escola Superior Agrária**



**POLITÉCNICO  
DE SANTARÉM**

**Influência do declínio amarelo das Apiáceas sobre diferentes variedades de cenoura**

Trabalho realizado com vista à obtenção do  
Grau Mestre em Engenharia Agronómica  
Nome: Cristiana dos Santos Marques  
Número: 170300099

Orientadores internos: Professora Doutora Elsa de Jesus Centeio Valério e Professora  
Doutora Carla Marisa Reis Varanda (Escola Superior Agrária de Santarém)  
Orientador Externo: Engenheiro Agrónomo Humberto Jorge Assunção Bizarro  
(Hortapronta, Hortas do Oeste, S.A.)

**Santarém**  
**2025**

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes”

**Leonardo da Vinci**

## Agradecimentos

Gostaria de começar a minha dissertação agradecendo a todas as pessoas importantes que acompanharam este desafio dando todo o suporte e incentivo. Também às instituições que auxiliaram e possibilitaram a realização da mesma. Desta forma gostaria de agradecer:

à Escola Superior Agrária de Santarém do Instituto Politécnico de Santarém e a todos os docentes que transmitiram os seus conhecimentos, não apenas durante o Mestrado em Engenharia Agronómica, mas também durante a Licenciatura em Agronomia e do TeSP em Viticultura e Enologia, durante 7 anos, nesta nobre instituição. Todos os ensinamentos durante estes anos foram deveras fundamentais.

às minhas orientadoras, um agradecimento muito especial, à professora Carla Varanda e à professora Elsa Valério, por toda a ajuda, conhecimento, apoio, compreensão e dedicação neste trabalho.

à empresa Hortapronta, Hortas do Oeste por me terem permitido realizar este estágio e ensaio experimental, oferecendo as condições necessárias para a sua realização.

às empresas de sementes por terem disponibilizado as sementes necessárias para a realização do ensaio quer em campo quer em estufa.

ao agricultor da Hortapronta pela sua prontidão de acolhimento deste ensaio no seu campo, pela simpatia, conhecimentos e toda a ajuda.

ao projeto RedeSusTERRA, pelo acolhimento deste trabalho, suporte e financiamento das atividades necessárias à realização do mesmo.

à minha família, namorado e amigos, pela manifestação de apoio durante este longo percurso académico. Especialmente aos meus pais pelo apoio e investimento na minha formação, sem eles este percurso não seria possível.

## **Lista de abreviaturas**

ADN - ácido desoxirribonucleico

CMoV - Carrot mottle virus

CTAB - cetyl trimethylammonium bromide (brometo de cetil trimetilamonio)

CtRLV - Carrot red leaf virus

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (ácido Etilenodiaminotetracético)

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization

NGS - Next-Generation Sequencing (Sequenciação de nova geração)

OEPP - Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção das Plantas

PCR – Polymerase chain reaction (Reação da Polimerase em cadeia)

PVP - Polivinilpirrolidona

## Resumo

O controlo de pragas e doenças constitui, atualmente, um dos grandes desafios da produção agrícola, especialmente na horticultura do Oeste. Além das doenças-chave como por exemplo, o míldio, oídio e podridões, cuja incidência aumenta devido ao clima da região, existem outras doenças menos conhecidas e que dependem de outros fatores para além do clima, como é o caso da bactéria de quarentena “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (*Ca. L. solanacearum*) na cultura da cenoura, detetada pela primeira vez em Portugal em 2017.

Por conseguinte, este trabalho teve como principal objetivo detetar a presença desta bactéria em diferentes variedades de cenoura, num campo agrícola do concelho de Óbidos, região Oeste de Portugal.

Este estudo realizou-se, por um lado, em campo, ao ar livre, onde a cultura esteve exposta às condições climáticas e o produtor utilizou as técnicas culturais habituais. Por outro lado, realizou-se um ensaio em vasos, com as mesmas variedades, em estufa, onde as condições foram mais controladas de forma a verificar a sanidade das sementes no que diz respeito à presença da bactéria.

Em ambos os ensaios, campo e estufa, foi avaliado o possível aparecimento de sintomas causados por “*Ca. L. solanacearum*”, como folhas avermelhadas e douradas e extremidades enroladas e também a presença dos insetos vetores responsáveis pela transmissão da doença.

Também foram monitorizados, em ambos os locais, através da colocação semanal de placas cromotrópicas de cor amarela, a presença dos vetores responsáveis pela transmissão da doença.

Os insetos vetores de “*Ca. L. solanacearum*” identificados neste trabalho foram os psilídeos *Bactericera cockerelli*, *Trioza apicalis* e *Bactericera trigonica*.

A partir dos 71 dias após sementeira todas as variedades manifestavam sintomas sugestivos da “*Ca. L. solanacearum*” em algumas das repetições. Decorridos 88 dias após sementeira foi verificado que todas as repetições de todas as variedades já manifestavam sintomas sugestivos desta doença.

Na fase final do ensaio de campo, foram recolhidas amostras foliares de plantas com sintomas, para confirmação da presença da bactéria através de PCR. Os resultados obtidos mostram que todas as amostras testadas deram negativo para a presença da bactéria. Os resultados foram confirmados por NGS.

Desta forma, os sintomas observados podem estar associados a outro agente, possivelmente ao vírus da folha vermelha, no entanto serão necessários testes para confirmar esta hipótese.

Este estudo é bastante relevante para as regiões produtoras de cenoura tendo em conta que sempre que possam surgir sintomas associados à bactéria “*Ca. L. solanacearum*” as plantas devem ser monitorizadas e devem ser efetuados os testes necessários para confirmar se efetivamente se trata desta doença ou de outra com sintomas semelhantes, tal como, o vírus da folha vermelha da cenoura. Estes resultados contribuem para que trabalhos semelhantes possam considerar várias perspetivas.

**Palavras-chave:** Bactéria, Sintomas, Vetores, PCR, “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

## Abstract

The management of pests and diseases affecting crops is currently one of the major challenges faced by agricultural production, particularly in the horticultural sector of Western Portugal. In addition to key diseases such as downy mildew, powdery mildew, and rots—whose incidence is increasing due to the region’s climate—there are other, lesser-known diseases that are influenced by factors beyond climatic conditions. One such example is the quarantine bacterium “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (*Ca. L. solanacearum*), which was first detected in carrot crops in Portugal in 2017.

The primary objective of this study was to detect the presence of this bacterium in different carrot varieties cultivated in an agricultural field in the municipality of Óbidos, located in the Western region of Portugal.

This study was carried out, on one hand, in an open field where the crop was exposed to natural climatic conditions and standard cultivation practices were applied by the grower. On the other hand, a pot trial was conducted in a greenhouse using the same cultivars, under more controlled conditions, to assess seed health regarding the presence of the bacterium.

In both settings—field and greenhouse—the possible appearance of symptoms caused by “*Ca. L. solanacearum*” was assessed, including reddish or golden-colored leaves and curled leaf tips. Additionally, the presence of insect vectors responsible for transmitting the disease was monitored.

Vector populations were monitored weekly at both locations using yellow chromotropic sticky traps. The insect vectors of *Ca. L. solanacearum* identified in this study were the psyllid species *Bactericera cockerelli*, *Trioza apicalis*, and *Bactericera trigonica*.

From 71 days after sowing, all carrot varieties showed symptoms suggestive of “*Ca. L. solanacearum*” in some of the replicates. By 88 days after sowing, all replicates of all varieties exhibited symptoms indicative of this disease.

At the final stage of the field trial, foliar samples were collected from symptomatic plants to confirm the presence of the bacterium through PCR analysis. The results showed

that all tested samples were negative for the bacterium. These findings were further confirmed by Next-Generation Sequencing (NGS).

Thus, the symptoms observed may be associated with another causal agent, possibly the red leaf virus. However, additional testing is required to confirm this hypothesis.

This study is highly relevant for carrot-producing regions, as it highlights the importance of monitoring plants whenever symptoms potentially associated with “*Ca. L. solanacearum*” appear. Appropriate diagnostic tests should be conducted to confirm whether the disease is indeed caused by this bacterium or by another pathogen with similar symptomatology, such as carrot red leaf virus. These findings provide valuable insights and encourage future studies to adopt broader diagnostic perspectives.

**Keywords:** Bacterium, Symptoms, Vectors, PCR, “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

# Índice

Agradecimentos .....	I
Lista de abreviaturas .....	II
Resumo .....	III
Abstract.....	V
Índice de Quadros .....	IX
Índice de Figuras .....	X
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1 Culturas hortícolas em Portugal.....	3
2.1.1 Cultura da cenoura .....	4
2.1.1.1 Descrição e origem .....	4
2.1.1.2 Importância económica.....	5
2.1.1.3 Ciclo cultural e exigências edafoclimáticas.....	8
2.1.1.4 Pragas, doenças e desordens fisiológicas .....	11
2.2 O Declínio amarelo das apiáceas .....	16
2.2.1 Biologia, sintomatologia e estragos .....	16
2.2.2 Transmissão da <i>Ca. L. solnanacearum</i> .....	19
2.2.3 Métodos de diagnóstico.....	21
<b>3. Material e métodos .....</b>	<b>23</b>
3.1 Procedimento em campo.....	23
3.1.1 Organização do ensaio .....	23
3.1.2 Instalação do ensaio .....	25
3.1.3 Organização da monitorização em campo .....	26
3.1.4 Observação de sintomas .....	30
3.1.4 Monitorização de insetos vetores .....	32
3.2 Procedimento em estufa.....	33
3.2.1 Instalação do ensaio .....	33
3.2.2 Monitorização visual dos sintomas .....	35
3.2.3 Monitorização de insetos vetores .....	35
3.3 Procedimentos laboratoriais.....	36
3.3.1 Identificação dos insetos vetores.....	36
3.3.2 Recolha das amostras .....	37
3.3.3 Maceração das amostras.....	38
3.3.4 Extração do DNA das amostras maceradas.....	40
3.3.5 PCR Convencional .....	41

3.3.6 NGS (Sequenciação de Nova Geração) .....	43
<b>4. Análise e discussão dos resultados .....</b>	<b>44</b>
4.1 Resultados obtidos no ensaio de campo .....	44
4.2 Resultados obtidos no ensaio de estufa .....	54
4.3 Resultados da monitorização dos insetos vetores.....	58
4.4 Amplificação por PCR .....	61
4.5 Análise metagenómica.....	62
<b>5. Conclusões e considerações gerais .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>70</b>

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Dados do ensaio em campo.....	25
<b>Quadro 2</b> - Dados do ensaio em estufa.....	34

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Produção das principais hortícolas entre 2020 e 2022 (INE, 2022) .....	4
<b>Figura 2</b> - Produção de cenouras e nabos por região (FAO, 2022) .....	6
<b>Figura 3</b> - Área e Produção de cenoura em Portugal (GPP, 2023) .....	6
<b>Figura 4</b> - Indicadores de análise do comércio internacional (GPP, 2023) .....	7
<b>Figura 5</b> - Preço Médio de Importação e de Exportação (€/kg) (GPP, 2023).....	8
<b>Figura 6</b> - Sintomas de referência da “ <i>Ca. L. solanacearum</i> ” (Cruz et al., 2018).....	17
<b>Figura 7</b> - Esquema do ensaio .....	24
<b>Figura 8</b> - Ensaio devidamente identificado .....	24
<b>Figura 9</b> - Sementeira em campo.....	25
<b>Figura 10</b> - Primeiras emergências (Variedade C e G) .....	27
<b>Figura 11</b> -Localização das placas cromotrópicas .....	27
<b>Figura 12</b> - Identificação das placas .....	28
<b>Figura 13</b> - Folha de registo do aparecimento de sintomas no campo .....	29
<b>Figura 14</b> - Evolução vegetativa do ensaio.....	29
<b>Figura 15</b> - Esquema dos registos efetuados na monitorização.....	30
<b>Figura 16</b> - Registo fotográfico do ensaio em campo a 19 de abril de 2024.....	31
<b>Figura 17</b> - Monitorização de cenouras através do microscópio a 22 de abril de 2024 .....	31
<b>Figura 18</b> - Material necessário para a instalação das placas cromotrópicas .....	32
<b>Figura 19</b> - Sementeira em estufa .....	33
<b>Figura 20</b> - Emergência das plantas em estufa .....	34
<b>Figura 21</b> – Registo fotográfico do ensaio em estufa no mês de abril .....	35
<b>Figura 22</b> -Placa cromotrópica no ensaio em estufa.....	36
<b>Figura 23</b> - Observação das placas cromotrópicas .....	37
<b>Figura 24</b> - Recolha das amostras em campo (a) e em estufa (b).....	37
<b>Figura 25</b> - Adição de azoto líquido à amostra.....	38
<b>Figura 26</b> – Amostra macerada.....	38
<b>Figura 27</b> - Microtubos mantidos em gelo .....	39
<b>Figura 28</b> - Conservação das amostras .....	39
<b>Figura 29</b> - Processo de extração CTAB .....	41
<b>Figura 30</b> - Processo do PCR convencional .....	43
<b>Figura 31</b> - Primeiros sintomas sugestivos da doença registados a 15 de abril de 2024....	44
<b>Figura 32</b> - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 19 abril 2024.....	45
<b>Figura 33</b> - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 3 maio 2024.....	45
<b>Figura 34</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade A, B, E e F registados a 3 de maio de 2024 .....	46
<b>Figura 35</b> - Sintomas da doença por repetição de cada variedade 10 maio 2024.....	46
<b>Figura 36</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade D, G e I registados a 10 de maio de 2024 .....	47
<b>Figura 37</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade H a 17 de maio de 2024 .....	47
<b>Figura 38</b> - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 17 maio 2024.....	48
<b>Figura 39</b> - Sintomas da doença por repetição de cada variedade 27 maio 2024.....	48
<b>Figura 40</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade C, F e G, registados em junho 2024 .....	49
<b>Figura 41</b> - Datas em que cada variedade evidenciou sintomas sugestivos (1) da “ <i>Ca. L. solanacearum</i> ” .....	50
<b>Figura 42</b> - Sintomas sugestivos da doença em todas as variedades do ensaio em campo	51
<b>Figura 43</b> - Registo das cenouras recolhidas no ensaio em campo .....	53

<b>Figura 44</b> - Desenvolvimentos de raízes secundárias/adventícias.....	53
<b>Figura 45</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade B em estufa no mês de abril 2024 .....	54
<b>Figura 46</b> - Sintomas sugestivos da doença na variedade B, C e I em vaso, registados a 6 de maio de 2024.....	55
<b>Figura 47</b> - Registos dos sintomas sugestivos da doença observados em todas as variedades em estudo na estufa, em julho de 2024.....	56
<b>Figura 48</b> - Registo dos sintomas sugestivos da doença no ensaio em estufa por variedade, em que 0 significa ausência de sintomas e 1 a presença de sintomas. ....	57
<b>Figura 49</b> - Ovo (a) e ninfa (b) observados ao microscópio nas cenouras recolhidas do ensaio de campo.....	58
<b>Figura 50</b> - Registo fotográfico do vetor <i>B. trigonica</i> .....	59
<b>Figura 51</b> - Registo fotográfico do vetor <i>B. cockerelli</i> .....	59
<b>Figura 52</b> - Registo fotográfico da <i>T. apicalis</i> na placa 2 da semana 12.....	60
<b>Figura 53</b> - Presença semanal dos insetos vetores em 13 semanas de monitorização.....	61
<b>Figura 54</b> - Resultado dos testes PCR às amostras sintomáticas recolhidas no ensaio de campo .....	62
<b>Figura 55</b> - Resultados da sequenciação de nova geração.....	63
<b>Figura 56</b> - Resultados do teste PCR ao vírus da folha vermelha da cenoura.....	64

## 1. Introdução

Em Portugal, no ano 2022 foram cultivados 38,9 mil hectares de culturas hortícolas, dando origem a 1,024 milhões de toneladas. Comparativamente a 2021 registou-se um decréscimo de 11,7% de área e 19% de produção. Entre 2020 e 2022 as hortícolas mais produzidas no país foram a couve-coração, tomate fresco, cenoura e abóbora. (INE,2022).

A cenoura é uma cultura com bastante impacto produtivo em Portugal, no período acima mencionado, tendo sido terceira cultura mais produzida, logo a seguir à couve-coração e ao tomate fresco, com uma produção que variou sensivelmente entre as 100 e 145 mil toneladas no decorrer dos três anos mencionados (INE, 2022).

A cultura da cenoura é afetada por várias pragas e doenças. Quanto às pragas da cultura, de acordo com Almeida (2015) a mosca-da-cenoura e os nemátodos são os que mais causam estragos à cultura, no que diz respeito às doenças, a cultura pode ser afetada por diversas, nomeadamente, alternariose, oídio, míldio e cercosporiose.

Em 2017, foi detetada pela primeira vez em Portugal, a bactéria “*Ca. L. solanacearum*”, na cultura da cenoura, na região Oeste. Esta bactéria apresenta riscos muito elevados para a horticultura da região e do país, apresentando algumas variantes consideradas de quarentena. Esta bactéria causa o declínio amarelo das Apiaceas e pode afetar plantas hortícolas como a cenoura, coentros e salsa. Esta bactéria é vetorizada por vários insetos picadores-sugadores (Cruz et al., 2018).

No que diz respeito à taxonomia da espécie “*Ca. L. solanacearum*”, esta, pertence ao reino da Bactérias, filo das Proteobactérias, classe das Alfaproteobactérias, ordem Rhizobiales, família das Filobacteriáceas e o género *Liberibacter* (EPPO, 2009). A “*Ca. L. solanacearum*” está incluída na lista de organismos recomendados para regulamentação como pragas de quarentena (EPPO, 2024).

