

LUÍSA ISABEL GUERREIRO DAVID COELHO

**CONTROLO BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO EM PLANTAS
CULTIVADAS, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE
RESÍDUOS ORGÂNICOS ENRIQUECIDOS COM ANTAGONISTAS**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

2022

LUÍSA ISABEL GUERREIRO DAVID COELHO

**CONTROLO BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO EM PLANTAS
CULTIVADAS, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE
RESÍDUOS ORGÂNICOS ENRIQUECIDOS COM ANTAGONISTAS**

Tese para obtenção do grau de doutor em
Ciências Agrárias e Ambientais

Trabalho efetuado sob orientação de:

Prof. Dr. Mário Manuel Ferreira dos Reis

Prof^ª Dr^ª Lúcia Pó Catalão Dionísio



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

2022

**CONTROLO BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO EM PLANTAS
CULTIVADAS, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE
RESÍDUOS ORGÂNICOS ENRIQUECIDOS COM ANTAGONISTAS**

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Luísa Isabel Guerreiro David Coelho

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.



A presente tese de doutoramento
foi apoiada pela Fundação para a Ciência e
Tecnologia através da bolsa de
doutoramento SFRH/BD/109218/2015

AGRADECIMENTOS

Um doutoramento é um caminho longo, que se faz com a companhia de colegas, amigos e familiares. A sua amizade, troca de ideias e colaborações fazem com que pareça mais fácil.

Começo por agradecer aos meus orientadores, o professor doutor Mário Reis e à professora doutora Lídia Dionísio, que mais uma vez me acompanharam. Tenho a agradecer todas as sugestões, o rigor científico e o empenho que sempre mostraram durante este trabalho. Por tudo o me ensinaram, conhecimento sem o qual não seria possível desenvolver este trabalho. Não podia ter sido melhor acompanhada.

Ao professor doutor Carlos Guerrero, que sempre acompanhou os ensaios e os resultados, obrigada pela sua disponibilidade e sugestões. Estarei sempre grata.

Não posso deixar de agradecer também aos professores doutores Amílcar Duarte e Luís Neto, que apesar de não estarem diretamente envolvidos, sempre me deram apoio.

À professora doutora Isabel Trillas, da Universidade de Barcelona, pela cedência dos fungos patogénicos.

Ao professor doutor Manuel Avilés e à doutora Celia Borrero, da Universidade de Sevilha, também pela cedência de fungos. À Celia Borrero agradeço ainda a prontidão com que esclareceu todas as minhas dúvidas ao longo deste trabalho.

À Liseta Viegas, pelo apoio prestado sempre que solicitado. Aos funcionários do horto, agradeço as sugestões e ajuda prestada para a exceção dos ensaios.

Agradeço também à Fundação para a Ciência e Tecnologia, por ter financiado para este trabalho, através de uma bolsa de doutoramento, e ao MED – Instituto Mediterrâneo para a agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, o centro de investigação onde estive inserida durante a realização do doutoramento.

Ao meu colega de doutoramento, Francisco Bueno-Pallero, que me acompanhou durante todos estes anos. Foram muitos os desafios que ultrapassamos juntos. Obrigada pela amizade e companheirismo.

A todos os colegas, que de diferentes formas me apoiaram e ajudaram: João Duarte, Micael Santos, Rita Andrade, Florinda Gama, Teresa Saavedra, Adriana Guerreiro e Custódia Gago. Aos colegas que mais recentemente me acompanharam neste desafio: Pedro Matias, Ana Rita Trindade, Beatriz Duarte, Tomás Magalhães e Rita Poeira. Sem vocês não teria sido a mesma coisa!

A todos os alunos, que aceitaram fazer os seus trabalhos nesta área, e que de alguma forma contribuíram para o avanço deste trabalho.

À Adega Cooperativa de Lagoa, às centrais de fruta e todos os campos de golfe que cederam os resíduos para que a compostagem pudesse ser realizada. A todos os colegas que trabalham nestas empresas, obrigada pela disponibilidade que vos é característica.

Aos meus amigos mais próximos, pelo apoio, compreensão e amizade.

Por fim, não posso deixar de agradecer àqueles que estão mais próximos e que são quem ouviu todos os desabafos, a minha família, sem exceção! Aos meus pais, por toda a

coragem que sempre me deram nestes desafios. À minha irmã, que ainda teve uma pequena contribuição voluntária, pela alegria e boa disposição.

Ao Frederico e à Mariana, a quem mais devo! São os primeiros a ouvir as notícias boas e as menos boas. Obrigada pelo absoluto apoio e motivação constante. À Mariana agradeço algo que ela dá de boa vontade, alegria e amor genuínos. Obrigada pela vossa paciência!

Muito obrigada a todos!

VISÃO GERAL DA TESE

Esta tese foi elaborada respeitando o Regulamento dos ciclos de estudo conducentes aos graus de mestre e de doutor da Universidade do Algarve, no despacho RT.86/2020, de 23 de julho de 2020.

O trabalho que aqui se apresenta é relevante e inovador nas áreas do ambiente e da agricultura.

Os resultados contribuem para a ampliação do conhecimento científico, relativamente ao papel desempenhado pelos compostos no controlo de doenças das plantas.

A reciclagem de resíduos resultantes da atividade agrícola e a utilização dos produtos obtidos na supressão de fitopatologias, contribui para a redução da aplicação de fitofármacos e conseqüentemente para a sustentabilidade da atividade agrícola, para a economia circular e para saúde humana.

Para promover a aplicação do conhecimento gerado, para além da necessária divulgação através dos meios tradicionais em ciência (publicações, pósteres e comunicações em congressos) foi também feita divulgação para públicos não científicos.

A presente tese está estruturada em sete capítulos. No primeiro, a introdução geral, apresenta-se uma revisão do estado da arte, enquadramento e objetivos do trabalho. Nos capítulos dois a cinco apresentam-se trabalhos já publicados em revistas científicas e no capítulo seis um trabalho submetido para publicação. No último capítulo, apresenta-se uma conclusão geral da tese.

No que respeita aos artigos expostos, no segundo capítulo descreve-se o papel da quitina no processo de compostagem e na ocorrência de organismos com capacidade supressiva. O terceiro e o quarto capítulos descrevem o uso de compostos para suprimir doenças em *Agrostis stolonifera* e em estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). No quinto capítulo descreve-se o enriquecimento de compostos com *Trichoderma atroviride* e o impacto desta técnica na capacidade supressiva de doenças. Finalmente, no último artigo (sexto capítulo) apresenta-se o impacto do tempo de armazenagem na capacidade supressiva dos compostos, enriquecidos ou não.

Os artigos correspondentes aos capítulos, foram publicados como se descreve abaixo:

- Coelho, L., Bueno-Pallero, F., Guerrero, C., Dionísio, L., Reis, M.I. 2021. **Effect of chitin from mushroom waste in the composting process of organic residues: compost characteristics and occurrence of biological control agents.** Acta Hortic. 1305, 155-162. doi: 10.17660/ActaHortic.2021.1305.22

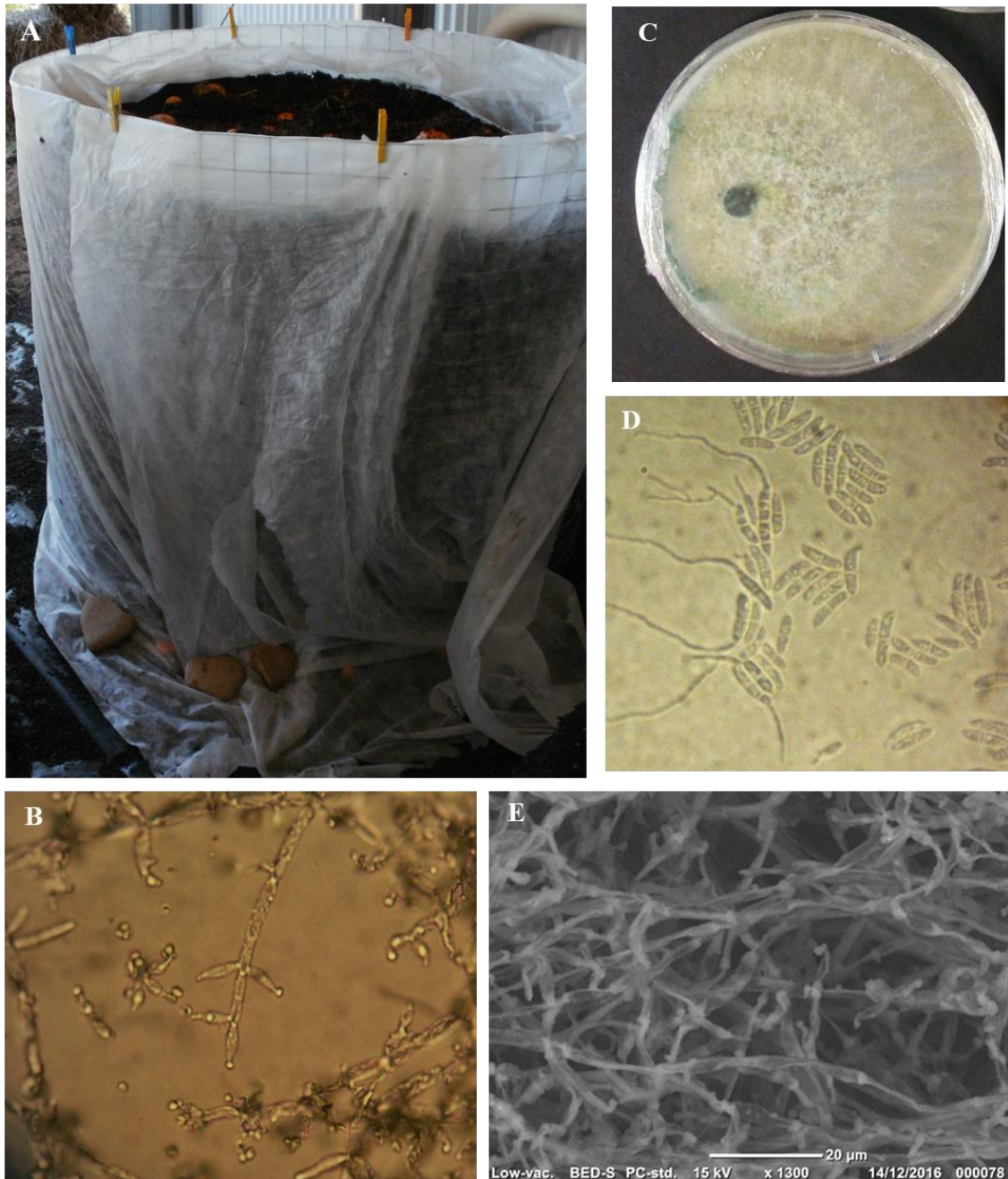


Figura 1: Processo de compostagem e microrganismos isolados dos compostos. A, pilha de compostagem no início do processo; B, Observação microscópica de *Trichoderma* spp. (1000x); C, Observação macroscópica de *Trichoderma atroviride*; D, Observação microscópica de *Bipolaris* spp. (1000x); E, Observação de *Trichoderma atroviride* em microscopia de varrimento (1300x).

- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. 2020. Use of organic composts to suppress turfgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. Biological Control, 141. Doi: [10.1016/j.biocontrol.2019.104154](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104154)

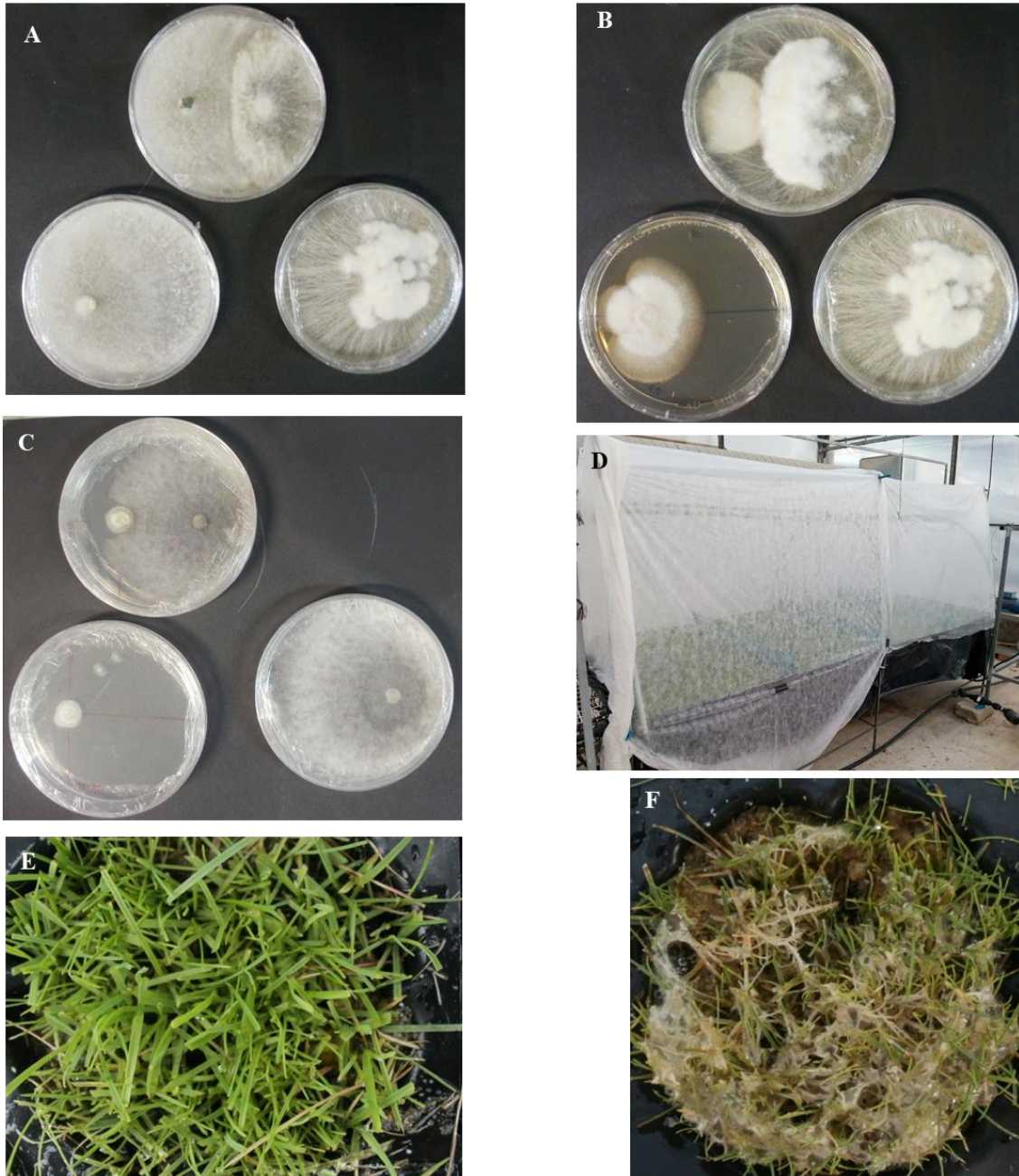


Figura 2: Ensaio *in vitro* e *in vivo* em relva. A, *Trichoderma atroviride* contra *Sclerotium rolfsii*; B, *Fusarium keratoplasticum* contra *Sclerotium rolfsii*; C, *Bionectria ochroleuca* contra *Clariireedia* spp.; D, Aspecto do túnel coberto onde decorreram os ensaios; E, Aspecto da relva sem sintomas; F, Relva fortemente infectada por *Sclerotium rolfsii*. Para as fotografias referentes aos ensaios *in vitro*, a placa de Petri do topo corresponde ao confronto directo entre o antagonista e o patogénico, a placa de Petri do lado inferior esquerdo corresponde ao antagonista e a do lado inferior direito ao patogénico.

- Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L. 2017. O desenvolvimento de doenças do solo em estévia pode ser controlado com a aplicação de composto orgânico? In: Associação Portuguesa de Horticultura (ed.). Actas Portuguesas de Horticultura nº 29. pp: 553-560. ISBN: 978-972-8936-28-0. [Link](#).



Figura 3: Ensaio *in vivo* com estévia. A, Aspeto geral do início do ensaio; B, Planta saudável de estévia em P2; C, Planta infetada com *Sclerotium rolfsii*; D, Planta infectada com *Rhizoctonia solani*; E, Planta infectada com *Sclerotium rolfsii* em P2t; F, Planta morta por *Sclerotium rolfsii* em Tt.

- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. 2021. Effect of the organic compost enrichment with *Trichoderma atroviride* in the biological control of turfgrass diseases. Biological Control 159. doi: 10.1016/j.biocontrol.2021.104620

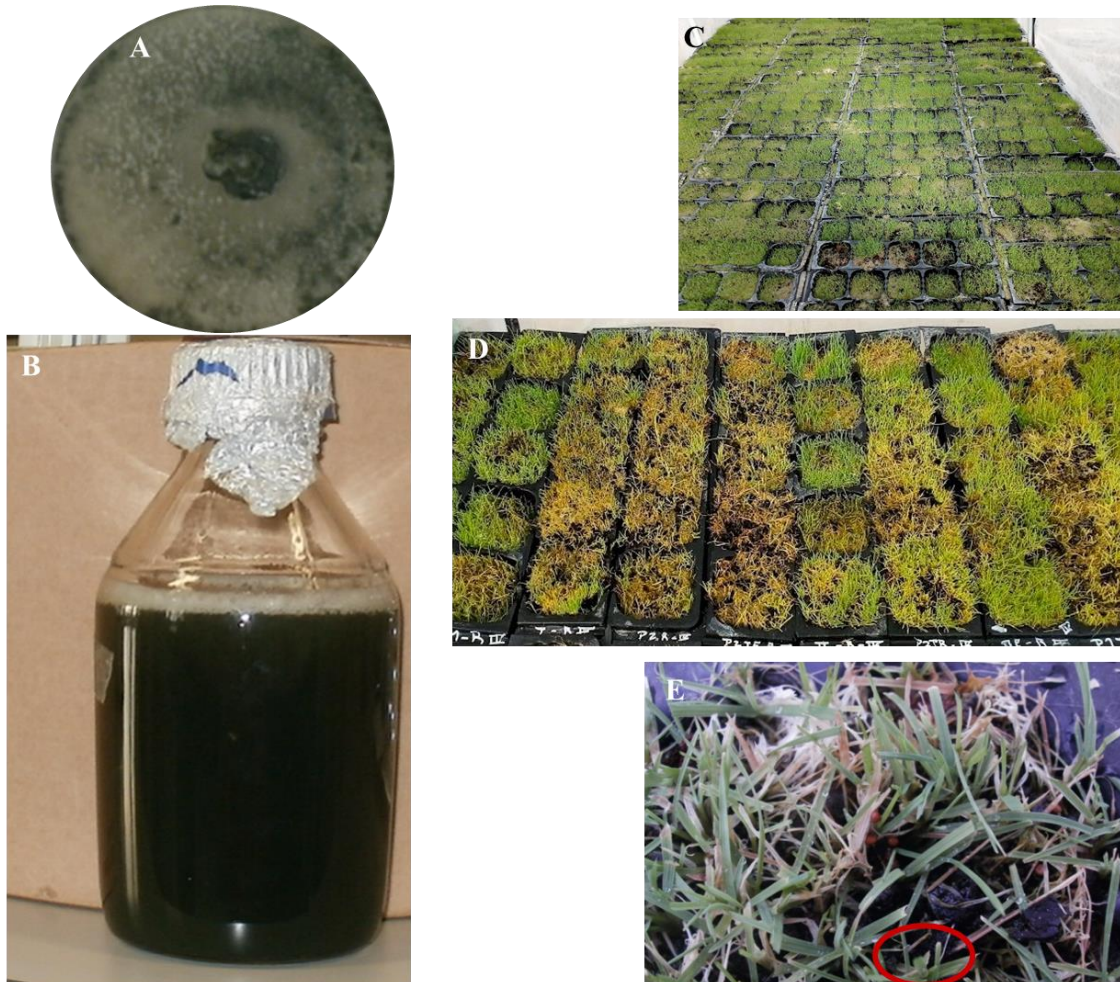


Figura 4: Enriquecimento dos substratos com *Trichoderma atroviride*. A, Cultura pura de *Trichoderma atroviride*; B, suspensão de *Trichoderma atroviride*; C, Aspecto geral do início do ensaio com os compostos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*; D, Aspecto geral do ensaio após desenvolvimento dos fungos fitopatogénicos; E, Relva infetada por *Scelotium rolfsii*, onde são visíveis os esclerócios.

Submetido

- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. 2020. The influence of the storage period on the suppressive capacity of composts enriched with *Trichoderma atroviride*. Submetido à revista Biological Control a 07 de setembro de 2022.

RESUMO

A compostagem valoriza resíduos orgânicos transformando-os em compostados ou compostos, com importantes aplicações agrícolas. Durante a compostagem, a presença de quitina - o principal componente da parede celular dos fungos - favorece a ocorrência de microrganismos com capacidade de degradar, desenvolvendo a capacidade de controle de doenças causadas por fungos do solo - capacidade supressiva - observada pelo uso desses compostos.

Para avaliar a influência da quitina na capacidade supressiva produziram-se dois compostos com resíduos agroindustriais: P1 (laranja, bagaço de uva e aparas de relva) e P2 (os mesmos que P1, acrescidos de resíduos da produção de cogumelos), em três compostagens realizadas em anos sucessivos. Os microrganismos isolados nos compostos foram identificados morfológica e molecularmente, e testou-se a sua capacidade antagonista contra doenças do solo, *in vitro*. Os compostos obtidos foram testados *in vivo*, em *Agrostis stolonifera* L. e em *Stevia rebaudiana* Bertoni, cultivadas nos compostos e em turfa comercial (P). Nos compostos obtidos foram isoladas 190 espécies de fungos, 31 das quais manifestaram capacidade antagonista, 14 espécies em P1 e 17 em P2. Nos ensaios *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii*, *Clariireedia* spp. e *Rhizoctonia solani*, *T. atroviride* foi o antagonista com maior taxa de inibição. Nos ensaios *in vivo* usando os compostos como substratos, o controle de *Clariireedia* spp. foi mais eficaz com P1, enquanto o controle de *R. solani* e *S. rolfsii* foi mais eficaz com P2. Amostras dos substratos (P1, P2 e P) foram submetidas a tratamento térmico (P1t, P2t e Pt) e enriquecimento (E) com o antagonista mais eficiente identificado *in vitro*: *T. atroviride* (P1E, P2E, P1tE, P2tE, PE e PtE). A capacidade supressiva dos diferentes substratos foi testada logo após a sua obtenção e depois de 6 e 12 meses de armazenamento.

Na relva, obteve-se um maior controle das doenças utilizando compostos enriquecidos, sendo P1E o mais eficaz contra *Clariireedia* spp. e P2E contra *R. solani*. Os compostos mantiveram a capacidade supressiva ao longo do tempo, sobretudo os enriquecidos, os quais proporcionaram os melhores resultados de proteção após 6 meses de armazenamento.

Neste trabalho, verificou-se que resíduos agroindustriais podem ser transformados em produtos com capacidade de reduzir a aplicação de fitofármacos sintéticos, mantendo esta capacidade por algum tempo e contribuindo para uma maior sustentabilidade e circularidade na agricultura.

Palavras-chave: Compostagem, supressividade, *Agrostis stolonifera*, *Trichoderma atroviride*, *Rhizoctonia solani*, *Claviceps spp.*, *Sclerotium rolfsii*

ABSTRACT

Composting is a process by which we increase the value of organic wastes by transforming them into compost, which has important agricultural applications. During composting, the presence of chitin favours the occurrence of microorganisms capable of degrading it, developing the ability to control diseases caused by soil fungi - suppressive capacity - observed using these composts.

To evaluate the influence of chitin on the suppressive capacity, two composts were produced with agro-industrial residues: P1 (orange fruit waste, grape marc and grass clippings) and P2 (P1 with added residues from mushroom production), with three composting processes in three successive years. The microorganisms isolated in the composts were identified both morphologically and molecularly, and their antagonistic capacity against soil diseases, *in vitro*. The obtained composts were tested *in vivo*, in *Agrostis stolonifera* L. and in *Stevia rebaudiana* Bertoni, cultivated in composts and in a commercial peat (P). In the composts, 190 species of fungi were isolated, 31 of which had antagonist capacity, 14 species in P1 and 17 in P2. During *in vitro* testing against *Sclerotium rolfsii*, *Clariireedia* spp. and *Rhizoctonia solani*, the antagonist with the highest inhibition rate was *T. atroviride*. During *in vivo* testing, control of *Clariireedia* spp. was more effective with P1, while that of *R. solani* and *S. rolfsii* was more effective with P2. Substrate samples (P, P1 and P2) were subjected to heat treatment (P1t, P2t and Pt) and enrichment (E) with the most efficient antagonist *in vitro*: *T. atroviride* (P1E, P2E, PE, P1tE, P2tE and PtE). The suppressive capacity of the different substrats was tested after 0, 6 and 12 months of storage.

In turfgrass, greater disease control was obtained with enriched composts, with P1E being the most effective against *Clariireedia* spp. and P2E against *R. solani*. The composts maintained their suppressive capacity over time, especially the enriched ones, providing the best results after 6 months of storage.

In this work, it was found it is possible to convert agro-industrial residues into products capable of reducing the application of synthetic phytopharmaceuticals and the suppressive capacity is kept for some time, contributing to sustainability and circularity of agriculture.

Keywords: Composting, supressiveness, *Agrostis stolonifera*, *Trichoderma atroviride*, *Rhizoctonia solani*, *Clarireedia* spp., *Sclerotium rolfsii*

Índice

AGRADECIMENTOS	i
VISÃO GERAL DA TESE	iv
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE QUADROS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xx
1. CAPÍTULO 1	1
1.1. Compostagem.....	2
1.1.1. Fases de compostagem e atividade microbiológica	3
1.2. Utilização dos compostos.....	4
1.2.1. Fertilizantes	5
1.2.2. Capacidade supressiva dos compostos.....	5
1.2.2.1 Tipos de supressividade	10
1.3. Compostagem com resíduos de quitina.....	12
1.4. Enriquecimento dos compostos com agentes de controlo biológico.....	15
1.4.1. <i>Trichoderma</i> spp.	15
1.5. Armazenamento dos compostos.....	16
1.6. Importância dos relvados	17
1.7. A cultura de estévia	18
1.8. Hipótese e objetivos	19
1.9. Referências	20
2. CAPÍTULO 2	29
2.1. Resumo.....	30
2.2. Introdução.....	31
2.3. Material e métodos	31
2.3.1. Processo de compostagem.....	31
2.3.2. Isolamento de agentes de controlo biológico	34
2.3.3. Análise estatística.....	34
2.4. Resultados e discussão	35

2.4.1.	Processo de compostagem.....	35
2.4.2.	Atividade enzimática.....	39
2.4.3.	Isolamento e identificação dos organismos antagonistas.....	40
2.5.	Conclusões	42
2.6.	Referências	42
3.	CAPÍTULO 3	45
3.1.	Resumo.....	46
3.2.	Introdução.....	47
3.3.	Material e métodos	48
3.3.1.	Produção de compostos orgânicos	49
3.3.2.	Isolamento e identificação de agentes de controlo biológico.....	50
3.3.3.	Capacidade antagonista – Testes <i>in vitro</i>	50
3.3.4.	Capacidade antagonista - Ensaio <i>in vivo</i>	51
3.3.5.	Análise estatística.....	53
3.4.	Resultados e discussão	53
3.4.1.	Produção de compostos orgânicos	53
3.4.2.	Isolamento e identificação de agentes de controlo biológico.....	56
3.4.3.	Ensaio <i>in vitro</i>	56
3.4.3.1	<i>Sclerotium rolfsii</i>	58
3.4.3.2	<i>Claviceps</i> spp. (antes <i>S. homoeocarpa</i>)	58
3.4.3.3	<i>Rhizoctonia solani</i>	58
3.4.4.	Ensaio <i>in vivo</i>	58
3.5.	Conclusões	64
3.6.	Referências	65
4.	CAPÍTULO 4	71
4.1.	Resumo.....	72
4.2.	Introdução.....	73
4.3.	Material e métodos	74
4.4.	Resultados e discussão	76
4.4.1.	Influência do composto na incidência e severidade das doenças.....	76

4.4.2.	Influência do composto na sobrevivência das plantas	79
4.5.	Conclusão	80
4.6.	Referências	80
5.	CAPÍTULO 5	83
5.1.	Resumo.....	84
5.2.	Introdução.....	85
5.3.	Material e métodos	87
5.3.1.	Preparação dos compostos e dos substratos	87
5.3.2.	Enriquecimento do composto	88
5.3.3.	Caracterização dos substratos.....	89
5.3.4.	Atividade enzimática.....	90
5.3.5.	Avaliação da capacidade supressiva dos compostos.....	90
5.3.6.	Análise estatística.....	92
5.4.	Resultados e discussão	93
5.4.1.	Caracterização dos compostos	93
5.4.2.	Atividade enzimática.....	95
5.4.3.	Avaliação da capacidade supressiva dos compostos.....	98
5.4.3.1	<i>Clariireedia</i> spp.	98
5.4.3.2	<i>Sclerotium rolfsii</i>	100
5.4.3.3	<i>Rhizoctonia solani</i>	101
5.5.	Conclusões	103
5.6.	Referências	104
6.	CAPÍTULO 6	111
6.1.	Resumo.....	112
6.2.	Introdução.....	112
6.3.	Material e métodos	114
6.3.1.	Preparação dos compostos e dos substratos	114
6.3.2.	Armazenamento dos compostos.....	115
6.3.3.	Caracterização de substratos	115
6.3.4.	Avaliação de supressividade dos compostos armazenados.....	116

6.3.5. Análise estatística.....	118
6.4. Resultados e discussão	118
6.4.1. Caracterização dos compostos	118
6.4.2. Atividade enzimática.....	122
6.4.3. Avaliação da supressividade dos compostos.....	124
6.5. Conclusões	130
6.6. Referências	131
7. CAPÍTULO 7.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Mecanismos de antagonismo entre os agentes de controlo biológico e o patogénico. A, antibiose; B, hiperparasitismo; C, microbiostase.	8
Figura 1.2: Supressividade geral e específica.	10
Figura 1.3: Esquema da estrutura química da quitina.	13
Figura 1.4: Objetivos do trabalho.	20
Figura 2.1: Atividade enzimática na fase termofílica, dia 56.	39
Figura 2.2: Atividade enzimática no final dos processos de compostagem, dia 112.	40
Figura 3.1: Eficácia do composto no controlo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i>	59
Figura 3.2: Eficácia do composto no controlo biológico de <i>Clariireedia</i> spp..	60
Figura 3.3: Eficácia do composto no controlo biológico de <i>Sclerotium rolfsii</i>	61
Figura 4.1: Variação da severidade das doenças provocadas por <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> ao longo dos ensaios.	77
Figura 4.2: Mortalidade das plantas expostas a <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia rolfsii</i> e sem exposição (controlo).	79
Figura 5.1: Esquema do ensaio, com os 12 tratamentos em estudo.	88
Figura 5.2: Eficácia dos compostos no controlo biológico de <i>Clariireedia</i> (gen. nov) spp..	98
Figura 5.3: Eficácia dos compostos no controlo biológico de <i>Sclerotium rolfsii</i>	100
Figura 5.4: Eficácia dos compostos no controlo biológico de <i>Rhizoctonia solani</i>	102
Figura 6.1: Populações microbianas aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento.	120
Figura 6.2: Severidade da doença aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento.	124
Figura 6.3: Índice de controlo biológico aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento.	126
Figura 6.4: Eficácia do composto em 0, 6 e 12 meses de armazenamento.	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1: Fases da compostagem e o dia de início de cada fase.	33
Quadro 2.2: Populações de microrganismos (ufc g ⁻¹ composto) durante a compostagem.	36
Quadro 2.3: Propriedades dos compostos analisadas em diferentes fases dos processos de compostagem.	37
Quadro 2.4: Algumas características físicas dos compostos, no final dos processos de compostagem.	38
Quadro 2.5: Fungos potencialmente antagonistas isolados dos compostos obtidos.	41
Quadro 3.1: Propriedades dos compostos, no final da compostagem, e da turfa.	54
Quadro 3.2: Populações microbianas (UFCs g ⁻¹ composto) no final do processo de compostagem e o número de agentes de controlo biológico isolados nas diferentes fases de compostagem (FA, FM e PF).	55
Quadro 3.3: Inibição (%) dos fungos patogénicos pelos potenciais antagonistas isolados de cada composto (P1 e P2).	57
Quadro 4.1: Características físico-químicas ¹ dos substratos.	75
Quadro 4.2: Populações microbianas nos compostos orgânicos.	75
Quadro 4.3: Percentagem de incidência das doenças nas plantas nos substratos.	76
Quadro 4.4: Severidade da doença nos diferentes substratos 45 DAP.	78
Quadro 5.1: Características dos substratos estudados.	93
Quadro 5.2: Enumeração de populações microbianas (UFC g ⁻¹ composto) nos diferentes substratos.	95
Quadro 5.3: Atividade enzimática nos substratos (atividade relativa enzimática g ⁻¹)... ..	96
Quadro 6.1: Algumas propriedades dos substratos testados.	119
Quadro 6.2: Atividade enzimática nos diferentes substratos (atividade relativa de enzima.g ⁻¹).	123
Quadro 6.3: Análise de componentes principais avaliando os parâmetros com efeito supressivo das doenças pelos compostos.	128

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB – Agente de Controlo Biológico

ANOVA – Análise de Variância Multifatorial

AUDPC - *Area under disease progress curve*

BCI - Índice de controlo biológico

CMA - *Corn Mill Agar*

CE – Condutividade elétrica

C/N - Relação carbono/ azoto

Cu - Cobre

DAP – Densidade aparente

E – Composto enriquecido com *Trichoderma atroviride*

FA – Fase de arrefecimento

IG – Índice de Germinação

K - Potássio

MP – Fase de Maturação

N – Azoto

NH₃ - Amoníaco

NH₄⁺ - Azoto na forma amoniacal

NO₃⁻ - Azoto na forma nitrica

P1 - composto P1, obtido com resíduos de laranja, bagaço de uva e aparas de relva

P2 - composto P2, obtido com resíduos de laranja, bagaço de uva, aparas de relva e resíduo da produção de cogumelos

PCA – *Plate Count Agar*

1/2PCA – Meio de cultura com metade da concentração recomendada pelo fabricante de PCA

PDA – *Potato Dextrose Agar*

PF – Produto Final

Mn - Manganês

MSM – Meio de sal mineral

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

t – Compostos sujeitos a tratamento térmico, a 60 °C durante 7 dias

UFC – Unidades formadoras de colónias

Zn – Zinco

1. CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Compostagem

O crescimento da população mundial exige o aumento da produção de alimentos, o que tem como consequência, uma maior produção de resíduos de origem agrícola, para os quais é fundamental encontrar uma resposta sustentável.

A agricultura, em particular, é uma atividade geradora de grande quantidade de resíduos orgânicos, quer seja na produção, na preparação ou na transformação dos produtos. A resposta para resolver o problema destes resíduos passa pelo seu reaproveitamento, favorecendo o aumento da economia circular na agricultura, e contribuindo também para se alcançar a neutralidade carbónica.

A compostagem pode ser uma das soluções para os resíduos resultantes da atividade agrícola, transformando-os e devolvendo-os aos solos, nomeadamente aos solos agrícolas, tornando a agricultura mais sustentável. Para além disso, apresenta uma alternativa ambientalmente sustentável para o uso de alguns dos fitofármacos.

A compostagem é uma técnica de gestão, tratamento e valorização de resíduos, pela qual a sua componente orgânica é decomposta biologicamente em condições controladas, alcançando-se um estado em que o produto pode ser manuseado, armazenado ou aplicado ao solo sem afectar negativamente o ambiente (Golueke, 1972; Barker, 2001; Day e Shaw, 2001). Este processo permite diminuir o impacto negativo dos resíduos agrícolas no ambiente, originando produtos, designados por compostos, que podem ser aplicados na agricultura (Barker, 2001), sendo conhecidos principalmente pelas suas propriedades como fertilizantes. A aplicação dos compostos permite a redução da aquisição de fatores de produção externos à exploração agrícola (Ceclie e Abdelrahman, 2014).

Os compostos são o resultado das transformações que os microrganismos, sob condições controladas, exercem sobre os resíduos orgânicos. O seu sucesso depende das características físicas, químicas e biológicas dos resíduos no início da compostagem. A mistura inicial deverá ser constituída por uma proporção adequada de diferentes resíduos, devendo manter-se os teores de água e de oxigénio adequados para a atividade microbiana (Day e Shaw, 2001; Ceclie e Abdelrahman, 2014).

A compostagem é um processo biodinâmico, onde a atividade dos microrganismos faz aumentar a temperatura, intensificando os processos de biodegradação dos materiais originais. Muitos autores consideram a compostagem como a sucessão de

microrganismos influenciada pela temperatura (Day e Shaw, 2001; Steger et al., 2007; Suárez-Estrella et al., 2012). Durante este processo, podem identificar-se três fases principais: inicial, termofílica e final (Day e Shaw, 2001; Batista e Batista, 2007), apesar de vários autores considerarem um maior número de fases (Ceglie e Abdelrahman, 2014).

As diferentes fases de compostagem têm um papel fundamental na decomposição e na sucessão de microrganismos ao longo do processo. As populações de microrganismos vão alternando à medida que mudam as condições ambientais, como a temperatura, o teor de humidade, o teor e a natureza da matéria orgânica, o pH ou a densidade aparente (Day e Shaw, 2001; Batista e Batista, 2007; Ceglie e Abdelrahman, 2014). Assim, durante as diferentes fases de compostagem, os microrganismos presentes são o resultado de interações dinâmicas e complexas com as condições ambientais envolventes.

1.1.1. Fases de compostagem e atividade microbiológica

A atividade dos microrganismos é regulada pelas características da mistura a compostar, como o teor de humidade, o arejamento, e a relação C/N. A forma e o tamanho da pilha de compostagem, com efeito no arejamento e dissipação de calor, assim como a temperatura exterior, podem também fazer variar a atividade dos microrganismos e, consequentemente, a temperatura do material (Day e Shaw, 2001; Brito, 2005).

No início da compostagem, é fundamental que a mistura dos materiais tenha uma relação C/N adequada, situada entre 25 e 30, equilibrando a quantidade de materiais ricos em carbono e em azoto. Os materiais com carbono em abundância fornecem a matéria orgânica e a energia para a compostagem, enquanto os azotados controlam a rapidez do processo (Day e Shaw, 2001). O azoto é fundamental para o crescimento dos microrganismos, por ser constituinte das proteínas que representam aproximadamente metade da massa das células microbianas. O rápido crescimento dos microrganismos está dependente da disponibilidade de azoto na mistura a compostar. No entanto, se os microrganismos não conseguirem usar o azoto por falta de carbono, este será perdido por volatilização ou por lixiviação e desnitrificação dos nitratos (Brito, 2005).

Na fase inicial ou de crescimento mesofílico, são decompostas as substâncias de degradação mais fácil, como os hidratos de carbono, lípidos e proteínas (Hoitink et al., 1997; Day e Shaw, 2001). As bactérias mesófilas são os organismos predominantes,

sendo os principais consumidores destas substâncias (Hoitink et al., 1997) que, quando escassas, juntamente com o aumento da temperatura, criam condições desfavoráveis para estes organismos, levando à diminuição da sua abundância em benefício das bactérias termófilas, actinomicetes e fungos. Entra-se, deste modo, na fase termofílica, com temperaturas superiores a 45 °C (Day e Shaw, 2001). Posteriormente, a subida da temperatura para valores próximos de 65 a 70 °C aumenta a higienização do material, pela destruição da maioria dos agentes patogénicos e sementes, assim como a libertação de substâncias fitotóxicas por via térmica (Day e Shaw, 2001). Entretanto, como resultado da redução das fontes nutritivas, a atividade microbiana decresce, tendo como consequência a diminuição da temperatura voltando-se a uma etapa mesofílica e de maturação (Day e Shaw, 2001). Nesta fase, o material é recolonizado por uma grande diversidade de microrganismos, muitos deles com capacidade supressiva contra agentes fitopatogénicos (Hoitink e Boehm, 1999).

A temperatura do material é um indicador da evolução do processo. Segundo Stentiford (1993) e Beata-Hall et al. (2002), a máxima atividade microbiana ocorre a temperaturas mesofílicas, entre 35 e 40 °C, a máxima biodegradação tem lugar a temperaturas compreendidas entre os 45 e os 55 °C. A máxima higienização ocorre a temperaturas superiores a 55 °C. A temperatura não deve permanecer durante muito tempo acima de 60 °C, pois muitas espécies de microrganismos morrem ou são inactivadas, originando um abrandamento da decomposição da matéria orgânica (Beata-Hall et al., 2002).

No final da compostagem, sendo o composto rico em celulose, lenhina e substâncias húmicas, com pouca matéria orgânica facilmente degradável, os microrganismos patogénicos ficam em desvantagem em comparação com os saprófitas, visto que, normalmente, os agentes fitopatogénicos apenas conseguem utilizar produtos facilmente assimiláveis (Reis, 2016).

No final da compostagem, obtém-se um produto estável e praticamente livre de agentes patogénicos e sementes, que pode ser aplicado ao solo ou usado como componente de substratos em culturas sem solo (Reis, 1997; St. Martin e Brathwaite, 2012).

1.2. Utilização dos compostos

Os compostos são uma fonte de matéria orgânica, frequentemente aplicados ao solo como corretivos (Pane e Zaccardelli, 2014). Quando usados na agricultura, os compostos

melhoram nas propriedades físicas e químicas dos solos, aumentando a capacidade de retenção de água, a capacidade de troca catiônica, o teor de matéria orgânica, melhorando a estrutura do solo, contribuindo para melhorar o estado nutritivo dos solos (Santos, 2001; Torres et al, 2003; Varennes, 2003). Ao nível biológico e bioquímico são também conhecidas melhorias, como o aumento das populações de microrganismos e da atividade enzimática nos solos, favorecendo o controlo biológico de doenças das plantas (Hoitink e Fahy, 1986; Borrero et al, 2009; Bonanomi et al., 2010; Saadi et al., 2010; Castaño et al., 2013; Liu et al 2016), reduzindo a aplicação de pesticidas (Coelho et al., 2016; Coelho et al., 2017), incluindo os herbicidas, sendo também eficazes no controlo de infestantes (Coelho et al., 2019) e de nemátodes (Coelho et al., 2021). Assim, a aplicação dos compostos na agricultura torna possível a reutilização de resíduos orgânicos, favorecendo a sustentabilidade da atividade.

1.2.1. Fertilizantes

As comunidades microbianas são fundamentais numa agricultura sustentável, sendo um dos fatores que intervêm na mineralização do solo, tornando os nutrientes disponíveis para as plantas (Bonanomi et al., 2010; Ceglie e Abdelrahman, 2014). Resultando os compostos da atividade microbiana, a sua aplicação na agricultura contribui para a sustentabilidade desta atividade (Huber et al., 2009), podendo ser aplicados também em agricultura biológica (Regulamento EU 2018/848). Assim, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, origina fertilizantes orgânicos, tornando as unidades de produção agrícola menos dependentes de outras formas de fertilizantes.

1.2.2. Capacidade supressiva dos compostos

As plantas estão sujeitas a ataques de microrganismos que lhes podem causar doenças se não forem prevenidas ou devidamente tratadas, com grandes perdas económicas na atividade agrícola (Mehta et al., 2014), responsáveis por cerca de 10 % de perdas na produção (Strange e Scott, 2005). A monocultura, cada vez mais frequente, aumenta a perda de diversidade microbiana no solo, afetando o estado sanitário das plantas e contribuindo para o aumento da incidência de doenças (Mo et al., 2016).

Na década de 70 do séc. XX, surgiu o conceito de supressividade dos compostos orgânicos, nomeadamente no controlo de doenças do solo (Hoitink e Fahy, 1986). Desde então, a sua utilização tem sido referida e desenvolvida para o controlo biológico de fitopatologias (Hoitink e Fahy, 1986; Borrero et al, 2009; Liu et al 2016), apesar da sua capacidade supressiva não estar ainda completamente compreendida (Castaño et al., 2013).

Atualmente, para controlar as doenças do solo, recorre-se maioritariamente a fitofármacos, que contribuem para o empobrecimento da microbiota (Bonanomi et al., 2010; Saadi et al., 2010), com consequências negativas para o produtor, o consumidor e o ambiente.

Recentemente, tem-se assistido a um crescente interesse pelo biocontrolo, particularmente devido ao impacto dos fitofármacos de síntese na saúde pública e no ambiente (Bonanomi et al., 2010), levando a UE a desenvolver políticas que reduzam a sua toxicidade e a procurar agentes de biocontrolo eficazes, de baixo custo e ambientalmente favoráveis (Martin, 2003). Tanto a legislação nacional como a europeia têm tentado criar políticas que incentivem os agricultores a reduzir a dependência de produtos fitofarmacêuticos sintéticos. A União Europeia pretende reduzir o uso dos pesticidas, tendo como meta uma diminuição de 50 % até 2030, de acordo com a estratégia “do prado ao prato” (https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides_en). Esta proposta visa o uso sustentável dos fitofármacos, contribuindo para um ar mais puro, água limpa, solo saudável e a promoção da biodiversidade. Neste contexto, as propriedades supressivas dos compostos, representam uma oportunidade para o desenvolvimento de uma agricultura mais ecológica e segura. Os compostos podem ser usados tanto na prevenção, como na mitigação e controlo de doenças das plantas (Noble e Coventry, 2005; Mehta et al., 2014; Pane e Zaccardelli, 2014).

O controlo biológico foi definido por Pal e McSpadden (2006), como o uso de organismos naturais ou modificados, genes ou produtos genéticos, para reduzir os efeitos dos organismos indesejáveis e favorecer os benéficos como plantas, insectos e microrganismos. A capacidade dos compostos para promoverem um ambiente total ou parcialmente desfavorável para os organismos patogénicos é conhecida como supressividade (Pane e Zaccardelli, 2014).

Os compostos, quer sejam aplicados ao solo ou usados em culturas sem solo, representam uma alternativa para o controlo de doenças das plantas, devido à quantidade e diversidade

de microrganismos que contêm (Bernal-Vicente et al., 2008; Saadi et al., 2010; Alfano et al., 2011; Liu et al., 2016; Köhl et al., 2019; Coelho et al., 2020). A morte dos patogênicos durante o processo de compostagem, seguida da recolinização por uma população ativa de microrganismos antagonistas, são os fatores-chave para a capacidade supressiva dos compostos, ficando livres de agentes fitopatogênicos. A estes fatores juntam-se a estabilização da matéria orgânica e as características físicas e químicas do composto (Hoitink et al., 1993).

A componente biológica dos compostos, representada principalmente por fungos, bactérias, actinomicetes, protozoários e nemátodes, desempenha um papel fundamental na supressividade (Ntougias et al., 2008; Pane et al., 2011; Pugliese et al., 2011, Pane e Zaccardelli, 2014). A aplicação de compostos ao solo proporciona o aumento das comunidades microbianas, levando ao aumento da competição com os organismos do solo e à redução dos agentes fitopatogênicos presentes (Barker, 2001; Bonanomi, 2010). Esta interação entre o agente patogênico, o hospedeiro e os microrganismos colocados no solo são os fatores que mais contribuem para a eficácia da supressividade, juntamente com as características físicas e químicas do meio, nomeadamente a disponibilidade de nutrientes (Hoitink et al., 1993).

Os compostos têm mostrado capacidade supressiva contra diferentes agentes fitopatogênicos, nomeadamente *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Ralstonia solanacearum* (Cotxarrera et al., 2002; Pugliese et al., 2008; Borrero et al., 2009; Alfano et al., 2011; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013; Jambhulkar et al., 2015; Liu et al., 2016).

A supressividade tem sido relacionada com o grau de maturação dos compostos (Trillas et al., 2006). O teor de matéria orgânica desempenha um papel fundamental na capacidade supressiva dos compostos, por ser um suporte natural dos microrganismos, em quantidade e diversidade (De Corato, 2020).

Um grande número de agentes de controlo biológico tem sido isolado a partir de compostos (Cotxarrera, et al., 2002; Pugliese et al., 2008; Borrero et al., 2009; Alfano et al., 2011; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013; Suárez-estrella et al., 2013; Jambhulkar et al., 2015; Liu et al., 2016; De Corato, 2020). O conhecimento da microbiota de um composto é fundamental para a previsão da sua capacidade supressiva, determinada ou potenciada pela atividade microbiológica (Hoitink et al., 1993), e dependente do nível de decomposição da matéria orgânica, a qual deverá ser capaz de

manter a população microbiana com capacidade de induzir o controlo biológico (Boehm e Hoitink, 1992).

Um composto maduro encontra-se normalmente colonizado por agentes de biocontrolo, os quais têm a capacidade de erradicar agentes patogénicos, através do controlo biológico (Hoitink *et al.*, 1993 e Hoitink *et al.*, 1997).

A matéria-prima com que se iniciam os processos de compostagem influencia as populações microbianas finais e logo a capacidade supressiva dos compostos (Termorshuizen *et al.*, 2006; Bonanomi *et al.*, 2007; Pane e Zaccardelli, 2014). Os resíduos utilizados na compostagem podem originar diferentes efeitos sobre diferentes fitopatogénicos. Por exemplo, em compostos obtidos com bagaço de uva, com baixo teor de celulose e elevado de açúcares, criam-se condições para o desenvolvimento de *Penicilium*, com capacidade para suprimir *S. rolfsii* (Avillés *et al.*, 2011).

A supressividade depende das relações entre os diferentes microrganismos do solo e o ambiente envolvente, baseiando-se em fenómenos de competição, antibiose, microbiostase, predação, hipovirulência e hiperparasitismo e indução de resistência sistemática adquirida (Borrero *et al.*, 2009; Saadi *et al.*, 2010; Pane e Zaccadelli, 2014; Reis, 2016) (Figura 1.1).

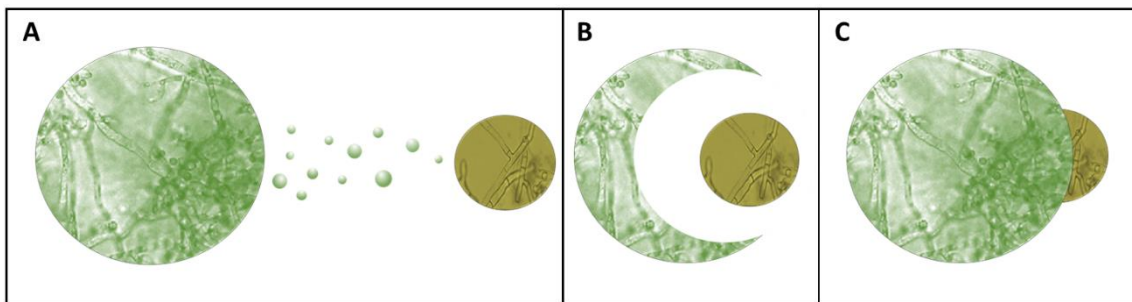


Figura 1.1: Mecanismos de antagonismo entre os agentes de controlo biológico e o patogénico. A, antibiose; B, hiperparasitismo; C, microbiostase.

A antibiose é um fenómeno mediante o qual os microrganismos inibem a atividade dos patogénicos pela produção ou secreção de um ou mais compostos (Hoitink *et al.*, 1996) (Figura 1.1-A), onde se incluem antibióticos e enzimas líticas (Baker e Cook, 1974; Lorito *et al.*, 1994; Pane e Zaccardelli, 2014). As enzimas líticas desempenham um papel bastante importante no controlo biológico, onde se destacam as quitinases, glucanases e

protéases (Lorito et al., 1994; Pane e Zaccardelli, 2014). A produção destes compostos ocorre normalmente quando os nutrientes se tornam limitantes (Lewis et al., 1991). Apesar de os antibióticos terem um largo espectro de ação, podendo limitar o crescimento dos organismos benéficos, a maior parte deles são mais seletivos para os patogénicos (O'Sullivan e O'Gara, 1992).

No caso de os organismos com capacidade supressiva serem predadores dos patogénicos, trata-se de um fenómeno de hiperparasitismo (Hoitink et al., 1997; Pane e Zaccardelli, 2014) (Figura 1.1-B). Este tipo de antagonismo é bastante específico, mas pouco frequente, sendo necessário o predador e o patogénico específicos. No entanto, quando se verifica hiperparasitismo, o processo é bastante eficaz. *Trichoderma* spp. são organismos conhecidos como hiperparasitas (Pane e Zaccardelli, 2014).

A microbiostase é um fenómeno de competição por nutrientes induzida pelas populações de microrganismos presentes nos compostos (Figura 1.1-C). Este tipo de controlo resulta da supressão da germinação de esporos dos patogénicos, assim como o seu crescimento e atividade, não se verificando a morte, mas a redução das populações (Hoitink e Fahy, 1986). Para além disso, há também uma competição por espaço (Pane e Zaccardelli, 2014).

Mais recentemente surgiu o conceito de resistência sistémica adquirida nas plantas, mediada pelos compostos. Este controlo promove a redução de doenças, tanto no local de aplicação do composto como em locais espacialmente separados (Lucas, 1998; Avilés et al., 2011; Pane e Zaccardelli, 2014), tornando-se assim eficaz também no controlo de doenças foliares (Pane e Zaccardelli, 2014). Como resposta a estímulos específicos, as plantas são capazes de aumentar a sua capacidade de defesa contra os agentes fitopatogénicos (Lucas, 1998; Avilés et al., 2011; Pane e Zaccardelli, 2014), podendo esta proteção ser estimulada pela presença de microrganismos semelhantes ao patogénico, mas sem capacidade virulenta (Cook e Baker, 1983; Lucas, 1998).

Para além da resistência sistémica adquirida, é também conhecido o mecanismo de resistência sistémica induzida. Neste caso, a colonização das raízes das plantas por rizobactérias ou fungos promotores do crescimento das plantas, frequentes na matéria orgânica, induz a resistência das plantas a determinados patogénicos (Pane e Zaccardelli, 2014).

A supressividade pode ser direta, verificando-se um claro efeito causal entre o patogénico e o composto, ou indirecta. Podem ser exemplos de supressividade indirecta causada pela aplicação de compostos, o melhoramento do desenvolvimento vegetativo ou o favorecimento dos antagonistas nativos do solo (Pane e Zaccardelli, 2014).

1.2.2.1 Tipos de supressividade

De acordo com a natureza e atividade dos organismos envolvidos, são conhecidos dois tipos de supressividade, a geral e a específica (Figura 1.2).

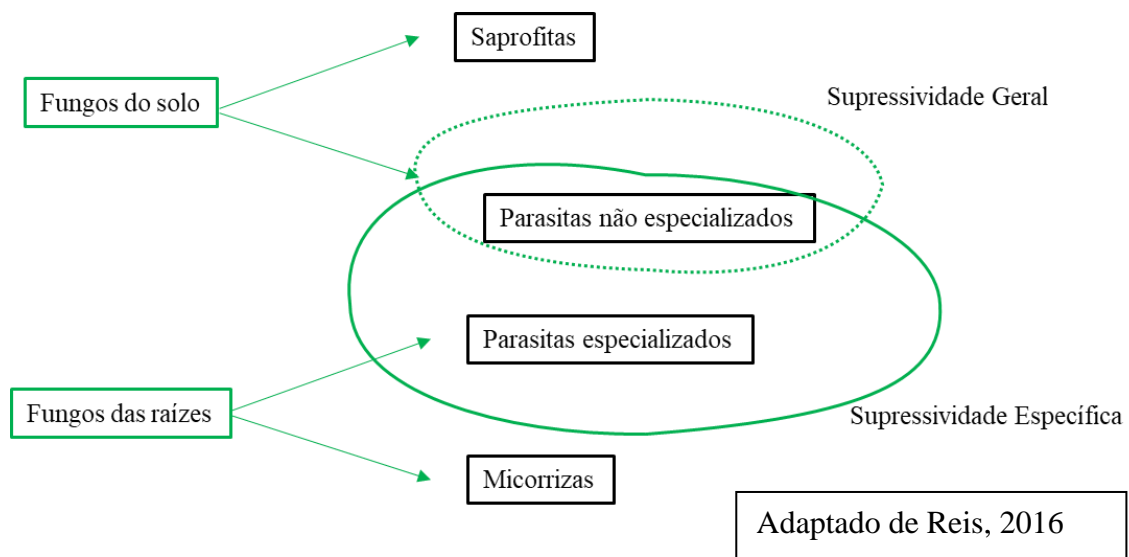


Figura 1.2: Supressividade geral e específica.

De acordo com a natureza, os agentes fitopagénicos, poderão ser mais facilmente controlados por modelos de supressividade geral ou específica (Pane e Zaccardelli, 2014). De qualquer modo, os solos supressivos deverão ter a combinação dos processos de supressividade geral e específica (Reis, 2016), apesar dos efeitos poderem ser diferentes de acordo com as condições edáficas, climáticas e práticas culturais. Os agentes de controlo biológico intervenientes na supressividade surgem após a fase termofílica do processo de compostagem (Jambhumkar et al., 2015).

Supressividade geral

A supressividade geral está relacionada com o elevado número de microrganismos presentes no meio e a sua atividade, inibindo o crescimento dos patogénicos (Pane e Zaccardelli, 2014; Jambhulkar et al, 2015; Reis, 2016). A biomassa e a atividade microbiana criam um ambiente competitivo, previnem a germinação dos esporos dos patogénicos e a infeção da planta.

Este tipo de supressividade baseia-se na atividade de diversos microrganismos que, ao competirem, reduzem o espaço e a disponibilidade de recursos para os patogénicos, caracterizados por uma reduzida capacidade de competição saprófita (Hoitink et al., 1993; Reis, 2016). Os microrganismos podem também produzir antibióticos reduzindo a sobrevivência e o crescimento dos patogénicos (Ceglie e Abdelrahman, 2014).

A supressividade geral é frequentemente estimulada pelo aumento do teor de matéria orgânica e de determinadas práticas culturais que estimulam a atividade microbiana nos solos (Reis, 2016), assim como a capacidade de a manter suficiente ao longo do tempo, através da lenta degradação de compostos complexos de carbono, particularmente os polímeros de hidratos de carbono (Hoitink et al. 1996).

Muitas vezes, a supressividade geral, pode não controlar completamente a doença, mas contribuir para diminuir a sua ocorrência e severidade dos patogénicos, reduzindo a necessidade de controlo químico (Whipps, 1997). No entanto, esta supressividade não é transferível entre solos (Jambhumkar et al., 2015).

Por exemplo, de acordo com Hoitink *et al.* (1993), os patogénicos *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. são suprimidos mediante o fenómeno de supressão geral.

Supressividade específica

Na supressividade específica, a ação de um ou de um grupo seletivo de microrganismos, designados por antagonistas, têm a capacidade de reduzir a sobrevivência dos patogénicos, competindo por nutrientes ou produzindo antibióticos ou enzimas (Pane e Zaccardelli, 2014; Reis, 2016). A supressividade específica é um processo mais qualitativo, devido aos efeitos específicos de grupos seletivos de antagonistas, perante o patogénico durante algumas fases do seu ciclo de vida (Cook e Baker, 1983).

Para alguns agentes de controlo biológico, diferentes mecanismos ou combinações de mecanismos podem estar envolvidos na supressão de diferentes doenças das plantas (Whipps, 2001), podendo incluir a competição por nutrientes, antibiose e indução de resistência. No caso do controlo biológico de *Rhizoctonia solani* pelos compostos, apenas um grupo limitado de microrganismos é capaz da sua erradicação (Hoitink *et al.*, 1997). *Trichoderma* spp., incluindo *T. hamatum* e *T. harzianum*, são os hiperparasitas predominantes em compostos preparados com resíduos lenhino-celulósicos (Hoitink *et al.*, 1997). *Trichoderma* spp. é um agente de controlo efetivo de *R. solani*, capaz de ser inoculada num composto, maturado ou não, sendo mais eficaz em combinação com algumas bactérias de controlo biológico (De Ceuster e Hoitink, 1999). Outros microrganismos, como *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium balustinum*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Penicillium* spp., *Gliocladium virens* têm sido identificados como agentes de biocontrolo em compostos (Hoitink *et al.*, 2005). No caso da supressividade específica, a transferência de supressividade é um processo fácil, sendo responsáveis espécies ou grupos específicos de microrganismos (Reis, 2016).

Apesar de os compostos se revelarem ambientalmente compatíveis e economicamente sustentáveis (Alfano *et al.*, 2011; Metha *et al.*, 2014), é ainda necessário mais conhecimento científico para que o mercado invista nestes produtos como meio de luta na proteção das culturas (Castaño *et al.*, 2013). Este trabalho insere-se precisamente numa estratégia do aumento do saber no que respeita ao papel dos compostos no controlo de doenças das plantas.

1.3. Compostagem com resíduos de quitina

O enriquecimento do material a compostar com resíduos que contenham quitina pode reforçar a capacidade supressiva dos compostos obtidos contra fungos, organismos fitopatogénicos com quitina na sua estrutura (Sharp *et al.*, 2013; Brzezinska *et al.*, 2014). Os microrganismos quitinolíticos, em maior abundância nestes compostos, têm demonstrado capacidade para suprimir diversos fitopatogénicos (Nandakumar *et al.*, 2001; Viswanashan e Samiyappan, 2001).

As enzimas têm um papel bastante importante na compostagem, sendo através da sua síntese que os microrganismos degradam a matéria orgânica (Hubbe, 2014). A quitina é o segundo polímero mais abundante, apenas ultrapassada pela celulose. É encontrada nos exosqueletos de crustáceos e de insetos (Brzezinska, 2014; Homthong et al., 2016), sendo o principal componente da parede celular dos fungos (Brzezinska, 2014).

A quitina é um polímero insolúvel em água e em diversos solventes orgânicos, resistente, flexível e biodegradável, representado pela fórmula química $(C_8H_{13}O_5N)_n$. Trata-se de um polissacarídeo formado por longas cadeias de N-acetilglucosamina, as quais se encontram unidas por ligações covalentes β (1,4) (Brzezinska, 2014), sendo um importante reservatório de carbono e de azoto (Parham e Deng, 2000) (Figura 1.3).

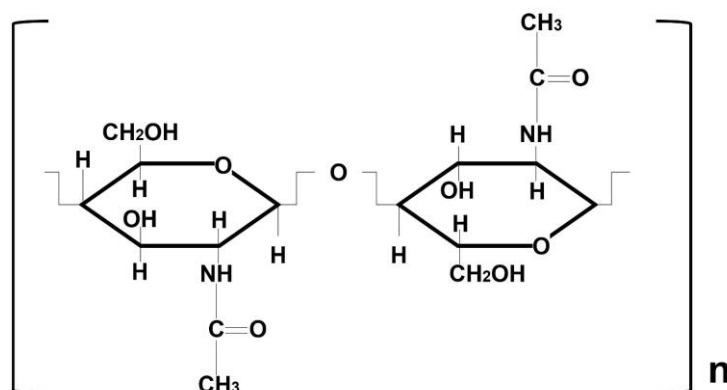


Figura 1.3: Esquema da estrutura química da quitina.

Alguns resíduos ricos em quitina, como os da indústria relacionada com os crustáceos, ainda não têm um destino apropriado, sendo importante encontrar uma solução para estes resíduos uma vez que poderão ser aplicados em diversas áreas, resolvendo problemas ambientais (Wang et al., 2008). A compostagem de resíduos com quitina promove o desenvolvimento no composto de microrganismos com capacidade para a degradar (Sharp, 2013) pela ação da quitinase (López-Mondéjar et al., 2012). Muitos microrganismos combatem fungos fitopatogénicos, sintetizando várias substâncias bioativas, por exemplo, as quitinases ou as glucanases (Brzezinska, 2014). As enzimas responsáveis pela degradação da quitina, estão também associadas ao controlo biológico de doenças das plantas causadas por fungos.

Na Natureza, os microrganismos quitinolíticos, são capazes de degradar a quitina, tanto em condições aeróbicas como em anaerobiose, podendo ser encontrados em diversos ambientes, fazendo parte importante dos ciclos do azoto e do carbono (McCreath e Gooday, 1992). Muitos actinomicetes são saprófitos capazes de degradar substâncias como a lenhina e a quitina. As bactérias dos géneros *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga* e *Pseudomonas* também são capazes de degradar a quitina, assim como os fungos *Aspergillus*, *Mucor* e *Mortierella* (Brzezinska et al., 2014).

O controlo de fungos fitopatogénicos com recurso a microrganismos, é uma estratégia amiga do ambiente que se tem vindo a focar no aproveitamento de enzimas sintetizadas por microrganismos, nomeadamente quitinases, as quais são capazes de catalizar a quitina, hidrolisando as ligações de β -1,4-glicosídicas entre N-acetil-D-glucosamina. A enzima exo- α -1,3-glucanase é capaz de se ligar às paredes celulares de vários fungos fitopatogénicos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinera*, *Coletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium aurantiogriseum* ou *Rhizoctonia solani* (Ait-Lahsen et al., 2001).

A enzima β -glucosaminidase pode desempenhar um papel importante nos ciclos do azoto e do carbono do solo (Parham e Deng, 2000). Esta enzima está também envolvida no controlo biológico de doenças do solo, apresentando atividade contra inúmeros fungos patogénicos das plantas, tendo sido associado à presença de *Trichoderma* spp. (Lorito et al., 1994).

Inbar e Chet (1995) observaram que N-acetil- β -D-glucosaminidase é a primeira quitinase formada quando *Trichoderma* spp. entra em contato com o hospedeiro, facilitando o micoparasitismo (Baek et al., 1999), tendo efeito no controlo de *Rhizoctonia solani* e de *Sclerotinia sclerotiorum* (Brunner et al. 2003). De acordo com Brzezinska (2014), a quitinase é eficaz na inibição de *R. solani*, *Marchophomia faseolina* e *Fusarium* spp.. Sabe-se, por exemplo, que *Trichoderma harzianum* produz duas N-acetilglucosaminidases, quatro endoquitinases e uma quitibiosidase (Haran, 1996). A aplicação de produtos contendo *Trichoderma* spp. possibilita o controlo biológico, como resultado da produção de enzimas como as quitinases ou glucanases (Brzezinska, 2014).

O emprego de microrganismos representa por isso uma alternativa aos produtos químicos sintéticos, apresentando uma maior segurança e menor impacto ambiental (Brzezinska, 2014).

1.4. Enriquecimento dos compostos com agentes de controlo biológico

A capacidade supressiva dos solos pode ser melhorada mediante o enriquecimento com antagonistas específicos (Reis 2016). Deste modo aumenta-se a eficácia do biocontrolo através do uso de compostos, permitindo melhores resultados do que com os não enriquecidos (Postma et al., 2003; Pugliese et al., 2013; Shen et al., 2013).

Vários autores referem que o enriquecimento de compostos com microrganismos pode ter influência no controlo de determinadas doenças. Por exemplo, Fu et al. (2016), refere que o enriquecimento com *Bacillus* spp. pode contribuir para a redução de *Fusarium* em banana, com aumento do crescimento da planta.

Um dos fungos mais frequentemente usados no enriquecimento dos compostos é *Trichoderma* spp. (Blaya, 2013; De Corato, 2020), eficaz contra vários patogénicos das plantas como *Rhizoctonia solani* (Hoitink et al., 2001; Trillas et al., 2006; Val-Moraes, 2015), *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002), *Colletotrichum orbiculare* (Zhang et al., 1998), *Phytophthora capsici* (Segarra et al., 2013) e patogénicos das folhas, como *Botrytis cinerea* (Segarra et al., 2007).

No entanto, é necessário mais conhecimento acerca do efeito do enriquecimento de compostos com antagonistas no controlo de doenças (Pugliese et al., 2011), objetivo a que este trabalho pretende responder.

1.4.1. *Trichoderma* spp.

Várias estirpes de *Trichoderma* tem-se mostrado eficazes contra diversas doenças de culturas agrícolas (Brunner et al., 2003; Trillas et al., 2006, Rossi e Patteri, 2009, Huang et al., 2012, Coelho et al., 2016, Hirpara et al., 2016).

Trichoderma spp. é um género de fungos que têm sido definidos como fungos do solo, não patogénicos, simbiotes, capazes de colonizar as raízes de plantas por mecanismos idênticos aos fungos micorrízicos e produzir compostos químicos que estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa da planta (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004). Algumas estirpes oferecem vantagens, como a rápida colonização da rizosfera dentro das comunidades microbianas estáveis e pré-existentes; controlo da microbiota patogénica e melhoria do estado sanitário das plantas, assim como do crescimento das raízes (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2013).

São conhecidas diversas espécies de *Trichoderma* que atuam como agentes de controle biológico, reduzindo o crescimento de diferentes fitopatogênicos. O método pelo qual atuam pode variar consoante a espécie do antagonista e do patogênico. Por exemplo, *T. harzianum* causa a lise do micélio de *S. rolfsii* e de *R. solani* (Elac et al., 1979). Numa primeira fase, quando o antagonista deteta outro fungo em crescimento na sua direção sintetiza enzimas, incluindo proteases, glucanases e quitinases, que degradam a parede celular do patogênico, permitindo a penetração do seu micélio (Harman, 2004; Viterbo et al., 2002). Seguidamente, *Trichoderma* enrola-se em torno do hospedeiro, acabando por matá-lo (Harman, 2004). A adesão de *Trichoderma* ao hospedeiro é feita pela ligação de hidratos de carbono da parede celular de *Trichoderma* às lectinas do fungo-alvo, sintetizando enzimas que degradem a sua parede celular, assim como antibióticos. Posteriormente, as hifas de *Trichoderma* penetram no fungo hospedeiro. A supressividade dos compostos também pode ser devida a fenómenos de hiperparasitismo (De Corato, 2020). Este processo é normalmente observado em fitopatogênicos com propágulos superiores a 200 µm de diâmetro, como *R. solani* e *S. rolfsii*. Nestes processos são descritas interações sinérgicas entre enzimas que degradam as paredes celulares dos fungos e os compostos antifúngicos que inibem a germinação dos esporos. O hiperparasitismo é fortemente afetado pelo grau de decomposição da matéria orgânica.

1.5. Armazenamento dos compostos

A capacidade supressiva dos compostos é função do grau de maturação e estabilidade da matéria orgânica. A capacidade de controle dos agentes fitopatogênicos pode ser afetado pela idade do composto, devido a alterações nas populações microbianas e na sua atividade, assim como nas suas características físico-químicas (Hoitink et al., 2001; Avilés et al., 2011; Jambhulkar et al., 2015; Martin, 2015).