Alguns vetores encontram-se identificados como transmissores da doença para as plantas, no entanto pensa-se que também pode ser veiculada através de sementes de cenoura contaminadas, sendo uma questão que carece de confirmação (Cruz et al., 2018).

Esta doença tem um grande impacto para os produtores de cenoura representando um grande risco de disseminação por todo o campo de forma bastante rápida, e sendo uma doença de quarentena, pode inviabilizar a comercialização da produção. Tendo em conta, que, até à data, não existem meios de controlo da doença, é importante compreender como se transmite para prevenir o seu aparecimento e disseminação. Neste contexto, o presente trabalho possui objetivos, nomeadamente:

- I. Observar e registar os possíveis sintomas em diferentes variedades de cenoura;
- II. Acompanhar o desenvolvimento das mesmas variedades em estufa de modo a verificar possíveis manifestações dos sintomas associados à doença;
- III. Observar e recolher os vetores encontrados na parcela do ensaio de campo;
- IV. Identificar molecularmente a bactéria a partir de plantas sintomáticas e assintomáticas, assim como em insetos vetores.

O desenvolvimento de todo o trabalho e respetivos ensaios e análises foi apoiado e suportado pelo projeto RedeSusTERRA (<https://redesusterra.webnode.pt/>) cujo foco é a promoção de práticas sustentáveis em sistemas agrícolas com impacto nos territórios. Este projeto abrange vários campos, com distribuição em 10 concelhos de Portugal, incidindo na horticultura e fruticultura.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Culturas hortícolas em Portugal

A horticultura é uma atividade extremamente importante, particularmente no Ribatejo e Oeste. A produção de hortícolas frescas regista-se sobretudo na faixa litoral do país. No entanto, as zonas Entre Douro e Minho e, sobretudo, do Alentejo tem ganho uma maior importância. As regiões localizadas no litoral tem condições naturais muito favoráveis para o desenvolvimento destas culturas, o que contribui para boas produtividades (GPPAA, 2007).

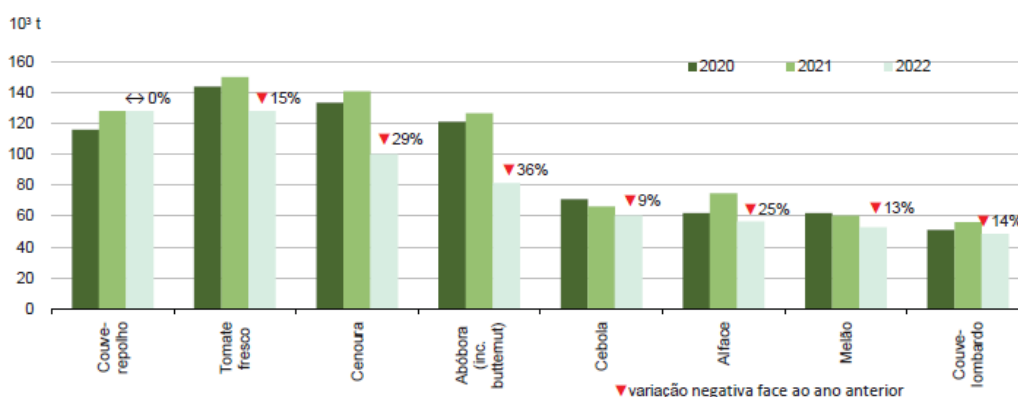
Devido a diferentes aspetos, tais como a diversidade climática, biodiversidade a inovação e processos, Portugal encontra-se muito bem posicionado no mercado, tendo oportunidade de apresentar produtos diferenciados e seguros (GPP, Análise setorial FRUTAS & HORTÍCOLAS, 2020).

Em 2018 a componente dos vegetais e produtos hortícolas representou 17% da produção agrícola e 30% da produção vegetal, estando os produtos hortícolas frescos a ocupar uma fração de 50% da produção (GPP, 2020).

Entre 2007 e 2016 a área de hortícolas registou um aumento de 9.752 hectares. A região com maior acréscimo foi o Ribatejo e Oeste, crescendo 36% no que diz respeito à sua área produtiva, representando um aumento de 8.679 hectares, sendo que 5.133 hectares correspondem à produção de tomate-de-indústria. O Ribatejo e Oeste concentram quase 69% da área de hortícolas da produção continental (GPP, 2020).

Em 2022, a área cultivada de hortícolas alcançou os 38,9 mil hectares dando origem a 1,024 milhões de toneladas. Em comparação a 2021 apresenta um decréscimo de 11,7% em relação à área, já em relação à produção representa uma quebra de 19%. Na origem destas oscilações está o aumento do valor dos fatores de produção e também a seca que se prolongou mais que o habitual. O preço dos hortícolas pagos aos produtores aumentou cerca de 64,9% entre janeiro e dezembro de 2022 (INE, 2022).

Em Portugal, das culturas hortícolas mais produzidas apenas a couve-repolho manteve uma produção semelhante ao ano anterior, o mesmo não aconteceu com outras culturas que registaram decréscimos na sua produção, tais como, a cenoura com menos 29% de produção, a abóbora com menos 36% (**Figura 1**) (INE, 2022).



**Figura 1** - Produção das principais hortícolas entre 2020 e 2022 (INE, 2022)

## 2.1.1 Cultura da cenoura

### 2.1.1.1 Descrição e origem

A cenoura pertence ao género *Daucus*, com cerca de 25 espécies, sendo um dos maiores da família Apiaceae. É uma das mais importantes hortícolas de raiz. A raiz é comercializada fresca, com ou sem rama, ou após transformação industrial (Almeida, 2015).

A cenoura é uma das raízes mais importantes da família Apiaceae sendo cultivada em todo o mundo. É uma espécie herbácea bienal. As raízes da cenoura, têm boa capacidade de armazenamento. Uma grande quantidade de carboidratos é armazenada nas raízes principais alargadas para a floração da cenoura no segundo ano. A flor da cenoura é uma umbela achatada em forma de guarda-chuva. A cenoura é uma cultura de clima frio que pode ser semeada na primavera em zonas de clima temperado ou no outono ou inverno em zonas de clima subtropical (Que et al., 2019).

A cenoura é a cultura mais importante da família Apiaceae. As cenouras foram usadas inicialmente para fins médicos e gradualmente utilizadas na alimentação. As cores da polpa da raiz da cenoura podem variar, desde brancas, amarelas, laranja, vermelhas, ou diferentes tonalidades de roxo (Dias, 2014).

A cultura da cenoura está posicionada entre os dez vegetais mais consumidos mundialmente. É produzida e vários locais do mundo, como por exemplo, na Ásia, nos

Estados Unidos, na Europa e representa a maior área de cultivo e produção mundial em todas as umbelíferas. Além disso, a cenoura, é rica em compostos bioativos, tais como, carotenoides, antocianinas, óleos essenciais e fibras alimentares (Kielkowska & Kiszczak, 2023).

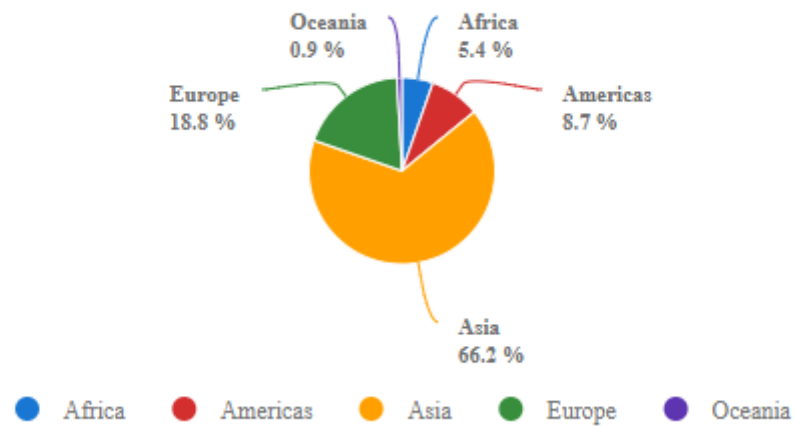
Segundo Dias (2014), as primeiras cenouras a serem cultivadas tinham polpa amarela e roxa. As cenouras de coloração laranja, mais consumidas atualmente, foram desenvolvidas nos séculos XV e XVI na Europa Central. A popularidade da cenoura laranja aumentou quando foi reconhecido o seu alto teor de pró-vitamina A. Os carotenoides e antocianinas são os principais pigmentos antioxidantes encontrados nas cenouras. A diferença entre cultivares de cenouras depende do tipo de pigmentos nelas presentes.

É uma cultura importante para a segurança nutricional mundial tendo em conta que é uma das principais fontes alimentares de carotenoides pro-vitamínicos A (Kielkowska & Kiszczak, 2023). Como diversos outros vegetais com cor, a cenoura é extremamente rica em antioxidantes. Os carotenoides, polifenóis e vitaminas presentes na cenoura atuam como antioxidantes, anticancerígenos e imunopotenciadores (Dias, 2014).

### **2.1.1.2 Importância económica**

A produção de cenoura encontra-se principalmente nas zonas temperadas. A Europa foi historicamente a região com mais produção, embora a produção asiática, com destaque da China, tenha vindo a aumentar (Almeida, 2015). De acordo com Dias (2014), é uma raiz de distribuição mundial.

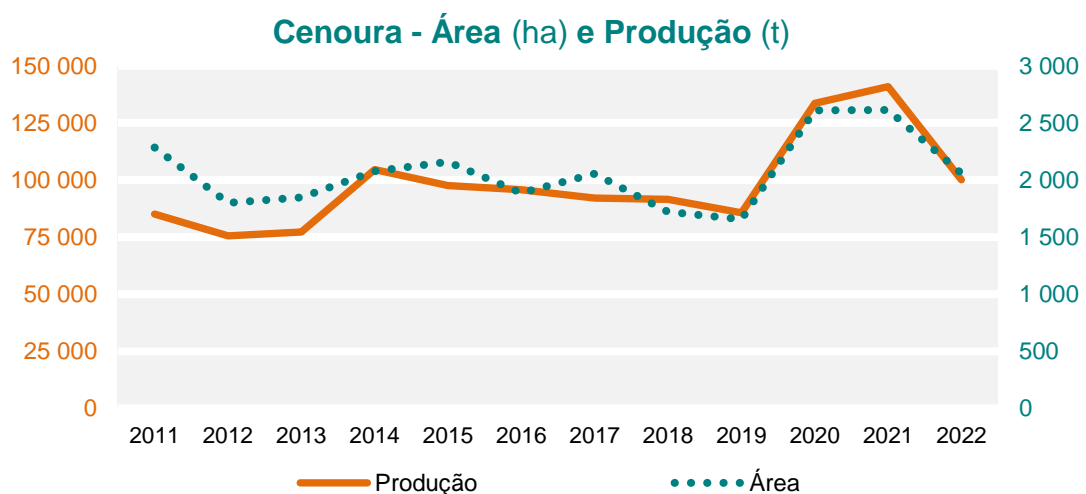
Embora a produção desta cultura seja mundial, existem alguns continentes com maior relevância no que diz respeito à produção desta cultura. De acordo com a FAO (2022), a Ásia representa 66.2% da produção de cenouras e nabos, um crescimento significativo tendo em conta registos mais antigos. Segue-se a Europa com 18.8%, as Américas com 8.7%, África com 5.4% e por fim, com 0.9% a Oceânia (**Figura 2**).



**Figura 2** - Produção de cenoura e nabos por região (FAO, 2022)

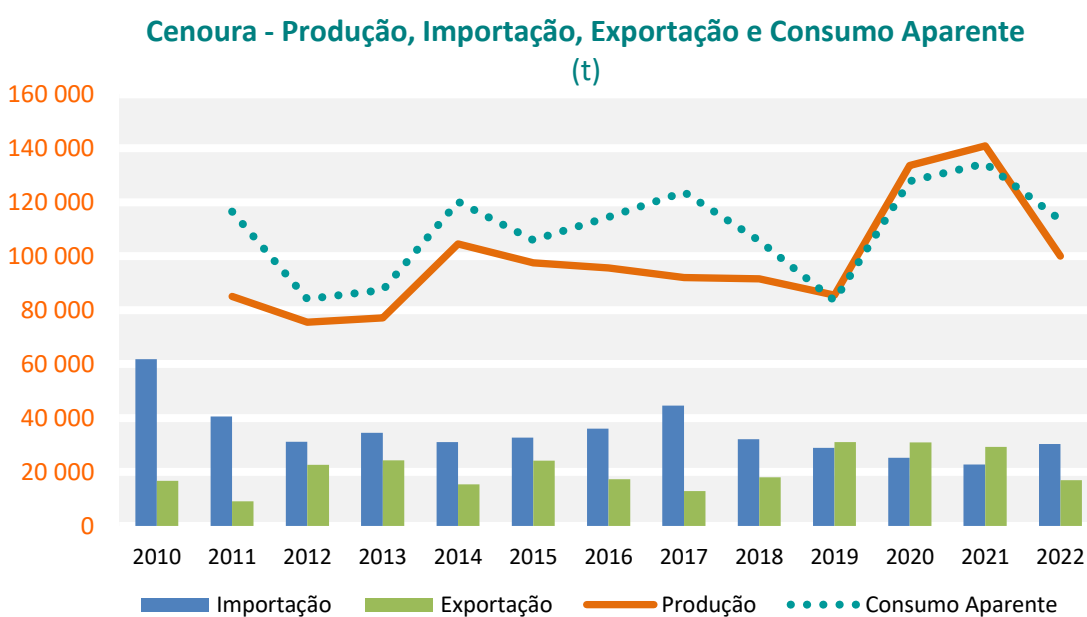
A produção de cenoura em Portugal tem vindo a decrescer devido a uma maior disponibilidade no mercado europeu, que apresenta maior qualidade e preços mais competitivos. As principais regiões produtoras são o Ribatejo e o Oeste, com perto de 75% da área nacional. Espanha e França são os principais fornecedores de cenoura para o mercado nacional (Almeida, 2015).

No que diz respeito à área e produção da cultura da cenoura em Portugal, é possível verificar que no ano 2022, foram produzidas 100 057 toneladas de cenoura em 2057 hectares (**Figura 3**) (GPP, 2023)



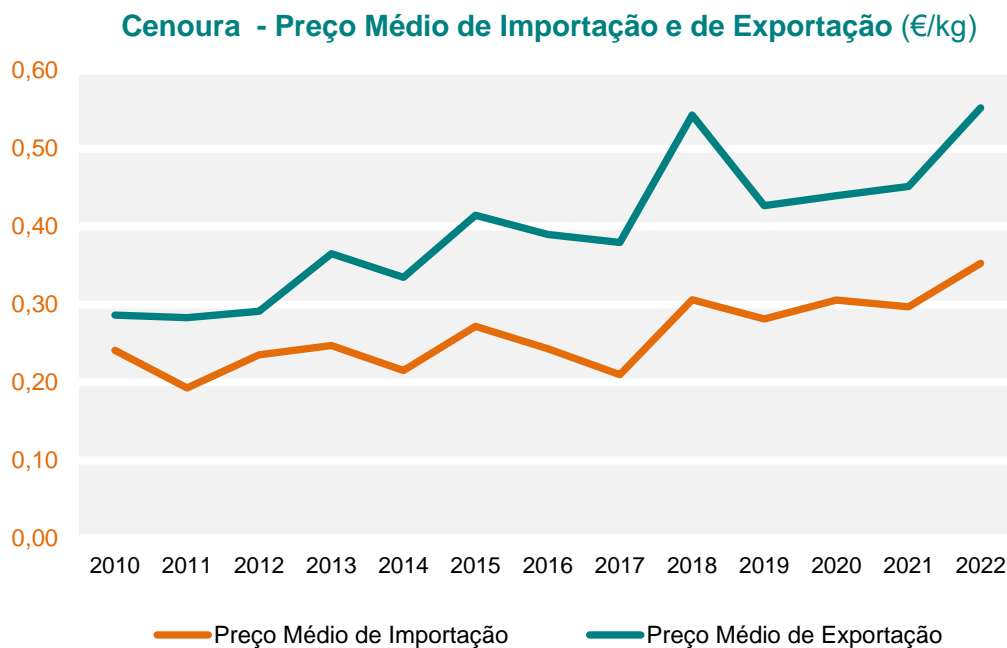
**Figura 3** - Área e Produção de cenoura em Portugal (GPP, 2023)

Em 2022 foram produzidas 100 057 toneladas de cenoura, que foram importadas 30 406 toneladas e exportadas cerca de 16 970 toneladas (GPP, 2023). Um dado importante é o consumo aparente desta cultura hortícola que está estimado em 113 493 toneladas, um valor superior ao que é produzido justificando dessa forma a necessidade de importação. Desde 2010 que o consumo aparente de cenoura sempre foi superior à produção, no entanto, em 2020 e 2021 essa tendência teve uma ligeira alteração que foi novamente suprimida em 2022 (**Figura 4**).



**Figura 4** - Indicadores de análise do comércio internacional (GPP, 2023)

No que diz respeito aos preços (euro/kg) desta cultura em 2022, de acordo com os dados obtidos, o preço médio registado na importação foi 0.35 €/kg enquanto o preço médio de exportação foi de 0.55 €/kg (**Figura 5**) (GPP, 2023).



**Figura 5** - Preço Médio de Importação e de Exportação (€/kg) (GPP, 2023)

### 2.1.1.3 Ciclo cultural e exigências edafoclimáticas

Normalmente, as Apiaceas apresentam problemas de germinação, que dizem respeito a uma reduzida faculdade germinativa, além do baixo vigor germinativo também evidenciam uma grande heterogeneidade na emergência. Estes problemas de germinação podem estar relacionados com o facto de o embrião das Apiaceas ocupar uma pequena percentagem do volume da semente, cerca de 5%. Além deste fator é frequente que aquando da colheita muitas destas sementes ainda se encontram imaturas (Almeida, 2015).