Durante o armazenamento, os compostos sofrem alteração nas suas características físico-químicas e microbiológicas. O teor de azoto e as populações de microrganismos são os fatores que mais frequentemente sofrem alterações (Al-Bataina, 2016), tendo impacto na sua capacidade supressiva, sendo necessário determinar o período durante o qual os compostos têm efeito no controle de doenças das plantas.

De acordo com Hoitink et al. (2001), nos compostos imaturos não se verifica supressividade contra *Pythium aphanidermatum* em pepino, tal como *Trichoderma* spp. não exerce controlo biológico de *R. solani*. Nestes casos, a síntese de enzimas líticas, envolvidas no parasitismo dos patogénicos por *Trichoderma*, é reprimida na matéria orgânica fresca devido às elevadas concentrações de glucose. Quando os teores de glucose decrescem nos compostos, os esclerócios de *R. solani* são destruídos, prevalecendo o controlo biológico.

Quando a matéria orgânica está excessivamente estabilizada, o decréscimo da atividade microbiana terá impacto na redução do controlo biológico (Jambhulkar et al., 2015).

A manutenção da capacidade supressiva de um composto ao longo de tempo é fundamental, apesar de ainda não ser claro a influência da duração do armazenamento dos compostos nesta capacidade (Saadi et al., 2010, Reis e Coelho, 2013). Este trabalho pretende também responder às lacunas existentes na bibliografia acerca deste efeito, nomeadamente quando os compostos são ou não enriquecidos em antagonistas.

1.6. Importância dos relvados

Os relvados são formações herbáceas com um interesse particular em diversas atividades desportivas, pois constituem um piso muito favorável à sua realização. Na região do Algarve, a prática desportiva de golfe é uma importante atividade económica, com rendimentos diretos e indiretos, tendo esta região recebido várias vezes o título de melhor destino de golfe atribuído pela IAGTO (*International Association of Golf Tour Operators*) (Guerrero et al., 2008; Coelho et al., 2018). Nesta região de Portugal, existem 37 campos de golfe, correspondente a 43 percursos.

Os relvados são bastante suscetíveis a doenças foliares e do solo (Barker, 2001; Saharan e Mehta, 2008), responsáveis por grandes encargos económicos, nomeadamente com a compra de pesticidas. A aplicação de compostos, para além de reduzir estes gastos, leva também à redução da aplicação de adubos.

Nos relvados, sendo normalmente monoculturas, a microbiota dos solos é reduzida e alterada, devido à aplicação de pesticidas sintéticos, aumentando a incidência de doenças nas plantas (Xiong et al., 2016). De entre os fungos que causam doenças nos relvados destacam-se *Claviceps* spp. e *Rhizoctonia solani* (Guerrero et al., 2008), estando

também sujeitos ao aparecimento de novas doenças, como o caso de *Curvularia trifolii* (Coelho et al., 2020), para as quais é necessário encontrar uma solução sustentável. A adequada manutenção dos relvados é fundamental, uma vez que a sua má qualidade causa problemas estéticos e de inadequada capacidade para o jogo. No entanto, a gestão sustentável é imprescindível, reduzindo-se a utilização de água, energia, fertilizantes e pesticidas sintéticos, os quais causam graves problemas, nomeadamente a resistências aos fungicidas, alterações no ecossistema e riscos para a saúde humana e animal (Johnson e Atallah, 2006). A utilização de compostos orgânicos pode contribuir para reduzir os desequilíbrios nos ecossistemas dos campos de golfe, aumentando o seu estado nutritivo e favorecendo o controlo biológico das doenças de forma mais sustentável.

1.7. A cultura de estévia

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) pertence à família das Asteráceas, com origem na América do Sul. É uma cultura herbácea de ciclo perene, ainda pouco estudada, mas que apresenta grande potencial de desenvolvimento na Europa.

Nas folhas de estévia, a concentração dos glicosídeos de esteviol é elevada, destacando-se o esteviosídeo, rebaudiosídeo A e C, e dulcosídeo A (Starrat et al. 2002). Estas características conferem à cultura uma grande importância na indústria alimentar, como fornecedor de edulcorante, podendo ser um substituto dos adoçantes sintéticos (Santos et al., 2000). A utilização de estévia pode ajudar a resolver alguns problemas de saúde como a diabetes e a obesidade (Chowdhury et al., 2022).

A estévia é pouco suscetível a ataques de insetos, mas é atacada por alguns fungos fitopatogénicos, nomeadamente, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*, causando grandes perdas de produção (Ramesh et al., 2006; Yadav et al., 2011). Para a sustentabilidade da cultura é fundamental encontrar soluções para minimizar os prejuízos causados pelas doenças. Apesar de não ser uma cultura edaficamente exigente (Ramesh et al., 2006), a aplicação de compostos ao solo, poderá aumentar a produtividade, pelo aumento de nutrientes disponíveis, assim como contribuir para a prevenção ou tratamento de doenças.

1.8. Hipótese e objetivos

O caráter inovador deste trabalho consiste na produção de compostos a partir de misturas de resíduos agroindustriais de diversas origens, entre os quais se encontram resíduos orgânicos ricos em quitina, com vista ao desenvolvimento de populações de antagonistas que possam contribuir para o controlo biológico de doenças do solo. Pretende-se, neste trabalho, aprofundar o conhecimento sobre a utilização destes compostos.

Sendo a agricultura uma atividade vital para a economia do país, é fundamental encontrar alternativas sustentáveis de combate às doenças do solo, as quais causam grandes prejuízos, minimizando assim o impacto ambiental da atividade.

Neste trabalho pretende-se estudar o efeito de resíduos ricos em quitina, provenientes da produção de cogumelos, nas características físico-químicas dos compostos obtidos a partir de misturas de outros resíduos agroindustriais e na diversidade dos agentes de controlo biológico isolados.

Em ensaios *in vitro*, recorrendo a testes de inibição de confronto direto, pretende-se testar os fungos isolados contra os fitopatogénicos *Clariireedia* spp., *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani*, frequentes em relvados e estévia. Por técnicas de biologia molecular serão identificados aqueles que mostrarem maior capacidade para inibir o crescimento dos patogénicos.

Com o objetivo de avaliar a capacidade supressiva dos compostos obtidos, estes serão testados *in vivo*, no controlo de doenças provocadas por *Clariireedia* spp., *S. rolfii* e *R. solani*, bastante importante em agricultura.

Será testado o efeito do enriquecimento dos compostos, com o fungo antagonista que apresentar melhores resultados nos testes *in vitro* para os três patogénicos em estudo. Os compostos, com e sem enriquecimento, serão testados em ensaios *in vivo*, em *Agrostis stolonifera* e estévia, contra os patogénicos em estudo.

É ainda objetivo deste trabalho, determinar o período durante o qual os compostos (com e sem enriquecimento) mantêm a capacidade supressiva, sendo testados *in vivo* após 0, 6 e 12 meses de armazenamento.

A Figura 1.4 esquematiza os objetivos pretendidos neste trabalho.

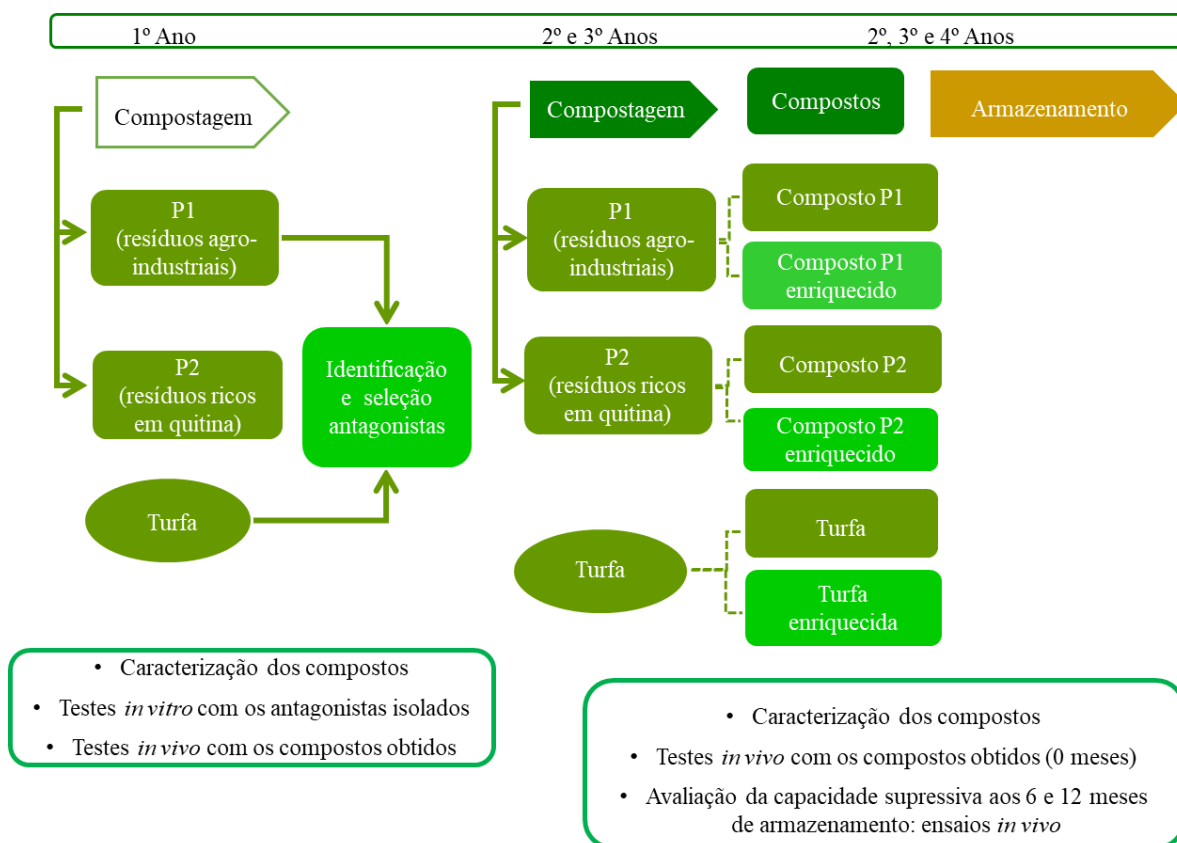


Figura 1.4: Objetivos do trabalho.

1.9. Referências

- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., Cruz, J., Monte, E., Llobell, A., 2001. An antifungal exo-a 1,3 glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 67, 5833–5839. doi: 10.1128/AEM.67.12.5833-5839.2001
- Al-Bataina, B.B., Young, T.M., Ranieri, E., 2016. Effects of compost age on the release of nutrients. *Int Soil Water Conserv Res* 4, 230-236. doi: 10.1016/j.iswcr.2016.07.003
- Alfano, G., Lustrato, G., Lima, G., Vitullo, D., Ranalli, G., 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biol. Control* 58, 199-207.
- Avilés M., Borrero, C., Trillas, M.I., 2011. Review on compost as na inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. *Dyn Soil Dyn Plants* 5, 1-11.
- Baek, J., Howell, C.R., Kenerley, C.M., 1999. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 35, 41-50
- Barker, A.V., 2001. Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), *Compost utilization in horticultural cropping systems*. Lewis Publications, Boca Raton, pp.201-225
- Batista, J.G., Batista, E.R.B., 2007. *Compostagem – Utilização de compostos em Horticultura*. Universidade dos Açores. 251 pp.

- Beata-Hall, L., Sàágua, M. C., Bartolomeu, M. L., Anselmo, A. M., Rosa, M. F., 2002. A compostagem como processo de valorização dos resíduos produzidos na extracção de azeite em continuo. *Biotecnologia Ambiental. Boletim de Biotecnologia* 72, 31-37.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Códon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7, 249-260. doi: 10.2436/im.v7i4.9480
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Intrigliolo, F., Pascual, A., 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutriactive and biocontrol effects. *Bioresour. Technol.* 99 (18), 8722-8728. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.019
- Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J.A., Ros, M., 2013. Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt. *Pestic Biochem Phys* 107, 112-119. Doi: 10.1016/j.pestbp.2013.06.001
- Bohem, M.J., Hoitink, H.A.J., 1992. Sustenance of microbial activity and severity of Pythium root rot Poinsettia. *Phytopathol* 82, 259-264.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42, 136-144. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.10.012
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala, F., 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *J Plant Pathol* 89 (3), 311-324.
- Borrero, C., Trillas, I., Avilés, M., 2009. Carnation *Fusarium* wilt suppression in four composts. *Eur J Plant Pathol* 123, 425-433. doi 10.1007/s10658-008-9380-4
- Brito, L. M., 2005. Manual de Compostagem. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. Instituto Politécnico de Viana do Castelo.
- Brunner, K., Peterbauer, C.K., Mach, R.L., Lorito, M., Zeilinger, S., Kubicek, C.P., 2003. The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43, 289-295. doi: 10.1007/s00294-003-0399-y
- Brzezinska, M.S., Jankiewicz, U., Burkowska, A. and Walczak, M., 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. *Curr Microbiol.* 68 (1), 71-81 [http://doi.org/ 10.1007/s00284-013-0440-4](http://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4)
- Castaño, R., Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés M., 2013. Selection of biological control agents against tomato *Fusarium* wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media. *BioControl* 58, 105-116. Doi: 10.1007/s10526-012-9465-z
- Castaño, R., Borrero, C., Avilés, M., 2011. Organic matter fractions by SP-MAS 13C NMR and microbial communities involved in the suppression of *Fusarium* wilt in organic growth media. *Biol. Control* 58(3), 286-293. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.011
- Ceclie, F.G., Abdelrahman, H., 2014. Ecological Intensification through Nutrients Recycling and Composting in Organic Farming. In: Maheshwari, D.K. (Ed.). *Composting for Sustainable Agriculture*. Springer. pp.1-22.

- Chowdhury, A.I., Alam, M.R., Raihan, M.M., Rahman, T., Islam, S., Halima, O. 2022. Effect of stevia leaves (*Stevia rebaudiana* Bertoni) on diabetes: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Food Sci Nutr*, 2868-2878. doi:10.1002/fsn3.2904
- Coelho, L., Borrero, C., Bueno-Pallero, F., Guerrero, C., Fonseca, F., Reis, M., Avilés, M., Dionísio, L., 2019. First report of *Curvularia trifolii* causing Curvularia blight in *Agrostis stolonifera* in South of Portugal. *Plant Dis*. doi: 10.1094/PDIS-03-19-0517-PDN
- Coelho, L., Dionísio, L., Bueno, F., Reis, M., Duarte, J., Guerrero, C., 2016. *Trichoderma gamsii* as a biological control agent of turfgrass diseases. In: Guerrero, C., editor, Book of Abstracts of the 5th European Turfgrass Society Conference – Turfgrass – Towards Sustainability and Perfection for Aesthetic, recreational and Sports, Albufeira, Portugal, pp. 145-146
- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M., 2018. Controlo de *Sclerotinia homoeocarpa* em relva com compostos de resíduos orgânicos. *Revista de Ciências Agrárias* 41 (spe), 116-124. <https://doi.org/10.19084/rca.17076>
- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M., 2020. Use of organic composts to suppress turfgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. *Biol. Control* 141, 104154 doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104154
- Coelho, L., Osório, J., Beltrão, J., Reis, M., 2019. Organic compost effects on *Stevia rebaudiana* weed control and on soil properties in the Mediterranean region. *Revista de Ciências Agrárias* 42 (1), 109-121. doi: 10.19084/RCA18281
- Coelho, L., Reis, M., Bueno-Pallero, F., Guerrero, C., Gonçalves, M.A., 2021. Compost application in the soil: effects in the yield and in nematodes control in carrot crop. *Acta Hort* 1305. doi 10.17660/ActaHortic.2021.1305.23
- Cook, J.R., Baker, K.R., 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul, MN, American Phytopathological Society.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use a sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 34, 467-476.
- Day, M., Shaw, K., 2001. Biological, Chemical and Physical processes of composting. In: *Compost utilization in horticultural cropping systems*, P.J. Stoffella e B.A. Kahn eds. (Lewis Publications, Boca Raton), pp 18-50.
- De Ceuster, T.J.J., Hoitink., H.A.J., 1999. Using Compost to Control Plant Disease. *BioCycle* 40 (6), 61-64.
- De Corato, U., 2020. Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. *Rhizosphere*. 13, 100192. Doi:10.1016/j.rhisph.2020.100192
- Elad, Y., Chet, I., Katan, J., 1980. *Trichoderma harzianum*: A Biological Control Agent Effective Against *Sclerotium rolfisii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70, 119-121

- Fu, L., Penton, C.R., Ruan, Y.Z., Shen, Z.Z., Xue, C., Li, R., Shen, Q. R., 2017. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. *Soil Biol Biochem* 104, 39–48.
- Golueke, C.G. 1972. *Composting: A Study of the Process and its Principles*. Emmaus, Pennsylvania, USA: Rodale Press.
- Guerrero, C., Vitoriano, J., Neto, L., Dionísio, L., 2008. Control of fungi diseases on turfgrass using *Trichoderma harzianum*. *Wseas transactions on Environment and Development* 9 (4), 736-745.
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I., 1996. Molecular mechanisms of lysis involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142, 2321-2331.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2, 43 – 56. doi: 10.1038/nrmicro797.
- Hermosa, R., Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S., 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiol* 16, 69-80. doi: 10.2436 / 20.1501.01.181
- Hirpara, D.G., Gajera, H.P., Bhimani, R.D., Golakiya, B.A., 2016. The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Curr Genet*, 62, 619-641. doi: 10.1007/s00294-016-0567-5
- Hoitink, H., Boehm, M., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol* 37, 427-446.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., Hadar, Y., 1993. Mechanisms of Suppression of Soilborne plant pathogens in compost-amended substrates. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.), *Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects*. The Ohio State University, Ohio, pp.601-621.
- Hoitink, H.A.J., Fahy, P.C., 1986. Basis for control of soilborne plant pathogens with composts. *Annu Rev Phytopathol*. 24, 93-114.
- Hoitink, H.A.J., Inbar, Y., Boehm M.J., 1991. Status of composted-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Dis* 75, 869-873. doi: 10.1094/PD-75-0869.
- Hoitink, H.A.J., Krause, M.S., Han, Y., 2001. Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.). *Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 263–274.
- Hoitink, H.A.J., Stone, A.G., Han, D.Y., 1997. Supresión of plant disease by composts. *Hort Science* 32, 184-187.
- Homthong, M., Kubera, A., Srihuttagam, M., Hongtrakul, V., 2016. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp.. *Agric. Nat. Resour.* 50, 232-242. doi: 10.1016/j.anres.2015.09.005

- Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., Shen, Q., 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiol Res* 167, 135-143. Doi: 10.1016/j.micres.2011.06.002
- Inbar, J., Chet, I., 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141 (11), 2823-2829. Doi: 10.1099/13500872-141-11-2823
- Jambhulkar, P.P., Sharma, M., Jakshman, D., Sharma, P., 2015. Natural Mechanisms of Soil Suppressiveness Against Diseases Caused by *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, and *Phytophthora*. In: M.K. Meghvansi and A. Varma, editor(s), *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Springer, p.95-123.
- Johnson, D.A., Atallah, Z.K., 2006. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. *Plant Dis* 90, 755-758. doi: org/10.1094/PD-90-0755
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, J., 2019. Mode of Action Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 1-19. doi: 10.3389/fpls.2019.00845
- Lewis, J.A., Roberts, D.P., Hollenbeck, M.D., 1991. Introduction of cytoplasmic leakage from *Rhizoctonia solani* hyphae by *Gliocladium virens* and partial characterization of a leakage factor. *Biocontrol Sci Technol* 1, 21-29.
- Liu, L., Sun, C., He, X., Liu, X., Wu, H., Liu, M., Tang, C., Zhang, Y., 2016. The secondary compost products enhances soil suppressive capacity against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Soil Biol.* 75, 70-78. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.04.005
- López-Mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M. and Pascual, J.A., 2012. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and greenhouse nursery experiments. *Pestic Biochem Physiol.* 103, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.02.001>
- Lorito, M., Hayes, C.K., Dipietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E., 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an *N*-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology.* 84, 398-405.
- Machado, D.F.M., Parzianello, F.R., Silva, A.C.F., Antonioli, Z.I., 2012. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o Bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 26, 274-288.
- Lucas, J. A. 1998. *Plant Pathology and Plant pathogens*, 3rd ed. Osney Mead, Oxford. Blackwell Science, Ltd. 247 pp.
- Martin, F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* 41, 325-350.
- McCreath K.J., Gooday G.W., 1992. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. *J Microbiol Meth* 14, 229-237
- Mehta, C.M., Palni, U., Franke-Whittle, I.H., Sharma, A.K., 2014. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Manage.* 34, 607-622. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.012>

- Mo, A.S., Qiu, Z.Q., He, Q., Wu, H.Y., Zhou, X.B., 2016. Effect of continuous monocropping of tomato on soil microorganism and microbial biomass carbon. *Commun Soil Sci Plant Anal* 47 (9), 1069-1077. doi: 10.1080/00103624.2016.1165832
- Nandakumar, R., Babu, S., Raguchander, T., Samiyappan, R., Viswanathan, R., 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 33, 603-612 doi: 10.1016/S0038-0717(00)00202-9
- Noble, R., Coventry, E., 2005. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: A review. *Biocontrol Sci Technol* 15 (1), 3-20. Doi: 10.1080/09583150400015904
- Ntougias, S., Papadopoulou, K.K., Zervakis, G.I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., 2008. Suppression of soil-borne pathogens of tomato by composts derived from agro-industrial wastes abundant in Mediterranean regions. *Biol. Fertil. Soil* 44, 1081-1090. doi: 10.1007/s00374-008-0295-1
- O'Sullivan, D. & O'Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev* 56, 662-676.
- Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., Bonanomi, G., 2011. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biol. Control* 56, 115-124. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.002
- Pane, C., Zaccardelli, M., 2014. Principles of Compost-based Plant Diseases Control and Innovative New Developments. In: Maheshwari, D.K. (Ed.). *Composting for Sustainable Agriculture*. Springer. pp.151-171.
- Pal, K.K., McSpadden, G.B., 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. APSnet. 1-25. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Parham, J.A., Deng, S.P., 2000. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biol Biochem* 32, 1183-1190. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00034-1
- Postma, J., Montanari, M., van den Boogert, P.H.J.F., 2003. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *Eur J Soil Biol* 39, 157-163. doi:10.1016/S1164-5563(03)00031-1
- Pugliese, M., Liu, B.P., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *J Plant Dis Protect* 115 (5), 220-228. doi: 10.1007/BF03356267
- Pugliese, M., Liu, B., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2011. Microbial enrichment of compost with biological control agents to enhance suppressiveness to four soil-borne diseases in greenhouse. *J Plant Dis Protect* 118 (2), 45-50. Doi: 10.1007/BF03356380
- Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N., 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertolini]: A Comprehensive Review. *Adv Agron* 89, 137-177.
- Regulamento (UE) 2018/848 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de maio de 2018 relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o regulamento (CE) nº 834/2007 do Conselho.

- Reis, M., 1997. Compostagem e caracterização de resíduos vegetais para utilização como substratos hortícolas, Dissertação apresentada na Universidade do Algarve, para efeito de prestação de Provas de Doutoramento. Faro.
- Reis, M., 2016. Os compostos no controlo das doenças das plantas. *Revista de Ciências Agrárias* 39 (1), 25-35. doi:10.19084/RCA15111
- Reis, M., Coelho, L., 2013. Controlling *Rhizoctonia solani* in Cucumber Using Compost of Agro-industrial Residues. *Acta Hort* 1013, 499-505.
- Rossi, V., Patteri, E., 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. *Biol. Control* 49, 52-57.
- Saadi, I., Laor, Y., Medina, S., Krassnovsky, A., Raviv, M., 2010. Compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* was not reduced after one-year storage under various moisture and temperature conditions. *Soil Biol Biochem* 42, 626-634.
- Saharan, G.S., Mehta, N., 2008. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer Science Business.
- Santos, J., 2001. *Fertilização & Ambiente, Reciclagem Agro-florestal de Resíduos e Efluentes*. Edições Europa – América. Lisboa.
- Santos, G., Guerrero C., Reis M., Migue, G., Kienle, U., 2000. Stevioside and rebaudioside A foliar leaf content changes in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni as a response to the potassium fertilisation. *Proceedings of the 19e Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits*. 30 August-2 September, Promotion des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (APPAM). Digne les Bains, França.
- Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., Trillas, I., 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellu* strain T34. *Phytopathol Mediterr*, 52 (1), 77-83.
- Segarra, G., Casanova, E., Borrero, C., Avilés, M., Trillas, M., 2007. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 117, 393-402. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-11242
- Sharp, R. G., 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3, 757-793.
- Shen, Z., Zhong, S., Wang, Y., Wang, B., Mei, X., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2013. Induced soil microbial suppression of banana fusarium wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. *Eur J Soil Biol* 57, 1-8.
- St. Martin, C.C.G., Brathwaite, R.A.I., 2012. Compost and compost tea: Principles and prospects as substrates and soil borne disease management strategies in soil-less vegetable production. *J Biol Agric Hortic*, 28, 1-33. doi: 10.1080/01448765.2012.671516
- Starratt, A.N., Kirby, C.W., Pocs, R., Brandle, J.E., 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 59, 367 – 370.

- Steger, K., Jarvis, A., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I., 2007. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Res Microbiol* 158, 617-624.
- Stentiford, E. I., 1993. Diversity of composting systems. In: Hoiting, H., Keener, H., 1993. *Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects*. The Ohio State University. Ohio. pp. 95-110.
- Strange, R.N., Scott, P.R., 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annu rev phytopathol* 43 (1), 83-116. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839
- Suárez- Estrella, F., Arcos-Nievas, M.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Moreno, J., 2013. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol Control*. 62, 509-515. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.008
- Termorshuizen, A.J., van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Rämert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmora-Nahum, S., 2006. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biol Biochem* 38 (8), 2461-2477. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.03.002
- Torres, M., Fernandez, R., Fernandez, P., 2003. Utilización de compost de lodos de depuradora en olivar. *Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía*. Sevilla.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol Control* 39, 32-38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.05.007
- Varenes, A., 2003. *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora. Lisboa. 488 pp.
- Val-Moraes, S.P., 2015. Suppressiveness in Different Soils for *Rhizoctonia solani*. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.). *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Springer, pp. 175-184.
- Viswanathan, R., Samiyappan, R., 2001. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in sugarcane. *Microbiol. Res.* 155, 309-314. doi: 10.1016/S0944-5013(01)80009-4
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L., Chet, I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 549-556. doi: 10.1023/a:1020553421740.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52, 487-511. Doi: 10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.
- Xiong, W., Zhao, Q., Xue, C., Xun, W., Zhao, J., Wu, H., Li, R., Shen, Q., 2016. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla fusarium wilt disease. *Front Microbial*. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00117

Capítulo 1

Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. A Review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Can J Plant Sci, 91 (1), 1-27 doi: 10.4141/cjps10086

https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides_en (accedido a 11/08/2022)

2. CAPÍTULO 2

Efeito da quitina no processo de compostagem de resíduos orgânicos: características do composto e ocorrência de agentes de controle biológico

Este capítulo está publicado em:

Coelho, L., Bueno-Pallero, F., Guerrero, C., Dionísio, L., Reis, M. 2021. **Effect of chitin from mushroom waste in the composting process of organic residues: compost characteristics and occurrence of biological control agents**. Acta Hort. 1305, 155-162. Doi: [10.17660/ActaHortic.2021.1305.22](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1305.22)

Apresentado em painel em III International Symposium on Growing Media, Composting and Substrate Analysis, Milan, Italy. Livro de resumos, Pag. 99.

2.1. Resumo

A compostagem é um processo biológico que permite a transformação e valorização dos resíduos orgânicos em compostos, que podem ser aplicados na agricultura com imensos benefícios. A quitina, presente em alguns resíduos orgânicos, permite aumentar a diversidade microbiana, aumentando a capacidade supressiva dos compostos obtidos, responsável pelo controlo biológico de doenças das plantas. Obtiveram-se dois compostos, P1 e P2, em pilhas com reviramento manual. As misturas compostadas incluíram resíduos de laranja, bagaço de uva e aparas de relva para P1 (0,9:1:1,1 v/v), e ainda resíduos de produção de cogumelos para P2 (1,8:1,5:0,2:0,5 v/v). Misturas idênticas destes resíduos orgânicos foram compostadas três vezes, com um intervalo de doze meses entre si. Os parâmetros físicos, químicos e biológicos foram monitorizados para controlar os processos de compostagem. A atividade microbiana foi comparada, nas principais etapas da compostagem, por enumeração de fungos, bactérias aeróbias, actinomicetos e microrganismos quitinolíticos. Para estudar a capacidade antagonista dos microrganismos presentes nos compostos, isolaram-se os fungos de ambos os compostos a partir de amostras colhidas após a fase termofílica (as amostras foram colhidas a cada duas semanas) e no final dos processos de compostagem. Os isolados foram identificados através das suas características morfológicas (macro e microbiológicas) e por técnicas de biologia molecular. Os compostos obtidos apresentaram pH neutro, ligeiramente superior em P2; o teor de azoto foi ligeiramente superior em P1. O composto P2 apresentou maiores valores de matéria orgânica, populações microbianas mais elevadas e atividade enzimática superior. No total, foram isoladas 190 espécies de fungos em ambos os compostos. Destas, 31 espécies apresentaram capacidade antagonista, sendo 14 (14/31) isoladas de P1 e 17 (17/31) de P2. A presença de resíduos ricos em quitina na mistura compostada terá contribuído para a maior diversidade microbiológica e atividade enzimática no composto P2.

Palavras-chaves: Potencial antagonista, Fungos, Cogumelos, Supressividade, *Trichoderma* spp.

2.2. Introdução

A compostagem é uma técnica de gestão, tratamento e valorização de resíduos orgânicos, reduzindo o seu impacto negativo no ambiente e dando origem a produtos, designados por compostos, com aplicações agrícolas relevantes (Barker, 2001), utilizados principalmente como fertilizantes ou corretivos do solo, e como substratos hortícolas. O uso de compostos orgânicos para controlar doenças do solo, responsáveis por grandes perdas económicas na agricultura (Mehta et al., 2014), foi sugerido pela primeira vez na década de 1970 (Hoitink e Fahy, 1986). Desde então, o uso de compostos tem sido relatado e desenvolvido para o controlo biológico de agentes fitopatogénicos (Hoitink e Fahy, 1986; Borrero et al., 2009; Liu et al., 2016). A presença de quitina nos resíduos compostados promove o desenvolvimento de organismos quitinolíticos, que podem decompor a quitina em condições aeróbicas e anaeróbicas, pela ação da quitinase. Resíduos de fungos, como os da produção de cogumelos, podem ser uma fonte de quitina (López-Mondéjar et al., 2012), pois podem apresentar valores da ordem de $57,75 \text{ mg g}^{-1}$ de quitina (López-Mondéjar et al., 2012). Espera-se que, os compostos enriquecidos com quitina, tenham um potencial supressivo reforçado, causando a lise de organismos fitopatogénicos com quitina na sua estrutura, responsáveis por doenças dos solos (Sharp, 2013; Brzezinska et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da quitina, de resíduos da produção de cogumelos, nas características físico-químicas dos compostos de misturas de resíduos agroindustriais e na diversidade dos agentes de controlo biológico presentes.

2.3. Material e métodos

2.3.1. Processo de compostagem

Através da compostagem de resíduos agroindustriais, com reviramento manual, foram obtidos dois compostos, denominados P1 e P2. O composto P1 resultou de uma mistura de resíduos de laranja, proveniente de uma associação de produtores da região; bagaço de uva, com origem numa adega, e aparas de relva de um campo de golfe (0,9:1:1,1, v/v). O composto P2 foi obtido com as mesmas matérias-primas, às quais foram adicionados resíduos de produção de cogumelos (*Shiitake*) (1,8:1,5:0,2:0,5, v/v). As pilhas de compostagem, com um volume inicial de 1 m^3 de cada uma das misturas, foram colocadas

Capítulo 2

dentro de um cilindro de rede metálica com malha quadrada de 5 cm, protegida com rede plástica de sombreamento, para suporte das misturas, impedindo que estas caíssem para o exterior. O volume de cada componente das misturas iniciais foi calculado de modo a obter uma relação C/N inicial adequada e semelhante. As pilhas foram cobertas com geotêxtil (17 g m^{-2}), para ajudar a reduzir as perdas de calor do material sem comprometer o arejamento natural, e mantidas sob um abrigo para proteção da chuva e do sol direto. A compostagem destas misturas foi repetida três vezes, para avaliação da qualidade do composto.

Foram monitorizadas todas as fases do processo de compostagem. A temperatura foi registada diariamente em quatro locais diferentes das pilhas, com uma sonda portátil (TP 62, Umwelt Elektronik GmbH & Co.KG, Alemanha) que registou a temperatura em 6 pontos diferentes, distanciados de 20 cm ao longo da sonda, com 1 m de comprimento. Periodicamente recolheram-se amostras das misturas para análise. O pH foi determinado em extrato aquoso (1:2 p/v) com um potenciómetro (Crison Micro pH, 2001), e a condutividade elétrica foi medida no mesmo extrato, após filtração, com um medidor de condutividade (Crison 522). Determinaram-se os teores de matéria orgânica e minerais (Ramos et al., 1987), matéria seca (Martinez, 1992) e azoto Kjeldhal, e calculou-se a relação C/N, com base no teor de carbono estimado na matéria orgânica (58 %) e no de azoto. O índice de Zucconi (Zucconi et al., 1985) dos compostos, que indica a ausência de substâncias fitotóxicas, foi avaliado após o teste de germinação de *Lepidium sativum* L.. Valores do índice de Zucconi abaixo de 65-70% indicam a possível presença de substâncias tóxicas. O teor de quitina dos resíduos da produção de cogumelos foi determinado de acordo com Nitschke et al. (2011).

Segundo Suárez-Estrella et al. (2013), foram consideradas, com base na variação de temperatura, cinco etapas de compostagem, (Quadro 2.1).

Quadro 2.1: Fases da compostagem e o dia de início de cada fase.

Fase	Designação	Dias de compostagem
Início	RM	0
Termofílica	TP	7
Arrefecimento	CP	70
Maturação	MP	98
Final	FP	112

RM, material no início da compostagem; TP, fase termofílica; CP fase de arrefecimento; MP, fase de maturação; FP, fase final, nas compostagens realizadas.

Em cada fase de compostagem, foram realizados testes microbiológicos para enumeração de microrganismos. Prepararam-se suspensões de amostras de composto em solução salina tamponada com fosfato, com as quais se prepararam diluições decimais em série, e efectuou-se a sua inoculação em meios de cultura adequados para avaliar o crescimento de microrganismos. Os fungos foram cultivados em placas de “Potato Dextrose Agar” (PDA) (Biokar, França) e incubados a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas; bactérias aeróbicas totais foram cultivadas em Plate Count Agar (PCA) (Oxoid, Inglaterra) a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas; actinomicetos, em 1/2PCA a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas (Coelho et al., 2013); microrganismos aeróbios quitinolíticos foram cultivados em meio de sal mineral (MSM) com quitina e agar, a 28 ± 2 °C por 5 dias (Alfano et al., 2011). Os microrganismos aeróbios celulolíticos foram cultivados em MSM, com tiras de papel filtro de 0,5 x 8,0 cm como fonte de carbono, incubados a 37 ± 2 °C por 15 dias (Alfano et al., 2011). Para a enumeração de fungos, bactérias aeróbias, actinomicetos e microrganismos quitinolíticos, os meios de cultura foram inoculados pela técnica de espalhamento à superfície, recorrendo a uma ansa de Drigalsky. A enumeração dos microrganismos celulolíticos ocorreu em meio líquido e foi aplicada a técnica do Número Mais Provável (Sutton, 2010). Estes ensaios foram realizados em triplicado.