O tamanho das sementes é muito variável de lote para lote e por esse motivo pode variar entre as 500 e 1700 sementes por grama. Devido a esta questão no mercado de sementes de cenoura existe a calibração das mesmas e as embalagens tem definido o número de sementes. De uma forma geral, podem-se considerar entre 800 a 1000 sementes por grama. Além do tamanho também a faculdade e o vigor germinativo são bastante variáveis (Almeida, 2015).

Tendo em conta todos estes fatores, é possível verificar uma grande variabilidade entre lotes, sendo a escolha da semente um fator de extrema importância no que diz respeito ao sucesso do desenvolvimento cultural. O produtor, deve escolher, se possível,

sementes com facultade germinativa superior a 80%, embora na maioria dos lotes o mais comum é 65% (Almeida, 2015).

O clima, incluindo a temperatura, precipitação, humidade e também a duração do dia e intensidade da luz desempenham um papel vital na produtividade agrícola, na qual, a temperatura é o fator mais importante e que afeta a produção da cultura da cenoura (Nguyen, 2015).

De acordo com a região e com a variedade das cenouras, poderá haver oscilações no que serão as condições ideais, dessa forma, de acordo com Almeida (2015) a temperatura ótima para a germinação é de 20 a 35°C. Em média o somatório de temperaturas necessário até à germinação é de 60°C e a emergência ocorre após a acumulação de 130°C, pode ser atingido num período variável, entre 7 a 21 dias.

Após a germinação, a raiz principal alonga-se de forma bastante rápida, atingindo o seu comprimento máximo 12 a 24 dias após a emergência. A parte aérea tem um crescimento mais lento, são necessárias 3 a 4 semanas para que surja a primeira folha verdadeira, devido a este aspeto a cultura da cenoura tem dificuldades na competição com as infestantes (Almeida, 2015).

A luz afeta o desenvolvimento da cultura, interferindo principalmente no tamanho das plantas. O crescimento da raiz de armazenamento está dependente do fornecimento de assimilados das áreas fotossintéticas da planta, sendo essencial a presença de luz para o processo (Suojala, 2000).

Também a temperatura tem influência na morfologia da raiz bem como noutros aspetos relacionados com a qualidade. Quando as temperaturas ultrapassam os 21°C as raízes tendem a ficar curtas e espessas, quando as temperaturas baixam a valores inferiores a 16°C as raízes podem ficar mais longas e finas (Almeida, 2015).

Os principais fatores que determinam o rendimento potencial da cultura são a área foliar, a taxa líquida de assimilação, a duração do período de crescimento e a fração utilizável de biomassa. O índice de área foliar determina a fração de luz interceptada. O número de horas do fotoperíodo também interfere no desenvolvimento cultural, quanto ao fotoperíodo longo, de 16 horas, este, é mais eficaz que um fotoperíodo curto, de aproximadamente 8 horas (Suojala, 2000).

No que diz respeito às preferências edáficas, a cultura adapta-se a diferentes tipos de solo, tendo preferência por solos soltos, profundos, de texturas ligeiras a médias. Deve haver um equilíbrio no solo, onde este forneça humidade e ao mesmo tempo seja bem drenado (Almeida, 2015). A cenoura não tem muita sensibilidade à seca, pois tem um sistema radicular bastante desenvolvido, sendo profundo e denso, no entanto, climas muito quentes e outros aspetos podem condicionar esta tolerância (Suojala, 2000), e o humedecimento do solo melhora a germinação e acelera a emergência da cultura (Almeida, 2015).

As qualidades internas e externas das cenouras são afetadas pelas diferentes características dos solos. O solo turfoso, com uma elevada percentagem de matéria orgânica, faz com as cenouras se desenvolvam com melhores características, apresentando níveis de doçura mais elevados e menos características amargas. Desta forma, este tipo de solo, tem melhores aptidões quando comparado com solos arenosos ou argilosos (Nguyen, 2015).

De forma que as raízes não sofram deformações indesejáveis, os solos pedregosos devem ser evitados, tal como, os solos argilosos que além de provocar deformações nas raízes também contribuem para um aumento das podridões (Almeida, 2015).

Em solos arenosos o número de raízes divididas e bifurcadas também é bastante menor (Nguyen, 2015). A cenoura é uma cultura com bastante sensibilidade à salinidade e ligeiramente tolerante à acidez, tendo preferência entre valores de pH que se mantenham entre os 6,0 e os 6,8. O solo deve ser preparado de forma que a sua estrutura fique homogénea com cerca de 30 cm de profundidade de forma que haja um bom desenvolvimento radicular. A cenoura é instalada em local definitivo a uma profundidade que pode variar de 3 a 5 mm (Almeida, 2015).

A instalação da cultura pode ser feita em qualquer época do ano desde que a temperatura média seja superior a 6°C. No que diz respeito à densidade de sementeira, é das culturas com maior densidade. Geralmente a sementeira é efetuada em linha ou banda com linhas que pode ir de 30 a 45 cm. O número de linhas por camalhão deve ser adaptado à realidade de colheita. O ciclo cultural das cenouras é variável, geralmente entre 90 a 130 dias, no entanto, pode variar de 72 a 220 dias (Almeida, 2015). A humidade do solo é um fator importante, tendo em conta que é um fator que interfere no comprimento da raiz (Suojala, 2000).

A cenoura pode ser colhida manualmente ou de forma mecânica, no entanto, os danos visíveis são diferentes de acordo com a modalidade praticada. Os danos causados via mecânica são superiores, no entanto, a dependência da mecanização é cada vez mais uma realidade. Podem ser reduzidos se a velocidade da máquina for bem-adaptada e as condições de humidade do solo forem propícias (Nguyen, 2015).

Quando a colheita é efetuada de forma mecânica, de forma geral, são realizadas outras operações tais como o corte da folhagem, arranque, limpeza e recolha. Esta operação é realizada quando a cenoura ainda está imatura ou parcialmente madura, quando a parte superior da raiz tem o tamanho comercialmente desejável. Após atingir a maturação comercial, a cultura pode permanecer no terreno, no entanto, é possível que alguma qualidade seja perdida nesse período (Almeida, 2015).

#### **2.1.1.4 Pragas, doenças e desordens fisiológicas**

Durante todo o ciclo cultural, a cenoura, está sujeita a diversas desordens fisiológicas.

O branqueamento da epiderme é uma condição que surge após a lavagem da cenoura sob a forma de uma película esbranquiçada. Também conhecido como “silvering”, é a escamação das células da epiderme que são danificadas em algum processo do manuseamento da cenoura, seja na colheita, lavagem ou manipulação nas linhas. É um fenómeno natural que ocorre umas horas ou dias depois de lavadas, a velocidade e intensidade com que ocorre pode variar. O escurecimento da raiz também é uma desordem fisiológica que surge devido à lavagem. Quando a cenoura é danificada em qualquer altura do processo, ocorre oxidação das regiões danificadas provocando escurecimento dessas áreas (Vilmorin, 2024).

As raízes bifurcadas e as cenouras rachadas também podem ter origem fisiológica. No primeiro caso, são provocadas devido a condições climáticas adversas, sobretudo temperaturas baixas nas primeiras semanas da cultura. O excesso de água, adubos pouco decompostos e obstáculos na zona de solo onde se dá o desenvolvimento radicular, por exemplo, pedras, torrões, entre outros podem promover este desenvolvimento anormal. A cenoura rachada, geralmente, provém da absorção excessiva de água que provoca dilatação

das células originando a rotura dos tecidos das mesmas. O excesso de fertilização azotada pode ter um comportamento semelhante (Vilmorin, 2024).

Além das desordens fisiológicas descritas acima, a cultura da cenoura é afetada por várias pragas e doenças, que também afetam negativamente a produção interferindo na disponibilidade e qualidade do produto para o mercado.

De entre as principais pragas da cenoura encontram-se os nemátodos, que têm elevado impacto especialmente se não foram efetuadas rotações culturais adequadas (Almeida, 2015).

Os nemátodos infetam a cultura da cenoura com elevados impactos a nível mundial. Podem ser divididos em dois grupos principais, nomeadamente, os nemátodos dos quistos (*Heterodera carotae* Jones), e os nemátodos das galhas (*Meloidogyne hapla*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*) (Joshi & Walia, 2024). Ambos os grupos manifestam sintomas idênticos sobre a vegetação da cultura e aparecem em colónias nos campos. Causam diversos sintomas, tais como, falta de vigor vegetativo, alterações na coloração da folhagem para tons amarelos e vermelhos com desenvolvimentos bastante lentos. Os nemátodos dos quistos provocam pilosidades nas raízes que ficam curtas e acabam por bifurcar. No caso dos nemátodos das galhas há um desenvolvimento de nódulos ao longo da raiz principal e das secundárias (Vilmorin, 2024; Society of Nematologists, 1992).

Outra praga importante na cultura da cenoura é o afídeo (*Cavariella aegopodii* Scopoli), que causa a diminuição do vigor da planta e o enrolamento das folhas quando o afídeo suga a seiva para se alimentarem, sendo o impacto maior quando os ataques são feitos em plantas mais jovens (Vilmorin, 2024). Este afídeo é também responsável pela transmissão de doenças na cultura como o vírus da folha vermelha da cenoura (*Carrot red leaf virus* – CtRLV).

Outra praga com importância económica na cultura é a mosca-da-cenoura (*Psila rosae* Fabricius). As plantas atacadas por este díptero perdem o vigor e as raízes perdem o valor comercial tendo em conta que as larvas da mosca abrem galerias na raiz (Joshi & Walia, 2024). É um problema presente em regiões cujo clima é temperado, a multiplicação da praga dá-se em terrenos frescos e ricos em matéria orgânica. A presença de vegetação na extremidade das parcelas e as rotações culturais curtas também favorecem a presença desta praga (Vilmorin, 2024).

Entre os fungos que provocam doenças na cenoura, a alternaria, (*Alternaria dauci* Kühn), também conhecida como queima das folhas é uma doença com grande importância estando difundida mundialmente. Ataques severos podem provocar grandes quebras de rendimento, iguais ou superiores a 20 toneladas/hectare. Os seus sintomas manifestam-se através de pequenas manchas escuras circundadas por uma aureola amarela, presente nas folhas mais velhas. Num estado avançado da doença as folhas começam a apresentar uma cor castanha e um aspeto queimado. A proliferação deste fungo dá-se com a presença de humidade sobras as folhas, com vento, com temperaturas entre os 14°C e 35°C, sendo a ideal de 28°, ou seja, tempo quente e húmido é indicativo da presença e desenvolvimento desta doença. O fungo sobrevive no solo e nos resíduos culturais e até em cenouras selvagens. (Vilmorin, 2024; Joshi & Walia, 2024).

A cercospora, também causada por um fungo, (*Cercospora carotae* Kirk), também conhecida como doença da mancha da cercospora, é outro fungo com alta importância na cultura da cenoura (Joshi & Walia, 2024). Não tem sintomas característicos e muitas vezes pode ser confundida com alternaria. O aumento da temperatura e da humidade fazem com que se desenvolvam sintomas, nomeadamente, pequenas lesões nas folhas, escuras e margens definidas. Ao contrário da alternaria, a cercospora incide sobre as folhas mais jovens, dando um aspeto queimado à folha. A disseminação deste fungo é feita pelo vento, insetos, gotas de água e máquinas agrícolas. A sobrevivência do fungo e os fatores favoráveis ao seu desenvolvimento são semelhantes aos da alternaria (Vilmorin, 2024).

O oídio da cenoura, causado pelo fungo (*Erysiphe heraclei* D.C) manifesta-se através da formação de uma camada branca com aspeto cinza que ocupa a região inferior e superior das folhas e pecíolos. Temperaturas entre 15 a 31°C, dias com vento e excesso de azoto contribuem para a dispersão deste fungo (Vilmorin, 2024).

O picado da raiz, também conhecido como Cavity Spot é uma doença causa por espécies de fungos do género *Pythium*. spp. Este problema tem influência na cultura da cenoura mundialmente. A espécie é específica de região para região. Quando os ataques são severos podem originar quebras de aproximadamente 50% na cultura. Os sintomas manifestam-se através de manchas alargadas, translúcidas ou negras situadas à superfície das raízes. A evolução da doença pode dar origem fendas longitudinais nas raízes. As manchas podem evoluir para podridões o que pode auxiliar na proliferação da bactéria. As raízes infetadas não são comercializáveis. Fatores propícios ao desenvolvimento deste

problema são o excesso de água e de azoto, rotações culturais inadequadas, temperaturas entre 15 a 25°C e solos ácidos (Vilmorin, 2024).

A podridão branca ou podridão esclerotinia é causada pelo fungo polífago (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary). Esta doença pode desenvolver-se quer em campo quer em câmaras de frio, durante o período de conservação. O seu desenvolvimento inicia-se no colo da planta e as folhas ficam com um tom amarelo, caem e apodrecem. As raízes ficam com micélio de coloração branca e aparecem os esclerotos, inicialmente brancos e posteriormente negros. Estes, tem capacidade de permanecer viáveis durante vários anos no solo. As condições favoráveis para o desenvolvimento deste fungo são as temperaturas amenas, entre os 12 a 25°C, a elevada densidade de sementeira, excesso de azoto e qualquer ferida na planta, que acaba por ser a porta de entrada para a doença (Vilmorin, 2024; Joshi & Walia, 2024).

A podridão da raiz é causada pelo fungo (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn), responsável pelos sintomas de raiz bifurcada e pelo estrangulamento do colo, que tem tendência a estiolar e a encortiçar. Os danos são mais frequentes nas raízes como o desenvolvimento de grandes manchas ocas. Pode ser confundido com o cavity spot. O desenvolvimento do fungo dá-se sob condições de solo húmido com temperaturas a partir de 15°C (Vilmorin, 2024; Grisham & Anderson, 1983).

A podridão negra das raízes desenvolve-se devido à presença de fungos, nomeadamente, (*Alternaria radicina* Meier) e (*Stemphylium radicinum* Meier). Trata-se de uma doença com grande impacto na conservação em câmaras de frio. Na raiz, formam-se ligeiras depressões oriundas de manchas negras que podem ter vários centímetros de diâmetro e estar cobertas de micélio escuro. Além de surgir na conservação também surgem no campo, onde são inicialmente contaminadas levando o fungo para a área de conservação. Este fungo tem uma ampla adaptabilidade de temperaturas, podendo variar entre os 0°C a 30°C, sendo a temperatura ótima de 16°C (Vilmorin, 2024).

A podridão intervenal, causada pelo fungo (*Phytophthora megasperma* (R. & J.) Pethybridge), manifesta-se através de manchas escuras e translúcidas ao redor da raiz. Os tecidos contaminados acabam por apodrecer. Esta sintomatologia é observável durante o período de inverno e na conservação em câmaras de frio. Fatores como a temperatura amena, excesso de humidade e ausência de rotações culturais contribuem significativamente para a disseminação da doença (Vilmorin, 2024).

A murchidão ou dampinf-off, pode ser causada por fungos como *Pythium* spp., (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.), *R. solani*, *A. radicina*, *A. dauci*. Estes fungos causam necroses nas células da zona do colo da planta, que acaba por tombar provocando a morte das plântulas. As plantas que sobrevivem podem apresentar raízes bifurcadas. A presença destes fungos também está associada a quebras na emergência que são agravadas com condições climáticas adversas e preparações de solo pouco adequadas. Existem fatores que potenciam a doença, tais como, solos mal drenados e compactos, excesso de humidade na fase de germinação, ambiente fresco e húmido. No caso de *R. solani* e *F. solani* as temperaturas ótimas são mais elevadas (Vilmorin, 2024; Kode et al., 2021).

Aster Yellows, é causada por um micoplama (*Candidatus Phytoplasma asteris*), que provoca alteração na cor e desenvolvimento vegetativo da cultura da cenoura. O micoplasma encontra-se no floema das plantas provocando um bloqueio de crescimento nas plantas e desenvolvem-se raízes adventícias de forma anormal. A tuberização da raiz principal sofre uma paragem. A sua transmissão é feita por cicadelídeos (*Macrostelus fascifrons*) e por psilas (*Trioza nigricornis*). Existe um transporte do micoplasma através do floema da planta (Schuh et al., 2023).

A cultura da cenoura também é afetada por vírus, entre os quais os causadores da folha vermelha.

O carrot red leaf virus (CtRLV) e Carrot mottle virus (CMoV). Os sintomas na cultura são observáveis através da tonalidade vermelha que se manifesta na folhagem da cenoura, que inicialmente pode ser confundida com carências nutricionais. Quando existem ataques severos o desenvolvimento vegetativo fica bloqueado o que se reflete na produtividade cultural. Esta doença é disseminada através de insetos vetores, especificamente o afídeo *C. aegopodii*. O que torna essencial o controlo dos afídeos na cultura (Vilmorin, 2024; Yoshida, Naoto, 2020).

O vírus da folha vermelha, manifesta sintomas muito semelhantes à bactéria “*Ca. L. solanacearum*” cuja doença é conhecida pelo declínio amarelo das Apiáceas.

A cultura da cenoura também é afetada por várias bactérias. A queima bacteriana da folha, causada pela bactéria (*Xanthomonas carotae* Fawcett), aparece tendencialmente na margem dos folíolos como pequenos pontos de cor amarela, evoluindo posteriormente para

manchas castanhas com auréola amarela. Os folíolos ficam com um aspeto enrolado chegando a provocar necroses nas folhas e pecíolos. As condições ideais para o desenvolvimento desta bactéria são humidade elevada e temperaturas entre os 25 a 30°C (Vilmorin, 2024).

A sarna comum, causada por espécies de bactérias do género *Streptomyces* spp., é uma doença que se manifesta na cenoura através de verrugas na parte superior da raiz. Expõem uma textura encortiçada e aspeto seco. Esta doença manifesta-se essencialmente durante períodos secos e em solos naturalmente ácidos, com pH inferior a 6 (Vilmorin, 2024).

O declínio amarelo das Apiaceae é uma recente doença bacteriana que afeta culturas hortícolas, como a cenoura, o coentro e a salsa. Esta doença, foi detetada em Portugal em 2017, na região Oeste. No entanto, afeta outros países da Europa, como a Espanha, onde é responsável por grandes impactos económicos (Cruz et al., 2018). Dada a relevância desta doença neste trabalho, a doença do declínio amarelo das Apiaceae é descrita mais pormenorizadamente no ponto seguinte.

## **2.2 O Declínio amarelo das apiáceas**

### **2.2.1 Biologia, sintomatologia e estragos**

A doença do declínio amarelo das Apiaceae é causada pela bactéria “*Ca. L. solanacearum*”. Esta bactéria é um agente patogénico de Solanaceae, mas também causa graves distúrbios fisiológicos nas espécies Apiaceae, como nas cenouras (Haapalainen, 2014). Esta bactéria Gram-negativa, é limitada pelo floema e não cultivável que é transmitida de plantas infetadas para plantas saudáveis naturalmente por insetos vetores psilídeos e artificialmente por enxertia (EPPO, 2020).

As espécies desta bactéria são um grupo com bastante variabilidade que colonizam o floema das plantas hospedeiras. Isto, leva ao colapso das vias condutoras, interrompendo o transporte dos assimilados o que resulta na morte celular geral (Sauer et al., 2024).

São conhecidos, até agora, vários haplótipos da bactéria, nomeadamente, o haplótipo A, B, C, D e E que são conhecidos por infetar diferentes culturas com elevada importância económica. Os haplótipos A e B são transmitidos pela *Bactericera cockerelli* a

plantas solanáceas. O haplótipo C, é transmitido por *Trioza apicalis* às plantas de cenoura. Respetivamente ao haplótipo D e E, também transmissíveis a Apiaceae o principal vetor responsável pela transmissão é a *Bactericera trigonica* (Sauer et al., 2024).

No desenvolvimento cultural das cenouras, as infecções pela bactéria apresentam sintomas (**Figura 6**) como o enrolamento das folhas, descoloração amarelada, bronze e arroxeadas das folhas, nanismo dos brotos e das raízes da cenoura e proliferação de raízes secundárias (EPPO, 2020).



**Figura 6** -Sintomas de referência da “*Ca. L. solanacearum*” (Cruz et al., 2018)

As plantas de cenoura apresentam cloroses evidentes na parte aérea, que atinge a generalidade das folhas, parte dos folíolos, demonstram enrolamento e um bronzeado acompanhado de colorações violácea. Também é evidente um reduzido crescimento das folhas e das raízes, bem como deformação e desenvolvimento de raízes secundárias/adventícias. Noutras Apiaceae verificam-se sintomas de folhagem bastante idênticos (Cruz et al., 2018).

É extremamente difícil atribuir claramente os sintomas da cenoura e as perdas culturais às infecções pela bactéria “*Ca. L. solanacearum*”. Todos os sintomas associados à doença são inespecíficos e facilmente podem ser idênticos e associados a carências nutricionais ou causado por stress ambiental sob a cultura. Além disso, o vírus da folha vermelha da cenoura, causa sintomas praticamente iguais, tais como a descoloração da folhagem, nanismo, proliferação de caules de plantas e o desenvolvimento de bastantes raízes adventícias/secundárias (Sauer et al., 2024).

O número de folhas que apresentam sintomas de descoloração e a redução do peso da raiz está diretamente relacionado com o grau de infecção da planta. Quando as células do floema estão densamente colonizadas pela bactéria, estas colapsam (Haapalainen, 2014).

A distribuição da bactéria na Europa representa uma grande ameaça fitossanitária à produção de várias espécies de plantas. A “*Ca. L. solanacearum*” foi localizada pela primeira vez em 2008 na Finlândia e de seguida na Espanha (Trkulja et al., 2023).

Posteriormente a presença da bactéria foi detetada na Suécia e Noruega em 2011. Seguiu-se a França em 2012 e a Alemanha em 2014. Em 2016 foi confirmada na Grécia, Itália e Reino Unido. Mais tarde a Bélgica, Estónia e Portugal confirmaram a doença em 2017. Na Áustria foi verificada a presença em 2019 e na Sérvia e Turquia em 2020 (Trkulja et al., 2023).

A importação de batata-de-semente dessas mesmas áreas geográficas constitui um risco acrescido. Fatores ambientais, são considerados riscos menores, fatores tais como chuva ou vento (Cruz et al., 2018).

A contaminação cruzada entre culturas de Solanáceas e Apiáceas ou a presença de insetos vetores não infecciosos são questões consideradas de baixo risco. É sugerido que que exista uma monitorização dos campos vizinhos sempre que existam culturas destas famílias, e que sempre que exista qualquer suspeita da presença da doença sejam feitas as devidas análises. É importante considerar a possibilidade que as sementes podem ser veículo da bactéria, sendo essencial controlar devidamente a origem das sementes, bem como, reunir informação necessária para o despiste desta e de outras doenças quando se obtém as mesmas (Cruz et al., 2018).

Atualmente, não se verifica conhecimento suficiente para controlar a doença, contudo, é essencial controlar os potenciais vetores, tentando impedir a sua introdução e

transmissão. A análise de risco iniciada pela OEPP/EPPO (Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção das Plantas/ European and Mediterranean Plant Protection Organization) identifica como principais riscos para a introdução da bactéria na Europa, os frutos de plantas da família as Solanáceas, como o tomate, pimento, beringela, entre outros, importados de países cuja presença está confirmada (Cruz et al., 2018).

A incidência e o impacto da doença são variáveis de ano para ano sendo influenciada por diversos fatores, nomeadamente, o tamanho da população de vetores, dos predadores dos vetores, das condições climáticas, das variedades presentes na parcela e nas práticas agrícolas aplicadas (Haapalainen, 2014).

### **2.2.2 Transmissão da *Ca. L. solnanacearum***

Embora a bactéria seja disseminada principalmente por insetos vetores psílídeos, também existe propagação da mesma através de material vegetativo infetado, assim como por batata de semente (Trkulja et al., 2023).

Os psílídeos (Hemiptera: Psylloidea) com cerca de 2 a 3 mm de comprimento cuja alimentação se baseia na seiva das plantas, sugando-a através do aparelho bucal denominado de estilete (Haapalainen, 2014).

O ciclo de vida dos psílídeos começa com o acasalamento dos adultos férteis, posteriormente segue-se a oviposição da fêmea nas folhas da planta hospedeira, segue-se a eclosão dos ovos e o desenvolvimento ninfal ao longo de cinco estágios instares, e a emergência dos adultos (Haapalainen, 2014).

A duração do ciclo de vida, o número de ovos, o alcance do voo, o número de gerações anuais e os hospedeiros em que estes insetos hibernam dependem além da espécie em questão também das condições ambientais a que estão expostos (Trkulja et al., 2023).

Como já referido, dependendo da estação e das condições climáticas, os adultos (recém-emergidos), voam para novas plantas hospedeiras e iniciam um novo ciclo. No inverno, migram para plantas de abrigo. Os psílídeos adultos são capazes de voar cerca de

1km de distância, ou até mais devido à influência do vento (Haapalainen, 2014). O tempo necessário para o desenvolvimento do ovo até a adulto maduro depende da temperatura, mas geralmente é cerca de um mês (Haapalainen, 2014).

Através dos ciclos de vida curtos, as populações podem desenvolver-se muito rapidamente se não forem tomadas medidas de controlo. Quando um psílídeo se alimenta da seiva do floema de uma planta infetada, a bactéria pode ser ingerida por este. Através do vetor a bactéria consegue entrar para uma nova planta. O tempo que decorre entre a aquisição do patógeno e o momento do potencial de transmissão do patógeno para uma nova planta pelo inseto vetor denomina-se de período latente, este período é variável tendo em conta a cultura e o vetor (Haapalainen, 2014).

As três espécies vectoras que foram estabelecidas até então incluem a *B. cockerelli*, *T. apicalis* e *B. trigonica*, tendo em conta que as últimas duas mencionadas são extremamente importantes na Europa, principalmente para plantas da família Apiaceae (Trkulja et al., 2023).

A *B. trigonica* tem duas ou três gerações por ano, alimenta-se de cenouras e outras plantas, e os adultos hibernam em arbustos perenes. A *T. apicalis* é uma praga comum da cenoura no Norte e centro da Europa, tem apenas uma geração anual. No início do verão, em junho e julho, os psílídeos alimentam-se de cenouras e produzem uma nova geração que posteriormente, em adulto, hiberna em árvores coníferas (Haapalainen, 2014).

A dispersão da doença do declínio amarelo das Apiáceas, planta a planta foi confirmada para ambos os vetores acima mencionados, através da alimentação, pois a bactéria foi encontrada em vários órgãos internos do corpo destes vetores, sendo transmitida ao hospedeiro de forma persistente (Cruz et al., 2018).

A transmissão desta bactéria é similar à dos vírus de propagação persistente, pois, requer que esta permaneça por um determinado período nos tecidos do vetor, permitindo que se multiplique antes de ser transmitido a uma nova planta (Trkulja et al., 2023).

Existem outros vetores que podem transmitir a doença, tal como a *B. cockerelli*, também é reconhecida como inseto vetor (Cruz et al., 2018).

No caso de *B. cockerelli* foi demonstrado que consegue adquirir a bactéria, mas a transmissão à descendência não se encontra definitivamente confirmada (Cruz et al., 2018).

Existem combinações de alelos diferentes nesta bactéria, os haplótipos A e B são transmitidos pela *B. cockerelli* de plantas solanáceas infetadas para plantas saudáveis. No caso das plantas Apiaceae, o haplótipo C é transmitido pela *T. apicalis*, enquanto os haplótipos D e E são vetorizados pela *B. trigonica* (EPPO, 2020).

O psílídeo da cenoura poderá ser um vetor menos eficiente na transmissão da bactéria do que o psílídeo da batata, tendo em conta que será necessária uma grande concentração da bactéria para a infeção das cenouras e para o desenvolvimento da doença (Haapalainen, 2014).

A bactéria “*Ca. L. solanacearum*”, pode ser transmitida e disseminada pelos seus vetores, mas também através de plantas portadoras da doença, como sementes. O processo comercial de sementes, verificado mundialmente, pode induzir a contaminação entre países quer pelo material de propagação ou até pelo transporte de vetores que disseminem a infeção, por exemplo, os ovos dos insetos vetores (EPPO, 2020).

A bactéria também pode estar presente nas sementes. No caso das batatas-desemente infetadas, geralmente, não germinam, mas em casos raros podem produzir plantas infetadas. No entanto, plantas infetadas cuja transmissão ocorreu por via da semente são geralmente fracas e de curta duração, não contribuindo significativamente para a propagação da doença. As sementes das solanáceas não transmitem a bactéria (EPPO, 2020).

Para mitigar a propagação a outros potenciais hospedeiros, é importante que exista um controlo da bactéria em lotes de sementes vendidos a nível mundial. É necessário investigar sobre a produção de sementes de cenoura em campos isentos de pragas ou em instalações isentas de insetos, para garantir que as mesmas são eximes desta bactéria (Bertolini et al., 2015).

### **2.2.3 Métodos de diagnóstico**

As espécies de *Candidatus Liberibacter* são parasitas obrigatórios de plantas e de psílídeos e dessa forma apenas se conseguem multiplicar nos hospedeiros. Desta forma é essencial recorrer a métodos de identificação molecular, que permitem identificar de uma forma sensível e específica o agente patogénico presente na planta.

Os métodos desenvolvidos para detetar “*Ca. L. solanacearum*” compreendem o PCR convencional e quantitativo em tempo real (EPPO, 2024). Estes métodos podem detetar ou identificar a “*Ca. L. solanacearum*” em material vegetal ou insetos (Teresani et al., 2014).

Os modelos PCR requerem preparação de extratos e purificação de ácidos nucleicos o que é processo mais moroso e trabalhoso que aumenta o risco de contaminação do material (Teresani et al., 2014).

A sequenciação de DNA é uma ferramenta importante para identificar microrganismos. Com a possibilidade de detetar genes ou regiões específicas para bactérias e fungos, respetivamente, e posteriormente comparar com bancos de referência, ajuda a efetuar identificações com precisão. As tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS), permitem efetuar análises em plantas com e sem genoma obtendo a sequenciação a uma escala genómica. É possível descobrir genes, marcadores, descobrir RNA bem como outros aspetos. É um método preciso que fornece um grande número de sequências de referência estabelecidas (Brautigam & Gowik, 2010).

De forma abstrata, esta técnica NGS, permite efetuar análises rápidas e abrangentes de populações de ácidos nucleicos. São emitidas sequencias de DNA para serem analisadas (Metzker , 2010).

### **3. Material e métodos**

Para a realização dos ensaios, quer em campo como em estufa, foram selecionadas nove variedades com maior relevância na região. Estas sementes foram obtidas em duas empresas de sementes, no entanto, o seu nome não será divulgado uma vez que não foi facultada autorização para o efeito. As variedades foram devidamente identificadas e separadas para as respetivas sementeiras.

#### **3.1 Procedimento em campo**

Para a instalação do ensaio em campo, foi necessário determinar uma organização adequada à situação, quais as necessidades para a instalação do mesmo. No decorrer do desenvolvimento cultural foram efetuadas observações visuais de sintomas, a monitorização dos insetos vetores e também foi realizada a colheita de amostras para posterior análise.

##### **3.1.1 Organização do ensaio**

Cada variedade teve quatro repetições ao longo da parcela. Foram feitas linhas de 71 metros, levando aproximadamente 10 000 sementes/linha. No total, cada variedade esteve representada com aproximadamente 40 000 sementes. No total do ensaio, foram semeadas aproximadamente 360 000 sementes.

O condicionamento da sementeira mecanizada, não permitiu fazer troca de sementes até a quarta repetição ser semeada. O processo de troca constante iria obrigar a aspirar os depósitos a cada 71 metros semeados o que levaria a perdas de semente, de tempo e não seria prático nem objetivo.

Para a realização do ensaio foram fornecidas 900 000 mil sementes, de forma gratuita, por parte das empresas envolvidas no fornecimento das mesmas.

A cada uma das nove variedades foi atribuída uma letra, nomeadamente, A, B, C, D, E, F, G, H, I.

O semeador, tinha capacidade de semear três linhas, então as primeiras foram a A, B, e C que foram colocadas nos depósitos e semeadas nas quatro posições observadas na (**Figura 7**). Quando a última repetição era semeada, eram trocadas as sementes e foi efetuado a processo de troca três vezes.



**Figura 7-** Esquema do ensaio

Cada modalidade foi devidamente identificada com placas (**Figura 8**) no início e final de cada linha de sementeira de modo a não haver enganos nas observações por variedade.



**Figura 8** - Ensaio devidamente identificado

### 3.1.2 Instalação do ensaio

O ensaio foi conduzido numa parcela homogénea de solo arenoso localizada no concelho de Óbidos. A sementeira decorreu no mês pré-estabelecido, sendo efetuada no dia 29 de fevereiro de 2024.

O comprimento, como acima mencionado foi de 71 metros, a sementeira foi efetuada por um semeador pneumático de 3 linhas (modalidades) da marca Orietta (**Figura 9**). A largura de trabalho foi 1.65 metros. Cada repetição tinha 9 linhas, tendo em conta que o semeador semeou 3 linhas de cada vez, necessitou de passar três vezes para realizar cada uma das repetições.



**Figura 9** - Sementeira em campo

Na totalidade, realizou doze passagens para efetuar toda a sementeira, perfazendo dessa forma uma largura total de 20 metros de ensaio. Desta forma a área total do ensaio foi de aproximadamente 1420 m<sup>2</sup> sendo possível verificar no **quadro 1** todos os dados mencionados sobre o ensaio em campo.

**Quadro 1** - Dados do ensaio em campo

<b>Dados do ensaio em campo</b>	
<b>Data da sementeira</b>	29/02/2024
<b>Nº de Variedades</b>	9
<b>Área do ensaio</b>	1420 m <sup>2</sup>
<b>Nº de Repetições</b>	4
<b>Largura de trabalho</b>	1,65 metros
<b>Comprimento das linhas</b>	71 metros

<b>Semeador</b>	Orietta de 3 linhas
<b>Sementes por linha</b>	10 000
<b>Sementes por variedade</b>	40 000
<b>Total de sementes do ensaio</b>	360 000

Todas as operações culturais, tratamentos fitossanitários, plano de rega e outros aspetos necessários para o desenvolvimento da cultura foram totalmente assegurados pelo produtor que se disponibilizou e aceitou a realização deste ensaio na sua exploração agrícola. Foi importante manter as intervenções culturais habituais do agricultor para que não houvesse qualquer alteração no desenvolvimento e tratamento da cultura.

Estas variedades foram escolhidas devido ao facto de serem as mais comercializadas e utilizadas na região. Por outro lado, algumas destas são mais recentes e houve necessidade de estudar a resistência ao declínio amarelo das Apiaceae causada pela “*Ca. L. solanacearum*”.

### 3.1.3 Organização da monitorização em campo

Após a sementeira, foram feitas visitas ao campo semanais. Inicialmente, até à emergência das plântulas, foram realizadas com mais frequência de forma a conseguir determinar a semana em que começaram a surgir as primeiras emergências. O período em que decorreram estas observações decorreu entre março e agosto de 2024.

Neste período, foram observados possíveis sintomas na cultura, presença de vetores, quer nas plantas quer nas placas cromotrópicas de cor amarela. Também foram monitorizados possíveis sintomas a nível radicular e foram realizadas observações ao microscópio de ovos, pupas e ninfas.