A atividade enzimática foi avaliada, na fase termofílica e ao final dos processos de compostagem, utilizando o sistema API-ZYM™ (bioMérieux, Roma, Itália), de acordo com as normas do fabricante.

No final da compostagem, ao 112º dia, foram avaliadas as propriedades físicas dos compostos, nomeadamente a curva de retenção de água e a densidade aparente (De Boodt et al., 1974).

2.3.2. Isolamento de agentes de controlo biológico

No final da fase termofílica (CP e MP) e no final do processo de compostagem (FP), entre os dias 70 e 112, os fungos de ambos os compostos foram cultivados em PDA e isolados em cultura pura. A primeira etapa de identificação foi realizada por observação microscópica e macroscópica das características culturais e morfológicas dos organismos em estudo. Dos fungos identificados, foram selecionados os géneros que apresentaram propriedades antagonistas. Estes fungos foram submetidos a testes de inibição pela técnica de confronto direto (Magan e Lacey, 1984), contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Claviceps* spp.. Os ensaios foram realizados em meio de cultura PDA. Após a realização dos testes de inibição *in vitro*, os fungos que apresentaram taxa de inibição acima de 50% (procedimento descrito no próximo capítulo), foram identificados por técnicas moleculares. A identificação dos fungos foi feita pela análise das sequências nucleotídicas da região ITS1-5.8S-ITS2 utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). As pesquisas BLAST do GenBank mostraram uma alta similaridade da sequência isolada. Os fungos que apresentaram capacidade antagonista foram mantidos em meios de cultura PDA e *Corn Meal Agar* (CMA).

2.3.3. Análise estatística

As características físicas e químicas dos compostos P1 e P2 foram submetidas a um teste t de Student, usando o programa IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corp., 1989-2017, EUA).

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Processo de compostagem

O teor de quitina nos resíduos de cogumelos foi de 5,1 % (p/p), valor semelhante ao citado por López-Mondéjar et al. (2012). Ambos os processos de compostagem tiveram um desenvolvimento conforme o esperado. A fase termofílica foi alcançada 3 e 5 dias após o início da compostagem em P1 e P2, respectivamente. A temperatura atingiu um valor superior em P1, provavelmente devido à menor relação C/N inicial. Durante os processos de compostagem, as misturas foram reviradas cinco vezes, promovendo a degradação de toda a matéria-prima por atividade microbiana e homogeneizando as misturas finais. Considerou-se que a compostagem foi concluída aos 112 dias após o seu início, altura em que a temperatura dos materiais atingiu a temperatura ambiente e permaneceu estável.

No primeiro dia de compostagem (RM) não foram observadas diferenças significativas entre as populações dos organismos (Quadro 2.2). No entanto, desde o início da fase termofílica, ocorreram diferenças significativas ao longo da compostagem (Quadro 2.2). Como esperado, devido ao maior teor de quitina em P2, as maiores populações de organismos quitinolíticos foram quantificadas neste composto, em todas as fases de compostagem (exceto no início, conforme referido). Somente no final da compostagem se registaram diferenças nas populações dos organismos celulolíticos, sendo os valores superiores em P2. As populações de bactérias e fungos mesófilos também foram significativamente superiores em P2 (Quadro 2.2). Esses resultados podem ter sido impulsionados pela presença dos resíduos de cogumelos na mistura P2.

Quadro 2.2: Populações de microrganismos (ufc g⁻¹ composto) durante a compostagem.

S	C	Bactérias		Fungos		Actinomicetos		Quit.	Celul.	ACB
		25 °C	55 °C	25 °C	55 °C	25 °C	55 °C	25 °C	25 °C	
RM	P1	2.0x10 ⁹	1.3x10 ⁶	7.6x10 ⁸	3.0x10 ⁷	1.2x10 ⁶	6.3x10 ⁵	2.0x10 ³	3.8x10 ⁴	-
	P2	5.6x10 ⁹	1.2x10 ⁸	6.2x10 ⁸	7.0x10 ⁷	1.5x10 ⁹	3.2x10 ⁵	1.0x10 ³	4.5x10 ⁴	-
TP	P1	2.0x10 ⁹	1.5x10 ^{8*}	7.5x10 ^{9*}	5.0x10 ⁸	2.8x10 ⁹	3.3x10 ⁶	5.3x10 ^{3****}	4.5x10 ⁴	-
	P2	1.2x10 ¹⁰	1.9x10 ^{7*}	5.7x10 ^{10*}	1.6x10 ⁸	1.1x10 ⁹	1.7x10 ⁶	5.5x10 ^{5****}	4.0x10 ⁴	-
CP	P1	5.0x10 ^{11*}	1.4x10 ^{8*}	4.0x10 ⁸	2.2x10 ⁸	1.6x10 ⁸	1.5x10 ⁷	2.2x10 ^{4****}	1.0x10 ⁴	2
	P2	1.9x10 ^{10*}	2.9x10 ^{9*}	1.0x10 ⁹	2.2x10 ⁸	7.0x10 ⁷	9.6x10 ⁷	1.1x10 ^{5****}	9.5x10 ³	2
MP	P1	2.3x10 ⁹	9.0x10 ⁷	1.7x10 ^{9*}	2.5x10 ^{7*}	5.1x10 ⁷	1.9x10 ⁸	2.8x10 ^{7****}	2.4x10 ⁴	3
	P2	6.7x10 ⁹	1.5x10 ⁹	4.5x10 ^{10*}	2.9x10 ^{9*}	1.0x10 ⁸	2.1x10 ⁷	1.5x10 ^{7****}	4.9x10 ⁴	5
FP	P1	6.0x10 ^{9*}	8.0x10 ⁷	7.6x10 ^{10*}	3.1x10 ⁷	2.4x10 ⁷	7.3x10 ⁷	1,9x10 ^{6**}	3.1x10 ^{5*}	9
	P2	2.0x10 ^{11*}	1.3x10 ⁹	5.3x10 ^{11*}	1.9x10 ⁹	6.9x10 ⁷	2.4x10 ⁷	1.6x10 ^{7**}	7.8x10 ^{5*}	10
Total										31

S, fase de compostagem; C, composto; RM, mistura inicial; TP, fase termofílica (temperatura > 60 °C); CP, Fase de arrefecimento (temperatura < 45 °C); MP, Fase de maturação (temperatura < 30 °C); FP, Fase final à temperatura ambiente; P1, composto P1; P2, composto P2; T, turfa; Quit, microrganismos quitinolíticos; Celul., microrganismos celulolíticos; ACB, Agentes de controlo biológico isolados e identificados em cada fase. Para cada fase de compostagem: *p≤0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

Durante as compostagens, verificou-se que o teor de matéria orgânica foi significativamente mais alto em P2, principalmente durante as fases de arrefecimento, de maturação e final (Quadro 2.3). O carbono da matéria orgânica utilizado pelos microrganismos durante o processo de compostagem (Day e Shaw, 2005; Sullivan e Miller, 2005) é perdido para a atmosfera como CO₂ (Sullivan e Miller, 2005), contribuindo para a redução do teor de matéria orgânica. Tal como referido por Day e Shaw (2005), observou-se, em ambas as pilhas, uma redução gradual do teor de matéria orgânica durante a compostagem, exceto no TP para P1, e TP e CP para P2, provavelmente devido à heterogeneidade do material, que pode ter afetado a representatividade das amostras recolhidas (Quadro 2.3).

Quadro 2.3: Propriedades dos compostos analisadas em diferentes fases dos processos de compostagem.

S	C	pH	CE (dS m ⁻¹)	MO (%)	N (%)	C/N	MS (%)	Índ. de Zucconi (%)
RM	P1	6.27	0.96	75.0	1.55	29.9	30.4	-
	P2	6.07	1.71	78.7	1.74	27.5	31.1	-
TP	P1	4.79	1.60	81.8	1.70	28.7	34.9	-
	P2	5.12	1.91	83.0	1.77	27.5	35.5	-
CP	P1	7.16***	1.45	75.7*	1.72	25.5	45.0	74.5
	P2	7.51***	1.77	84.7*	1.84	27.2	39.7	75.0
MP	P1	7.10***	1.67	70.9***	1.88	21.9***	49.1**	-
	P2	7.40***	2.22	81.6***	1.72	27.5***	43.1**	-
FP	P1	7.06***	1.76*	68.6***	1.99*	20.1***	50.3	85.2***
	P2	7.33***	2.67*	81.1***	1.68*	28.9***	46.5	91.8***

S, fase de compostagem; C, composto; P1, composto P1; P2, composto P2; CE, condutividade elétrica; MO, matéria orgânica; N, azoto; C/N, razão C/N; MS, matéria seca; Índ. de Zucconi, Índice de Zucconi; RM, mistura inicial; TP, Fase termofílica (temperatura > 60 °C); CP, Fase de arrefecimento (temperatura < 45 °C); MP, Fase de maturação (temperatura < 30 °C); FP, Fase final à temperatura ambiente, Para cada fase de compostagem: * p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

Em ambas as pilhas, o pH variou como esperado: verificou-se uma rápida diminuição inicial do pH (Quadro 2.3), como consequência da produção dos ácidos orgânicos (Torres et al. 2003), seguida de um aumento, provavelmente como resultado da formação de amónia devido à decomposição de proteínas (Day e Shaw, 2005). Durante as fases CP, MP e FP, o pH manteve-se mais elevado em P2 (Quadro 2.3)

O teor de azoto *Kjeldhal* aumentou durante a compostagem de P1, e diminuiu em P2 após a fase de maturação (Quadro 2.3). Este aumento do teor de azoto é explicado por um efeito de concentração devido à redução da massa dos materiais iniciais. Durante a compostagem não ocorreu lixiviação do azoto de forma sensível porque as pilhas foram protegidas da chuva e o material foi cuidadosamente humedecido, por pulverização manual para evitar excesso de aplicação de água e o seu escoamento consequente. No

Capítulo 2

final da compostagem, o teor de azoto situou-se dentro do nível ótimo para compostos orgânicos (Ferreira et al. 2002), sendo significativamente diferente: 1.99 % em P1 e 1.68 % em P2 (Quadro 2.3). O maior teor de azoto, determinado em P1, pode ter sido causado pela maior proporção de aparas de relva nesta mistura. A relação C/N diminuiu em P1, como esperado, mas aumentou ligeiramente em P2, devido à redução do azoto (Quadro 2.3).

O índice de germinação (IG), indicador da presença de substâncias fitotóxicas nos compostos, atingiu valores adequados no dia 70, durante a fase de arrefecimento. No final da compostagem, o IG atingiu 85.2 % em P1 e 91.8 % em P2 (Quadro 2.3), acima do mínimo necessário indicando, segundo Zucconi et al. (1985), a ausência de problemas de fitotoxicidade nos compostos (65 a 70%).

Em relação às características físicas dos compostos, P2 apresentou maior teor de água dificilmente utilizável e densidade do solo (Quadro 2.4).

Quadro 2.4: Algumas características físicas dos compostos, no final dos processos de compostagem.

	CA	EAW	RW	DAW	Daps
P1	39.8	20.7	2.56	19.6***	0.266***
P2	30.4	12.5	3.6	38.0***	0.218***

P1, composto P1; P2, composto P2; CA, capacidade de arejamento; EAW, água facilmente utilizável, RW, água de reserva; DAW água dificilmente utilizável; Daps, densidade aparente. Para cada característica física: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Na fase final da compostagem ambos os compostos apresentaram características adequadas para aplicações agrícolas, nomeadamente P2, com maior teor de matéria orgânica e maior Índice de Zucconi (Quadro 2.3).

2.4.2. Atividade enzimática

Durante a fase termofílica, ao 56º dia após o início da compostagem, a atividade enzimática foi maior em P2. A atividade de β -glicuronidase, N-acetilglicosaminidase e cistina arilamidase foi observada apenas em P2 (Figura 2.1).

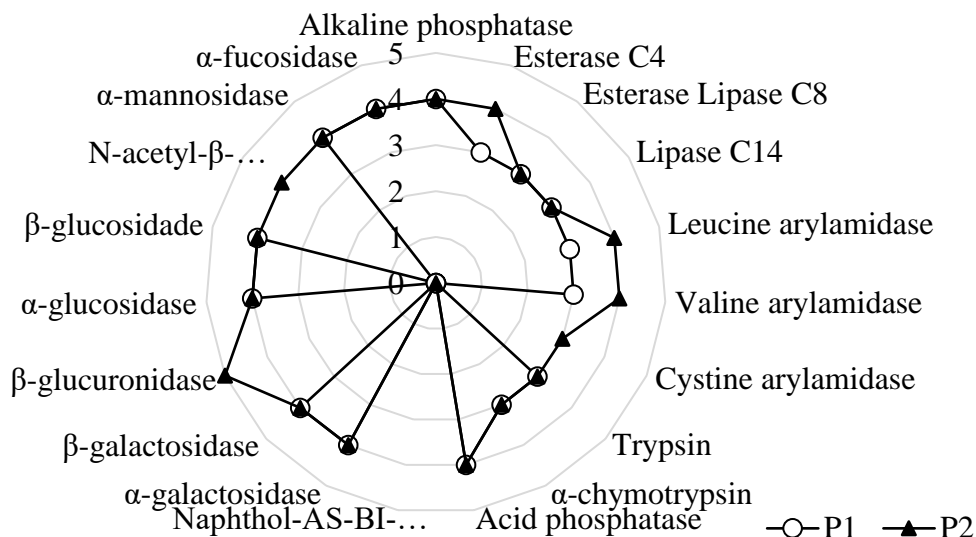


Figura 2.1: Atividade enzimática na fase termofílica, dia 56. P1, composto P1; P2, composto P2; N-acetil- β , N-acetil- β -glicosaminidase; Naftol-AS-BI, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase.

No final dos processos de compostagem, no dia 112, as enzimas fosfatase alcalina, esterase C4, esterase lipase C8, lipase C14, α galactosidase, α fucosidase e N-acetilglicosaminidase estavam ativas em ambos os compostos, porém mais intensamente em P2 (Figura 2.2).

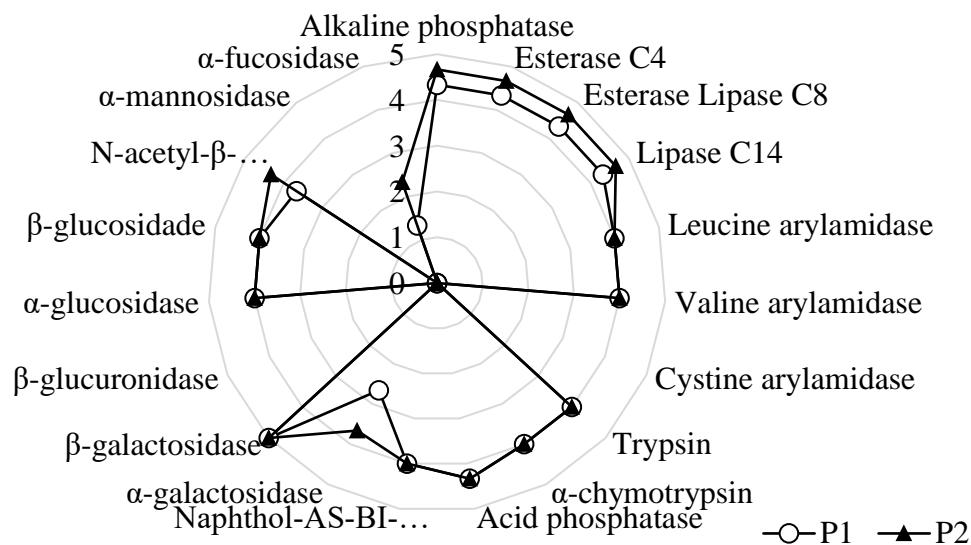


Figura 2.2: Atividade enzimática no final dos processos de compostagem, dia 112. P1, composto P1; P2, composto P2; N-acetil- β , N-acetil- β -glucosaminidase; Naftol-AS-BI, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase

O maior teor de matéria orgânica, bem como algumas propriedades físicas de P2, podem ter contribuído para o aumento das populações de microrganismos e, portanto, para maior manifestação de atividade enzimática. As enzimas micolíticas, possuindo atividade antifúngica, podem ser utilizadas no controle biológico de doenças do solo. A concentração de N-acetilglucosaminidase foi maior em P2, resultante da hidrólise enzimática completa da quitina, um polissacarídeo composto por um polímero de cadeia longa de N-acetilglucosamina (Brzezinska et al., 2014).

2.4.3. Isolamento e identificação dos organismos antagonistas

Durante a compostagem, foram isoladas 190 espécies de fungos em ambas as pilhas. A identificação foi realizada durante as fases CP, MP e FP, quando ocorreu a recolonização por microrganismos benéficos. Em P1 foram identificados catorze espécies de fungos potencialmente antagonistas e dezassete em P2. A maioria das espécies de fungos isoladas ocorreu em ambos os compostos, no entanto algumas foram observadas apenas num deles: *F. keratoplasticum* apenas em P1; *T. asperellum*, *Beauveria pseudobassiana*, *Bionetria ochroleuca* e *Clonostachys rosea* apenas em P2 (Quadro 2.5).

Quadro 2.5: Fungos potencialmente antagonistas isolados dos compostos obtidos.

Estirpe isolada – Código de Laboratório	
Composto P1	Composto P2
<i>Trichoderma atroviride</i> – A	<i>Trichoderma atroviride</i> – D
<i>Purpureocillium</i> sp. - A	<i>T. atroviride</i> – E
<i>Purpureocillium</i> sp. - B	<i>T. atroviride</i> – F
<i>Fusarium keratoplasticum</i> - A	<i>Beauveria pseudobassiana</i> - A
<i>Fusarium oxysporum</i> – A	<i>T. atroviride</i> – G
<i>F. oxysporum</i> - B	<i>T. asperellum</i> - A
<i>Penicillium</i> sp. - A	<i>Penicillium</i> sp. - B
<i>F. keratoplasticum</i> - B	<i>T. atroviride</i> – H
<i>T. atroviride</i> – B	<i>Purpureocillium</i> sp. - E
<i>T. atroviride</i> – C	<i>Bionetria ochroleuca</i> – A
<i>Purpureocillium</i> sp. - C	<i>B. ochroleuca</i> – B
<i>Purpureocillium</i> sp. - D	<i>Fusarium oxysporum</i> - C
<i>Fusarium lichenicola</i> - A	<i>F. oxysporum</i> – C
<i>Metarhizium anisopliae</i> - A	<i>B. ochroleuca</i> - C
	<i>F. lichenicola</i> - B
	<i>Metarhizium anisopliae</i> - B
	<i>Clonostachys rosea</i> - A

As espécies mais importantes, considerando a sua capacidade antagonista, foram *Trichoderma* spp. (*T. asperellum* e *T. atriviride*) (Benítez et al., 2004). O maior número de antagonistas encontrados no composto P2, pode ter sido causado pela mistura enriquecida com quitina na compostagem da mistura P2. A quitina, o segundo polímero mais abundante depois da celulose. É difícil de degradar, mas alguns organismos, como os fungos quitinolíticos, são capazes de o fazer. Os microrganismos produtores de quitinase, podem inibir o crescimento de muitos fungos fitopatogénicos (Brzezinska et al., 2014). Os fungos quitinolíticos, após colonizarem o composto e degradarem a quitina presente nos resíduos de cogumelos, são capazes de inibir o crescimento de outros fungos com quitina na sua estrutura. *T. harzianum* e *T. atroviride*, produtores de enzimas micolíticas, apresentam atividade antifúngica capaz de inibir fungos patogénicos, como

S. rolfsii e *R. solani* (Brzenzinska et al., 2014; Coelho et al., 2018). Alguns fungos também podem apresentar potencial para o controlo biológico de determinadas populações de insetos (Herrera-Estrella e Chet, 1999). Os fungos entomopatogénicos, aparentemente superam as barreiras físicas dos hospedeiros, produzindo múltiplas enzimas extracelulares, incluindo enzimas quitinolíticas, que ajudam a penetrar na cutícula e facilitam a infeção. O controlo de doenças e pragas de plantas por agentes biológicos é uma técnica promissora, alternativa ao uso de produtos químicos.

2.5. Conclusões

Os processos de compostagem originaram compostos com qualidade agrícola, permitindo a valorização de resíduos agroindustriais e contribuindo para a sustentabilidade agrícola. Durante os processos de compostagem, foram isolados e identificados potenciais agentes de controlo biológico contra doenças de plantas. P2 apresentou melhores propriedades físicas e químicas, maior diversidade microbiana com maior atividade enzimática, nomeadamente N-acetilglucosaminidase, responsável pela decomposição da glucosamina, componente da quitina. O maior número de antagonistas foi também isolado do composto P2, contribuindo para a redução de fitofármacos na agricultura.

2.6. Referências

- Álvarez-Baz, G., Fernández-Bravo, M., Pajares, J. e Quesada-Moraga, E. (2015) Potential of native *Beuaveria pseudobassiana* strain for biological control of pine wood nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol.* 132, 48-56 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.08.006>
- Barker, A.V. (2001). Compost utilization in sod production and turf management. In *Compost utilization in horticultural cropping systems*, P.J. Stoffella and B.A. Kahn eds. (Lewis Publications, Boca Raton), p. 201-225.
- Borrero, C., Trillas, I. e Avilés, M. (2009). Carnation Fusarium wilt suppression in four composts. *Eur J Plant Pathol.* 123, 425-433 <http://doi.org/10.1007/s10658-008-9380-4>
- Brzezinska, M.S., Jankiewicz, U., Burkowska, A. e Walczak, M. (2014). Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. *Curr Microbiol.* 68 (1), 71-81 <http://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4>

- Coelho, L., Reis, M. e Dionísio, L (2013). Variation in microbial populations during composting of agro-industrial waste. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 4179-4186. <http://do.org/10.1007/s00253-012-4202-1>
- Coelho, L, Dionísio, L., Guerrero, C. e Reis, M. 2018. Controlo de *Sclerotinia homoeocarpa* em relva com compostos de resíduos orgânicos. *Revista de Ciências Agrárias.* 41 (*spe*), 116-124. <https://doi.org/10.19084/rca.17076>
- Day, M. e Shaw, K. (2001). Biological, Chemical and Physical processes of composting. In *Compost utilization in horticultural cropping systems*, P.J. Stoffella and B.A. Kahn eds. (Lewis Publications, Boca Raton), pp 18-50.
- De Boodt, M., Verdonck, O. e Cappaert, I. (1974). Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Horticulturae* 37, 2054-2062. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1974.37.20>
- Herrera-Estrella, A. e Chetz, I. (1999). Chitinases in biological control. *Chitin and Chitinases*, 171 – 184
- Hoitink, H.A.J. e Fahy, P.C. (1986). Basis for control of soilborne plant pathogens with composts. *Annu Rev Phytopathol.* 24, 93-114.
- López-Mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M. e Pascual, J.A. (2012). Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and greenhouse nursery experiments. *Pestic Biochem Physiol.* 103. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.02.001>
- Martinez, F.X. (1992). Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los substratos. Paper presented at *Actas de las I Jornadas de Substratos de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas* (Derio, Spain).
- Mehta, C.M., Uma Palni, Franke-Whittle, I.H. and Sharma, A.K. (2014). Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Manage.* 34, 607-622. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.012>
- Nitschke, J., Altenbach, H., Malolepszy, T. e Mölleken, H. (2011). A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr Res.* 346, 1307-1310. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.040>
- Ramos, J.C.M., Vilaseca, J.S. e Ramon, A.C. (1987). Control analític de la qualitat del compost i estudi de la seva maduració. Paper presented at *Experiències amb el compost, Estudis I Monografies Servei del Medi Ambient* (Barcelona, Spain).
- Sharp, R.G. (2013). A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3, 757-793. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040757>
- Suárez- Estrella, F., Arcos-Nievas, M.A., López, M.J., Vargas-García, M.C. e Moreno, J. (2013). Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol Control.* 62, 509-515. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.008

Capítulo 2

Sullivan, D.M. e Miller, R.O. (2001). Compost Quality Attributes, Measurements, and Variability. In Compost utilization in horticultural cropping systems, P.J. Stoffella and B.A. Kahn eds. (Lewis Publications, Boca Raton), p. 95-122.

Sutton, S. 2010. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. *J Valid Technol* 16 (3), 35-38.

Vetter, J. (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Leutinula edodes*. *Food chem.* 102, 6-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.037>

Zucconi, F., Mónaco, A. e Forte, M. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In Composting of agricultural and other wastes, J.K.R. Gasser ed. (Elsevier Applied Science Publishers, London, United Kingdom), p. 73-85.

3. CAPÍTULO 3

Aplicação de compostos orgânicos para suprimir doenças de
relvados de *Agrostis stolonifera*

Este capítulo está publicado em:

Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. 2020. Use of organic composts to suppress turfgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. Biological Control, 141. doi: [10.1016/j.biocontrol.2019.104154](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104154)

Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. 2018. Controle de *Sclerotinia homoeocarpa* em relva com compostos de resíduos orgânicos. Revista de Ciências Agrárias, 41 (n. spe.): 116-124. doi: [10.19084/rca.17076](https://doi.org/10.19084/rca.17076)

3.1. Resumo

Os relvados são suscetíveis a várias doenças causadas por fungos, sendo necessário reduzir o seu controlo químico devido ao impacto ambiental que estes produtos causam, pela legislação atualmente em vigor e pelo possível desenvolvimento de resistência aos fungicidas. Este estudo foi realizado durante três anos, tendo como objetivo avaliar o efeito antagonista da microbiota associada aos compostos orgânicos. Foram produzidos dois compostos, P1 e P2, a partir de resíduos agroindustriais. Os fungos de ambos os compostos foram isolados e identificados, tendo sido avaliada a sua capacidade antagonista, em testes *in vitro* e *in vivo*, contra *Sclerotium rolfii* Sacc, *Clariireedia* gen. nov. (anteriormente *Sclerotinia homeocarpa* (Benn, 1937)) e *Rhizoctonia solani* (Kühn 1858). Os ensaios *in vivo* foram realizados com *Agrostis stolonifera* L., semeada em vasos de 100 mL contendo os compostos P1, P2 e um substrato comercial à base de turfa (P) (Hansa Torf Floragard, Alemanha). Amostras dos substratos P1, P2 e P foram submetidas a um tratamento térmico, obtendo-se assim os substratos Pt, P1t e P2t. As propriedades antagonistas de P, P1 e P2 foram comparadas com substratos com tratamento térmico. Nos testes *in vitro*, *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma asperellum* apresentaram crescimento superior aos agentes patogénicos testados. *T. atroviride* apresentou a melhor capacidade antagonista, com percentagens de inibição de 67.5%, 63.8% e 62.5% contra *Clariireedia* spp., *S. rolfii* e *R. solani*, respetivamente. Nos testes *in vivo*, a eficácia e o índice de controlo biológico (BCI) foram maiores em P1 e P2 do que em P. O BCI variou de 1.66 (Pt) a 39.03 (P2) no controlo de *S. rolfii*, de 1.38 (Pt) a 14.66 (P1) no controlo de *Clariireedia* spp. e de 1.87 (Pt) a 21.45 (P1) no controlo de *R. solani*. Na relva, o composto P2 apresentou o maior efeito supressivo nas doenças do solo estudadas, o que não ocorreu quando a sua microbiota foi eliminada por tratamento térmico.

Palavras-chave: azoto, boas práticas agrícolas, doenças das plantas, manutenção de relvados

3.2. Introdução

A compostagem é um método de tratamento de resíduos sólidos, os quais são biologicamente decompostos sob condições controladas, atingindo um estado em que podem ser manuseados, armazenados ou aplicados no solo sem afetar o meio ambiente (Golueke, 1991). O processo de compostagem depende de fatores físicos e químicos como a temperatura, o arejamento, a humidade e relação C/N (Boulter et al., 2000; Day e Shaw, 2005).

Na região do Algarve, a prática de golfe é uma atividade económica importante, com rendimentos diretos e indiretos. Nesta região de Portugal, existem cerca de 40 campos de golfe, com uma área estimada de 2 000 ha de relva. É fundamental uma correta manutenção sustentável dos relvados, dado tratar-se de uma cultura bastante suscetível a doenças foliares e do solo (Barker, 2001; Saharan e Mehta, 2008), que causam alterações estéticas, impossibilitando a utilização dos *greens*, responsáveis por grandes perdas económicas. O uso de fungicidas sintéticos, para o controlo de agentes fitopatogénicos, tem causado diversos problemas, como a resistência dos fungos, desequilíbrio do ecossistema devido aos efeitos tóxicos e riscos para a saúde humana e animal (Johnson e Atallah, 2006). A utilização de compostos orgânicos pode contribuir para reduzir os desequilíbrios nos ecossistemas dos campos de golfe.

O interesse crescente pela proteção do meio ambiente e da saúde pública levou à necessidade de encontrar alternativas, levando à procura de estratégias para reduzir o uso de produtos sintéticos, como fertilizantes e pesticidas (Bonanomi et al., 2010). Além disso, quer a legislação europeia (Diretiva 2009/128/CE, de 21 de outubro) quer a nacional (Lei portuguesa 26/2013, de 11 de abril) direcionam as práticas culturais para a redução de pesticidas (Trillas et al., 2006).

Os compostos orgânicos apresentam uma capacidade supressiva natural contra microrganismos patogénicos de plantas, nomeadamente *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Ralstonia solanacearum* em diferentes plantas (Cotxarrera, et al., 2002; Pugliese et al., 2008; Borrero et al., 2009; Alfano et al., 2011; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013; Jambhulkar et al., 2015; Liu et al., 2016). A supressão de doenças é um processo que depende da constituição da comunidade microbiana e do aumento da capacidade competitiva de microrganismos benéficos contra os fitopatogénicos (Liu et al., 2016).

O uso de microrganismos antagonistas é uma alternativa e uma abordagem atrativa para o controlo de doenças, que se tem mostrado economicamente sustentável e compatível com o meio ambiente, sem o impacto negativo dos produtos químicos (Barker, 2001; Stowell e Gelernter, 2001; Trillas et al., 2006); Dempsey et al., 2012; Gan e Wickings, 2017). Os agentes de biocontrolo são de fácil aplicação, podem ativar mecanismos de resistência das plantas e contribuir para melhorar o seu crescimento.

Trichoderma spp. é um agente de controlo biológico, que tem sido estudado com sucesso em inúmeras culturas, contra diferentes doenças de plantas (Trillas et al., 2006, Rossi e Patteri, 2009, Huang et al., 2012, Coelho et al., 2016, Hirpara et al., 2016).

Os relvados são suscetíveis a uma grande variedade de agentes patogénicos fúngicos do solo, sendo *Sclerotium rolfii*, *Claviceps* spp. (identificada como *Sclerotinia homeocarpa* por Benn (1937) e *Rhizoctonia solani* entre as mais frequentes. Os sintomas de *Sclerotinia* spp. podem persistir desde o início do verão até o início do outono (Saharan e Mehta, 2008) em zonas climáticas tropicais quentes (Burpee e Martin, 1992). A cobertura dos relvados com composto, sozinho ou em mistura com areia, pode aumentar a atividade microbiana do solo e, conseqüentemente, a capacidade supressiva para várias doenças do relvado. A capacidade supressiva de compostos produzidos a partir de resíduos agroindustriais foi estudada durante três anos. Foram identificados fungos potencialmente antagonistas e avaliado, *in vitro*, o seu efeito antagonista. Para avaliar a capacidade supressiva dos compostos obtidos, semeou-se relva (*Agrostis stolonifera* L., var. T1), uma das principais espécies utilizadas nos *greens* dos campos de golfe, usando, como substrato, os dois compostos orgânicos. Relativamente à doença, avaliou-se a incidência, o número de manchas causadas, a área afetada, a severidade, área sob curva de progresso da doença (AUDPC), a sua redução e o Índice de Controlo Biológico (BCI).

3.3. Material e métodos

Os ensaios de supressividade, *in vivo*, decorreram no *Campus* de Gambelas da Universidade do Algarve, Portugal (37°02'35.45"N, 7°58'20.64"W).

3.3.1. Produção de compostos orgânicos

Foram produzidos, por compostagem de resíduos agroindustriais, dois compostos, P1 e P2, em pilhas com arejamento por revolvimento. O composto P1 foi obtido com uma mistura de resíduos de laranja, provenientes de uma central citrícola, aparas de relva de campos de golfe e bagaço de uva de uma adega (0,9:1,1:1 v/v). O composto P2 foi produzido com as mesmas matérias-primas, às quais foram adicionados resíduos da produção de cogumelos (*Shiitake*) (1,8:0,2:1,5:0,5 v/v). As misturas foram preparadas de forma a obter a relação C/N inicial semelhante em ambas as pilhas. Inicialmente o volume de cada pilha de compostagem, P1 e P2, era de 1 m³. Para proteger as pilhas da chuva e do sol direto, estas foram construídas debaixo de telhado, e cobertas com material geotêxtil. A compostagem foi repetida três vezes consecutivas, tendo início na mesma época do ano (março – abril). Durante os processos de compostagem, a temperatura foi medida diariamente, em quatro locais diferentes das pilhas, com sondas portáteis (TP 62, Umwelt Elektronik GmbH & Co.KG, Alemanha), registrando-se os valores da temperatura em 6 pontos diferentes, distanciados 20 cm ao longo da sonda. O pH foi determinado em extrato aquoso (1:2 p/v) com um potenciômetro (Crison Micro pH, 2001), e a condutividade elétrica foi medida no mesmo extrato, após filtração, com um medidor de condutividade (Crison 522). Também foram quantificados os teores de matéria orgânica e mineral (Ramos et al., 1987), o de matéria seca (Martinez, 1992), a relação C/N, o teor de azoto Kjeldhal e as populações microbiológicas. O índice de Zucconi dos compostos (Zucconi et al., 1985), que indica a ausência de substâncias fitotóxicas, foi avaliado após a realização de testes de germinação, usando sementes de *Lepidium sativum* L. Os valores do índice de Zucconi abaixo de 65-70% indicam a possível presença de substâncias tóxicas. A avaliação microbiológica dos compostos foi realizada pela enumeração de fungos e bactérias em meios de cultura adequados. As amostras foram suspensas em solução salina tamponada com fosfato, seguindo-se a preparação de diluições decimais seriadas e a inoculação em meio de cultura adequado para o crescimento do microrganismo em estudo. Para enumeração de fungos, bactérias aeróbias, actinomicetos e microrganismos quitinolíticos, os meios de cultura foram inoculados pela técnica de espalhamento à superfície em placa. A enumeração dos microrganismos celulolíticos, ocorreu em meio líquido, recorrendo-se à técnica do Número Mais Provável (Sutton, 2010).

Os fungos foram cultivados em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Biokar, França) e incubados a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas; as bactérias aeróbias totais, em *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid, Inglaterra), a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas; os actinomicetos, em ½ PCA a 25 ± 2 °C e 55 ± 2 °C por 24-48 horas (Coelho et al., 2013); os microrganismos aeróbicos quitinolíticos foram cultivados em meio de sal mineral (MSM) adicionado de quitina e agar, incubados a 28 ± 2 °C durante 5 dias (Alfano et al., 2011). Os microrganismos aeróbicos celulolíticos foram cultivados em MSM com tiras de papel filtro de 0.5 x 8.0 cm como fonte de carbono, incubados a 37 ± 2 °C durante 15 dias (Alfano et al., 2011). Estes ensaios foram realizados em triplicado.