Em março, foram observadas as primeiras emergências especialmente nas variedades B, C, D e G foram as que tiveram um desenvolvimento mais rápido (**Figura 10**).



**Figura 10** - Primeiras emergências (Variedade C e G)

As observações foram feitas ao longo das linhas, observando o desenvolvimento vegetativo de 3 linhas de cada vez. Não seria viável estabelecer pontos de observação tendo em conta que os sintomas poderiam surgir em qualquer local do ensaio, dessa forma foi estabelecido que seria observada toda a área do mesmo.

As placas cromotrópicas foram colocadas pela primeira vez a 22 de março de 2024, quando a cultura já tinha alguma área foliar representativa, foram trocadas semanalmente até ao final do ciclo cultural das cenouras. Foram estabelecidos três pontos estratégicos no campo de ensaio, de forma a cobrir toda a área do mesmo (**Figura 11**).



**Figura 11** -Localização das placas cromotrópicas

Esses pontos tinham em consideração a orientação predominante do vento no local e também as manobras das máquinas agrícolas, de forma a não serem danificadas pelas mesmas. As placas foram marcadas com o número da semana e com a localização onde estavam, por exemplo P1L1 (Placa1; Localização1); P1L2; P1L3 (**Figura 12**).



**Figura 12** - Identificação das placas

A partir da detecção dos primeiros sintomas, em meado de abril, o ensaio foi monitorizado com extrema atenção de forma a registrar qualquer evidência de sintoma. Foi realizada uma tabela de forma a registrar a ausência (0) ou presença (1) dos sintomas por variedade, em cada uma das repetições (**Figura 13**). O esquema em desenho servia para marcar o local onde se tinham observado os sintomas de forma a acompanhar o desenvolvimento dos mesmos. Posteriormente, os dados foram registados numa folha de cálculo em Excel.

Data de Observação	Identificação das repetições			
Variedades	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				
I				

Outras observações:

Legenda:	
Ausência	0
Presença	1

Marcar neste esquema os locais das observações semanais a começar a meados de Abril.

**Figura 13** - Folha de registo do aparecimento de sintomas no campo

Como mencionado, a monitorização dos sintomas e a troca das placas cromotrópicas foram realizadas semanalmente, com registos fotográficos (**Figura 14**) e em papel. O desenvolvimento cultural ocorreu de acordo com o que habitual com a presença de pragas e doenças que são expectáveis e comuns nas parcelas. Foram efetuados os tratamentos fitossanitários, as adubações e a monda de infestantes sempre que o agricultor considerou necessário.



**Figura 14** - Evolução vegetativa do ensaio

### 3.1.4 Observação de sintomas

Foram monitorizados os desenvolvimentos vegetativos da cultura e se existiam variedades com sintomatologia da doença. Foi efetuado o registo da observação visual por variedade de forma tolerância à doença. Simultaneamente foram feitos registos fotográficos de forma a conseguir demonstrar as possíveis diferenças entre variedades e os possíveis sintomas (**Figura 15**).



**Figura 15** - Esquema dos registos efetuados na monitorização

Durante a monitorização, houve uma recolha aleatória de folhas de cenoura infestadas para verificar se existem larvas e/ou pupas e fazer identificações mais específicas. As folhas foram colocadas dentro de um saco de plástico com efeito balão, devidamente identificado (com a referência do campo e a data de colheita da amostra). Neste momento foram verificados os primeiros sintomas sugestivos da doença e foi iniciado o controlo semanal de sintomas no ensaio de campo. A primeira observação com registos foi realizada a 19 de abril de 2024, altura em que a cultura ainda apresentava baixa densidade foliar (**Figura 16**).



**Figura 16** - Registo fotográfico do ensaio em campo a 19 de abril de 2024

Ainda em abril houve monitorização, com respetiva recolha aleatória de algumas cenouras por variedade e por repetição de modo a observar possíveis desenvolvimentos sintomáticos na vegetação (**Figura 17**).



**Figura 17** - Monitorização de cenouras através do microscópio a 22 de abril de 2024

### 3.1.4 Monitorização de insetos vetores

Paralelamente à monitorização visual dos sintomas sugestivos da doença, foi efetuada a monitorização dos insetos vetores conhecidos como responsáveis pela transmissão da “*Ca. L. solanacearum*”, nomeadamente, as espécies vetorais que foram estabelecidas e até então incluem a *B. cockerelli*, *T. apicalis* e *B. trignonica*.

A monitorização teve início no mês de março, a partir da colocação das primeiras placas, a troca das mesmas foi feita semanalmente. As observações foram registadas por placa e por localização, tendo em conta que, no ensaio, estavam presentes 3 placas simultaneamente. Não foram contados os vetores, apenas registada a presença (1) ou ausência (0) dos mesmos. A monitorização foi efetuada ao longo de 13 semanas.

As monitorizações dos insetos picadores-sugadores na cultura da cenoura foram efetuadas com placas cromotrópicas amarelas, como mencionado anteriormente. Foi seguido o protocolo do projeto RedeSusterra, adaptado ao ensaio.

No que diz respeito ao procedimento para a instalação e recolha das placas cromotrópicas amarelas, foram utilizadas as quadriculadas da Biosani, um suporte de madeira e um arame para fixar as placas. Também foram necessárias molas da roupa para fixar as mesmas à caixa de cartão, quando recolhidas. Todas as placas foram devidamente identificadas com um marcador de acetato (**Figura 18**).



**Figura 18** - Material necessário para a instalação das placas cromotrópicas

A instalação das placas teve em conta a predominância do vento na parcela (predominantemente norte) e a aproximação da área foliar. As placas foram trocadas, sempre que possível, a cada 7 dias e quando retiradas, foram devidamente acondicionadas de forma a não tocarem umas nas outras. Foram identificadas com o número da semana, com a data de colocação e com a localização (L1, L2 ou L3), tendo em conta que o ensaio tinha 3 placas simultaneamente.

Após a recolha das placas, estas, foram acondicionadas até serem observadas no laboratório da Escola Superior Agrária de Santarém através do microscópio ótico disponível.

### 3.2 Procedimento em estufa

A estufa onde foi instalado o ensaio foi em Santarém, na Escola Superior Agrária. O ensaio foi devidamente preparado e organizado de forma a conseguir acompanhar o desenvolvimento cultural das mesmas variedades, mas, em ambiente protegido.

#### 3.2.1 Instalação do ensaio

Foi efetuado o ensaio em estufa, no mesmo período que em campo. A preparação do ensaio começou a 4 de março de 2024 com a organização do local e dos materiais. A sementeira foi efetuada a 8 de março de 2024 (**Figura 19**), como indicado no **quadro 2**, posteriormente foi feita a primeira rega.



**Figura 19** - Sementeira em estufa

## Quadro 2 - Dados do ensaio em estufa

Dados do ensaio em estufa	
Preparação dos vasos	04/03/2024
Data da sementeira	08/03/2024
Nº de Variedades	9
Nº de Repetições	4
Sementes por vaso	4
Total de sementes do ensaio	144

Tal como no campo, as observações foram feitas semanalmente. A rega foi assegurada inicialmente por um voluntário com acesso à estufa e posteriormente foi realizada de forma automática com pequenos aspersores colocados nos vasos.

A 20 de março de 2024 já todas as variedades tinham emergido e apresentavam sensivelmente o mesmo nível de desenvolvimento vegetativo (**Figura 20**).



**Figura 20** - Emergência das plantas em estufa

As observações continuaram de forma a verificar o normal desenvolvimento foliar e também se existiam sintomas aparentes da doença. Nas nove variedades não se registaram oscilações no que diz respeito ao normal desenvolvimento da cultura (**Figura 21**).



**Figura 21** – Registo fotográfico do ensaio em estufa no mês de abril

### 3.2.2 Monitorização visual dos sintomas

Durante o desenvolvimento das cenouras em vaso, foram registados os sintomas sugestivos da doença. A metodologia de registo em estufa foi diferente, tendo em conta a maior facilidade de observação. Sempre que eram detetadas alterações sugestivas da presença da “*Ca. L. solanacearum*”, o registo da observação era efetuado com registo fotográfico assinalando a respetiva variedade, repetição e data. As observações foram efetuadas entre abril e julho de 2024 e devidamente registadas e organizadas.

### 3.2.3 Monitorização de insetos vetores

Também foi colocada uma placa cromotrópica de cor amarela de forma a controlar a presença dos vetores. Embora seja um ambiente protegido não seria possível garantir a ausência dos mesmos sem o controlo com a placa.

A placa cromotrópica também foi observada durante todo o período do ensaio em estufa de forma a controlar a ausência ou presença dos vetores (**Figura 22**).



**Figura 22** -Placa cromotrópica no ensaio em estufa

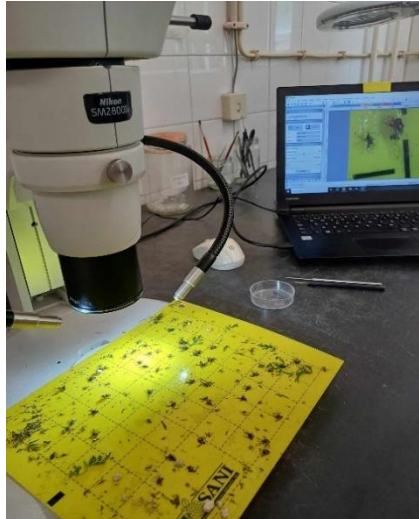
### 3.3 Procedimentos laboratoriais

#### 3.3.1 Identificação dos insetos vetores

Os registos dos vetores encontrados foram efetuados na folha de cálculo Excel (**Anexo 1**), onde está especificado a ausência ou a presença do vetor na placa em questão, em que (0) diz respeito à ausência e (1) à presença, não tendo em consideração quantos, apenas considerando a presença. Em cada semana foi feito o registo onde consta a data de colocação das placas, a data de recolha e a data de observação das mesmas.

A pesquisa dos vetores foi feita de acordo com a pesquisa e informação registada até então, sobre os vetores responsáveis pela transmissão da doença. Foi registada a localização das placas (L1, L2, L3) de forma que fosse possível verificar se em alguma das localizações há maior presença de vetores.

Existe também um local de registo de observações, caso haja algum aspeto relevante sobre a placa ou sobre a presença dos insetos. Todas as placas foram observadas individualmente (**Figura 23**) e registos os vetores presentes nessas mesmas placas



**Figura 23** - Observação das placas cromotrópicas

### 3.3.2 Recolha das amostras

Quando já se verificavam os sintomas sugestivos da doença em todas as variedades, foi possível fazer a recolha, em campo, de uma cenoura por variedade e repetição com sintomas e outra cenoura por variedade e por repetição, sem sintomas. Esta recolha foi realizada 93 dias após a sementeira, a 2 de junho de 2024. Na estufa, foi recolhida uma amostra da rama de cenoura por variedade.

Com esta recolha pretendeu-se adquirir material vegetal sintomático e assintomático de forma a testar o mesmo para verificar a ausência ou presença da bactéria. Foi recolhido o material em campo (**Figura 24a**) e também em estufa (**Figura 24b**)



**Figura 24** - Recolha das amostras em campo (a) e em estufa (b)

Em ambas as recolhas, as amostras foram colocadas em sacos de plásticos devidamente identificados por variedade.

### 3.3.3 Maceração das amostras

O material vegetal utilizado no ensaio fez no total 27 amostras, mais precisamente, 18 oriundas do ensaio de campo, onde 9 são de plantas sintomáticas e outras 9 de plantas assintomáticas. O material vegetal recolhido no ensaio da estufa contabilizou mais 9 amostras de plantas sintomáticas.

No laboratório da Escola Superior Agrária de Santarém, procedeu-se aos processos necessários para a extração do DNA. Iniciou-se esse processo com a maceração das amostras recolhidas.

As amostras, de forma individual, foram colocadas num almofariz, adicionando-se azoto líquido à amostra (**Figura 25**) de forma a promover uma rutura celular de forma mais fácil e preservando o DNA da mesma. Após adicionado o azoto, a amostra foi macerada até ficar totalmente em pó (**Figura 26**).



**Figura 25** - Adição de azoto líquido à amostra



**Figura 26** – Amostra macerada

Posteriormente, quando todas as amostras se verificaram maceradas, encheram-se dois microtubos para cada amostra macerada, garantido que cada variedade ficou com dois exemplares devidamente preparados para os processos seguintes. Durante o processo de maceração os microtubos foram sendo colocados em gelo (**Figura 27**) até que todas as amostras estivessem prontas.



**Figura 27** - Microtubos mantidos em gelo

Entre cada maceração o material foi devidamente trocado garantido a limpeza do material tal como a descontaminação das mãos e da bancada com etanol. Após a maceração de todas as amostras os microtubos foram congelados e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Figura 28**), exceto, os 9 microtubos correspondentes às amostras sintomáticas recolhidas no campo que foram de seguida usados para extração do DNA.



**Figura 28** - Conservação das amostras

### 3.3.4 Extração do DNA das amostras maceradas

A extração do DNA bacteriano foi realizada segundo o método CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamonio), de acordo com (Munyaneza et al., 2010), com algumas adaptações. Às folhas maceradas em azoto líquido foram adicionados 600 µL de tampão de extração CTAB 2% (CTAB 1X: 20mM EDTA, 0,1M Tris HCl pH 8, 1,4M NaCl, 2% de CTAB, 4% PVP, 0,1% de β-mercaptoetanol, adicionados imediatamente antes da sua utilização, e 0,5% de Proteinase K). A suspensão foi incubada a 55°C durante 90 min e misturada, por inversão, a cada 15 min. De seguida, foram adicionados 600µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e os microtubos sujeitos a agitação durante 10 min. Procedeu-se de seguida à centrifugação dos microtubos durante 10 min a 13000rpm, o sobrenadante foi recuperado para novos microtubos, aos quais se adicionaram 2,5 volumes de etanol absoluto frio. De seguida, homogeneizaram-se as amostras por inversão e centrifugaram-se a 13000rpm durante 20 min. Descartou-se o sobrenadante e o ‘pellet’ foi lavado com 500µL de etanol a 70%. Voltou-se a centrifugar a 13000rpm durante 15 min e o sobrenadante foi descartado. O ‘pellet’ ficou a secar à temperatura ambiente e em cima de papel absorvente para promover a evaporação do etanol na totalidade. Para terminar, ao ‘pellet’ foram adicionados 30µL de água estéril e o DNA foi conservado a -20 °C.

O processo (**Figura 29**) foi realizado, inicialmente, para o conjunto de amostras sintomáticas das plantas do ensaio em campo.



**Figura 29** - Processo de extração CTAB

### 3.3.5 PCR Convencional

O DNA bacteriano extraído das 9 amostras foi sujeito a PCR (Reação da polimerase em cadeia) (**Figura 30**) para amplificação de uma porção de 383pb da região 16S-23S rRNA IGS, utilizando os ‘primers’ Lso TX 16/23F e Lso TX 16/23R (Ravindran et al., 2011) que são específicos para “*Ca. L. solanacearum*”:

- Lso TX 16/23F (primer direto): 5'-AAT TTT AGC AAG TTC TAA GGG-3';
- Lso TX 16/23R (primer reverso): 5'-GGT ACC TCC CAT ATC GC-3'

As reações foram realizadas para um volume final de 25 µl e foram compostas por: 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 nM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de DreamTaq DNA polimerase e 2 µl de DNA. A amplificação foi realizada num termociclador (Eppendorf), com uma etapa inicial de desnaturação de 98 °C por 30 segundos seguida por 35 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 s, e uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos resultantes da amplificação foram analisados através da electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,5X: 1,1M Tris; 900mM Borate; 25mM EDTA; pH 8,3) com uma voltagem constante de 80V, durante aproximadamente 1h. Para posterior análise, utilizou-se como referência o marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) e os géis foram visualizados num aparelho de digitalização de imagem SMART t5 (VWR, Universidade de Évora).



**Figura 30** - Processo do PCR convencional

### **3.3.6 NGS (Sequenciação de Nova Geração)**

O DNA total extraído foi eluído em 30  $\mu$ l de tampão de eluição e foi enviado para a empresa STABVida (Caparica, Portugal) para Sequenciação de Nova Geração (NGS) da região 16S.

## 4. Análise e discussão dos resultados

### 4.1 Resultados obtidos no ensaio de campo

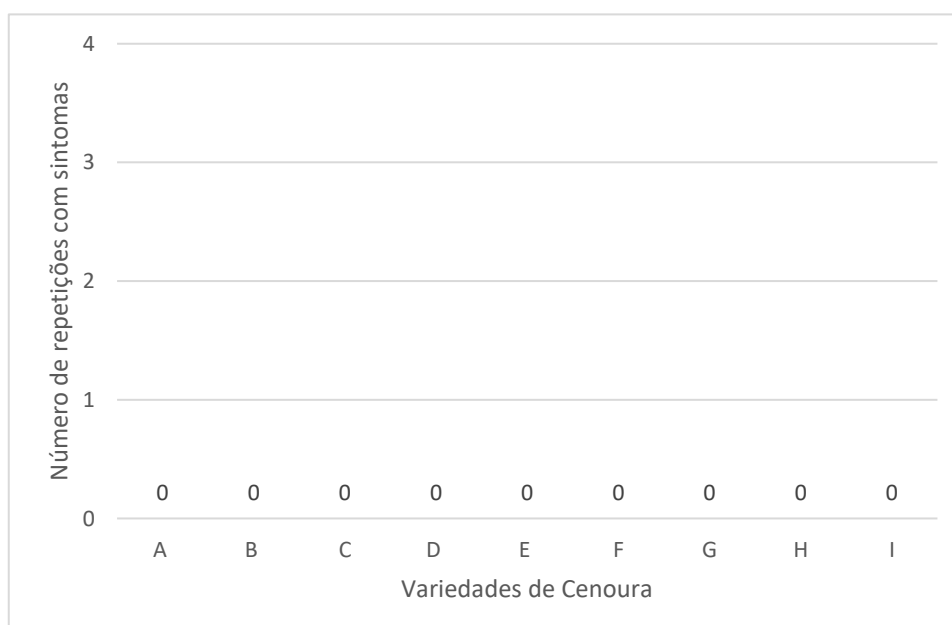
Aparentemente, os sintomas observados correspondem aos associados à “*Ca. L. solanacearum*”. No entanto, as observações necessitam de confirmação molecular para garantir que não possa ser outro organismo a causar esta sintomatologia.

Após verificados os primeiros sintomas aparentes da doença (**Figura 31**), numa recolha aleatória de plantas e observada no microscópio, foram iniciadas as observações semanais por variedade e por repetição.



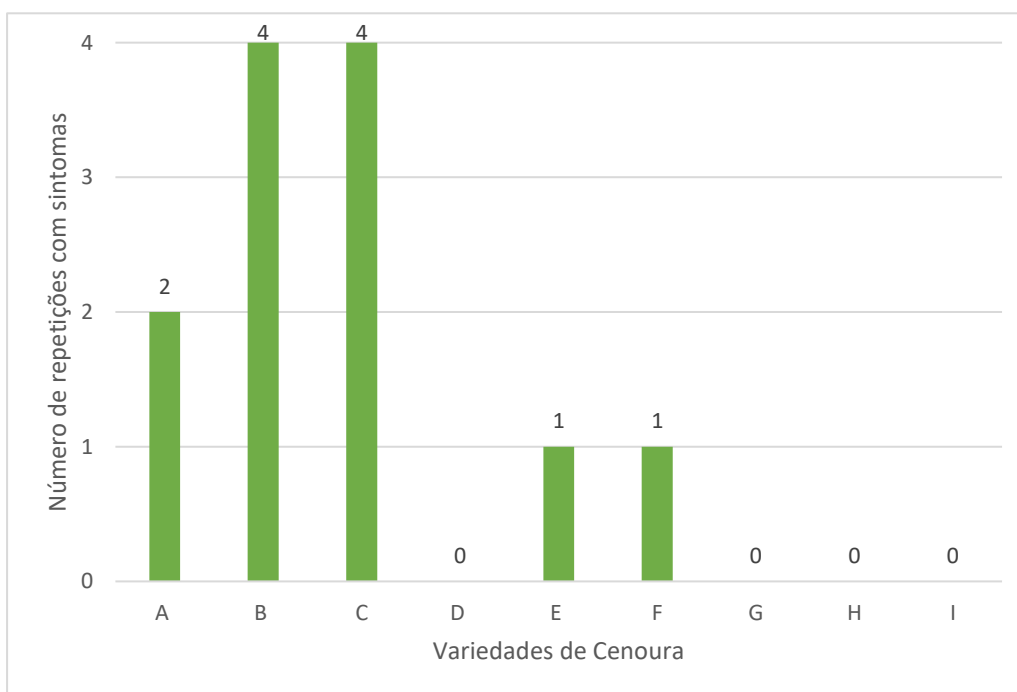
**Figura 31** - Primeiros sintomas sugestivos da doença registados a 15 de abril de 2024

Na primeira observação em campo, não foi possível detetar possíveis sintomas observáveis (**Figura 32**).



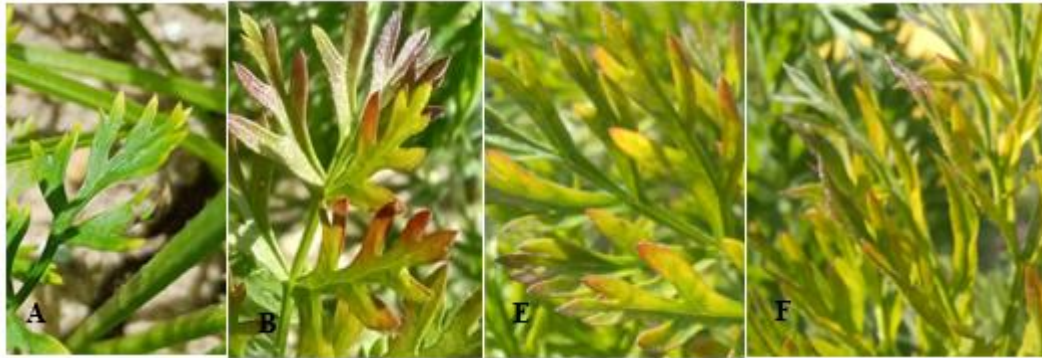
**Figura 32** - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 19 abril 2024

Na semana seguinte, mais precisamente a 3 de maio de 2024, foram detetados os primeiros sintomas aparentes em algumas das variedades presentes no ensaio. A variedade A, B, C, E e F, manifestaram desta forma sintomatologia que aparentava ser causada pela doença, algumas destas, manifestam em 100% das repetições, tal como a variedade B e C (**Figura 33**).



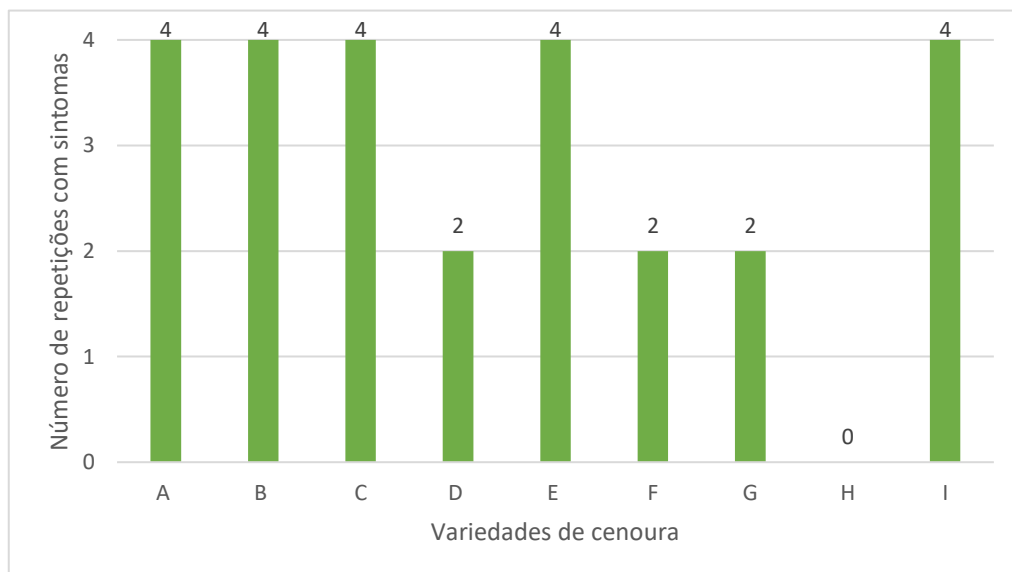
**Figura 33** - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 3 maio 2024

Foram registadas fotograficamente (**Figura 34**) algumas das plantas que estiveram na origem da alteração dos registos efetuados a 3 de maio de 2024.



**Figura 34** - Sintomas sugestivos da doença na variedade A, B, E e F registados a 3 de maio de 2024

Tendo em conta o surgimento persistente de sintomas aparentes, a observação semanal foi de extrema importância de forma a acompanhar o desenvolvimento das evidências sintomáticas. A 10 de maio de 2024, a terceira observação, registou um aumento notório do que aparentava ser realmente a proliferação da doença entre variedades e repetições (**Figura 35**). Até então, apenas a variedade H não demonstrava qualquer evidência de infeção pela bactéria.



**Figura 35** - Sintomas da doença por repetição de cada variedade 10 maio 2024

Como é possível verificar, a variedade A, B, C, E e I apresentavam sintomas típicos (**Figura 36**) da doença em 100% das repetições, aparentando dessa forma, serem as mais suscetíveis no que diz respeito à manifestação de sintomas quando surgia a infeção.



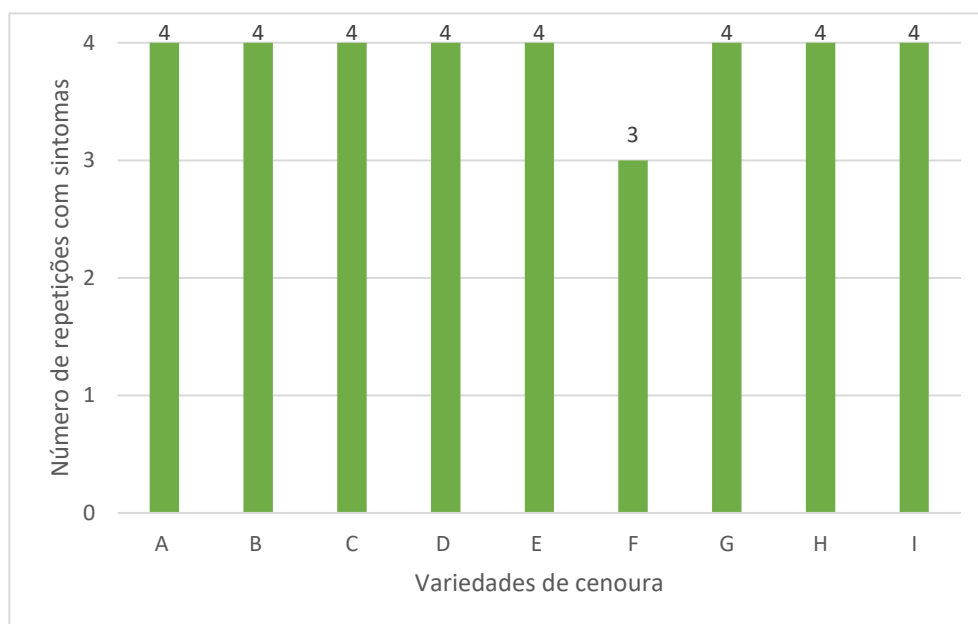
**Figura 36** - Sintomas sugestivos da doença na variedade D, G e I registados a 10 de maio de 2024

Na semana seguinte, a 17 de maio de 2024, foi efetuada uma nova observação e o seu respetivo registo, onde foi possível constatar facilmente uma crescente manifestação de sintomas aparentes em todas as variedades, inclusive na variedade H (**Figura 37**), que, até então, não manifestava sintomas aparentes da doença e nesta data já apresentava sintomatologia em 100% das suas repetições.



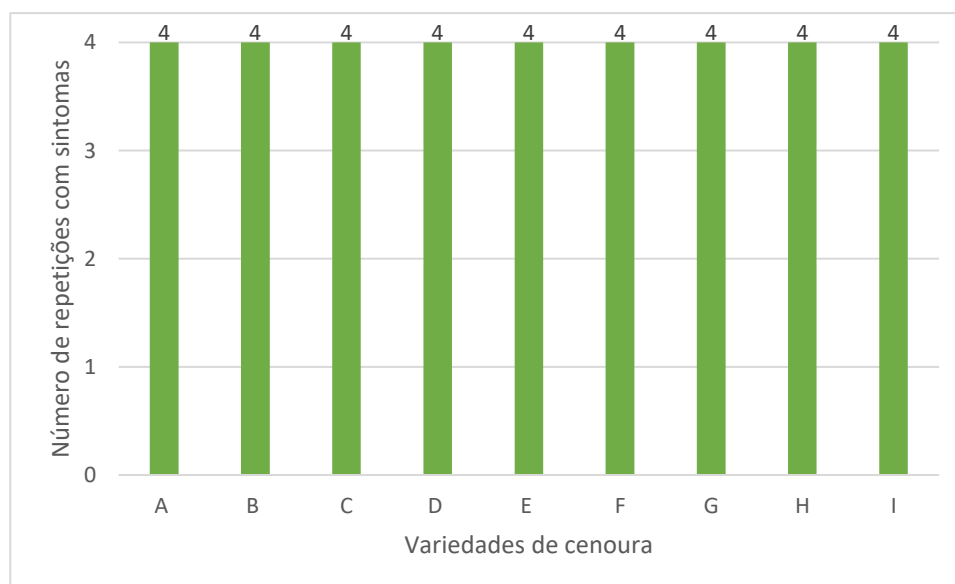
**Figura 37** - Sintomas sugestivos da doença na variedade H a 17 de maio de 2024

Na data acima mencionada, todas as variedades apresentavam sintomas sugestivos da doença em 100% das suas repetições, à exceção da variedade F que manifestava em 75% das repetições (**Figura 38**).



**Figura 38** - Sintomas da doença por repetição de cada variedade a 17 maio 2024

É importante acompanhar a evolução dos sintomas e não havendo sintomatologia em 100% das variedades e das repetições, o acompanhamento foi feito de forma a registar as evoluções das possíveis manifestações de sintomas. Desta forma, foi efetuado um novo registo a 27 de maio de 2024, nesta data, foi verificado que a variedade F já apresentava sintomas sugestivos da doença em todas as repetições (**Figura 39**).



**Figura 39** - Sintomas da doença por repetição de cada variedade 27 maio 2024

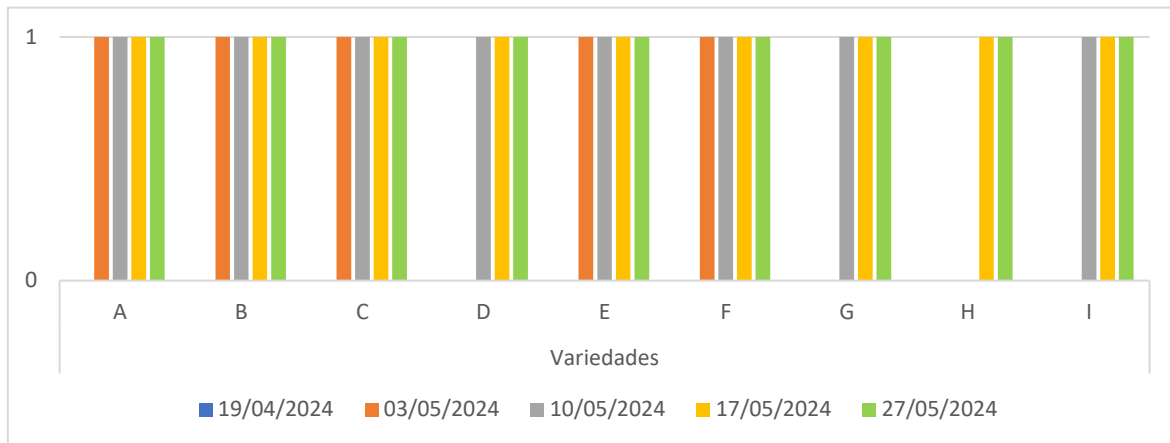
Após serem verificados indícios dos sintomas em todas as variedades, as observações continuaram, mas de forma a verificar a possível intensificação de sintomas registrando os mesmos em fotografia. Nessa altura, também passou a ser possível verificar as raízes (**Figura 40**) de forma a observar possíveis sintomas.



**Figura 40** - Sintomas sugestivos da doença na variedade C, F e G, registados em junho 2024

Foi possível verificar que o período em que decorreram as maiores evidências sintomáticas nas folhas da cultura foi entre 3 e 27 de maio (**Figura 41**), no período de aproximadamente um mês todas as variedades apresentavam sintomas sugestivos da “*Ca. L. solanacearum*”. Graficamente, observa-se que algumas das variedades começaram a apresentar sintomas mais cedo, e que outras apresentaram sintomas mais tardios. Não é possível associar esta diferença a um fator específico tendo em conta que ao serem variedades diferentes também tem ciclos culturais que oscilam entre si.

Todos os sintomas que sugerem a presença da doença podem ser facilmente confundidos, tendo em conta que há sintomas semelhantes associados a carências nutricionais ou stress ambiental, tal como mencionado em Sauer et al. (2024).



**Figura 41** - Datas em que cada variedade evidenciou sintomas sugestivos (1) da “*Ca. L. solanacearum*”

Foi possível observar e registrar (**Figura 42**) a forma como os sintomas sugestivos da “*Ca. L. solanacearum*” podem variar visualmente de variedade para variedade. Tal como evidenciado por Cruz et al. (2018), as plantas apresentaram cloroses na parte aérea com ligeiros enrolamentos e cores que variaram entre o bronze e o vermelho.

A incidência e o impacto da doença são variáveis de ano para ano e existem inúmeros fatores que podem interferir no desenvolvimento da mesma. Além disso, Haapalainen, (2014), afirma que fatores como o tamanho das populações de vetores, dos predadores dos mesmos, as condições climáticas e as variedades presentes na parcela têm um grande impacto na incidência da doença sobre a cultura.