No final dos processos de compostagem, após 112 dias, foram avaliadas as propriedades físicas dos compostos, nomeadamente a curva de retenção de água e a densidade aparente (De Boodt et al., 1974).

3.3.2. Isolamento e identificação de agentes de controlo biológico

No final da fase termofílica (período de arrefecimento) e durante a fase final do processo de compostagem (entre os dias 70 e 112), os diferentes fungos quantificados em ambas as pilhas, foram isolados e mantidos em cultura pura, tanto em PDA como em *Corn Meal Agar* (CMA). Para identificação dos diferentes organismos, as suas características culturais e estruturais foram estudadas através da observação macroscópica e microscópica. Após os testes de inibição de crescimento *in vitro*, os fungos que apresentaram uma taxa de inibição superior a 50% (procedimento descrito em 3.3.3) foram identificados por técnicas moleculares. A identificação das espécies de fungos foi feita pela análise das sequências nucleotídicas da região ITS1-5.8S-ITS2 utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). As pesquisas BLAST do GenBank mostraram uma alta similaridade da sequência isolada. Os fungos que apresentaram capacidade antagonista foram mantidos em meio de cultura PDA e CMA.

3.3.3. Capacidade antagonista – Testes *in vitro*

Os fungos isolados dos compostos foram testados, *in vitro*, quanto à sua capacidade antagonista, contra *S. rolfsii*, *Clarithredia* spp., provenientes da coleção da Universidade de Sevilha e *R. solani*, da Universidade de Barcelona, utilizando a técnica de confronto

direto (adaptado de Dennis e Webster, 1971; Chen et al., 2016). Para tal, foram colocados na superfície dos meios de cultura, um disco com micélio em crescimento ativo do fungo patogénico e outro com micélio do antagonista, separados por 3 cm. Os organismos tinham sido cultivados durante sete dias em PDA. Cada fungo também foi cultivado individualmente para avaliar a sua taxa de crescimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e com três repetições. As placas inoculadas foram incubadas no escuro a 25 ± 2 °C. O raio da zona de crescimento de cada fungo, foi medido diariamente, permitindo o cálculo da percentagem de inibição (IP), de acordo com a seguinte fórmula:

$$IP (\%) = \frac{(Rc-R1)}{Rc} \times 100$$

Onde:

Rc = raio do crescimento do patogénico cultivado individualmente

R1 = raio do crescimento do patogénico na presença do antagonista

3.3.4. Capacidade antagonista - Ensaio *in vivo*

Para avaliar a capacidade supressiva dos compostos P1 e P2 *in vivo*, semeou-se relva (*Agrostis stolonifera* L. var. T1) em vasos de 100 mL, em estufa não aquecida. O ensaio foi instalado com seis tratamentos diferentes: turfa (P) (Hansa Torf Floragard, Alemanha), compostos P1 e P2, e os mesmos substratos submetidos a um tratamento térmico (t) a 60 °C durante sete dias, denominados Pt, P1t e P2t, respetivamente. Cada tratamento foi constituído por cinco vasos, com quatro repetições. Quando a relva cobriu toda a superfície dos substratos, foram inoculados os agentes patogénicos *S. rolfsii*, *Clariireedia* spp. e *R. solani*, cultivados previamente em cultura pura, no meio de cultura PDA, durante sete dias. A inoculação dos substratos foi feita colocando um disco de PDA, com 6.5 mm de diâmetro, contendo micélio em crescimento ativo. No ensaio com *S. rolfsii*, além do disco com o micélio, também foram adicionados dois esclerócios em cada vaso. Os três patogénicos estudados foram inoculados simultaneamente. Os substratos submetidos ao tratamento térmico e inoculados com os fungos patogénicos foram utilizados como controlo positivo; os substratos submetidos a tratamento térmico, mas

não inoculados, constituíram o controlo negativo. Para conservar a humidade e a temperatura do ar, os vasos foram mantidos dentro de um túnel e no interior da estufa. A temperatura do ar e a humidade relativa do ar próximo às plantas foram registadas diariamente. As plantas foram irrigadas por microaspersão, para manter alta a humidade do ambiente. A adubação foliar com azoto (18 % N e 8 % matéria orgânica) foi aplicada semanalmente com adubo orgânico-mineral (Ret-Sul, Eibol, Espanha), na concentração recomendada pelo fabricante de 150 mL 100L⁻¹, correspondente a 4.5 kg de azoto ha⁻¹. A relva foi cortada semanalmente com auxílio de uma tesoura. Os ensaios em estufa foram realizados três vezes, com um intervalo de oito a dez meses. Para cada ensaio, foi preparado um novo composto, usando a mesma mistura de materiais e técnica de compostagem. Para determinação da severidade e da incidência da doença, foram registados, semanalmente, em todos os vasos o número de manchas causadas pela doença assim como a área afetada. A severidade da doença foi avaliada de acordo com a escala de severidade dos sintomas, adaptada de Baayen e Van der Plas (1992), onde: 0 = planta assintomática (0 % doença); 1 = planta muito pouco infetada (5 % de doença); 2 = sintomas ligeiros (20 %); 3 = sintomas bem desenvolvidos (50 %); 4 = fortes sintomas da doença em toda a área (80 %); 5 = plantas mortas (100 %). A área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) foi determinada de acordo com Campbell e Madden (1990), mostrando uma velocidade crescente de desenvolvimento da doença. A AUDPC, calculada por vaso, expressa a severidade da doença, integrada desde o início dos sintomas até à conclusão do ensaio, dividindo-se o resultado pelo tempo de duração da doença (número de dias), em cada ensaio. Esta avaliação teve como objetivo comparar os vários ensaios, com uma variedade de durações epidémicas, calculada de acordo com:

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y = severidade da doença

t = tempo

O índice de controlo biológico (BCI) e a eficácia foram calculados de acordo com Byrne et al. (2005). O BCI foi aplicado para combinar eficácia-consistência da redução da doença, de acordo com:

$$BCI = \frac{Eficácia}{Consistência}$$

A eficácia é a percentagem da redução média da doença e a consistência é o desvio padrão dessas médias.

3.3.5. Análise estatística

As características físicas e químicas de P1 e P2 foram comparadas através de um teste t de Student. Para a comparação dos três substratos em estudo (P1, P2 e a turfa comercial), foi utilizada a análise de variância multifatorial (ANOVA) seguida do teste de amplitudes múltiplas de Duncan (*New Multiple-Range Test*). Os dados da percentagem de inibição obtidos através dos ensaios *in vitro* e dos ensaios *in vivo*, relativos à doença, tais como a incidência, número de manchas, área afetada, severidade, AUDPC e BCI foram analisados por ANOVA e usando o teste de amplitudes múltiplas de Duncan. A normalidade da distribuição da amostra e a homogeneidade das variâncias foram verificadas antes da análise de variâncias (Zar, 1999). A correlação de Person foi usada para testar a significância da relação entre o progresso da doença e a redução da doença, e entre o pH do composto, CE, matéria orgânica e teor de azoto. Para a análise estatística, foi usado o software IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corp., 1989-2017, EUA).

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Produção de compostos orgânicos

De acordo com o teste t de Student, o pH atingiu valores significativamente mais elevados no composto P2 ($p < 0.001$), embora ambos apresentassem valores neutros; a CE também

foi significativamente mais elevada em P2 ($p < 0.05$), tal como a matéria orgânica ($p < 0.001$) que atingiu valores superiores a 80 % neste composto (Quadro 3.1).

Quadro 3.1: Propriedades dos compostos, no final da compostagem, e da turfa.

	pH	CE (dS.m ⁻¹)	MO (%)	N (%)	C/N	DM (%)	Índice de Zucconi (%)
P1	7.06b***	1.76b*	68.6c***	1.99a*	20.1b***	50.3a	85.2***
P2	7.33a***	2.67a*	81.1b***	1.68b*	28.9a***	46.5b	91.8***
T	6.00c	0.126c	93.4a	2.11a	50.5a	22.8c	

P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; CE, condutividade elétrica; MO, matéria orgânica; N, Azoto; C/N, relação C/N; DM, matéria seca. Para comparar os compostos orgânicos, de acordo com o teste t de Student, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Para os três substratos, valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), de acordo com o novo teste de amplitude múltipla de Duncan (New Multiple-Range).

O composto P1 apresentou maior teor de azoto ($p < 0.05$), provavelmente devido à maior proporção de aparas de relva presente na mistura inicial. Em ambos os compostos, o teor de azoto apresentou valores acima do valor mínimo recomendado de 0.75 % (Ferreira et al., 2002). Essas pequenas diferenças nas características do composto podem ter influenciado o crescimento das populações microbianas.

As características mencionadas (pH, CE e teor de N) favoreceram o desenvolvimento de grandes populações de microrganismos em ambos os compostos (Quadro 3.2), conforme relato de Coelho et al. (2012), em processos de compostagem semelhantes.

Quadro 3.2: Populações microbianas (UFCs g⁻¹ composto) no final do processo de compostagem e o número de agentes de controlo biológico isolados nas diferentes fases de compostagem (FA, FM e PF).

C	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Quitin.	Celulol.	ACB		
						FA	FM	PF
P1	6.00x10 ^{9*}	7.58x10 ^{10*}	2.40x10 ⁷	1.9x10 ^{6**}	3.14x10 ^{5*}	2	3	9
P2	2.02x10 ^{11*}	5.26x10 ^{11*}	6.86x10 ⁷	1.6x10 ^{7**}	7.83x10 ^{5*}	2	5	10

C, composto; P1, composto P1; P2, composto P2; Quitin., microrganismos quitinolíticos; Celulol., microrganismos celulolíticos; ACB, Agentes de controlo biológico; FA, Fase de Arrefecimento (temperatura < 45 °C); MP, Fase de Maturação (temperatura < 30 °C); PF, Produto Final (temperatura ambiente); *p≤0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001, de acordo com o teste t de Student.

A atividade microbiana é responsável não só pela rápida transformação dos resíduos orgânicos durante a compostagem, mas também pelo desenvolvimento da capacidade supressiva dos compostos.

No final dos processos de compostagem, as maiores populações microbianas foram observadas no composto P2, com exceção dos actinomicetos (Quadro 3.2). As diferentes características físicas e químicas de P1 e P2 contribuíram para o desenvolvimento de microbiota diversificada nos compostos. As diferenças verificadas nos valores de pH, CE, matéria orgânica e teor de azoto podem ser explicadas pelas diferentes composições químicas, com origem nas misturas iniciais, que terão contribuído para diferentes a diversidade microbiana e consequentemente compostos com características diferentes.

Como esperado, a adição de resíduos de cogumelos em P2, ricos em quitina, com teor médio de 57.75 mg. g⁻¹ (López-Mondéjar et al., 2012), promoveu o crescimento de microrganismos quitinolíticos (Quadro 3.2). A presença de quitina na mistura inicial estimulou o desenvolvimento de fungos com capacidade de a decompor, pela ação da quitinase (Sharp, 2013). As diferenças significativas no teor de matéria orgânica nos compostos contribuíram para aumentar as populações de fungos, bactérias e actinomicetos (Antil et al., 2013).

O teste de germinação de *Lepidium sativum* L. apresentou uma taxa de germinação significativamente superior (p < 0.001) em P2 (91,8 %) em relação a P1 (85.2 %) (Quadro 3.2). Em ambos os compostos, o valor alcançado foi superior ao mínimo exigido para a sua utilização agrícola que, de acordo com Zucconi et al. (1985), deverá ser de 65 %.

3.4.2. Isolamento e identificação de agentes de controlo biológico

Durante os processos de compostagem de P1 e P2, foram isolados 190 fungos. Nas fases de arrefecimento e maturação, foram identificados 31 fungos com potencial efeito antagonista: 14 em P1 e 17 em P2 (Quadro 3.2). A presença de quitina em P2 pode ter promovido o aumento do número de antagonistas isolados conforme relatado por Sharp (2013). Outras propriedades, como pH, condutividade elétrica, matéria orgânica e propriedades físicas também podem promover o efeito antagonista de P2 (Cotxarrera et al., 2002; Avilés et al., 2011; Pane et al., 2011). Os 31 fungos potencialmente antagonistas isolados, foram identificados morfológicamente como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Fusarium*, *Bionectria*, *Beauveria*, *Clonostachys* e *Metarhizium*. Em conformidade com Mehta et al. (2014), estes fungos são frequentes em compostos orgânicos.

Pela análise da sequência de nucleótidos, os 31 fungos isolados foram identificados, ao nível da espécie, como sendo: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium keratrosplasticum*, *Fusarium lichenicola*, *Bionectria ochroleuca*, *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* e *Metarhizium anisopliae*. *T. asperellum*, *B. ochroleuca*, *B. bassiana* e *C. rosea* foram isolados apenas no composto P2, e *F. keratrosplasticum* apenas no composto P1. Dos fungos que apresentaram melhor capacidade antagonista, foram identificados de P1, um isolado de *T. atroviride*, um de *F. oxysporum*, um de *F. keratrosplasticum*, um de *F. lichenicola* e um de *M. anisopliae* foram isolados de P1. De P2, cinco isolados foram identificados como *T. atroviride*, um como *T. asperellum*, um como *F. oxysporum*, um como *F. lichenicola*, um como *M. anisopliae*, um como *C. rosea* e um como *B. ochroleuca* (isolado do meio de cultura quitinolítico). Provavelmente *F. oxysporum* isolado de P1 e de P2, não é patogénico pois não foram observados, nas plantas testadas, sintomas de doenças provocados por este fungo. A grande diversidade de *Trichoderma* spp. pode ser explicada pelo alto teor de substâncias lenhinocelulósicas dos resíduos agrícolas (Jambhumkar et al., 2015).

3.4.3. Ensaio *in vitro*

Nos ensaios *in vitro*, os vários fungos com potencial antagonista, mostraram diferenças significativas entre as suas percentagens de inibição ($p < 0.05$) (Quadro 3.3).

Quadro 3.3: Inibição (%) dos fungos patogênicos pelos potenciais antagonistas isolados de cada composto (P1 e P2).

P1 – Inibição do crescimento dos fungos patogênicos (%)			
Estirpes isoladas – Cod. Lab.	<i>Clariireedia</i> spp.	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>
<i>T. atroviride</i> – A	59.5 bcd	58.5 abc	60.2 ab
<i>Purpureocillium</i> sp. - A	29.8 j	25.8 de	49.8 efgh
<i>Purpureocillium</i> sp. - B	45.9 gh	35.3 bcde	40.5 i
<i>F. keratoplasticum</i> - A	62.4 abc	49.5 abcde	39.7 i
<i>F. oxysporum</i> – A	30.5 j	35.1 bcde	50.8 defgh
<i>F. oxysporum</i> - B	44.5 gh	35.9 bcde	48.8 fgh
<i>Penicillium</i> sp. - A	41.9 hi	34.1 cde	40.3 i
<i>F. keratoplasticum</i> - B	48.2 fg	35.8 bcde	45.6 ghi
<i>T. atroviride</i> – B	64.2 ab	63.6 a	58.7 abcd
<i>T. atroviride</i> – C	65.0 ab	58.9 abc	62.5 a
<i>Purpureocillium</i> sp. - C	29.8 j	25.8 de	49.8 efgh
<i>Purpureocillium</i> sp. - D	45.9 gh	35.3 de	40.6i
<i>F. lichenicola</i> - A	45.2 gh	35.2 bcde	49.1 fgh
<i>M. anisopliae</i> - A	30.2 j	35.4 de	27.5 bcdefg
P2 – Inibição do crescimento dos fungos patogênicos (%)			
	<i>Clariireedia</i> spp.	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>
<i>T. atroviride</i> – D	63.4ab	63.8 a	56.4 abcdef
<i>T. atroviride</i> – E	66.3a	60.6 ab	57.5 abcde
<i>T. atroviride</i> – F	66.7a	63.6 a	58.6 abcd
<i>Beauveria</i> sp. - A	37.3 i	31.4 de	46.4 ghi
<i>T. atroviride</i> – G	64.2 ab	58.9 abc	62.5 a
<i>T. asperellum</i> - A	57.6 cd	57.1 abcd	61.6 a
<i>Penicillium</i> sp. - B	26.9 j	41.6 abcde	42.8 hi
<i>T. atroviride</i> – H	67.5 a	62.8 a	59.4 abc
<i>Purpureocillium</i> sp. - E	37.7 i	33.5 cde	27.4 bcdefg
<i>B. ochroleuca</i> – A	52.4 ef	34.4 bcde	52.4 cdefg
<i>B. ochroleuca</i> – B	54.6 de	34.4 bcde	51.5 hi
<i>F. oxysporum</i> - C	38.0 i	36.1 bcde	42.5 hi
<i>F. oxysporum</i> – C	47.5 fg	57.7 sbcd	45.9 ghi
<i>B. ochroleuca</i> - C	54.6 de	34.4 bcde	51.5 cdefg
<i>F. lichenicola</i> - B	45.7 gh	35.4 bcde	49.3 fgh
<i>M. anisopliae</i> - B	30.5 j	35.9 bcde	27.6 bcdefg
<i>C. rose</i> - A	42.3 hi	42.1 abcde	43.1 hi

R. solani, *Rhizoctinia solani*; *S. rolfsii*, *Sclerotium rolfsii*; P1, composto P1; P2, composto P2. Para cada doença, os valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0.05$), de acordo com o teste de amplitudes múltiplas de Duncan. As letras maiúsculas, após o nome das espécies, correspondem ao código de laboratório para os diferentes isolados.

3.4.3.1 *Sclerotium rolfsii*

Dez fungos (*Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp.) mostraram as maiores percentagens de inibição contra *S. rolfsii*, com taxas de inibição do seu crescimento que variaram entre 51 e 64 % (Quadro 3.3). A maior percentagem de inibição para *S. rolfsii* foi observada com *T. atroviride*. Destes dez isolados de fungos, sete foram isolados em P2 e três em P1 (Quadro 3.3).

3.4.3.2 *Clariireedia* spp. (antes *S. homoeocarpa*)

Doze dos fungos isolados reduziram o crescimento de *Clariireedia* spp. (*Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *Bionectria* spp.). As taxas de supressividade de *Clariireedia* spp. variaram entre 52 e 68%. *T. atroviride* apresentou a maior percentagem de inibição (68%). Oito desses doze fungos foram isolados de P2 e quatro de P1 (Quadro 3.3).

3.4.3.3 *Rhizoctonia solani*

Quinze dos fungos isolados (*Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *B. ochroleuca*) reduziram o crescimento de *R. solani*, com taxas de inibição entre 50 e 63 %. Tal como verificado para as outras doenças, *T. atroviride* mostrou a maior taxa de inibição também para *R. solani*. Nove desses quinze fungos foram isolados de P2 e seis de P1 (Quadro 3.3).

A maior taxa de inibição do crescimento foi alcançada com *T. atroviride*, tal como observado por Lahlali e Hijri (2010), quando confrontou *T. atroviride* com *R. solani* em batateiras. Alguns fungos isolados de P1 e P2 inibiram o crescimento dos fungos patogênicos, tendo-se verificado que o número de antagonistas isolados em P2 foi maior que em P1. De acordo com Castaño et al. (2011), o sistema de compostagem utilizado e a composição da matéria-prima, podem afetar a capacidade supressiva dos compostos orgânicos, podendo promover uma riqueza microbiológica diferente. Em P2, a presença de quitina, na matéria-prima, pode ter desempenhado um papel fundamental na diversidade microbiológica.

3.4.4. Ensaio *in vivo*

Para as doenças estudadas (*R. solani*, *Clariireedia* spp. e *S. rolfsii*) a área afetada pela doença foi significativamente inferior nos vasos com os compostos orgânicos ($p < 0.05$)

particularmente com P2 (Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3). A exceção foi para *Clariireedia* spp., onde a área afetada pela doença foi menor em P1 ($p < 0.05$) (Figura 3.2). Nos substratos sem inóculo do agente patogénico (controlo) não se verificaram sintomas de doenças.

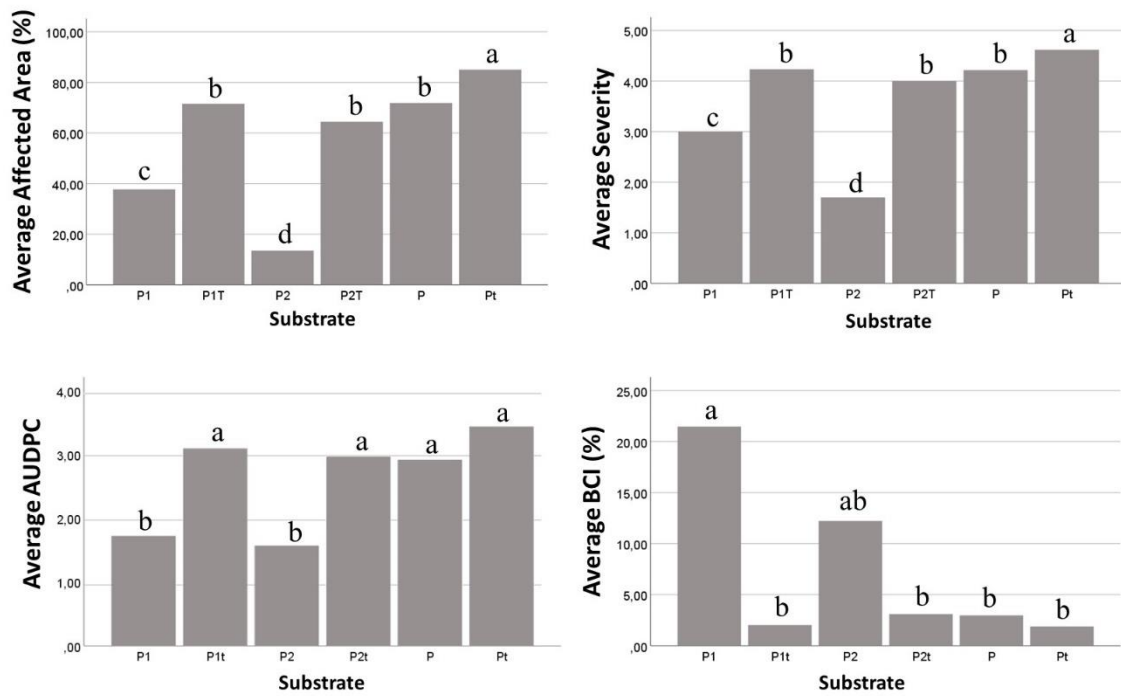


Figura 3.1: Eficácia do composto no controlo biológico de *Rhizoctonia solani*. *Average Affected Area*, média da área afetada pela doença; *Average Severity*, média da severidade da doença; *Average AUDPC*, média da área sob o progresso da curva da doença; *Average BCI*, média do índice de controlo biológico; P1, composto P1; P1t, composto P1 com tratamento térmico; P2, composto P2; P2t, composto P2 com tratamento térmico, P, turfa; Pt, turfa com tratamento térmico. Barras com a mesma letra não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

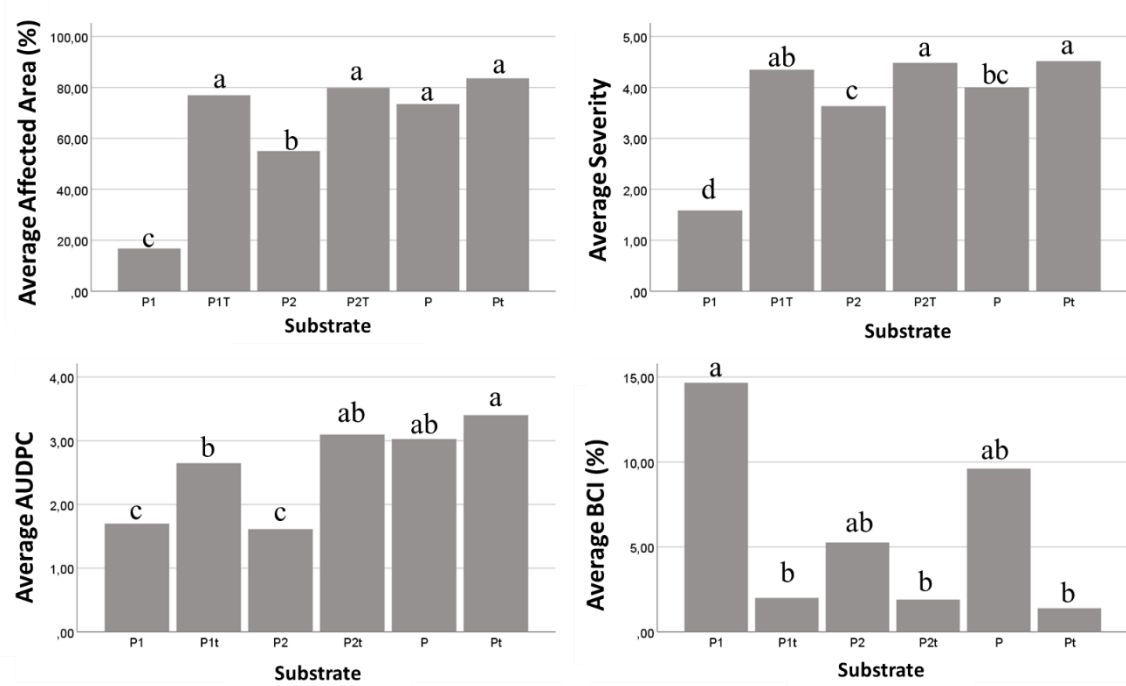


Figura 3.2: Eficácia do composto no controlo biológico de *Clariireedia* spp.. *Average area*, média da área afetada pela doença; *Average Severity*, média da severidade da doença; *Average AUDPC*, média da área sob o progresso da curva da doença; *Average BCI*, média do índice de controlo biológico; P1, composto P1; P1t, composto P1 com tratamento térmico; P2, composto P2; P2t, composto P2 com tratamento térmico, P, turfa; Pt, turfa com tratamento térmico. Barras com a mesma letra não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (teste de Duncan).

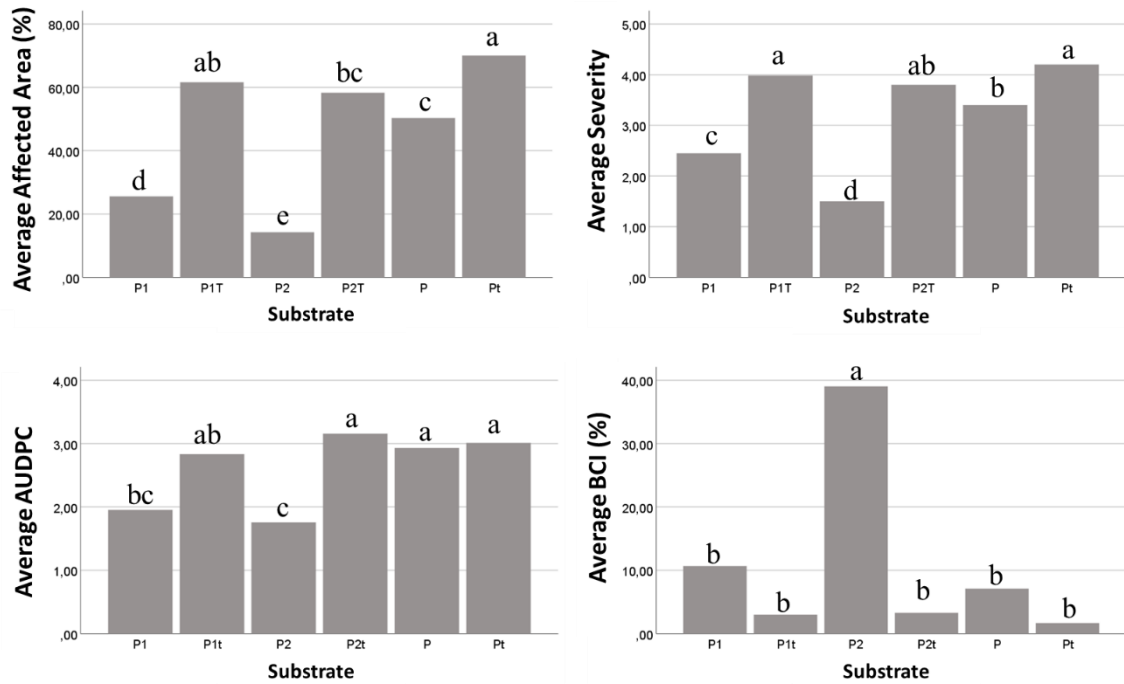


Figura 3.3: Eficácia do composto no controlo biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Average Area*, média da área afetada pela doença; *Average Severity*, média da severidade da doença; *Average AUDPC*, média da área sob o progresso da curva da doença; *Average BCI*, média do índice de controlo biológico; P1, composto P1; P1t, composto P1 com tratamento térmico; P2, composto P2; P2t, composto P2 com tratamento térmico, P, turfa; Pt, turfa com tratamento térmico. Barras com a mesma letra não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (teste de Duncan).

Relativamente a *Clariireedia* spp., Walsh et al. (1999) relataram que uma das medidas culturais para controlar esta doença é a aplicação de azoto. P1 apresentou maior teor de azoto ($p < 0.01$) (Quadro 3.1), o que poderá ter contribuído para a redução da área afetada por esta doença (Figura 3.2). Quando comparadas com a turfa (P), as populações microbianas em P1 e P2 contribuíram para uma maior capacidade supressiva da doença devido à atividade microbiológica (Hoitink et al, 1993; Hoitink et al., 2001). Quando os substratos foram submetidos a tratamento térmico (controlo negativo) a área afetada pela doença foi maior para as doenças estudadas (Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3), com diferenças significativas ($p < 0.05$), devido à eliminação das populações microbianas nos compostos (Borrero et al., 2006). No final do ensaio, a relva que cresceu em P1 e P2 apresentou uma diminuição significativa da área afetada pela doença ($p < 0.001$), em comparação com os restantes substratos. O papel do composto no controlo biológico foi evidente.

Comparando os seis substratos estudados, verificou-se que as doenças se desenvolveram mais rapidamente nos substratos submetidos a tratamento térmico e turfa, evidenciando o efeito positivo dos compostos orgânicos. Além disso, considerando que as doenças se desenvolveram apenas nos vasos inoculados, não se tendo observado sintomas nos vasos sem inóculo, mostra-se que a origem da doença se deu pela inoculação e não por qualquer outra forma de contaminação.

Os compostos têm sido descritos como bons agentes de controlo biológico de fungos fitopatogénicos de diferentes culturas, como *Fusarium oxysporum* em tomate (Cotxarrera, et al., 2002; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013) e cravo (Borrero et al., 2009; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013), *F. oxysporum* e *Pythium ultimum* em tomate (Alfano et al., 2011) ou *R. solani* em feijão e *F. oxysporum* f.sp. *basilica* em manjeriço (Pugliese et al., 2008).

A severidade da doença aproximou-se do valor máximo (5) para *Clavibacterium* spp. em P, Pt, P1t e P2t (Figura 3.2). As doenças foram menos severas em P1 e P2, principalmente P2, no caso de *R. solani* (Figura 3.1); P1 foi o composto que apresentou maior capacidade supressiva para controlar *Clavibacterium* spp. (Figura 3.2). Neste estudo, foi observada uma correlação negativa entre a severidade da doença e algumas propriedades do composto. Valores mais elevados de pH e CE de P2 produziram efeitos negativos no crescimento dos patogénicos. Cotxarrera et al. (2002) observaram que valores mais altos de pH e CE reduziram o crescimento de *Fusarium oxysporum* em tomateiro, reduzindo a sobrevivência do patogénico. Os mesmos autores referiram que os maiores valores de pH reduziram o crescimento, esporulação e patogenicidade de *F. oxysporum*, pois reduzem a disponibilidade de micronutrientes como Fe, Cu e Zn. Pane et al. (2011) relataram uma correlação negativa entre o tombamento de plantas por *S. minor* e a salinidade do composto.

A incidência da doença variou entre 0 a 1, indicando a sua ausência ou presença nos vasos, respetivamente (Reis e Coelho, 2013). A incidência da doença foi significativamente menor em P1 e P2 ($p < 0.05$), quando comparada com os restantes tratamentos. O composto P1 destacou-se na redução da incidência de *Clavibacterium* spp., provavelmente pelo maior teor de azoto (Walsh et al., 1999). Foi observada uma correlação negativa significativa entre este nutriente e a área afetada e severidade da doença ($p < 0.001$) e incidência. Townsend et al. (2018) também verificaram que os níveis mais altos de azoto

reduziram a severidade de *dollar spot*. P2 destacou-se na redução de *R. solani*, provavelmente devido ao seu menor teor de azoto, tal como observado por Tani e Beard (1997) e Tredway e Burpee (2001). O melhor desempenho de P2 no controlo de *R. solani* também pode ser atribuído à maior população de *Trichoderma* spp., que é conhecido como um excelente antagonista de *R. solani* (Hoitink et al., 1991).

A AUDPC utilizada como índice de severidade, indicou que P1 e P2, comparados com os substratos submetidos a tratamento térmico e à turfa, apresentaram maior efeito supressivo das doenças em estudo (Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3). Borrero et al. (2009) observaram que no controlo de *Fusarium* em cravo, os compostos orgânicos também apresentaram menor AUDPC quando comparados à turfa. Para as doenças estudadas, no final dos ensaios, a AUDPC foi significativamente menor em P1 e P2 ($p < 0.05$), em relação aos restantes substratos (Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3).

O BCI foi significativamente superior em P1 e P2 ($p < 0.05$) (Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3). Este indicador variou de 1.66 (em Pt) a 39.03 (em P2) no controlo de *S. rolfsii* (Figura 3.3), de 1.38 (em Pt) a 14,66 (em P1) para controlar *Clavireedia* spp. (Figura 3.2) e de 1.87 (em Pt) e 21.45 (em P1) para *R. solani* (Figura 3.1). Valores semelhantes foram encontrados por Suárez-Estrella et al. (2013), no controlo de *F. oxysporum* em tomateiro. Quando comparado com os outros cinco substratos, o substrato P2 apresentou maior BCI para *S. rolfsii* (Figura 3.3). Foi verificada uma correlação positiva entre as populações microbianas dos compostos e BCI. Populações mais elevadas e diversificadas de microrganismos podem contribuir para o sucesso de compostos orgânicos no controlo biológico, conforme descrito por Castaño et al. (2013), nomeadamente *Trichoderma* sp.. Em beterraba, Upadhyay e Mukhopadhyay (1986) observaram que *Trichoderma harzianum* invadia e lisava o micélio e esclerócios de *S. rolfsii*.

Jambhulkar et al. (2015) referem que os compostos orgânicos apresentam uma capacidade supressiva contra doenças do solo, nomeadamente *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp.. No entanto, apenas 20 % dos compostos orgânicos, conseguem reduzir o tombamento causado por *Rhizoctonia* spp. (Hoitink e Boehm, 1999). *R. solani* é controlada por *Trichoderma* spp., através de um processo de supressividade específica (Hoitink et al., 1991). Ambos os compostos (P1 e P2) exibiram uma capacidade supressiva para *R. solani* (Figura 3.1), provavelmente devido às suas populações microbianas (Quadro 3.2), nomeadamente *Trichoderma* spp.. Foi observada uma

correlação positiva entre a população de *Trichoderma* spp. e o BCI para *R. solani* ($R^2 = 0.684$, $p < 0.01$). As características físico-químicas dos compostos também podem afetar as suas propriedades supressivas, através de efeitos diretos sobre os agentes patogênicos e microrganismos antagonistas, ou efeitos indiretos sobre os sistemas hospedeiros através do fornecimento de nutrientes, melhoria da estrutura do solo, porosidade e capacidade de retenção de água, entre outros fatores (Boulter et al., 2000). A capacidade de arejamento de P1 foi de 14.6 %, mas P2 apresentou valores significativamente superiores, 25.6 % ($p < 0.05$). Os melhores resultados, alcançados com o composto P2, podem estar relacionados com a sua capacidade de arejamento. Segundo Avilés et al. (2011), a capacidade de arejamento tem um efeito positivo na severidade de doenças que causam a podridão das raízes das plantas. Outra razão para a maior capacidade de controlo biológico de P2 pode ser a presença de quitina dos resíduos de cogumelo, conhecida por representar cerca de 57.8 mg g^{-1} de resíduo de cogumelo (López-Mondéjar et al., 2012). A compostagem de resíduos orgânicos com quitina, promove o desenvolvimento de fungos com maior capacidade de degradação. A atividade da quitinase, reforça o potencial supressivo dos compostos contra os agentes fitopatogênicos com quitina na sua estrutura, pela lise das células (Alfano et al., 2011; Sharp, 2013). A presença de organismos quitinolíticos está associada aos mecanismos de supressividade da doença baseados na hidrólise da parede celular do patógeno.

Populações numerosas de actinomicetos também influenciam a capacidade supressiva dos compostos (Mahatma e Mahatma, 2015). Nas doenças estudadas, as populações quitinolíticas apresentaram correlação negativa com os parâmetros de desenvolvimento da doença, contribuindo para o seu controlo biológico.

3.5. Conclusões

Os compostos orgânicos, provenientes de resíduos agroindustriais, possuem características que permitem o desenvolvimento de microrganismos antagonistas, como *Trichoderma atroviride*, com atividade contra fungos patogênicos do solo, nomeadamente *Claviceps* spp., *S. rolfii* e *R. solani*. Este antagonista apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento, entre 56.4 a 67.5 %, no controlo dos três fungos fitopatogênicos estudados. Nos ensaios *in vivo*, o composto P1 apresentou a maior capacidade supressiva contra *Claviceps* spp.. P2, com menor teor de azoto e maior

concentração das populações de *Trichoderma* spp., apresentou maior capacidade no controlo de *R. solani*. Os resultados mostraram que o uso dos compostos testados tem potencial como medida de biocontrolo, reduzindo o uso de fitofármacos sintéticos na manutenção dos relvados.

3.6. Referências

- Alfano, G., Lustrato, G., Lima, G., Vitullo, D., Ranalli, G., 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biol. control* 58, 199-207. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.001
- Antil, R.S., Raj, D., Adballa, N., Inubushi, K., 2015. Physical, Chemical and Biological parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Composting for Sustainable Agriculture*, Springer, London, pp. 83-101.
- Avilés M., Borrero, C., Trillas, M.I., 2011. Review on compost as an inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. *Dyn Soil Dyn Plants* 5, 1-11.
- Baayen, R.P., Van der Plas, C.H., 1992. Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to *Fusarium* wilt. *Euphytica* 59, 165-174.
- Barker, A.V., 2001. Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), *Compost utilization in horticultural cropping systems*. Lewis Publications, Boca Raton, pp.201-225.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42, 136-144. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.10.012
- Borrero, C., Reis, M., Guerrero, C., Dionísio, L., Torres, V., Castaño, R., Castillo, S., Trillas, M.I., Avilés M., 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in turfgrass. Control biológico *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en césped. (In Spanish). Conference paper XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología
- Borrero, C., Infantes, M.J., González, E., Tello, J.C., Avilés, M., 2006. Relation between suppressiveness to tomato *Fusarium* wilt and microbial populations in different growth media. *Acta Hort.* 697. doi:10.17660/ActaHortic.2005.697.54
- Borrero, C., Trillas, I., Avilés, M., 2009. Carnation *Fusarium* wilt suppression in four composts. *Eur J Plant Pathol* 123, 425-433. doi 10.1007/s10658-008-9380-4
- Boulter, G.J., Boland G.J., Trevors, J.J., 2000. Compost: A study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 16, 115-134.
- Burpee, L. Martin, B., 1992. "Biology of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrasses. *Plant Disease*, vol. 76(2), 112-117.

- Byrne, J.M., Dianase, A.C., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control* 32, 408-418. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.12.001
- Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience, New York.
- Castaño, R., Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M., 2013. Selection of biological control agents against tomato Fusarium wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media. *BioControl* 58, 105-116. Doi: 10.1007/s10526-012-9465-z
- Castaño, R., Borrero, C., Avilés, M., 2011. Organic matter fractions by SP-MAS 13C NMR and microbial communities involved in the suppression of Fusarium wilt in organic growth media. *Biol. Control*, 58(3), 286-293. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.011
- Coelho, L., Dionísio, L., Bueno, F., Reis, M., Duarte, J., Guerrero, C., 2016. *Trichoderma gamsii* as a biological control agent of turfgrass diseases. In: Guerrero, C., editor, Book of Abstracts of the 5th European Turfgrass Society Conference – Turfgrass – Towards Sustainability and Perfection for Aesthetic, recreational and Sports, Albufeira, Portugal, pp. 145-146.
- Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L., 2012. Variation in microbial population during composting of agro-industrial waste. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(9), 4179-4186. Doi: 10.1007/s00253-012-4202-1
- Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L., 2013. Culture media performance on the detection of actinomycetes from composts. *Acta Hort.* 1013, 473-478. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.1013.58
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biol Biochem* 34, 467-476. doi: 10.1016/S0038-0717(01)00205-X.
- Day, M., Shaw, K., 2001. Biological, chemical and physical processes of composting. In: Stofella P.J., Kahn, B.A. (Eds.). *Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 17– 50.
- De Boodt, M., Verdonck, O., Cappaert, I., 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Hort.* 37, 2054-2062.
- Dempsey, J.J., Wilson, I.D., Spencer-Phillips, P.T.N., Arnold, D.L., 2012. Suppression of *Microdochium nivale* by potassium phosphite in cool-season turfgrasses. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil and Plant Science* 62, 70-78 doi: 10.1080/09064710.2012.681392
- Ferreira, J.; Conceição, J., Strecht, A., Ribeiro, J., Soeiro, A., Cotrim, G., 2002. Manual of organic agriculture - Fertilization and plant protection for sustainable agriculture. 3rd Edition. Lisbon. (In Portuguese language) Manual de agricultura biológica – Fertilização e protecção das plantas para uma agricultura sustentável. Agrobio. 3^a Edição. Lisboa.

- Gan, H., Wickings, K., 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 66-77. doi: 10.1016/j.agee.2017.05.014
- Golueke, C.G., 1972. *Composting: A Study of the Process and its Principles*. Emmaus, Pennsylvania, USA: Rodale Press.
- Hirpara, D.G., Gajera, H.P., Bhimani, R.D., Golakiya, B.A., 2016. The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc.. *Curr Genet*, 62, 619-641. doi: 10.1007/s00294-016-0567-5
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., Hadar, Y., 1993. Mechanisms of Suppression of Soilborne plant pathogens in compost-amended substrates. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.), *Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects*. The Ohio State University, Ohio, pp.601-621.
- Hoitink, H., Boehm, M., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol* 37, 427-446.
- Hoitink, H.A.J., Inbar, Y., Boehm M.J., 1991. Status of composted-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Dis* 75, 869-873. doi: 10.1094/PD-75-0869.
- Hoitink, H.A.J., Krause, M.S., Han, Y., 2001. Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.). *Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 263–274.
- Jambhulkar, P.P., Sharma, M., Jakshman, D., Sharma, P., 2015. Natural Mechanisms of Soil Suppressiveness Against Diseases Caused by *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, and *Phytophthora*. In: M.K. Meghvansi and A. Varma, editor(s), *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Springer, p.95-123.
- Johnson, D.A., Atallah, Z.K., 2006. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. *Plant Dis* 90, 755-758. doi: 10.1094/PD-90-0755
- Lahlali, R., Hijri, M., 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett* 311 (2), 152-159. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02084.x
- Liu, L., Sun, C, He, X., Liu, X., Wu, H., Liu, M., Tang, C., Zhang, Y., 2016. The secondary compost products enhances soil suppressive capacity against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *European Journal of Soil Biology*, 75: 70-78. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.04.005
- López-Mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M., Pascual, J.A., 2012. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *In vitro* and greenhouse nursery experiments. *Pestic Biochem Phys* 103, 1-8. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.02.001
- Mahatma, M.K., Mahatma, L., 2015. Soil Suppressive Microorganisms and Their Impact on Fungal Wilt Pathogens. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.). *Organic*

- Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Springer, pp. 249-274.
- Martinez, F.X., 1992. Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los substratos. Actas de las I Jornadas de Substratos de la SECH 294, 55-65.
- Mehta, C.M., Palni, U., Franke-Whittle, I.H., Sharma, A.K., 2014. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Manage* 34, 607-622. doi: 10.1016/j.wasman.2013.11.012
- Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., Bonanomi, G., 2011. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biol. Control* 56, 115-124. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.002
- Pugliese, M., Liu, B.P., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *J Plant Dis Protect* 115(5), 220-228. doi: 10.1007/BF03356267
- Ramos, J.C.M., Vilaseca, J.S., Ramon, A.C., 1987. Control analític de la qualitat del compost i estudi de la seva maduració, In: *Server del Medi Ambient, Diputació de Barcelona, (Ed.). Experiències amb el compost. Estudis I monografies: 12, pp. 31-69.*
- Rossi, V., Patteri, E., 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biol. Control* 49, 52-57.
- Saharan, G.S., Mehta, N., 2008. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management.* Springer Science Business.
- Sharp, R.G., 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3, 757-793. doi: 10.3390/agronomy3040757
- Smiley, R.W., Dernoeden, P.H., Clarke, B.B., 1992. *Compendium of turfgrass diseases.* Amer. Phytopath. 2nd edition.
- Stowell, L.J., Gelernter, W.D., 2001. Diagnosis of Turfgrass Diseases. *Annual Reviews of Phytopathology*. 39, 135-55
- Sutton, S. 2010. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. *J Valid Technol* 16 (3), 35-38.
- Suárez-Estrella, F., Arcos-Vievas, M.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Moreno, J., 2013. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biol Control* 67, 509-515. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.008
- Tani, T., Beard, J.B., 1997. *Color Atlas of Turfgrass Diseases.* John Wiley & Sons, New Jersey.
- Townsend, R.V., Nangle, E., Koch, P.L. 2018. Dollar spot severity and oxalic production affected by nitrogen fertilization in creeping bentgrass. In: *Book of Abstracts of the 6th European Turfgrass Society Conference – Different Shades of Green, Manchester, UK, pp. 64-65.*
- Tredway, L.P., Burpee, L.L., 2001. *Rhizoctonia diseases of turfgrass.* The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-1109-01

- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol Control* 39, 32-38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.05.007
- Upadhyay, J.P., Mukhopadhyay, A.N., 1986. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in sugarbeet. *Tropical pest management*, 32 (3), 215-220. Doi: 10.1080/09670878609371066
- Walsh, B., Ikeda, S.S., Boland, G.J., 1999. Biology and Management of Dollar Spot (*Sclerotinia homoeocarpa*); an Important Disease of Turfgrass. *HortScience* 34(1), 13-21.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Sninsky J.J., White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Innis MA, Gelfand DH, Academic Press, New York, New York, pp. 315–322.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zucconi, F., Mónaco, A., Forte, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser, J.K.R. (Ed.). *Composting of agricultural and other wastes*. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 73-85.

4. CAPÍTULO 4

O desenvolvimento de doenças do solo em estévia pode ser controlado com a aplicação de composto orgânico?

Este capítulo está publicado em:

Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L. 2017. **O desenvolvimento de doenças do solo em estévia pode ser controlado com a aplicação de composto orgânico?** *In*: Associação Portuguesa de Horticultura (ed.). Actas Portuguesas de Horticultura nº 29. pp: 553-560. ISBN: 978-972-8936-28-0. [Link](#).

Apresentado em painel no Congresso Luso-brasileiro de Horticultura, 1 a 4 de novembro de 2017, ISCTE, Lisboa. Livro de resumos, Pag. 293.

4.1. Resumo

Numerosos compostos orgânicos manifestam capacidade supressiva para determinadas doenças do solo, devido nomeadamente à actividade de alguns dos microrganismos que os colonizam. Esta capacidade possibilita, em determinadas situações, a utilização dos compostos na protecção das plantas contra doenças do solo.

Neste trabalho, cultivou-se estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) em vasos de 200 mL, com três substratos diferentes: turfa (T), composto orgânico resultante da compostagem de laranja de refugio, bagaço de uva e aparas de relva (P1), composto orgânico resultante da compostagem de laranja de refugio, bagaço de uva, aparas de relva e substrato da produção de cogumelos (P2), com e sem tratamento térmico. O tratamento térmico foi aplicado colocando os substratos em estufa regulada a 60 °C durante sete dias, originando as modalidades designadas por TT, P1T e P2T, respectivamente. Sete dias antes da plantação da estévia, os substratos colocados nos vasos, foram inoculados com *Sclerotinia rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. A inoculação consistiu na colocação, em cada vaso, de dois cilindros, com 6 mm de diâmetro, de meio de crescimento (PDA) em placas de Petri com os agentes patogénicos. Na inoculação de *S. rolfsii*, para além dos dois cilindros com o patógeno, foram também colocados 6 esclerócios. Os vasos de controlo continham os seis substratos testados, sem inóculo. O ensaio incluiu 18 modalidades (6 substratos, dois inóculos e os mesmos 6 substratos sem inóculo -controlo) com 4 repetições e 5 plantas por modalidade e repetição. Durante o ensaio mantiveram-se os substratos humedecidos, e as condições de temperatura e humidade do ar adequadas para o desenvolvimento dos patógenos. Periodicamente, as plantas foram observadas e registada a severidade da doença e o número de plantas mortas.

Verificou-se que as doenças evoluíram mais rapidamente quando o substrato tinha recebido tratamento térmico, o que revela o controlo destas doenças por acção biológica. Nos compostos sujeitos a tratamento térmico ocorreu maior número de plantas mortas por *S. rolfsii* e *R. solani*, tendo a sobrevivência da estévia sido superior no substrato P2 e nas modalidades inoculadas com *R. solani*.

Palavras-chave: Biocontrolo, antagonistas, compostagem, *Sclerotinia rolfsii*, *Rhizoctonia solani*

Abstract

Several organic composts show suppressive capacity for some soil diseases, due to the activity of microorganisms which are present in the composts. This capacity promotes the use of composts in the protection of plants against soil diseases.

In this work we resorted to stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in 200 mL pots, with three different substrates, with and without thermic treatment: turf (T), organic compost resulting from the composting of orange waste, grass clippings and grape marc (P1) and organic compost resulting from the composting of orange waste, grass clippings and grape marc and substrate for the production of mushrooms (P2). The thermic treatment was applied by submitting the substrates to an autoclave treatment of 60°C for seven days, originating the varieties designated by TT, P1T and P2T, respectively. Seven days ahead of the stevia plantation the substrates in the pots were inoculated with *Sclerotinia rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. To inoculate the pathogens, two cylinders with 6 mm in diameter of growth medium (PDA) from Petri dishes with the pathogen were placed on each pot. To inoculate *S. rolfsii*, however, 6 sclerotia were additionally placed on each pot. The control pots contained the six tested substrates, but without the inoculum. The study had 18 treatments (6 substrates, 2 pathogenic fungi and the same 6 substrates without pathogen - control) with 4 repetitions and 5 plants per modality and repetition. During the test the substrates were kept moist and the conditions of air temperature and humidity were adequate for the development of the pathogens. Periodically the plants were observed, registering the severity of the disease and the number of dead plants.

It was concluded that the diseases developed more rapidly when the substrate had received thermic treatment, showing the control of soil diseases by means of biological action. In the composts subjected to thermic treatment a greater number of dead plants by *S. rolfsii* e *R. solani* were observed, while the survivability of stevia was higher in the P2 substrate and in the treatment inoculated with *R. solani*.

Keywords: Biocontrol, antagonists, composting, *Sclerotinia rolfsii*, *Rhizoctonia solani*

4.2. Introdução

O recurso a compostos orgânicos na agricultura apresenta várias vantagens. Desde logo, a redução de resíduos e a sua transformação num composto estável que pode ser aplicado

na actividade agrícola, tornando-a mais sustentável (Barker, 2001, Ferreira et al., 2002). Os compostos poderão ser aplicados ao solo, tornando-os mais férteis e supressivos para doenças do solo (Hoitink & Fahy, 1986), reduzindo o recurso a fitofármacos com soluções de baixo custo, ambientalmente favoráveis (Martin, 2003) e sem efeitos na saúde pública (Bonanomi et al., 2010). Quando o composto tem origem em resíduos ricos em quitina, como o obtido a partir de resíduos da produção de cogumelos, estimula o desenvolvimento de fungos com a capacidade de a degradar, pela acção da quitinase, potenciando o desenvolvimento de compostos mais supressivos (Sharp, 2013).

A estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) é uma planta da família Asteraceae, originária da América do Sul, ainda pouco estudada, mas que apresenta grande potencial de desenvolvimento na Europa. A alta concentração dos glicósidos nas suas folhas atribui-lhe grande importância, sendo um possível substituto de edulcorantes sintéticos (Santos et al., 2000, Ramesh et al., 2006, Ahmed et al., 2007). A estévia é suscetível a *Sclerotinia sclerotiorum* e a *Rhizoctonia solani*, que lhe causam grandes perdas de produção (Ramesh, et al., 2006), sendo importante encontrar soluções de cultivo sustentáveis.

Neste trabalho pretendeu-se estudar o efeito de dois compostos orgânicos no controlo biológico das doenças do solo, provocadas por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii*, na cultura de estévia.

4.3. Material e métodos

Através de um processo aeróbico de compostagem de resíduos agroindustriais, com reviramento manual, foram obtidos dois compostos, designados por P1 e P2. O composto P1 resultou da compostagem de laranja de refugo, bagaço de uva e aparas de relva, e o P2 da compostagem de laranja de refugo, bagaço de uva, aparas de relva e substrato da produção de cogumelos (material rico em quitina).

Em placas de Petri com meio de crescimento PDA, desenvolveram-se culturas puras dos fungos patogénicos *Sclerotinia rolfsii* e *Rhizoctonia solani*.

Vasos de 200 mL foram cheios com 6 substratos diferentes: turfa loira (Hansatorf, Alemanha) (T), composto orgânico P1 e composto orgânico P2. Estes substratos foram também sujeitos a um tratamento térmico, em estufa regulada a 60 °C durante sete dias, originando as modalidades designadas por TT, P1T e P2T, respetivamente. O tratamento térmico teve como objetivo a inativação dos antagonistas presentes nos compostos,

permitindo a verificação do carácter biológico da supressividade. O Quadro 4.1 mostra as características físico-químicas dos substratos utilizados no ensaio e o Quadro 4.2 as suas populações microbianas.

Quadro 4.1: Características físico-químicas¹ dos substratos.

	pH	CE (dS.m ⁻¹)	MO (%)	MS (%)	N _{Kj} (%)	IG (%)
T	6	< 15				
P1	7,03	2,12	61,9	49,0	1,86	89,9
P2	7,23	3,34	76,3	45,9	1,49	94,5

¹ CE, condutividade eléctrica; MO, matéria orgânica; MS, matéria seca; N_{Kj}, azoto Kjeldhal; IG, índice de germinação de Zucconi.

Para cada substrato (P1 e P2) em cada coluna os valores das médias não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Quadro 4.2: Populações microbianas nos compostos orgânicos.

	Fungos	Bactérias	Actinomicetes	Quitinolíticos	Celulolíticos	Número
	ufc.g ⁻¹			MPN	Antagonistas	
P1	2,27x10 ^{11*}	1,60x10 ^{10**}	2,40x10 ^{6***}	1,92x10 ^{6**}	2,30x10 ^{2*}	10
P2	1,02x10 ^{12*}	5,25x10 ^{11**}	2,20x10 ^{6***}	1,62x10 ^{7**}	9,30x10 ^{2*}	12

Para cada composto (P1 e P2) em cada coluna os valores das médias mostram diferenças estatisticamente significativas para: * p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; sem indicação: sem diferenças significativas. ufc, unidades formadoras de colónias; NPM, número mais provável.

Os substratos acima descritos foram inoculados com os patogénicos a testar, colocando-se em cada vaso dois cilindros, com 6 mm de diâmetro, de meio de cultura PDA com micélio do patogénico. No caso de *S. rolfsii*, para além dos dois cilindros com o micélio do microrganismo patogénico, foram também inoculados 6 esclerócios desse microrganismo. Os vasos de controlo continham os seis substratos testados mas sem inóculo.

A plantação de estévia foi efetuada sete dias após a inoculação dos patogénicos nos substratos. O ensaio decorreu em estufa, mantendo-se os substratos humedecidos, as temperaturas próximas de 30 °C e a humidade do ar próxima de 85 %.

Semanalmente, as plantas foram observadas e registada a severidade e incidência da doença, assim como o número de plantas mortas. A severidade da doença foi determinada de acordo com a seguinte escala: 1 – planta saudável; 2 – pequena lesão; 3 – média lesão; 4 – grande lesão e 5 – planta morta: “damping-off”.

O estudo decorreu em 3 substratos diferentes (P1, P2 e turfa), tratados e não termicamente e inoculados com *R. solani* e *S. rolfsii*. Os testes também foram efetuados em substratos sem inoculação. Desta forma foram 18 modalidades, as quais foram instaladas em 4 blocos completos casualizados, num total de 360 vasos.

Os resultados foram sujeitos a uma análise da variância e ao teste de separação de médias de Duncan, com o programa de estatística SPSS® (versão 20.0, SPSS Inc.).

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Influência do composto na incidência e severidade das doenças

Aos 45 dias após a plantação (DAP), observou-se elevada incidência das doenças, provocadas por *S. rolfsii* e *R. solani*, nas plantas de estêvia, com exceção do controlo onde os fungos patogénicos não foram inoculados e conseqüentemente não se registaram plantas infetadas (Quadro 4.3).

Quadro 4.3: Percentagem de incidência das doenças nas plantas nos substratos.

	<i>Sclerotinia rolfsii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Controlo (sem inóculo)
P1	100a	100a	0c
P1T	100a	100a	0c
P2	85b	90ab	0c
P2T	90ab	95ab	0c
T	100a	95ab	0c
TT	85b	95ab	0c

P1, composto P1; P1T, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2T, composto P2 tratado termicamente, T, turfa; TT, turfa tratada termicamente. Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferenças estatísticas para $p \leq 0,05$ (teste de Duncan).

A incidência, de ambas as doenças, atingiu 100 % nos compostos P1 e P1T, bem como em T, mas neste caso apenas com *S. rolfsii*. Em P1, a mais baixa e menos diversa

população microbiológica (Quadro 4.2) poderá estar na origem da maior incidência da doença, apresentando este composto menor capacidade supressiva para as doenças provocadas pelos fungos em estudo.

Os resultados obtidos no controlo comprovam que as doenças tiveram origem no inoculo introduzido nos vasos (Quadro 4.3).

Os primeiros sintomas de doença provocada por *R. solani* foram registados numa planta, 11 DAP em P1 (Figura 4.1). Inicialmente não se registaram diferenças estatísticas entre os diferentes substratos, as quais surgiram apenas 19 DAP, manifestando-se maior severidade nos substratos sujeitos a tratamento térmico, destacando-se o P1T, que permaneceu com menor capacidade supressiva durante todo o ensaio, contrariamente ao P2, que apresentou maior capacidade para impedir o desenvolvimento de *R. solani*, tal como já tinha sido verificado por Coelho & Reis (2013) com compostos resultantes da compostagem de resíduos agroindustriais, na cultura de pepino. O substrato P1, devido às suas características, principalmente menor população microbiana e maior teor de azoto, apresentou menor capacidade para controlar *R. solani* (Figura 4.1).

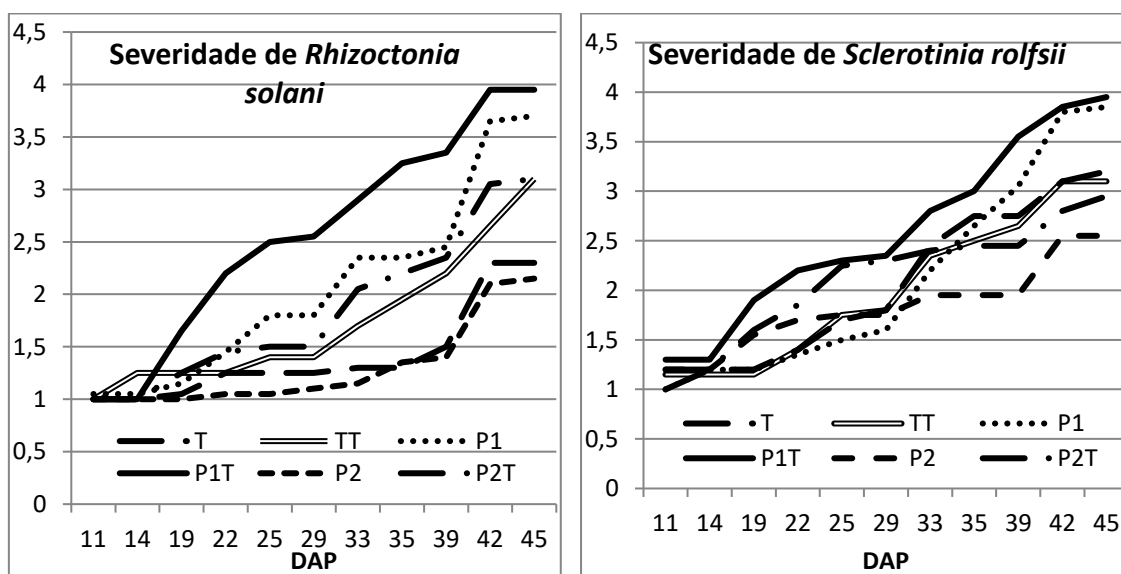


Figura 4.1: Variação da severidade das doenças provocadas por *R. solani* e *S. rolfsii* ao longo dos ensaios. A avaliação foi feita numa escala entre 1 e 5, onde: 1, planta saudável; 2, pequena lesão; 3, média lesão; 4, grande lesão e 5, planta morta: “damping-off”; P1, composto P1; P1T, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2T, composto P2 tratado termicamente, T, turfa; TT, turfa tratada termicamente.

De acordo com Hoitink *et al.* (1991), o controlo biológico de *R. solani* através de compostos, apenas é conseguido por um grupo limitado de microrganismos, que poderão

não estar presentes em P1, por este apresentar menor população de fungos, tanto em quantidade como em diversidade.

Também os sintomas provocados por *S. rolfsii* começaram a ser observados 11 DAP, em todas as modalidades excepto em P1 e P2T (Figura 4.1). As diferenças estatísticas registaram-se 19 DAP nos substratos tratados termicamente, evidenciando a origem biológica do controlo de *S. rolfsii*.

Até 33 DAP, nos substratos P1 e P2 foi observado um controlo significativo no desenvolvimento de *S. rolfsii*, sendo a severidade superior em P1T, sem diferenças em relação a P2T, T e TT. 35 DAP, no substrato P2, observaram-se valores de severidade significativamente menores, que se mantiveram até ao final dos ensaios (Figura 4.1).

No substrato P2, aos 45 DAP, registou-se maior capacidade supressiva para ambos os patogénicos (Quadro 4.4). Este resultado poderá ter origem na maior quantidade e diversidade microbiana, incluindo organismos quitinolíticos, observada neste substrato.

Quadro 4.4: Severidade da doença nos diferentes substratos 45 DAP

	<i>Sclerotinia rolfsii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Controlo
P1	3,85ab	3,7ab	1a
P1T	4,4a	3,95a	1a
P2	2,2d	2,15c	1a
P2T	3,3bc	3,1abc	1a
T	3,2bc	2,3bc	1a
TT	2,85cd	4,1a	1a

P1, composto orgânico P1; P1T, composto orgânico P1 tratado termicamente; P2, composto orgânico P2; P2T, composto orgânico P2 tratado termicamente, T, turfa; TT, turfa tratada termicamente. Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas para $p \leq 0,05$ (teste de Duncan).

Nos vasos não inoculados (controlos), as plantas não apresentaram, como seria de esperar, sintomas das doenças provocadas pelos fungos patogénicos em estudo. Nos vasos com os substratos tratados termicamente, a estévia apresentou maiores lesões, sobretudo em P1T quando exposto a *S. rolfsii*. Nos vasos inoculados com *R. solani*, não se verificaram diferenças entre P1T e P2T.

No substrato P1, para ambas as doenças, apesar de as plantas apresentarem menores lesões, a severidade das doenças não apresentou diferenças estatísticas relativamente ao substrato com tratamento térmico (P1T). Este facto poderá ter origem na população microbiana existente neste substrato, onde foram isolados menos antagonistas do que em P2, sendo também as populações de microrganismos menores.

4.4.2. Influência do composto na sobrevivência das plantas

Verificou-se que, para todos os tratamentos, *S. rolfsii* causou a morte a um maior número de plantas.

O substrato P2 apresentou maior capacidade supressiva, morrendo apenas 10 % das plantas expostas a *R. solani* e 20 % das expostas a *S. rolfsii*. O efeito supressivo dos compostos deve-se fundamentalmente aos microrganismos presentes (Quadro 4.2), mostrando a Figura 4.2 que, nos compostos tratados termicamente ocorreu maior percentagem de mortalidade de estévia, principalmente em P1T, ultrapassando 70 %.

Nos vasos onde não se inoculou nenhum patogénico não foram detetadas plantas infetadas com *R. solani* ou *S. rolfsii*.

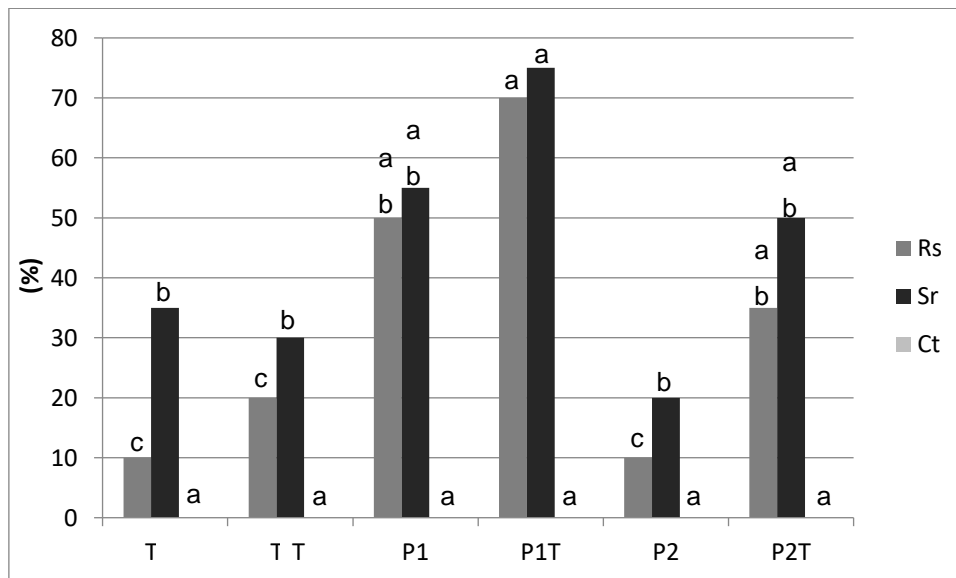


Figura 4.2: Mortalidade das plantas expostas a *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia rolfsii* e sem exposição (controlo). P1, composto P1; P1T, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2T, composto P2 tratado termicamente, T, turfa; TT, turfa tratada termicamente; Rs, *Rhizoctonia solani*; Sr, *Sclerotinia rolfsii*; Ct, controlo. Para cada doença, em cada coluna, as mesmas letras mostram que não existem diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

4.5. Conclusão

Neste estudo, verificou-se que os compostos orgânicos estudados apresentaram capacidade para suprimir *S. rolfsii* até 33 DAP. A partir desta data o composto P1 perdeu a capacidade de controlo desta doença.

O composto P2 mostrou-se supressivo relativamente a *R. solani* durante todo o ensaio, demonstrando ser esta capacidade supressiva de origem biológica, pois a mesma não foi observada nos substratos sujeitos a tratamento térmico, tendo-se registado nestes uma maior mortalidade das plantas.

Este trabalho mostrou ainda que a presença de resíduos ricos em quitina poderá proporcionar o desenvolvimento de antagonistas com maior capacidade para impedir o desenvolvimento de doenças do solo, causadas por exposição a *R. solani* e *S. rolfsii*.

4.6. Referências

- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A. & Hannan, M.M. (2007) An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. *American Eurasian Journal of Science Research*, **2**, 121-25.
- Barker, A.V. 2001. Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J. & Kahn, B.A. (eds.) *Compost utilization in horticultural cropping systems*. Lewis Publications. Boca Raton. pp. 201-225.
- Bonanomi, G., Anignani, V., Capodilupo, M. & Scala, F. 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 136-144.
- Ferreira, J., Conceição, J., Strecht, A., Ribeiro, J., Soeiro, A. & Cotrim, G. 2002. Manual de agricultura biológica – Fertilização e protecção das plantas para uma agricultura sustentável. Agrobio. 3ª Edição. Lisboa. pp. 435.
- Hoitink, H. A. J., Inbar, Y. & Boehm, M. J. 1991. Status of composted-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Dis.* 75, 869-873. In: Hoitink, H. A. J., Stone, A. G., Han, D. Y. 1997. Supresión of plant disease by composts. *Hort Science* 32, 184-187.
- Hoitink, H.A.J. & Fahy, P.C. 1986. Basis for control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* 24: 93-114.
- Martin, F.N. 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* 41: 325-350.
- Ramesh, K., Singh, V. & Megeji, N. 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertolini]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy* 89:137-177.

- Reis, M. & Coelho, L. (2013) Controlling *Rhizoctonia solani* in Cucumber Using Compost of Agro-industrial Residues. *Acta Horticulturae*, 1013: 499-505.
- Santos, G., Guerrero C., Reis M., Miguel, G. & Kienle, U., 2000. Stevioside and rebaudioside A foliar leaf content changes in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni as a response to the potassium fertilisation. Proceedings of the 19^o Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits. 30 August-2 September, Promotion des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (APPAM). Digne les Bains, França.
- Sharp, R. G. 2013. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3:757-793.