**Figura 42** - Sintomas sugestivos da doença em todas as variedades do ensaio em campo

No final do ciclo cultural, no mês de julho, foi feita uma visita técnica ao campo onde foram observadas e avaliadas as nove variedades presentes. Foram feitas reflexões e avaliações sobre o desenvolvimento de cada variedade e sobre os aspectos mais revelantes das mesmas. Dessa forma foi concluindo que:

- Variedade A: apresentou uma boa raiz, sendo que no campo apresentou cenouras pequenas e curtas. É conhecida por ser tolerante à “*Ca. L. solanacearum*”

- Variedade B: Apresentou pouca homogeneidade, pouco vigor e com muitas tonalidades vermelhas na vegetação, indícios bastante consistentes da presença da doença, sendo das variedades com mais plantas aparentemente infetadas.
- Variedade C: As cenouras apresentam uma tonalidade bastante laranja e com raízes curtas, são, no geral, muito leves e apresentam muitas raízes secundárias. Apresentou bastante sensibilidade à presença dos sintomas, no entanto, demonstrou ser das variedades com maior tolerância à alternaria, no campo.
- Variedade D: Das variedades em campo que demonstrou mais sensibilidade à presença de doenças como a alternaria e a cercosporiose. No entanto, apresentou uma boa estrutura e coloração. Além de apresentar sintomas sugestivos da doença foi a variedade que apresentou maior tolerância, com menos plantas a manifestar a sintomatologia associada à “*Ca. L. solanacearum*”. Em todas as repetições demonstrou ser bastante homogênea na sua produção.
- Variedade E: Apresentou uma boa produção em todas as repetições ficando registrada como uma variedade bastante produtiva e que se adaptou bem à região e às condições presentes no campo em que foi semeada.
- Variedade F: Em todas as repetições apresentou cenouras bem acabadas e prontas para a colheita. É caracterizada por ter cenouras muito lisas e consistentes. É uma das variedades que apresenta maior tolerância ao *Pythium* spp.
- Variedade G: Uma das variedades que apresentou maior resistência à alternaria. Apresentou, caracteristicamente, colo redondo e verde, típico da variedade. Das variedades mais precoces e que raramente apresenta rachamento da cenoura. Suporta bem condições de stress hídrico, comparando como as restantes. Apresentou uma boa área foliar e uma boa produtividade.
- Variedade H: Apresentou suscetibilidade à alternaria. Também exibiu uma tonalidade bastante laranja e cenouras bem acabadas. No entanto, foi das que apresentou maior heterogeneidade no ensaio.

- Variedade I: É das variedades mais produzidas na região e das mais produtivas. Apresenta uma característica específica em que a sua rama regenera quando a mais velha entra em senescência. No entanto, é uma variedade com bastante suscetibilidade quer a bactérias quer a vírus.

Além dos sintomas foliares, também foram observados sintomas nas raízes (**Figura 43**). É evidente, em algumas das variedades um reduzido crescimento das raízes, bem como deformações e desenvolvimentos de raízes secundárias/ adventícias (**Figura 44**), tal como no estudo desenvolvido por Cruz et al. (2018).



**Figura 43** - Registro das cenouras recolhidas no ensaio em campo



**Figura 44** - Desenvolvimentos de raízes secundárias/adventícias

No entanto, não é apenas a “*Ca. L. solanacearum*” que pode causar estes sintomas às cenouras. Por exemplo, o vírus da folha vermelha da cenoura, causa sintomas praticamente iguais, tais como a descoloração da folhagem, nanismo, proliferação de

caules de plantas e o desenvolvimento de bastantes raízes adventícias/secundárias como descreve Sauer et al. (2024). Tal como já mencionado é difícil atribuir claramente os sintomas, sendo necessário obter confirmações analíticas para garantir a presença da doença.

## 4.2 Resultados obtidos no ensaio de estufa

As observações e registos em estufa mostraram-se mais difíceis e complexos, tendo em conta que o desenvolvimento não é tão homogêneo como o desenvolvimento ao ar livre. A temperatura e a humidade num ambiente protegido fazem com que o desenvolvimento das plantas se diferencie tal como o facto de não serem expostas a fatores ambientais adversos como a chuva, geada, vento, entre outros.

As primeiras manifestações de sintomas semelhantes aos da “*Ca. L. solanacearum*” surgiram na variedade B, no mês de abril (**Figura 45**). A tonalidade das plantas em estufa não se manifesta tão exuberante como ao ar livre, e por esse motivo, não é tão evidente quando surge algum sintoma aparente. Tal como no campo, a variedade B, foi das primeiras a manifestar sintomas, inclusive, em todas as repetições.



**Figura 45** - Sintomas sugestivos da doença na variedade B em estufa no mês de abril 2024

O facto de existir manifestação nem que fosse apenas num vaso, já poderia ser sugestivo de algum problema com a semente, visto que, não houve registo da presença dos vetores responsáveis pela transmissão e conhecidos até então, no espaço do ensaio em ambiente protegido.

Durante o mês de maio, surgiram mais alguns sintomas sugestivos da doença, além da variedade B, também a variedade C e I (**Figura 46**). No que diz respeito à variedade B, os tons avermelhados tornaram-se mais evidencias e observáveis. É possível verificar que, no mês de maio, no campo, também foram verificados sintomas aparentes da doença nestas variedades e em todas as repetições das mesmas.



**Figura 46** - Sintomas sugestivos da doença na variedade B, C e I em vaso, registados a 6 de maio de 2024

Nas observações realizadas no mês seguinte, em junho, todas as variedades manifestaram sintomas indicativos da presença da doença, no entanto, as tonalidades observadas eram mais esbatidas e com muitos tons dourados, só em julho é que se verificou uma intensificação dessas cores e uma possível confirmação da presença da doença.

É possível verificar que os sintomas surgiram de forma mais lenta em estufa do que no ensaio ao ar livre, tal como o desenvolvimento cultural, no entanto, tal como em campo, todas as variedades manifestaram sintomas da possível presença da doença em ambiente protegido.

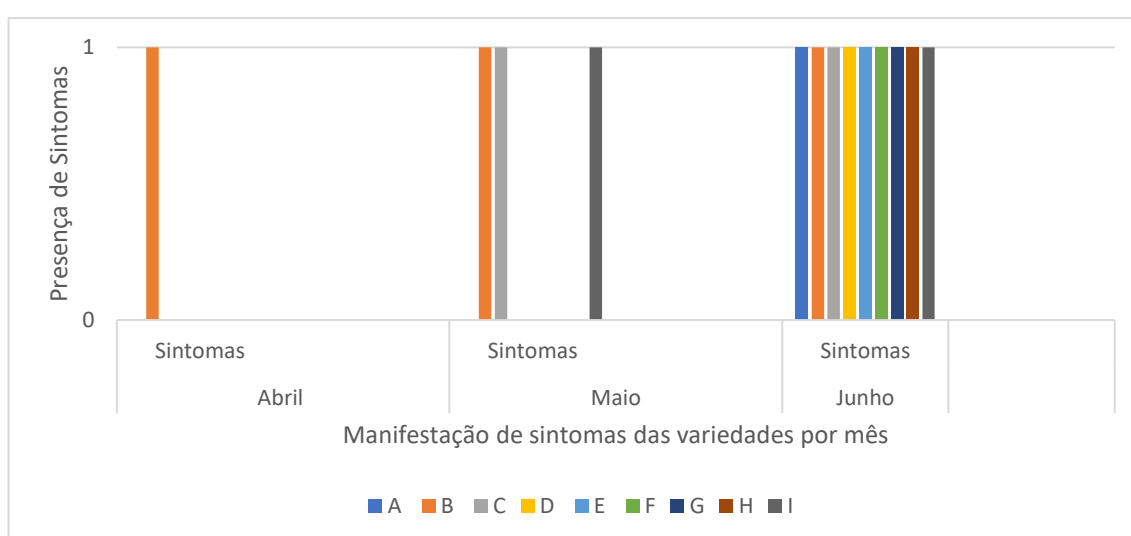
É importante referir que em estufa, apenas foram observados sintomas vegetativos. A observação das raízes não foi realizada tendo em conta a estrutura das mesmas, o desenvolvimento radicular em vaso não se verificou em condições normais e dessas formas cenouras não se desenvolveram adequadamente como em condições normais em campo.

Os registos efetuados (**Figura 47**), demonstram colorações entre bronze e avermelhado ou violeta, tal como referenciado por Cruz et al. (2018) as plantas de cenoura apresentam cloroses evidentes na parte aérea, que atinge a generalidade das folhas, parte dos folíolos, demonstram enrolamento e um bronzeado acompanhado de colorações violácea. Embora a intensidade da cor não se manifeste igualmente às do campo e também variaram entre as variedades, foi possível verificar as tonalidades caracteristicamente causadas por “*Ca. L. solanacearum*”.



**Figura 47** - Registos dos sintomas sugestivos da doença observados em todas as variedades em estudo na estufa, em julho de 2024

Foi possível observar a evolução do surgimento de possíveis evidências da presença da bactéria, registados mensalmente. No mês de abril apenas a variedade B apresentava sintomas sugestivos da doença, no entanto, com o decorrer do ciclo cultural da cenoura, mesmo que em vaso, em maio também a variedade C e I manifestaram sintomas associados à “*Ca. L. solanacearum*”. No mês de junho já existam evidências em todas as variedades, confirmadas em julho com a intensificação da coloração associada à doença. Os registos, tal como em campo, foram feitos com a indicação do 1 para a presença de sintomas e com 0 para a ausência dos mesmos (**Figura 48**).



**Figura 48** - Registo dos sintomas sugestivos da doença no ensaio em estufa por variedade, em que 0 significa ausência de sintomas e 1 a presença de sintomas.

Com estes resultados, tal como indica Cruz et al. (2018) é importante considerar a possibilidade de as sementes serem veículo da bactéria, sendo importante controlar devidamente a origem das mesmas.

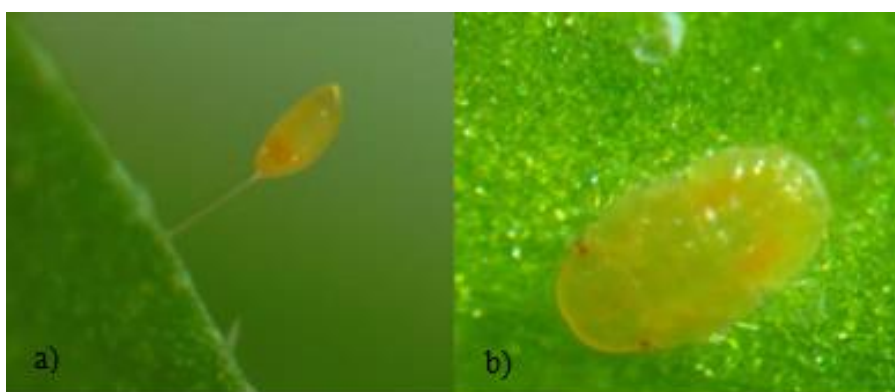
No entanto, a presença efetiva da doença não se verifica apenas visualmente, tal como em campo, foram necessários testes para confirmar se a “*Ca. L. solanacearum*” estava presente nestas plantas. É importante salientar que até ao momento não existem evidências suficientes de que haja transmissão por sementes de cenoura, existindo alguns estudos que indicam que não existe transmissão devido à semente, nomeadamente,

(Bertolini et al. 2014; Loiseau et al. , 2017a,b; Oishi et al ., 2017; Mawassi et al. , 2018; Haapalainen et al. 2018b; Carminati et al. 2019; EPPO, 2024).

### 4.3 Resultados da monitorização dos insetos vetores

A monitorização foi feita quer em campo quer em estufa, no entanto, não houve observação de nenhum dos vetores acima mencionados no ensaio realizado em estufa. Por esse motivo, os resultados mencionados posteriormente, dizem respeito, unicamente, à monitorização efetuada no ensaio de campo.

Inicialmente, numa recolha aleatória de folhas, a meados de abril, foi observado um ovo (**Figura 49a**) e uma ninfa (**Figura 49b**) dos vetores responsáveis pela transmissão da doença, desta forma, na amostra recolhida existiam evidências iniciais promissoras da presença, quer da doença, quer dos vetores responsáveis pela transmissão da “*Ca. L. solanacearum*”.



**Figura 49** - Ovo (a) e ninfa (b) observados ao microscópio nas cenouras recolhidas do ensaio de campo

Nas placas cromotrópicas, o vetor encontrado com maior frequência foi a *B. trigonica*, este vetor, como mencionado por Haapalainen, (2014) alimenta-se de cenouras e tem duas a três gerações anuais.

Foi observada durante todas as semanas de monitorização (**Figura 50**). Embora os registos fossem efetuados por semana e por localização de placa, não houve persistência da presença do vetor numa placa específica, evidenciando uma presença aleatória.



**Figura 50** - Registo fotográfico do vetor *B. trigonica*

A *B. cockerelli*, como mencionado pelo EPPO (2020), está associada à transmissão da doença em solanáceas como a batata. No entanto, também foi observada no ensaio em 6 das 13 semanas monitorizadas (**Figura 51**). Além de se verificar a sua presença e existência na região e no campo de ensaio, é um fator compreensível tendo em conta que muitos dos campos adjacentes tinham cultura de batata instalada. A presença deste vetor foi verificada na semana 1, 2, 6, 10, 11 e 12. Não se verifica uma tendência temporal, tendo em conta que surgiu no início da monitorização, no meio e no final.

O facto de existirem vários campos ao redor do campo de ensaio com a cultura da batata em diferentes fases de desenvolvimento, pode ter sido um fator que justifique a presença da *B. cockerelli* em todos os períodos acima mencionados.

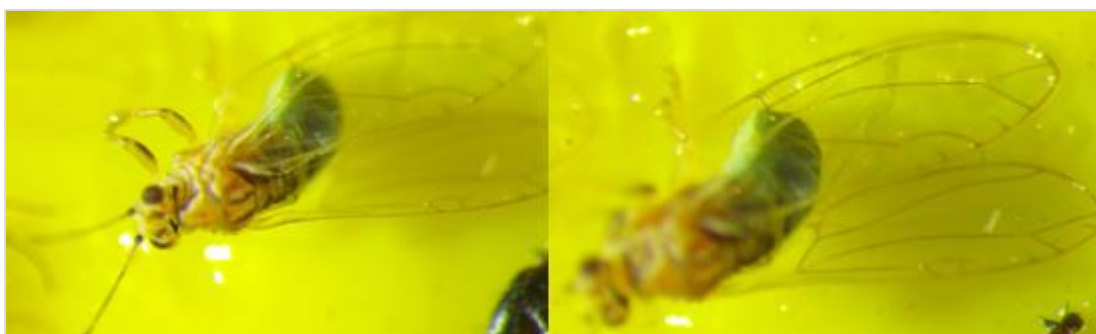


**Figura 51** - Registo fotográfico do vetor *B. cockerelli*

No que diz respeito à *T. apicalis*, é um vetor menos frequente de encontrar, e, como mencionado por Haapalainen, (2014) este vetor tem apenas uma geração anual e alimenta-

se de cenouras no início do verão em junho e julho. Foi neste período, mais precisamente, entre 21 de junho e 03 de julho de 2024 que este vetor foi capturado no ensaio em campo.

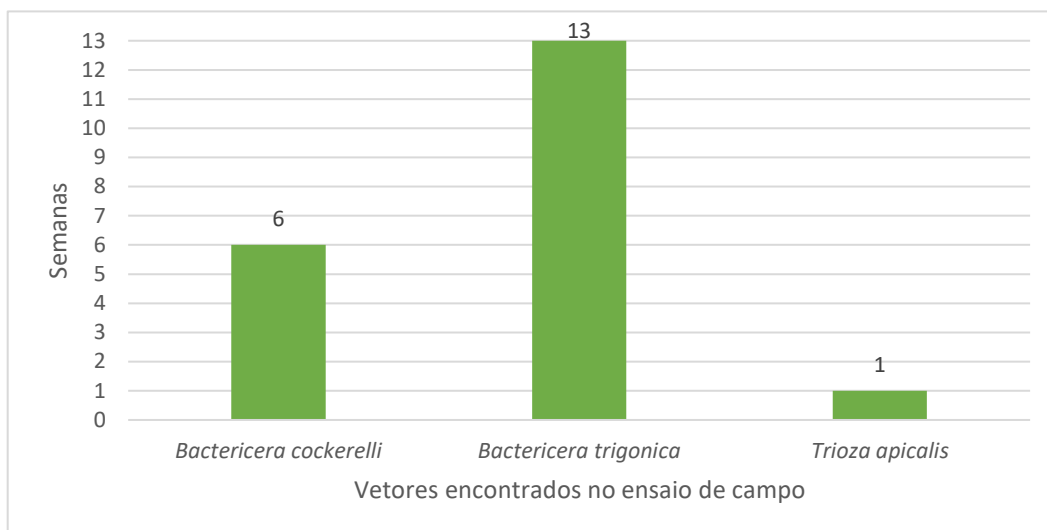
A sua coloração com tonalidades verde-claras, muitas vezes dificulta a observação nas placas cromotrópicas de cor amarela. Após 12 semanas de observação, na placa 2 foi verificada a presença deste vetor (**Figura 52**). Foi verificado apenas um indivíduo durante todo o processo de monitorização.



**Figura 52** - Registo fotográfico da *T. apicalis* na placa 2 da semana 12

Tal como referido por Trkulja et al. (2023), as espécies vetoras que foram estabelecidas até então incluem a *B. cockerelli*, *T. apicalis* e *B. trigonica*, tendo em conta que as últimas duas mencionadas são extremamente importantes na Europa, principalmente para plantas da família Apiaceae. Os três vetores responsáveis pela transmissão da bactéria foram observados e identificados na parcela do ensaio em campo, embora alguns com maior frequência que outros.

Verifica-se dessa forma que a *B. trigonica* foi o vetor encontrado em todas as semanas de monitorização, isto é, em 13 semanas, foi identificado em todas elas. No que diz respeito à *B. cockerelli*, durante o mesmo período, foi observada em 6 das 13 semanas. Respetivamente à *T. apicalis*, como mencionado acima, foi verificada a sua presença apenas numa das semanas de monitorização (**Figura 53**).



**Figura 53** - Presença semanal dos insetos vetores em 13 semanas de monitorização

Verificando a percentagem da presença de cada um dos vetores no campo, é possível verificar que a *B. trigonica* foi identificada em 100% das monitorizações, isto é, em 13 semanas foi identificada e observada em todas elas.