5. CAPÍTULO 5

Controlo Biológico de Doenças dos Relvados com Compostos
Orgânicos Enriquecidos com *Trichoderma atroviride*

Este capítulo está publicado em:

Coelho, L.; Dionísio, L.; Guerrero, C. & Reis, M. 2021. **Effect of the organic compost enrichment with *Trichoderma atroviride* in the biological control of turfgrass diseases.** Biological Control 159. doi: [10.1016/j.biocontrol.2021.104620](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104620)

5.1. Resumo

A crescente procura por produtos naturais, para o controlo de doenças de plantas, tem levado à pesquisa de agentes de controlo biológico, nomeadamente fungos, muitas vezes isolados de compostos de resíduos orgânicos. Através da compostagem de duas misturas diferentes de resíduos agroindustriais, obtiveram-se os compostos P1 e P2, de onde se isolou o antagonista, *Trichoderma atroviride*. Posteriormente, realizaram-se novos processos de compostagem que, quando terminados, foram inoculados com *T. atroviride*, previamente isolado, de forma a enriquecer os compostos com estas populações de microrganismos antagonistas (E), sendo os substratos denominados como P1E e P2E. Duas semanas após a inoculação com *T. atroviride*, a capacidade supressiva dos compostos foi testada contra *Sclerotium rolfsii*, *Claviceps* spp. e *Rhizoctonia solani*, em relva, *Agrostis stolonifera*, usando vasos de 100 mL. Os tratamentos testados foram: compostos P1 e P2 sem nenhum tratamento; P1 e P2 tratados termicamente (P1t, P2t); P1 e P2 enriquecidos sem e com tratamento térmico prévio (P1E, P2E, P1tE, P2tE), e um substrato comercial à base de turfa natural (P) e tratado termicamente (Pt), enriquecido (PE) e enriquecido após tratamento térmico (PtE). Os compostos enriquecidos mostraram o maior controlo das doenças. P1E foi mais eficaz no controlo de *Claviceps* spp.; vasos com plantas infetadas cultivadas em P1E, apresentaram 53.5 % menos área afetada em relação ao P1t. P2E foi mais eficaz contra *R. solani*; os resultados mostraram 69.3 % menos área afetada em relação ao P2t e ambos foram eficazes no controlo de *S. rolfsii*, com redução de 38.5 % no P1E e 43.5 % no P2E. As maiores populações de *Trichoderma* spp. quantificadas nos substratos enriquecidos, associadas à maior atividade enzimática, nomeadamente a N-acetil- β -glucosaminidase, com destaque para P2E, terão contribuído fortemente para o biocontrolo das doenças estudadas. Verificou-se um aumento de alguns macro e micronutrientes nos substratos tratados termicamente e enriquecidos.

Palavras chave: agricultura biológica, *Agrostis stolonifera*, biocontrolo, compostagem

5.2. Introdução

A redução da utilização de pesticidas é uma estratégia crescente para melhorar a sustentabilidade da agricultura, promovida pela legislação portuguesa (DL 26/2013) e europeia (Diretiva 2009/128/CE). Além disso, o Pacto Ecológico Europeu (*European Green Deal*) espera uma redução da aplicação de pesticidas sintéticos em 50 %. As aplicações de fitofármacos sintéticos têm contribuído para a poluição ambiental, perda de biodiversidade e podem entrar na cadeia alimentar (Brzezinska et al., 2014).

Compostos de resíduos orgânicos, devido às suas elevadas e diversificadas populações microbianas, podem ser uma das melhores soluções para o controlo biológico de doenças de plantas (Bernal-Vicente et al., 2008; Alfano et al., 2011; Liu et al., 2016; Coelho et al., 2020). Os compostos são também conhecidos pelo seu potencial como fertilizantes, nomeadamente devido ao seu elevado teor de matéria orgânica (Roe, 2001; Reis, 2016). Além disso, os compostos derivados de resíduos agrícolas e agroindustriais geralmente são livres de xenobióticos e concentrações excessivas de metais pesados (Ntougias et al., 2008; López-Mondéjar, 2012).

A transformação dos resíduos durante a compostagem, origina um composto rico em microrganismos antagonistas, que pode ser manuseado e aplicado na agricultura, permitindo que esses produtos sejam uma alternativa sustentável para o controlo de doenças de plantas (Hoitink et al., 2001). Os compostos são ambientalmente compatíveis e promovem uma economia circular, sem os impactos negativos dos produtos químicos (Barker, 2001; Brunner et al., 2003; Trillas et al., 2006; Köhl et al., 2019).

Entre os agentes de controlo biológico, os microrganismos quitinolíticos têm sido utilizados com sucesso no controlo de diversos fungos fitopatogénicos (Nandakumar et al., 2001; Viswanathan e Samiyappan, 2001; Brzezinska et al., 2014). A enzima fúngica quitinase é traduzida a partir de genes quitinase, que são induzidos pela presença de quitina. Entre os fungos filamentosos, *Trichoderma* spp. têm sido amplamente estudados para a produção de quitinase (Sandhya et al., 2004; Homthong, 2016).

As estirpes de *Trichoderma*, são conhecidas como fungos do solo não patogénicos, organismos simbioses oportunistas de plantas, capazes de colonizar as suas raízes por mecanismos como os de fungos micorrízicos e produzir compostos que estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa da planta (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004). Algumas estirpes de *Trichoderma* apresentam vantagens, como a rápida colonização da rizosfera dentro das comunidades microbianas estáveis e pré-existentes,

controlo da microbiota patogénica e competitiva e melhoria da saúde das plantas e do crescimento das raízes (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2013).

Trichoderma spp. é um dos agentes de controlo biológico eficaz contra muitos fungos patogénicos de plantas (Verma et al., 2007), nomeadamente fungos do solo fitopatogénicos (Hermosa et al., 2000), como *Rhizoctonia solani* (Hoitink et al., 2001; Trillas et al., 2006; Val-Moraes, 2015), *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002), *Colletotrichum orbiculare* (Zhang et al., 1998), *Phytophthora capsici* (Segarra et al., 2013). Segarra et al. (2007) verificaram que *Trichoderma* spp., quando aplicado nas raízes de plantas hospedeiras, também é capaz de reduzir o número de patogénicos causadores de doenças foliares, como *Botrytis cinerea*. Além disso, *Trichoderma* spp. também pode controlar outras doenças das plantas, como vírus, bactérias, nematodes (Al-Ani, 2018).

Trichoderma spp. apresenta diferentes mecanismos de ação contra fitopatogénicos, como micoparasitismo, antibiose e competição (Verma et al., 2007). *Trichoderma* spp. ataca os fungos do solo fitopatogénicos por competição ou morte de fungos através da produção de antibióticos ou enzimas (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2013). Sabe-se que a inibição, por *Trichoderma* spp., do crescimento do micélio do patogénico, não é causada pela penetração de hifas, indicando que metabolitos extracelulares podem ser responsáveis pela eliminação do patogénico (Chérif et al., 1990; Harman et al., 2004; Sandhya et al., 2004). *Trichoderma* spp. é capaz de reduzir a atividade de enzimas dos fungos patogénicos (Harman et al., 2004; Köhl et al., 2019). *Trichoderma* spp. é conhecida por produzir quitinases, β -1,3-glucanases, proteases e antibióticos voláteis e não voláteis (Elad et al., 1980). De acordo com Kubicek et al. (2011) *T. virens* e *T. atroviride* codificam um alto número de enzimas quitinolíticas. As quitinases sintetizadas por *Trichoderma* spp. mostram fortes atividades antifúngicas, catalisando a hidrólise da quitina, um componente importante de muitas paredes celulares de fungos, exoesqueletos de insetos e conchas de crustáceos e um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza (Collinge et al., 1993; Graham e Sticklen, 1994) depois da celulose (Campbell, 1996). Enzimas hidrolíticas permeabilizam e degradam a parede celular fúngica, como uma das principais etapas, numa infeção bem-sucedida (Karlsson et al., 2017; Köhl et al., 2019). Os relvados, nomeadamente os desportivos, são bastante suscetíveis a doenças transmitidas pelo solo (Barker, 2001) que causam enormes perdas económicas. O crescente interesse pela proteção do ambiente e da saúde pública aumentou o interesse por alternativas, para o controlo de doenças, mais amigas do ambiente, levando à procura de estratégias para reduzir o uso de produtos sintéticos, como fertilizantes e pesticidas

(Bonanomi et al., 2010). O recurso a fungicidas sintéticos para o controlo de fitopatogénicos no solo tem gerado problemas, como resistência a fungos, desequilíbrio do ecossistema por efeitos tóxicos de resíduos e riscos para a saúde humana e animal (Johnson e Atallah, 2006; Avilés et al., 2011).

Alguns compostos orgânicos apresentam capacidade supressiva contra doenças do solo, sendo *Trichoderma* spp. um fungo antagonista clássico, geralmente isolado de compostos. Neste trabalho, ao longo de dois anos, foi estudada a capacidade supressiva de dois compostos orgânicos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*, testando a sua capacidade no controlo biológico de doenças de relvados (*Agrostis stolonifera* L. cv. T1).

5.3. Material e métodos

Estes ensaios decorreram no *Campus* de Gambelas, Universidade do Algarve, Portugal (37°02'35.45"N, 7°58'20.64"W), numa estufa de aço, sem aquecimento, com cobertura de filme de polietileno e arejamento natural no telhado e nas paredes laterais. Para aumentar e estabilizar a humidade e a temperatura do ar, os ensaios foram mantidos sob um túnel colocado dentro da estufa. A temperatura e a humidade relativa do ar próximo das plantas foram registadas diariamente. A temperatura máxima variou entre 11 e 40 °C e a mínima entre 5 e 21.2 °C. A temperatura máxima média foi de 26.4 °C e a mínima média de 13.2 °C. A humidade do ar foi mantida acima de 57 %.

5.3.1. Preparação dos compostos e dos substratos

Dois compostos, P1 e P2, foram obtidos através da compostagem de resíduos agroindustriais, em pilhas com arejamento por revolvimento, durante 112 dias. O composto P1 foi obtido a partir de uma mistura de resíduos de laranja, provenientes de uma associação de agricultores; aparas de relva de um campo de golfe e bagaço de uva de uma adega, na proporção de 0.9:1.1:1 (v/v), respetivamente. O composto P2 foi produzido com as mesmas matérias-primas, às quais foram adicionados resíduos da produção de cogumelos (*Shiitake*), com a relação final de 1.8:0.2:1.5:0.5 (v/v). As diferentes proporções entre as pilhas visaram a obtenção de uma relação C/N inicial semelhante em ambas as pilhas. O volume inicial de cada pilha de compostagem foi de cerca de 1 m³ e ocorreu dentro de cilindros de rede metálica, protegidos por uma rede

plástica de sombreamento e geotextil para evitar perda excessiva de calor e humidade, permitindo a circulação natural do ar. Durante os processos de compostagem, foram monitorizados os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos conforme descrito por Coelho et al. (2020).

Os diferentes substratos e a turfa foram testados sem e com tratamento térmico e enriquecimento com *T. atroviride*, resultando em doze tratamentos diferentes: turfa (P) (Hansa Torf Floragard, Alemanha); compostos P1 e P2; os substratos anteriores submetidos a um tratamento térmico (t) a 60 °C durante sete dias, denominados Pt, P1t e P2t; substratos enriquecidos (E) PE, P1E e P2E, e os substratos submetidos a tratamento térmico e também PtE, P1tE e P2tE previamente enriquecidos (Figura 5.1).

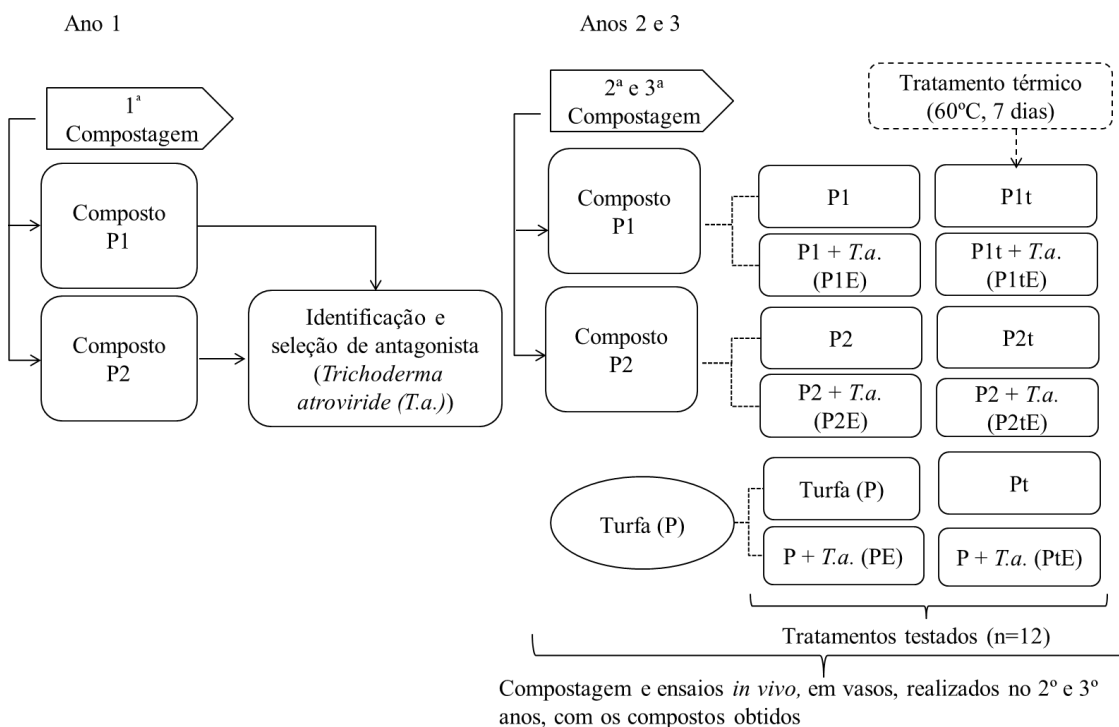


Figura 5.1: Esquema do ensaio, com os 12 tratamentos em estudo. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos sujeitos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*.

5.3.2. Enriquecimento do composto

De entre os fungos isolados dos compostos P1 e P2, *T. atroviride* foi o que apresentou os melhores resultados como agente de controlo biológico, com as maiores taxas de inibição

dos fungos fitopatogénicos estudados (Coelho et al., 2020). Preparou-se uma suspensão de *T. atroviride*, a qual foi obtida pela adição de 50 mL de água destilada esterilizada a placas de Petri onde o fungo cresceu durante sete dias. Esta suspensão continha 1.33×10^6 conídios mL^{-1} . P1, P2 e turfa (P) foram enriquecidos pela adição de 68 mL desta suspensão por litro de substrato, obtendo-se P1E, P2E e PE com 9.0×10^7 conídios L^{-1} nos substratos, os quais foram armazenados à temperatura ambiente e no escuro. Duas semanas após o enriquecimento, os compostos foram testados num ensaio de crescimento, *in vivo* (Figura 5.1).

5.3.3. Caracterização dos substratos

Após os processos de compostagem, foram avaliados os parâmetros físicos, químicos e biológicos dos compostos obtidos. O pH foi determinado em extrato aquoso (1:2 p/v) com um potenciómetro (Crison Micro pH, 2001), e a condutividade elétrica foi medida no mesmo extrato, após filtração, com um condutivímetro (Crison 522). Foram determinados os teores de matéria orgânica e mineral (Ramos et al., 1987), a matéria seca (Martinez, 1992), a relação C/N, o azoto e as populações microbianas. Os macro e micronutrientes foram determinados por um laboratório comercial (A2 Análises Químicas, Lda, Portugal), de acordo com a norma EN 13805:2002 / ICP-AES.

A quantificação das populações microbianas foi realizada através da enumeração do número de colónias obtidas em meios de cultura apropriados. As amostras dos substratos foram suspensas em solução salina tamponada com fosfato e foram preparadas diluições decimais seriadas, as quais foram inoculadas no meio de cultura adequado para o crescimento do microrganismo testado. Para a enumeração de fungos, bactérias aeróbias, actinomicetos e microrganismos quitinolíticos, os meios de cultura foram inoculados pela técnica de espalhamento em placa. Os fungos foram cultivados em *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Biokar, França) e incubados a 25 ± 2 °C por 24-48 h; bactérias aeróbias totais, foram cultivadas em *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid, Inglaterra), a 25 ± 2 °C por 24-48 h; actinomicetos, em 1/2PCA a 25 ± 2 °C por 24-48 h (Coelho et al., 2013); os microrganismos aeróbios quitinolíticos foram cultivados em meio de sal mineral (MSM) adicionado de quitina e agar, a 28 ± 2 °C durante 5 dias (Alfano et al., 2011). Todos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

5.3.4. Atividade enzimática

A atividade enzimática de todos os substratos (compostos e turfa) foi determinada usando o sistema API-ZYM™ (bioMérieux Italia, Roma, Itália), o qual avalia a atividade de 19 enzimas (Quadro 5.3). As galerias específicas foram inoculadas com 65 µL de uma suspensão de 1 g de substrato para 9 mL de solução salina estéril (NaCl 9.0 g L⁻¹). Após incubação, por 24 h a 37 °C, as galerias foram ativadas pela adição de 30 µL de Reagente ZYM A e Reagente ZYM B (bioMérieux Italia, Roma, Itália). De acordo com a cor desenvolvida em cada reação enzimática, foi atribuído um valor numérico, variando de 0 a 5, utilizando o quadro de cores fornecido pelo fabricante. Os resultados foram expressos como atividade relativa da enzima g⁻¹ de peso seco de compostos e turfa.

5.3.5. Avaliação da capacidade supressiva dos compostos

O efeito do enriquecimento dos compostos foi avaliado pela capacidade supressiva dos compostos em ensaios *in vivo*. Após enchimento de vasos com capacidade de 100 mL com cada um dos substratos, foi semeada relva (*Agrostis stolonifera* L.) na densidade correspondente a 10 g de semente m⁻². Os ensaios decorreram sob o túnel colocado dentro da estufa.

Quando a relva ocupou toda a superfície dos vasos procedeu-se à inoculação dos fungos patogênicos *Sclerotium rolfsii*, *Clariiredia* spp. (conhecida também como *Sclerotia homeocarpa* (Salgado-Salazar et al., 2018)) e *Rhizoctonia solani*. Em cada vaso foi colocado um disco de PDA de 6.5 mm de diâmetro com micélio em crescimento ativo. Para *S. rolfsii*, além do disco com micélio, foram adicionados dois esclerócios em cada vaso. Para cada doença, o ensaio foi delineado com quatro blocos completos casualizados, com doze tratamentos e cinco vasos por tratamento e bloco. Os substratos submetidos a tratamento térmico e inoculados com os patogênicos foram utilizados como controle positivo; substratos submetidos a tratamento térmico, mas não inoculados, foram o controle negativo. Para aumentar e estabilizar a humidade e a temperatura do ar, os vasos foram mantidos sob um túnel de polipropileno dentro da estufa. A temperatura e a humidade relativa do ar próximo às plantas foram registadas diariamente. A temperatura máxima variou entre 11 e 40 °C e a mínima entre 5 e 21.2 °C. A temperatura máxima média foi de 26.4 °C e a mínima média de 13.2 °C. A humidade do ar foi mantida acima de 57 %.

As plantas foram irrigadas por nebulização aérea para manter o teor de humidade alto. A adubação foliar foi aplicada semanalmente com fertilizante orgânico-mineral (Ret-Sul, Eibol, Espanha, com 18 % N-total, 0.75 Fe, 0.1 Mn, 9 % aminoácidos livres) na concentração recomendada pelo fabricante de 150 mL 100L⁻¹.

Estes ensaios foram repetidos duas vezes, com intervalo de dez meses, utilizando os compostos do 2º e 3º anos de compostagem, a partir do mesmo tipo de misturas (Figura 5.1).

Para os três fitopatogénicos estudados, o número de manchas da doença e a área afetada por cada doença foram registados semanalmente, em todos os vasos, para determinação da severidade e da incidência da doença. Para confirmar que os sintomas das plantas correspondiam a cada uma das doenças esperadas, foram inoculadas folhas com sintomas em meio de cultura PDA, procedendo-se à identificação dos fungos isolados, por macro e microscopia e por técnicas de biologia molecular. A identificação das espécies de fungos foi feita pela análise das sequências nucleotídicas da região ITS1-5.8S-ITS2 utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A severidade da doença foi avaliada numa escala de gravidade dos sintomas, adaptada de Baayen e Van der Plas (1992), onde: 0 = planta assintomática (0 % doença); 1 = planta muito pouco infetada (5 % de doença); 2 = sintomas ligeiros (20 %); 3 = sintomas bem desenvolvidos (50 %); 4 = fortes sintomas da doença em toda a área (80 %); 5 = plantas mortas (100 %).

A área sob curva de progresso da doença (AUDPC) foi determinada de acordo com Campbell e Madden (1990), mostrando uma velocidade crescente de desenvolvimento da doença. A AUDPC por vaso foi calculada pela severidade da doença integrada entre o início dos sintomas e a conclusão do ensaio e dividindo pela duração da epidemia, em dias, em cada ensaio, a fim de comparar os vários ensaios, que tiveram uma variedade de durações epidémicas, de acordo com:

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y = severidade da doença

t = tempo

O índice de controle biológico (BCI) e a eficácia foram calculados de acordo com Byrne et al. (2005). O BCI foi aplicado para combinar eficácia-consistência da redução da doença, conforme:

$$BCI = \frac{Eficácia}{Consistência}$$

A eficácia é indicada pela percentagem da redução média da doença e a consistência pelo desvio padrão dessas médias.

5.3.6. Análise estatística

O ensaio foi delineado com quatro blocos completos casualizados, com doze tratamentos e cinco vasos por tratamento e bloco. As propriedades químicas e microbiológicas dos substratos foram comparadas por análise de variância multifatorial (ANOVA) seguida pelo teste das amplitudes múltiplas de Duncan (*New Multiple-Range Test*). Os dados dos ensaios *in vivo*, como a incidência da doença, número de manchas da doença, área afetada pela doença, área sob curva de progresso da doença (AUDPC) e o índice de controle biológico (BCI) foram analisados por uma ANOVA e comparados através teste das amplitudes múltiplas de Duncan. A severidade da doença foi analisada e realizadas comparações múltiplas (todas aos pares) usando o teste de Kruskal-Wallis. A normalidade da distribuição amostral e a homogeneidade das variâncias foram verificadas antes dos testes ANOVA e Kruskal-Wallis (Zar, 1999; Field, 2009). No que respeita à análise estatística dos dados, nos dois anos consecutivos, foi usado o software IBM SPSS Statistics versão 25 (IBM Corp., 1989-2017, EUA).

5.4. Resultados e discussão

5.4.1. Caracterização dos compostos

Foram observadas algumas diferenças ($p < 0.05$) entre os compostos e a turfa utilizados como substratos (Quadro 5.1).

Quadro 5.1: Características dos substratos estudados.

	pH	EC (dS m ⁻¹)	OM	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	SO ₃	Fe	Mn
					(g 100g ⁻¹)					(mg.kg ⁻¹)	
P1	7.08c	1.58a	71.9e	2.05ab	0.77a	2.64b	2.09a	0.33ab	0.74a	602d	59.8a
P1t	7.60ab	1.71a	61.8f	1.83ab	0.71ab	2.34d	1.90b	0.31ab	0.64ab	620c	58.3a
P1E	7.08c	1.67a	77.0de	2.22a	0.56d	2.32d	1.68b	0.27b	0.62ab	467g	45.4bc
P1tE	7.52ab	1.90a	72.1e	2.17a	0.76a	2.51c	2.00b	0.32ab	0.45b	642b	60.1b
P2	7.35bc	2.33a	83.5bc	1.78ab	0.75a	2.79a	2.12a	0.34a	0.45b	467g	43.1cd
P2t	7.79a	2.26a	74.1de	1.65bc	0.69bc	2.53cd	2.03b	0.32ab	0.63ab	478f	42.7de
P2E	7.23bc	2.28a	89.9b	1.95ab	0.64c	2.47c	1.72b	0.29ab	0.67ab	702a	37.8e
P2tE	7.79a	2.21a	78.9cd	1.88ab	0.74a	2.61b	1.90b	0.33ab	0.72ab	521e	44.0bc
P	5.00d	0.10b	93.5a	1.18d							
Pt	4.93d	0.12b	93.5a	1.14d							
PE	5.06d	0.10b	94.7a	1.23cd							
PtE	4.73d	0.10b	95.7a	1.17d							

P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico (60 °C durante 7 dias); E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*; EC, condutividade eléctrica; OM, matéria orgânica; N, azoto. Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças entre si ($p < 0.05$), de acordo com o novo teste das amplitudes múltiplas de Duncan (*New Multiple-Range Test*).

Os substratos P1 e P2 sujeitos a tratamento térmico e tratamento térmico enriquecido com *Trichoderma* spp. apresentaram pH mais elevado, quando comparados com os compostos originais e enriquecidos (Quadro 5.1). Segundo Suárez-Estrella et al. (2013), a maior capacidade supressiva do composto é obtida quando o pH está próximo do neutro, a CE abaixo de 3 dS m⁻¹ e a matéria orgânica acima de 85 %. Os compostos estudados apresentaram características semelhantes às citadas por esses autores. O teor de matéria orgânica, superior a 85 %, foi registado em P2E (Quadro 5.1). Alguns autores verificaram que *T. harzianum* poderia solubilizar nutrientes de diferentes substratos, devido à

libertação de ácidos orgânicos e consequente acidificação do meio (Machado et al., 2012). Pang et al. (2017) também verificaram que o aumento do teor de matéria orgânica, azoto amoniacal, fósforo, potássio e azoto em fertilizantes orgânicos enriquecidos com *Trichoderma* spp., melhora a fertilização do solo e a sua biodiversidade. Esses autores também relataram que as plantas apresentaram maior biomassa e maior sistema radicular na presença de *Trichoderma* spp.. Esse aumento de nutrientes pode ser explicado pelo pH e pela microbiota do solo, o que afetará a disponibilidade de nutrientes para as plantas (Machado et al., 2012). O fósforo pode ser solubilizado e armazenado na biomassa de *Trichoderma* spp., sendo libertado posteriormente numa forma disponível para a planta (Halvorson et al., 1990).

Comparando os substratos tratados termicamente com os tratados termicamente e enriquecidos, verificou-se que o enriquecimento aumentou o teor de K_2O e Fe; P_2O_5 e Mn, dado que foram maiores em P2tE quando comparados com P2t (Quadro 5.1). Altomare et al. (1999) também verificaram que *Trichoderma harzianum*, em ensaios *in vitro*, apresentou capacidade de solubilizar MnO_2 , Zn, P_2O_5 e Fe, contribuindo para sua maior disponibilidade.

Como esperado, o enriquecimento dos compostos, com uma suspensão de 1.33×10^6 conídios mL^{-1} , contribuiu para o aumento das populações de fungos ($p < 0.05$). Resultados semelhantes foram verificados para as populações de *Trichoderma* spp. Na turfa, o enriquecimento não contribuiu para o aumento significativo das populações dos microrganismos estudados ($p < 0.05$). Nos substratos submetidos ao tratamento térmico, não foram quantificadas populações de *Trichoderma* spp. e as populações de fungos foram significativamente reduzidas, com predomínio de leveduras. A redução da microbiota do substrato pelo tratamento térmico favoreceu o desenvolvimento de *Trichoderma* spp. nos substratos enriquecidos (Quadro 5.2).

Quadro 5.2: Enumeração de populações microbianas (UFC g⁻¹ composto) nos diferentes substratos.

	Fungos	<i>Trichoderma</i> spp.	Bactérias	Actinomicetos	Quitinolíticos
P1	2.40x10 ⁶ c	3.07x10 ⁵ c	1.33x10 ⁶ b	5.47x10 ⁷ b	2.40x10 ⁷ b
P1t	2.20x10 ⁵ c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b
P1E	2.01x10 ¹⁰ b	1.91x10 ⁸ b	2.63x10 ⁸ b	8.70x10 ⁷ a	1.10x10 ⁸ b
P1tE	1.86x10 ⁶ c	9.52x10 ⁶ c	2.87x10 ⁶ c	8.00x10 ⁶ c	2.32x10 ⁶ b
P2	6.33x10 ⁶ c	8.27x10 ⁵ c	2.63x10 ⁷ c	4.63x10 ⁷ b	6.86x10 ⁷ b
P2t	1.00x10 ⁴ c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b
P2E	2.54x10 ¹¹ a	2.76x10 ⁸ a	2.69x10 ⁹ a	7.50x10 ⁷ a	2.16x10 ⁹ a
P2tE	2.68x10 ⁷ c	9.25x10 ⁶ c	3.33x10 ⁷ c	4.00x10 ⁶ c	2.31x10 ⁶ b
P	2.83x10 ⁵ c	2.00x10 ⁴ c	9.20x10 ⁶ c	1.09x10 ⁷ c	2.14x10 ⁵ b
Pt	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b
PE	1.36x10 ⁶ c	5.97x10 ⁶ c	3.00x10 ⁶ c	2.93x10 ⁶ c	2.03x10 ⁶ b
PtE	7.77x10 ⁵ c	4.80x10 ⁶ c	4.37x10 ⁶ c	9.9x10 ⁶ c	2.31x10 ⁶ b

P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substrato enriquecido com *Trichoderma atroviride*. Para cada coluna, valores com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas (p < 0.05), de acordo com o novo teste de amplitudes múltiplas de Duncan (*New Multiple-Range Test*).

As maiores populações de bactérias foram quantificadas em P2E, e as de actinomicetos em P2E e P1E. Esses microrganismos não foram isolados, como seria de esperar, nos substratos tratados termicamente. Os microrganismos quitinolíticos apresentaram a maior população em P2E, como esperado, uma vez que foram adicionados resíduos de cogumelos à pilha de compostagem (Quadro 5.2).

5.4.2. Atividade enzimática

Os compostos estudados apresentaram atividade enzimática elevada, tal como observado por Alfano et al. (2011). A maioria das 19 enzimas testadas, estava presente nos substratos à base de composto. Como esperado, os substratos submetidos a tratamento térmico e enriquecidos com *T. atroviride* apresentaram menor atividade que os substratos não tratados e enriquecidos. O reduzido número de populações microbianas observado na turfa explica os valores baixos relativos à atividade enzimática (P e Pt). No entanto, após o enriquecimento da turfa com *T. atroviride*, a atividade enzimática deste substrato

aumentou, principalmente para as enzimas fosfatase alcalina, fosfatase ácida, β -glicosidase e N-acetil- β -glucosaminidase (Quadro 5.3).

Quadro 5.3: Atividade enzimática nos substratos (atividade relativa enzimática g⁻¹).

Enzima ²	Substratos ¹											
	Composto P1				Composto P2				Turfa			
	P1	P1t	P1E	P1tE	P2	P2t	P2E	P2tE	P	Pt	PE	PtE
1	4.0ab	4.0ab	4.5a	4.0ab	5.0a	5.0a	5.0a	2.0cd	1.0de	0.0e	3.5abc	2.5bcd
2	4.0ab	2.0bc	4.5a	0.0c	5.0a	2.0bc	5.0a	1.0c	1.0c	0.0c	2.0bc	0.5c
3	4.0ab	4.0ab	4.0ab	4.0ab	5.0a	4.0ab	5.0a	1.5cd	1.0d	0.0d	3.0bc	1.5cd
4	4.0ab	0.0e	4.0ab	3.0bc	5.0a	4.0ab	5.0a	1.5cde	0.0e	0.0e	2.0cd	1.0de
5	4.0a	4.0a	4.0a	3.0ab	4.0a	4.0a	4.0a	2.5ab	1.0b	1.0b	2.0ab	0.5b
6	4.0a	2.0abc	4.0a	3.0ab	4.0a	3.0ab	4.0a	2.0abc	0.0c	0.0c	2.5ab	1.0bc
7	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	4.0a	2.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b
8	4.0a	0.0c	4.0a	4.0a	4.0a	2.0b	4.0a	2.0b	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c
9	4.0a	0.0c	4.0a	4.0a	4.0a	0.0c	4.0a	2.0b	0.0c	1.0bc	0.0c	0.0c
10	4.5a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	2.5ab	1.0b	1.0b	4.0a	2.5ab
11	4.0a	2.0b	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	0.5b	1.0b	1.0b	1.5b	0.5b
12	2.5abc	3.0ab	3.0ab	3.0ab	4.0a	2.0bc	4.0a	1.5bcd	0.0d	1.0cd	2.5abc	1.5bcd
13	5.0a	5.0a	5.0a	4.0ab	5.0a	3.0bc	4.0ab	2.5bcd	1.0d	1.0d	3.0bc	1.5cd
14	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	3.0ab	4.0a	2.0ab	1.0b	1.0b	3.0ab	2.0ab
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16	4.0a	3.0ab	4.0a	4.0a	4.0a	3.0ab	4.0a	2.5ab	0.0c	0.0c	3.0ab	2.0b
17	4.0ab	0.0c	5.0a	4.0ab	4.5ab	4.0ab	5.0a	2.5b	0.0c	0.0c	4.0ab	2.5b
18	0.0c	0.0c	2.0b	0.0c	0.0c	0.0c	4.0a	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c
19	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	3.5a	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	2.0ab	0.0b

¹ t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*.

² 1 – Fosfatase alcalina; 2 – Esterase (C 4); 3 – Esterase Lipase (C 8); 4 – Lipase (C 14); 5 – Leucina arilamidase; 6 – Valina arilamidase; 7 – Cistina arilamidase; 8 – Tripsina; 9 – α -quimotripsina; 10 – Fosfatase ácida; 11 – Naftol-AS-BI-fosfohidrolase; 12 – α -galactosidase; 13 – β -galactosidase; 14 – β -glucuronidase; 15 – α -glucosidase; 16 – β -glucosidase; 17 – N-acetil- β -glucosaminidase; 18 – α -manosidase; 19 – α -fucosidase. Para cada linha, os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas para p < 0.05 (Teste de Duncan).

O composto P2 apresentou maior atividade enzimática que o P1. Quando os compostos foram enriquecidos com *T. atroviride*, a sua atividade enzimática aumentou: em P1, nomeadamente fosfatase alcalina, esterase (C 4) e N-acetil- β -glucosaminidase; em P2, cistina arilamidase, N-acetil- β -glucosaminidase e α -manosidase (Quadro 5.3).

A quitina é um polímero ligado a β -(1,4)-N-acetil-B-glucosamina (Brzezinska et al., 2014), e N-acetil- β -glucosaminidase é uma exoquitinase (Gortari e Hours, 2008),

portanto parece razoável que a atividade da N-acetil- β -glucosaminidase tenha sido superior em P2 e nos substratos enriquecidos, considerando o maior teor de quitina nestes substratos. *Trichoderma* spp. é conhecido como produtor de N-acetilglucosaminidases, endoquitinases e uma quitibiosidase glucosamina (Brzezinska et al., 2014). Sabe-se que a β -glucosaminidase possui atividade antifúngica e está envolvida no controle biológico de fungos fitopatogênicos (Lorito et al., 1994). Esta atividade tem sido associada à presença de *Trichoderma* spp. e tem efeito no biocontrole de *R. solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Brunner et al., 2003). Avilés e Borrero (2017), usando composto de bagaço de azeitona para controlar a murchidão causada por *Verticillium*, verificaram que quando a atividade da N-acetil- β -glucosaminidase deixou de ser observada, a supressividade do composto foi parcialmente reduzida. Além disso, o maior teor de lipase em P2 e P2E, pode estar associado às maiores populações de fungos com capacidade de penetrar na cutícula do hospedeiro, constituída por quitina (Homthong et al., 2016), contribuindo para o controle biológico da doença transmitida pelo solo (Homthong et al., 2016; Boat et al., 2019).

Segundo Monteiro et al. (2010), a presença de fosfatase ácida pode desempenhar um papel no micoparasitismo de *Trichoderma* e na hidrólise da parede celular dos fitopatogênicos. Os compostos apresentaram maior atividade desta enzima e de outras fosfatases (Quadro 5.3). A leucina arilamidase, envolvida na liberação de um aminoácido N-terminal de peptídeos, amidas ou arilamidases, foi encontrada em P1 e P2, bem como em P1E e P2E (Quadro 5.3).