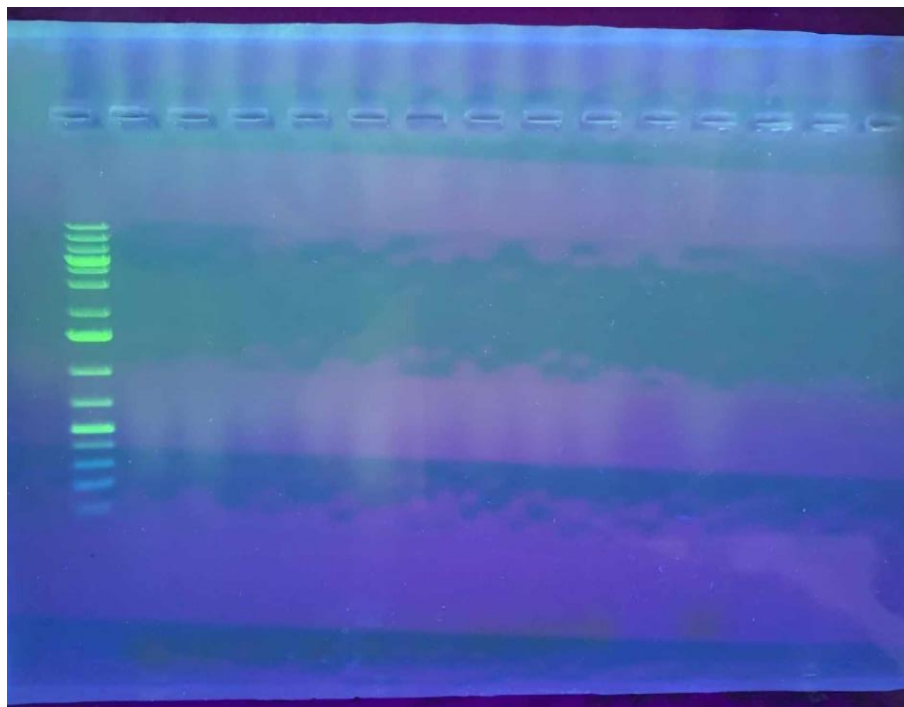
Quanto à *B. cockerelli*, foi registada em 46% das observações, ou seja, no total de 13 semanas foi observada em 6. Já a *T. apicalis*, com apenas registo numa das semanas da monitorização corresponde a 8% na totalidade do período de monitorização.

#### 4.4 Amplificação por PCR

O último processo para verificação dos resultados, são os testes laboratoriais. Foram preparadas todas as amostras necessárias para os posteriores testes PCR. Após as macerações das amostras sintomáticas e assintomáticas recolhidas quer em campo quer em estufa, foram efetuados os primeiros testes PCR às amostras sintomáticas recolhidas no ensaio do campo. As restantes amostras foram acondicionadas para serem analisadas posteriormente.

Após todo o processo da extração do DNA e posterior processo para deteção da bactéria nas amostras destas nove variedades sintomáticas recolhidas no ensaio de campo, foi obtido o resultado dos testes PCR. Como é possível observar na (**Figura 54**), a ausência

de bandas correspondentes a um segmento de DNA representam resultado negativo para o teste, em todas as variedades.



**Figura 54** - Resultado dos testes PCR às amostras sintomáticas recolhidas no ensaio de campo

Após estes resultados, considerando a ausência de um controlo positivo, foi necessário ponderar outra hipótese antes de obter uma conclusão dos resultados e também antes de avançar para os testes às restantes amostras que se encontravam conservadas.

Tendo em conta a necessidade de obter um resultado que garantisse fiabilidade, seguiram novamente as 9 amostras sintomáticas do ensaio de campo, desta vez para um teste mais específico, nomeadamente, uma sequenciação de nova geração. Esta sequenciação foi efetuada por um laboratório independente, fora da escola.

#### **4.5 Análise metagenómica**

Este método, NGS, de acordo com Brautigam e Gowik (2010), é preciso e fornece um grande número de sequências de referência estabelecidas. A amostra gerou 11.230 ‘reads’ (leituras de sequência). Foram identificadas um total de 56 unidades taxonómicas operacionais. A bactéria de interesse, “*Ca. L. solanacearum*” foi detetada, embora em percentagem baixa.

O resultado da sequenciação comparou os resultados obtidos inicialmente, indicando que, a presença da bactéria se encontrava com valores insuficientes para ser detetável no teste PCR e também para se manifestar sintomaticamente nas plantas.

É possível verificar, na (Figura 55) identificado com um retângulo vermelho, que a “*Ca. L. solanacearum*” se encontra numa percentagem quase não detetável, em valores próximos de zero.



Figura 55 - Resultados da sequenciação de nova geração

Os resultados obtidos neste trabalho parecem sugerir que os sintomas observados nas plantas não são da bactéria “*Ca. L. solanacearum*”. Desta forma, as restantes amostras conservadas não foram testadas, não se verificando necessidade de realizar esse processo tendo em conta os resultados.

Resultados fornecidos por uma das empresas fornecedoras das sementes e bastante envolvidas no ensaio, leva a crer que os sintomas poderão ter sido desencadeados pelo vírus da folha vermelha na cenoura (**Figura 56**), que de acordo com Sauer et al. (2024) é uma doença que causa sintomas praticamente iguais, tais como a descoloração da folhagem, nanismo, proliferação de caules de plantas e o desenvolvimento de bastantes raízes adventícias/secundárias.

Assim sendo, os sintomas desenvolvidos foram tão semelhantes que sem estes resultados analíticos seriam difíceis de determinar a verdadeira origem dos mesmos.

<i>Tested pathogen</i>	<i>Used primer</i>	<i>Extraction method</i>	<i>Absence</i>	<i>Presence</i>	<i>Doubt</i>
Carrot Red Leaf Virus ▾	CRLV-1 / CRIV-2 ▾	PCR, qPCR, RT-PCR, RT-c ▾	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Carrot Red Leaf Virus ▾	aRNA F / aRNA R2 ▾	PCR, qPCR, RT-PCR, RT-c ▾	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Carrot Mottle Virus ▾	Umbr-NNS / Umbr ▾	PCR, qPCR, RT-PCR, RT-c ▾	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>

**Figura 56** - Resultados do teste PCR ao vírus da folha vermelha da cenoura

## 5. Conclusões e considerações gerais

Através da realização deste estudo e respetivos ensaios foi possível adquirir novos conhecimentos e novas evidências de como melhorar o conhecimento sobre as patologias existentes nas culturas hortícolas do Oeste, mais precisamente, na cultura da cenoura.

Os três vetores conhecidos como transmissores desta bactéria foram identificados no ensaio de campo. Isto, indica que na eventualidade da bactéria surgir no campo haverá uma grande facilidade de disseminação da mesma. É extremamente importante que exista um controlo destes vetores de modo que com a possível presença da doença não exista uma disseminação da mesma de forma descontrolada.

É extremamente importante que existam esforços na sanidade das sementes, tal como na escolha apropriada das mesmas, evitando a proliferação da doença nos campos de cenoura, mas também das outras culturas suscetíveis à bactéria, tal como, a batata.

Apesar de todos os sintomas induzirem a dúvida sobre a presença de uma doença de quarentena como a causada por “*Ca. L. solanacearum*”, os testes realizados neste trabalho parecem sugerir que não era este o problema presente no campo de ensaio.

Os resultados provisórios dos PCR realizados por uma das empresas de sementes, no decorrer deste trabalho, indicaram que o verdadeiro causador da sintomatologia é o vírus da folha vermelha, não deixando de ser um problema no desenvolvimento da cultura, no entanto, ainda não está classificado como um agente de quarentena. Desta forma acaba por ser um aspeto de extrema importância para a produção de cenoura, e com menor impacto económico, não sendo necessário efetuar a destruição dos campos.

O conhecimento sobre estas possibilidades é uma descoberta promissora no avanço da investigação das patologias da cultura da cenoura, projetando uma situação diferente e menos gravosa do que seria expectável caso se confirmasse a presença da “*Ca. L. solanacearum*”.

É importante salientar que num único ano de ensaio não é possível determinar qualquer resultado com exatidão, tendo em conta todas as limitações de tempo, todas as oscilações de clima e tantas outras questões que podem influenciar os resultados, sendo dessa forma necessário efetuar estudos mais duradouros e persistentes.

Assim sendo, no futuro, seria importante realizar novas pesquisas, considerando a possibilidade de ser o vírus da folha vermelha da cenoura e direcionar os estudos e pesquisas de detecção também nessa perspectiva.

Alargar este estudo a outras áreas produtoras de cenoura também será uma mais-valia, pois, lidar com algo menos prejudicial será sempre uma alternativa melhor e um resultado bastante significativo.

## 6. Referências Bibliográficas

- Almeida, D. (2015). Manual de Culturas Hortícolas (3ªed) (1ºvol). Lisboa: Editorial Presença.
- Antolínez, C., Fereres, A., & Moreno, A. (2016). Sex-specific probing behaviour of the carrot psyllid *Bactericera trigonica* and its implication in the transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum'. doi:10.1007/s10658-016-1031-6
- Bertolini, E., Teresani, G., Loiseau, M., Tanaka, F., Barbé, S., Martínez, C., Cambra, M. (2015). Transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in carrot seeds. doi:10.1111/ppa.12245
- Brautigam, A.; Gowik, U. (2010). What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. (A. Weber, Ed.) pp. 831-841.
- Cruz, L., Velez, I., & Fernandes, C. (Março de 2018). Declínio amarelo das Apiaceae: um novo risco para a horticultura portuguesa. (INIAV, Ed.) p. 2. Obtido de <https://www.vidarural.pt/wp-content/uploads/sites/5/2018/07/aqui.pdf>
- Dias, J. C. (7 de outubro de 2014). Nutritional and Health Benefits of Carrots. Obtido de [https://www.scirp.org/pdf/FNS\\_2014120411490798.pdf](https://www.scirp.org/pdf/FNS_2014120411490798.pdf)
- Eizenberg, H., Tanaami, Z., Jacobsohn, R., & Rubin, B. (2001). Effect of temperature on the relationship between *Orobanche* spp. and carrot (*Daucus carota* L.). pp. 415- 420. doi:[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00165-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00165-4)
- EPPO. (2009). *EPPO*. Obtido de EPPO Global Database: <https://gd.eppo.int/taxon/LIBEPS>
- EPPO. (2020). 'Candidatus Liberibacter solanacearum' EPPO datasheets on pests recommended for regulation. doi: <https://doi.org/10.1111/epp.12043>
- EPPO. (setembro de 2024). EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Obtido de EPPO Data base: [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A1\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A1_list)
- FAO. (2022). Culturas e Produtos Pecuários . Obtido de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- GPP. (2020). Análise setorial FRUTAS & HORTÍCOLAS.
- GPP. (Outubro 2023). Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral . Obtido em Junho de 2024, de Informação sobre Produtos: <https://www.gpp.pt/index.php/produtos/produtos>
- GPPAA. (2007). Frutas, Hortícolas, Flores - Diagnóstico Setorial. Obtido em 19 de Junho de 2024, de [https://www.isa.utl.pt/files/pub/destaques/diagnosticos/Frutas\\_Horticolas\\_e\\_Flores\\_\\_Diagnostico\\_Sectorial.pdf](https://www.isa.utl.pt/files/pub/destaques/diagnosticos/Frutas_Horticolas_e_Flores__Diagnostico_Sectorial.pdf)

- Grisham, M., & Anderson, N. (1983). Pathogenicity and Host Specificity of *Rhizoctonia solani* isolated from carrots. (S. J. Paper, Ed.) pp. 1564-1569.
- Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of Candidatus Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. doi: <https://doi.org/10.1111/aab.12149>
- INE. (2018). *Estatísticas Agrícolas*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística. Obtido de [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=358629204&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358629204&PUBLICACOESmodo=2)
- INE. (2022). *Estatísticas Agrícolas*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística. Obtido de [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=137687&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=137687&PUBLICACOESmodo=2)
- Joshi, R., & Walia, R. (2024). Carrot - Root-knot nematode: the forking forfeiture. In R. K. Khan (Ed.), *Insights into Genetic Retinal Diseases: A Collection* (pp. 392-403). Cambridge Scholars Publishing. Obtido de [https://www.researchgate.net/profile/Raman-Walia-2/publication/379835513\\_CHAPTER\\_33\\_CARROT\\_-ROOT-KNOT\\_NEMATODE\\_THE\\_FORKING\\_FORFEITURE/links/661df40139e7641c0bcae7a0/CHAPTER-33-CARROT-ROOT-KNOT-NEMATODE-THE-FORKING-FORFEITURE.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Raman-Walia-2/publication/379835513_CHAPTER_33_CARROT_-ROOT-KNOT_NEMATODE_THE_FORKING_FORFEITURE/links/661df40139e7641c0bcae7a0/CHAPTER-33-CARROT-ROOT-KNOT-NEMATODE-THE-FORKING-FORFEITURE.pdf)
- Kielkowska, A., & Kiszczak, W. (26 de February de 2023). History and Current Status of Haploidization in Carrot. doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy13030676>
- Kode, J., Teunissen, J. W., Diemen, M. V., Horn, S., Uehlinger, N., & Groot, S. P. (2021). Breeding and seed sector innovations for organic foods systems - Carrot seed vigour, field emergence and tolerance to the damping-off pathogen: *Alternaria radicina*. Latvia: EUCARPIA Section Organic and Low Input Agriculture.
- Mawassi, M., Dror, O., Bar-Joseph, M., Piasezky, A., Sjolund, J. M., Levitzky, N., . . . Bahar, O. (15 de April de 2018). ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ Is Tightly Associated with Carrot Yellows Symptoms in Israel and Transmitted by the Prevalent Psyllid Vector *Bactericera trigonica*. doi:<https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-17-0348-R>
- Metzker, M. (2010). Sequencing technologies – the next generation. pp. 31–46.
- Munyanzeza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. (1 de Agosto de 2010). Association of “Candidatus Liberibacter solanacearum” With the Psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entology*, 103(4), 1060-1070. doi:<https://doi.org/10.1603/EC10027>
- Nguyen, H. V. (2015). Carrot processing- Handbook of Vegetable Preservation and Processing. International University VNU Ho Chi Minh city. Obtido em Agosto de 2024, de [https://www.researchgate.net/publication/287195720\\_Carrot\\_processing-Handbook\\_of\\_Vegetable\\_Preservation\\_and\\_Processing\\_Second\\_Edition](https://www.researchgate.net/publication/287195720_Carrot_processing-Handbook_of_Vegetable_Preservation_and_Processing_Second_Edition)
- Que, F., Hou, X.-L., Wang, G.-L., Xu, Z.-S., Tan, G.-F., Li, T., . . . Xiong, A.-S. (2019). Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family. Obtido de <https://academic.oup.com/hr/article/doi/10.1038/s41438-019-0150-6/6437801>

- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., & Gross, D. C. (2011). Development of Primers for Improved PCR Detection of the Potato Zebra Chip Pathogen, ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’. *92*, pp. 1542-1546. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0386>
- Sauer, J., Dewert, A., Fornefeld, E., & Gotz, M. (18 de Janeiro de 2024). *Influence of "Candidatus Liberibacter solanacearum" infection on carrot root weight in Germany*. Alemanha. doi:<https://doi.org/10.1007/s10658-024-02822-3>
- Schuh, Marissa; Grabowski, Michelle. (2023). University of Minnesota Extension - Aster-yellows. Obtido de Aster yellows: <https://extension.umn.edu/plant-diseases/aster-yellows>
- Society of Nematologists. (1992). Exotic Nematode Plant Pest of Agricultural and Environmental Significance to the United States. Obtido de HETERODERA CAROTAE: <https://nematode.unl.edu/pest8.htm>
- Suojala, T. (2000). Pre- and postharvest development of carrot yield and quality. Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Plant Production - Section of Horticulture, Finland. Obtido de <https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/ab09ebb1-c7d9-4b36-b463-68741127942c/content>
- Teresani, G. R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, C., Tanaka, F. A., Kitajima, E. W., . . . Font, M. I. (30 de January de 2014). Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with a Vegetative Disorder of Celery in Spain and Development of a Real-Time PCR Method for Its Detection. *104*, pp. 804-811. doi:<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0182-R>
- Trkulja, V., Tomić, A., Matić, S., Trkulja, N., Ilić, R., & Milovanović, T. P. (29 de Junho de 2023). An Overview of the Emergence of Plant Pathogen ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in Europe. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071699>
- Vilmorin. (2024). Catálogo Cenouras - Portugal. Obtido em Agosto de 2024, de <https://www.vilmorinmikado.es/pt/documentos>
- Wen, A., Johnson, C., & Gudmestad, N. C. (5 de January de 2013). Development of a PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ Haplotypes and Their Spatiotemporal Distribution in the United States. doi:[10.1007/s12230-012-9293-9](https://doi.org/10.1007/s12230-012-9293-9)
- Yoshida, Naoto. (2020). Biological and genetic characterization of carrot red leaf virus and its associated virus/RNA isolated from carrots in Hokkaido, Japan. (A. R. Institute, Ed.) doi:[10.1111/ppa.13202](https://doi.org/10.1111/ppa.13202)

# **Anexos**

**Anexo I** – Exemplo do formado de registo das observações das placas cromotrópicas realizado semanalmente.

Mês: Março 2024					
Data de colocação	22/03/2024				
Data de recolha	29/03/2024				
Data de Observação	15/04/2024				
<b>P1 = 1<sup>o</sup>s Placas</b>	<b>Identificação das placas</b>				
O que foi observado?	L1	L2	L3	<b>Total por inseto</b>	<b>Observações</b>
<i>Bactericera cockerelli</i>	0	0	1	1	
<i>Bactericera trigonica</i>	0	0	1	1	Só foi encontrado 1 macho
<i>Trioza apicalis</i>	0	0	0	0	
<b>Total nas placas</b>			2		
<b>Total</b>					
(Colocar nomes dos insetos)	Colocar o nº de cada um dos insetos com interesse				
<i>Bactericera trigonica</i>	1	0	0		
<b>Legenda:</b>					
<b>Ausência</b>	<b>0</b>				
<b>Presença</b>	<b>1</b>				