A alta atividade da β -glicosidase verificada em P1, P2, P1E e P2E pode indicar a existência de competição por compostos de carbono e, portanto, ser um indicador de microbiostase (Borrero et al., 2009).

5.4.3. Avaliação da capacidade supressiva dos compostos

5.4.3.1 *Clarireedia* spp.

No final do ensaio, a área afetada por *Clarireedia* (gen. nov) spp. foi significativamente inferior nos substratos P1 e P1E, sem diferenças estatísticas em relação a P2E ($p < 0.05$) (Figura 5.2).

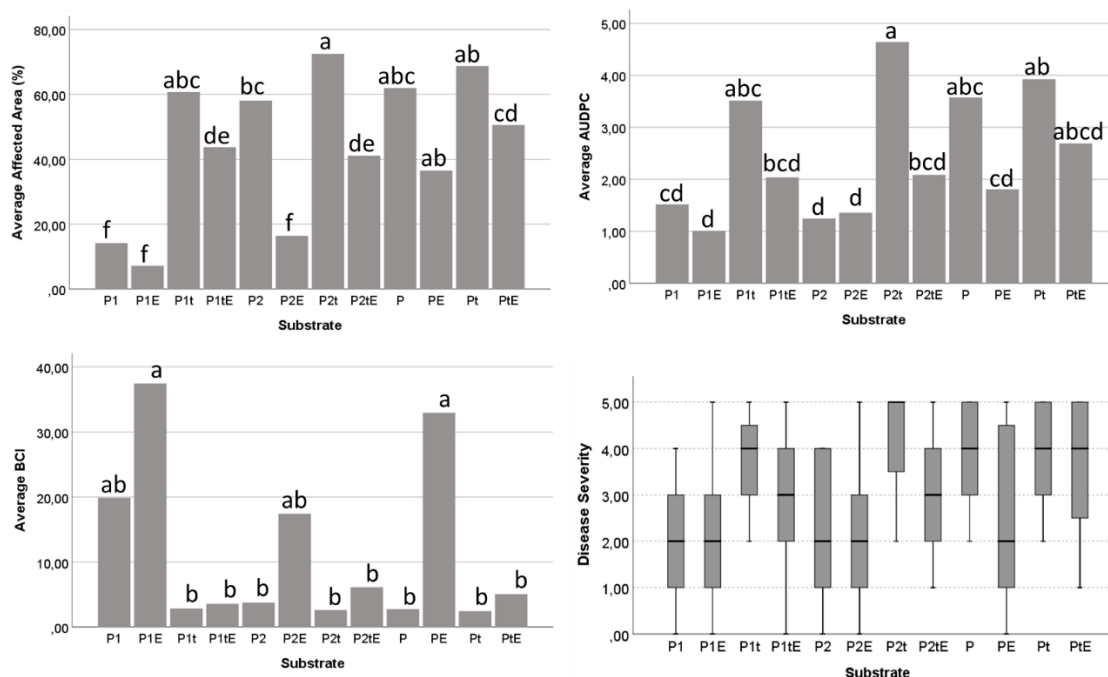


Figura 5.2: Eficácia dos compostos no controlo biológico de *Clarireedia* (gen. nov) spp.. *Average Affected Area*, Média da área afectada; *Average BCI*, média do índice de controlo biológico; *Average AUDPC*, área média sob o progresso da curva da doença; *Disease Severity*, Severidade da doença; P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. As barras com diferentes letras apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$ (Teste de Duncan).

Quando comparados com os substratos tratados termicamente, os enriquecidos apresentaram redução na área afetada de 53.5 % (P1E) e 56.1 % (P2E). Foi verificada uma correlação negativa entre o teor de azoto e a diminuição de *Clarireedia* spp. (Coelho et al., 2020). Neste ensaio, embora não se verifiquem diferenças significativas, os níveis

de azoto foram maiores em P1 (Figura 5.2 e Quadro 5.1), o que pode ter contribuído para um melhor controlo da doença. A aplicação de azoto contribuiu para a redução desta doença, sendo recomendada como medida cultural para seu controlo (Tani e Beard, 1997; Walsh et al., 1999). Em P1E, o maior teor de azoto associado às populações microbianas, nomeadamente *Trichoderma* spp., terá contribuído para um maior controlo da doença (Figura 5.2). O enriquecimento de P2 (P2E) conduziu à redução da área afetada quando comparado a P2 ($p < 0,05$) (Figura 5.2), porém não foram observadas diferenças entre P1 e P1E. As populações de *Trichoderma* spp. no composto P2E controlaram o crescimento de *Claviceps* spp., conforme relatado por Coelho et al. (2016). Esses autores observaram que *T. gamsii* foi eficiente no controlo do crescimento de *S. homeocarpa*, em relvados, onde foram observados menos sintomas de *dollar spot*. O enriquecimento de P1 (P1E), apesar da maior população de *Trichoderma* spp. não aumentou a proteção das plantas em comparação com P1. Provavelmente, o teor de azoto associado à população de *Trichoderma* spp. em ambos os substratos (P1 e P1E) reforçou a capacidade de controlo da doença. No entanto, os substratos submetidos ao tratamento térmico mostraram menor capacidade de controlar a doença (Figura 5.2), devido à redução de microrganismos, nomeadamente agentes de controlo biológico (Quadro 5.2/Figura 5.2), evidenciando a relevância dos antagonistas no controlo desta doença. Além disso, o controlo de *Claviceps* spp. com recurso a aplicações de azoto, pode trazer outros problemas no controlo de doenças, nomeadamente *R. solani*. Townsend et al. (2018) constataram que para atingir um controlo de 30 a 50 % de *dollar spot*, são necessárias quantidades elevadas de azoto, tornando a medida impraticável.

O BCI não apresentou diferenças significativas entre P1, P1E, P2E e PE ($p > 0.05$). A AUDPC foi maior nos substratos submetidos a tratamento térmico ($p < 0.05$). A severidade da doença apresentou diferenças significativas, $H(11) = 129.79$, $p < 0.001$ e P1E, P1, P2E e P2 mostraram a menor severidade da doença (Figura 5.2).

Claviceps (gen. nov) spp. é uma das principais causas da doença *dollar spot* em relvados. As aplicações de compostos enriquecidos com *T. atroviride* podem ser uma alternativa viável, às técnicas tradicionais, para reduzir a ocorrência de *dollar spot*.

5.4.3.2 *Sclerotium rolfsii*

No final do ensaio, as plantas inoculadas com *S. rolfsii* e cultivadas nos substratos enriquecidos com *T. atroviride* (P1E e P2E) e em P2 apresentaram a menor área afetada ($p < 0.05$) (Figura 5.3).

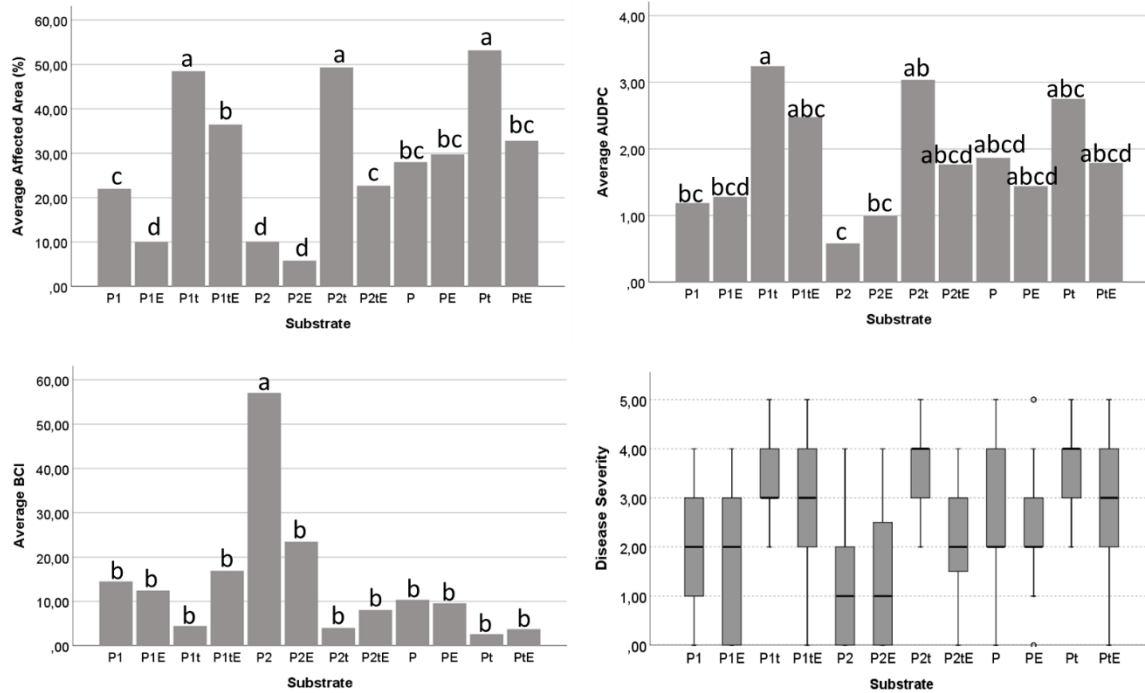


Figura 5.3: Eficácia dos compostos no controle biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Average Affected Area*, média da área afetada; *Average BCI*, média do índice de controle biológico; *Average AUDPC*, área média sob o progresso da curva da doença. *Disease severity*, severidade da doença. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. As barras com diferentes letras apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

Os substratos submetidos a tratamento térmico apresentaram a maior área afetada ($p < 0.05$), destacando o efeito dos microrganismos no controle de doenças das plantas. Para este fungo, houve um decréscimo de 38.5 % em P1E, comparando com P1t e de 43.5 % em P2E, comparado com P2t. Situação semelhante foi registrada para a severidade da doença ($p < 0.05$). AUDPC apresentou os maiores valores nos substratos com tratamento térmico (P1t, P2t e Pt) ($p < 0.05$). Os restantes tratamentos não apresentaram diferenças significativas, porém P2 apresentou os melhores resultados, indicados pelo menor índice AUDPC, sendo este substrato o que apresentou maior BCI, com valores

significativamente superiores aos restantes substratos. A severidade da doença apresentou diferenças significativas, $H(11) = 155.35$, $p < 0.001$ e P2, P2E, P1E e P1 mostraram a menor severidade da doença. Comparando os substratos tratados termicamente, quando enriquecidos, o controlo da doença foi melhorado, conforme indicado pela área afetada e pelos índices de severidade da doença (Figura 5.3). Nos compostos, esclerócios de *S. rolfsii* foram infetados por fungos antagonistas, tendo sido observado que *Trichoderma* spp. é o antagonista primário, colonizando esclerócios, independentemente das condições ambientais, conforme referido por Zmora-Nahum et al. (2008) e Reis (2016). Coelho et al. (2020), em ensaios *in vitro*, mostraram que *T. atroviride*, isolado de compostos orgânicos, provocou uma percentagem de inibição superior a 58.5 %, quando confrontada com *S. rolfsii*, prevenindo o desenvolvimento de esclerócios.

5.4.3.3 *Rhizoctonia solani*

Quando a relva foi inoculada com *R. solani*, verificou-se que o enriquecimento dos substratos aumentou a proteção das plantas, indicado pela diminuição da área afetada e pela severidade da doença, tanto em P1 quanto em P2 ($p < 0.05$) (Figura 5.4).

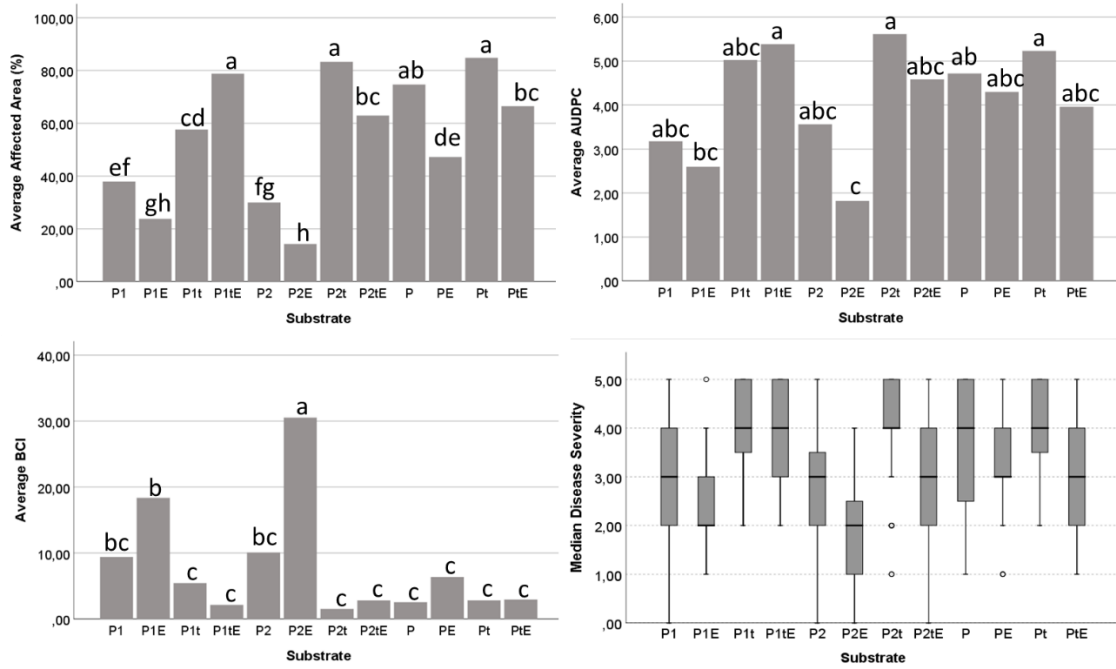


Figura 5.4: Eficácia dos compostos no controlo biológico de *Rhizoctonia solani*. *Average Affected Area*, média da área afectada; *Average BCI*, média do índice de controlo biológico; *Average AUDPC*, área média sob o progresso da curva da doença. *Disease severity*, severidade da doença. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. As barras com diferentes letras apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$ (Teste de Duncan).

Em relação aos substratos tratados termicamente, houve um decréscimo de 36.9 % em P1E e de 69.3 % em P2E. No entanto, o BCI apresentou diferenças significativas apenas em P2 ($p < 0.05$). Para AUDPC não se verificou efeito do enriquecimento, quando comparado aos substratos originais (P1 e P2) ($p > 0.05$). No entanto a severidade da doença apresentou diferenças significativas, $H(11) = 123.32$, $p < 0.001$, mostrando P2E o valor mais baixo de severidade seguido de P1E. Assim, comparando os doze tratamentos estudados, a área afetada e a severidade da doença foram menores em P2E, que apresentou o maior valor de BCI ($p < 0.05$). Estes resultados mostraram que o enriquecimento dos substratos com *T. atroviride* foi eficaz, aumentando o controlo do crescimento de *R. solani*. O composto P2 destaca-se pela maior população de *Trichoderma* spp., parte da qual já existia no composto antes do enriquecimento, o que pode estar associado à incorporação de resíduos ricos em quitina na mistura de compostagem. Coelho et al. (2020) relataram uma correlação positiva entre as populações de *Trichoderma* spp. e o BCI. A ação entre *Trichoderma* spp. e *R. solani*, é caracterizada

como supressividade específica, a qual resulta da ação de um ou mais antagonistas, nos quais *Trichoderma* spp. tem um papel importante (Reis, 2016). Além disso, as propriedades químicas do substrato podem influenciar o controlo de *R. solani*, nomeadamente o seu teor de fósforo, que pode ser solubilizado por *T. atroviride*, aumentando assim o seu teor. Altomare et al. (1999) descreveram que *Pythium* spp. e *Rhizoctonia* spp. não solubilizam fosfatos. Este facto pode ser usado a favor de *Trichoderma*, que ao solubilizar o P_2O_5 , melhora o controlo da doença. Além disso, o teor de azoto, menor nos substratos de P2 (Quadro 5.1), pode ter contribuído para o melhor desempenho desses substratos no controlo de *R. solani*, conforme citado por Tani e Beard (1997) e Tredway e Burpee (2001). O controlo de *R. solani* por *Trichoderma* spp. é conseguido através de um complexo processo micoparasitário, através do qual o antagonista produz enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro e o matam (Harman et al., 2004). A atividade de enzimas como a β -glucosaminidase, que é maior em substratos enriquecidos (Quadro 5.3), também terá contribuído para um maior controlo da doença (Brunner et al., 2003).

O enriquecimento de compostos com *Trichoderma* spp. melhorou sua eficácia como agentes de controlo de doenças, tal como verificado por outros autores (Avilés et al., 2011). As menores populações microbianas e atividade enzimática observadas na turfa (Quadro 5.2 e Quadro 5.3), em comparação com os compostos enriquecidos, podem explicar a baixa contribuição da turfa para o controlo de doenças, como observado por Alfano et al. (2011).

5.5. Conclusões

O enriquecimento de compostos orgânicos com *T. atroviride* aumentou alguns teores de nutrientes, como o potássio e o ferro. As maiores populações de microrganismos nos compostos enriquecidos aumentaram a atividade enzimática nestes compostos, particularmente de N-acetil- β -glucosaminidase.

O enriquecimento do composto contribuiu também para o controlo biológico de *S. rolfsii*, *Clariiredia* spp. e *R. solani*. Houve diminuição da área afetada por *Clariiredia* spp. em P1, sendo menor em P1E devido ao maior teor de azoto e às populações de *Trichoderma*

spp.. A população de *Trichoderma* em P2E terá contribuído para a maior eficácia deste substrato no controlo de *R. solani* e *S. rolfsii*.

Este trabalho permitiu concluir que os compostos orgânicos enriquecidos com *T. atroviride*, aplicados em relva, irão aumentar a sua sustentabilidade promovendo o controlo biológico de doenças com reduzida aplicação de pesticidas. Em campos de golfe, a aplicação de composto pode ser feita não apenas como *topdressing* (cobertura), mas especialmente como uma operação de *coring* (perfuração oca da relva), um procedimento de manutenção atual, usando uma mistura de areia e composto em vez de apenas areia, tradicionalmente aplicada. Com esta operação, o composto pode ser incorporado nos primeiros centímetros do perfil do solo, em condições mais próximas às testadas no ensaio de vaso.

5.6. Referências

- Al-Ani, L., 2018. Trichoderma: Beneficial Role in Sustainable Agriculture by Plant Disease Management. In: Egamberdieva, D., Ahmad, P. (Eds.). Plant Microbiome: Stress Response. Springer, pp. 105-126. doi: 10.1007/978-981-10-5514-0_5
- Alfano, G., Lustrato, G., Lima, G., Vitullo, D., Ranalli, G., 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. Biol. control 58, 199-207. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.05.001
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl Environ Microbiol 65 (7), 2926-2933. doi: 10.1128/AEM.65.7.2926-2933.1999
- Avilés M., Borrero, C., Trillas, M.I., 2011. Review on compost as an inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. Dyn Soil Dyn Plants 5, 1-11.
- Avilés, M., Borrero, C., 2017. Identifying characteristics of *Verticillium* wilt suppressiveness in olive mill composts. Plant disease 101 : 1568-1577. doi : 10.1094/PDIS- 08- 16- 1172- RE
- Baayen, R.P., Van der Plas, C.H., 1992. Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to *Fusarium* wilt. Euphytica 59, 165-174.
- Barker, A.V., 2001. Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), Compost utilization in horticultural cropping systems. Lewis Publications, Boca Raton, pp.201-225
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Códon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol 7, 249-260. doi: 10.2436/im.v7i4.9480

- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Intrigliolo, F., Pascual, A., 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutriactive and biocontrol effects. *Bioresour. Technol.* 99 (18), 8722-8728. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.019
- Boat, M.A.B., Sameza, M.L., Iacomini, B., Tchameni, S.N., Boyom, F.F., 2019. Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biological potential of common bean damping-off pathogens. *Biocontrol Science and Technology* 30 (3), 228-242. doi: 10.1080/09583157.2019.1700909
- Borrero, C., Trillas, I., Avilés, M., 2009., Carnation Fusarium wilt suppression in four compost. *Eur J Plant Pathol* 123, 425-433. doi: 10.1007/s10658-008-9380-4
- Brunner, K., Peterbauer, C.K., Mach, R.L., Lorito, M., Zeilinger, S., Kubicek, C.P., 2003. The Nag I N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43: 289-295. doi: 10.1007/s00294-003-0399-y
- Byrne, J.M., Dianase, A.C., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control* 32, 408-418. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.12.001
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 136-144.
- Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience, New York.
- Campbell, N.A., 1996. *Biology*. Benjamin Cummings NY. 4th edition. p. 23.
- Chérif, M., Benhamou, N., 1990. Cytochemical Aspects of Chitin Breakdown During the Parasitic Action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80: 1406-1414
- Coelho, L., Dionísio, L., Bueno, F., Reis, M., Duarte, J., Guerrero, C., 2016. *Trichoderma gamsii* as a biological control agent of turfgrass diseases. In: Guerrero, C., editor, Book of Abstracts of the 5th European Turfgrass Society Conference – Turfgrass – Towards Sustainability and Perfection for Aesthetic, recreational and Sports, Albufeira, Portugal, pp. 145-146.
- Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L., 2013. Culture media performance on the detection of actinomycetes from composts. *Acta Hortic.* 1013, 473-478. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.1013.58
- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M., 2020. Use of organic composts to suppress turfgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. *Biol. Control*, 141, 104154 doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104154
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., 1993. Plant Chitinases. *Plant Journal* 3, 31-40.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use a sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 34, 467-476.

- Elad, Y., Chet, I., Katan, J., 1980. *Trichoderma harzianum*: A Biological Control Agent Effective Against *Sclerotium rolfisii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121
- Field, A. 2009. *Discovering Statistics using SPSS*, 3rd Edition. SAGE, Los Angeles, London, New Dehli, Singapore, Washington DC, pp 821.
- Gortari, M.C., Hours, R.A., 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycol Progress* 7(4), 221-238. doi: 10.1007/s11557-008-0571-3
- Graham L.S., Sticklen M.B., 1994. Plant Chitinases. *Can J Bot* 72, 1057–1083.
- Halvorson, H.O., Keynan, A., Kornberg, H.L., 1990. Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol. Biochem.* 22, 887–890. doi: 10.1016/0038-0717(90)90125-J
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2, 43 – 56. doi: 10.1038/nrmicro797.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Díaz-Mínguez, J.M., Iturriaga, E.M., 2000. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38, 343-350. doi: 10.1007/s002940000173
- Hermosa, R., Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S., 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology* 16, 69-80. doi: 10.2436 / 20.1501.01.181
- Hoitink, H.A.J., Krause, M.S., Han, Y., 2001. Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.). *Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 263–274.
- Homthong, M., Kubera, A., Srihuttagam, M., Hongtrakul, V., 2016. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp.. *Agric. Nat. Resour.* 50, 232-242. doi: 10.1016/j.anres.2015.09.005
- Johnson, D.A., Atallah, Z.K., 2006. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. *Plant Disease* 90, 755-758. doi: 10.1094/PD-90-0755
- Karlsson, M., Atanasova, L., Jensen, D., Zeilinger, S., 2017. Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *Microbiol. Spectrum* 5 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0016-2016
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, J., 2019. Mode of Action Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front.Plant Sci.* 10, 1-19. doi: 10.3389/fpls.2019.00845
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L.D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M.G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Culpier, F., Deshpande, N., Döhren, H., Ebbole, D.J., Esquivel-Naranjo, E.U., Fekete, E., Flipphi, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-

- Oñate, M., Karaffa, L., Kosti, I., Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P.S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E.E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J.A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H.H., Zhang, M., Coutinho, P.M., Kenerley, C.M., Monte, E., Baker, S.E., Grigoriev, I.V. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 12: R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40
- Liu, L., Sun, C., He, X., Liu, X., Wu, H., Liu, M., Tang, C., Zhang, Y., 2016. The secondary compost products enhances soil suppressive capacity against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Soil Biol.* 75, 70-78. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.04.005
- López-Mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M., Pascual, J.A., 2012. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *In vitro* and greenhouse nursery experiments. *Pestic Biochem Phys* 103, 1-8. doi: org/10.1016/j.pestbp.2012.02.001
- Lorito, M., Hayes, C.K., Dipietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E., 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an *N*-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 84: 398-405.
- Machado, D.F.M., Parzianello, F.R., Silva, A.C.F., Antonioli, Z.I., 2012. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o Bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 26, 274-288.
- Martinez, F.X., 1992. Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los substratos. *Actas de las I Jornadas de Substratos de la SECH* 294, 55-65.
- Monteiro, V.N., Silva, R.D., Steindorff, A.S., Costa, F.T., Noronha, E.F., Ricart, C.A.O., de Sousa, M.V., Vainstein, M.H., Ulhoa, C.J., 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr. Microbiol.* 4, 298-305.
- Nandakumar, R., Babu, S., Raguchander, T., Samiyappan, R., Viswanathan, R., 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 33, 603-612 doi: 10.1016/S0038-0717(00)00202-9
- Ntougias, S., Papadopoulou, K.K., Zervakis, G.I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., 2008. Suppression of soil-borne pathogens of tomato by composts derived from agro-industrial wastes abundant in Mediterranean regions. *Biol. Fertil. Soil* 44: 1081-1090. doi: 10.1007/s00374-008-0295-1
- Pang, G., Cai, F., Li, R., Zhao, Z., Li, R., Gu, X., Shen, Q., Chen, W., 2017. *Trichoderma*-enriched organic fertilizer degeneration of monocropped soil to maintain better plant growth. *Plant soil*. 416, 181-192. doi: 10.1007/s11104-017-3178-0
- Ramos, J.C.M., Vilaseca, J.S., Ramon, A.C., 1987. Control analític de la qualitat del compost i estudi de la seva maduració, In: *Server del Medi Ambient, Diputació de Barcelona*, (Ed.). *Experiències amb el compost. Estudis I monografies*: 12, pp. 31-69.
- Reis, M., 2016. Os compostos no controlo das doenças das plantas. *Revista de Ciências Agrárias* 39 (1), 25-35. doi:10.19084/RCA15111

- Roe, N.E., 2001. Compost effects on crop growth and yield. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), Compost utilization in horticultural cropping systems. Lewis Publications, Boca Raton, pp. 123-134
- Salgado-Salazar, C., Beirn, L.A., Ismaiel, A., Boehm, M.J., Carbone, I., Putman, A.I., Tredway, L.P., Clarke, B.B., Crouch, J.A., 2018. *Clarireedia*: A new fungal genus comprising four pathogenic species responsible for dollar spot disease of turfgrass. Fungal Biol. 122, 761-773. doi: 10.1016/j.funbio.2018.04.004
- Sandhya, C., Adapa, L.K., Nanpoothiri, M., Binod, P., Szakacs, G., Pandey, A. 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. J. Basic Microbiol. 44 (1), 49-58. doi: 10.1002 / jobm.200310284
- Segarra, G., Casanova, E., Borrero, C., Avilés, M., Trillas, M., 2007. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. Eur. J. Plant Pathol. 117, 393-402. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-11242
- Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., Trillas, I., 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. Phytopathologia Mediterranea, 52 (1): 77-83.
- Suárez-Estrella, F., Arcos-Vievas, M.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Moreno, J., 2013. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. Biol Control 67, 509-515. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.008
- Tani, T., Beard, J.B., 1997. Color Atlas of Turfgrass Diseases. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Townsend, R.V., Nangle, E., Koch, P.L. 2018. Dollar spot severity and acid oxalic production by nitrogen fertilization in creeping bentgrass. 6th ETS Conference 2018 – Different Shades of Green. 2nd-4th July. Manchester, UK, pp. 164-65
- Tredway, L.P., Burpee, L.L., 2001. Rhizoctonia diseases of turfgrass. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-1109-01.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. Biol Control 39, 32-38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.05.007
- Val-Moraes, S.P., 2015. Suppressiveness in Different Soils for *Rhizoctonia solani*. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.). Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Springer, pp. 175-184.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampally, R.Y., Valero, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp., Panoply of biological control. Biochem. Eng. J. 37, 1-20.
- Viswanathan, R., Samiyappan, R., 2001. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in sugarcane. Microbiol. Res. 155, 309-314. doi: 10.1016/S0944-5013(01)80009-4
- Walsh, B., Ikeda, S.S., Boland, G.J., 1999. Biology and Management of Dollar Spot (*Sclerotinia homoeocarpa*); an Important Disease of Turfgrass. HortScience 34(1), 13-21. doi:10.21273/hortsci.34.1.13

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Sninsky J.J., White, T.J. (Eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications, Innis MA, Gelfand DH, Academic Press, New York, New York, pp. 315–322.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zhang, W., Han, D.Y., Dick, W.A., Davis, K.R., Hoitink, H.A.J., 1998. Compost and Compost Water Extract-Induced Systemic Acquired Resistance in Cucumber and Arabidopsis. *Phytopathology* 88 (5), 450-455.
- Zmora-Nahum, S., Danon, M., Hadar, Y., Chen, Y., 2008. Chemical properties of compost extracts inhibitory to germination of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biol Biochem* 40, 2523-2529. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.06.025

6. CAPÍTULO 6

Efeito do armazenamento na capacidade supressiva dos compostos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*

O conteúdo deste capítulo foi submetido à revista Biological control, a 07 de setembro de 2022.

Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M. **The influence of the storage period on the suppressive capacity of composts enriched with *Trichoderma atroviride*.**

6.1. Resumo

A aplicação de compostos ao solo pode favorecer o controlo de doenças, melhorando simultaneamente a sua fertilidade, contribuindo para a economia circular na agricultura. A atividade dos microrganismos antagonistas presentes nos compostos favorecem o controlo biológico de doenças do solo, o qual pode ser alcançado de diferentes formas, sendo *Trichoderma* spp. um dos fungos antagonistas mais conhecidos.

Foi avaliado o efeito do período de armazenamento dos compostos, enriquecidos com *Trichoderma atroviride*, no controlo de *Rhizoctonia solani*, *Claviceps* spp. e *Sclerotium rolfsii* em relva (*Agrostis stolonifera* L. cv. T1). Para tal, no final dos processos de compostagem, os dois compostos obtidos foram enriquecidos com *T. atroviride* e armazenados à temperatura ambiente e no escuro. Os compostos enriquecidos foram testados *in vivo*, aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento. Foi usada relva para avaliar a capacidade supressiva dos compostos, a qual foi semeada em vasos de 100 mL e, quando cobriu toda a área do vaso, foi inoculada com os fungos patogénicos. Determinou-se a incidência e a severidade das doenças, a AUDPC e o BCI. Os compostos enriquecidos mostraram um melhor controlo das doenças durante o período de armazenamento. Em ambos os compostos, com e sem enriquecimento, verificou-se uma diminuição da supressividade aos 12 meses de armazenamento, mais acentuada nos compostos não enriquecidos.

Palavras-chave: *Agrostis stolonifera*; fungos antagonistas; biocontrolo; compostagem; agricultura biológica

6.2. Introdução

A compostagem é um processo que permite a conversão de resíduos orgânicos em compostos, produtos com características melhoradas para serem utilizados na agricultura como fertilizantes ou no controlo de doenças de plantas (Golueke, 1991; Boulter et al., 2000; Cotxarrera, et al., 2002; Borrero et al., 2009; Alfano et al., 2011; Castaño et al., 2011; Castaño et al., 2013; Jambhulkar et al., 2015; Liu et al., 2016). Recentemente, tem-se verificado um aumento no interesse pela compostagem, devido à procura de métodos de tratamento de resíduos ambientalmente favoráveis, à necessidade de aumentar a

circularidade na agricultura e o aumento da procura de produtos agrícolas biológicos (Antil et al., 2014). O biocontrolo, através dos microrganismos presentes nos compostos, é uma abordagem alternativa e atrativa para o controlo de doenças das plantas, que contribui para a economia circular por ser uma opção sustentável e ambientalmente compatível, evitando o impacto negativo dos fitofármacos sintéticos, tanto na saúde humana como no meio ambiente (Barker, 2001; Stowell e Gelernter, 2001; Trillas et al., 2006; Dempsey et al., 2012; Gan e Wickings, 2017; Ram et al., 2019).

O controlo biológico de doenças de plantas, com recurso aos compostos orgânicos, depende da diversidade da comunidade microbiana, em particular da presença de espécies com capacidade competitiva contra os organismos patogénicos (Liu et al., 2016). A supressividade do composto está associada à atividade microbiana que interage com a matéria orgânica e a planta hospedeira (Mahatma e Mahatma, 2015; Val-Moraes, 2015). Fatores abióticos, como o pH, o cálcio, as diferentes formas de azoto e outros nutrientes, podem desempenhar um papel importante na capacidade supressiva (Kariuki et al., 2015).

Muitas das doenças do solo conhecidas, são consequência do baixo teor de matéria orgânica dos solos e das frequentes mobilizações (De Corato, 2020). A aplicação de composto, principalmente quando enriquecido com fungos antagonistas, pode ser utilizada no biocontrolo de doenças de plantas, sendo *Trichoderma* spp. um dos fungos mais utilizados (Blaya, 2013; De Corato, 2020, Coelho et al. 2021). *Trichoderma* spp. é eficaz contra muitos agentes fitopatogénicos (Verma et al., 2007), nomeadamente fungos do solo patogénicos de plantas (Hermosa et al., 2000), como *Rhizoctonia solani* (Hoitink et al., 2001; Trillas et al., 2006; Val-Moraes, 2015), *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002), *Colletotrichum orbiculare* (Zhang et al., 1998), *Phytophthora capsici* (Segarra et al., 2013) e patogénicos foliares, como *Botrytis cinerea* (Segarra et al., 2007).

Durante o armazenamento, as características do composto alteram-se, nomeadamente o teor de azoto e as populações microbianas (Al-Bataina, 2016) afetando a sua capacidade supressiva (Avilés et al., 2011; Boehm e Hoitink, 1992; De Corato, 2020; Jambhulkar et al., 2015). Por esta razão, a avaliação da capacidade supressiva dos compostos durante o armazenamento é fundamental, considerando que os compostos podem não ser utilizados imediatamente após a compostagem e perder essa capacidade ao longo do tempo. Durante o armazenamento, ocorreram alterações químicas nos compostos, sendo importante determinar a sua influência na supressividade (Rijn et al., 2007). Como resultado do

armazenamento, as populações microbianas variam e geralmente ocorre uma diminuição na biomassa microbiana (Butler et al. 2001). No entanto, a capacidade supressiva dos compostos é atribuída à atividade de diferentes comunidades microbianas, sendo a chave para entender a sua capacidade de controlo de doenças (Hadar, 2011). Além disso, as alterações nas populações microbianas ocorrem devido a mudanças nas características dos compostos, que se alteram com o tempo (Pesaro et al., 2004). Neste trabalho, os compostos obtidos foram armazenados e testados após 0, 6 e 12 meses. Após cada um desses períodos, foram determinadas as características físicas, químicas e microbiológicas dos compostos e avaliada sua capacidade supressiva em ensaios *in vivo*.

6.3. Material e métodos

Os ensaios com relva foram realizados no *Campus* de Gambelas, Universidade do Algarve, Portugal (37°02'35.45"N, 7°58'20.64"W), numa estufa de aço, não aquecida, com cobertura de filme de polietileno e arejamento pelo telhado e paredes laterais. Todos os ensaios foram repetidos duas vezes.

6.3.1. Preparação dos compostos e dos substratos

Dois compostos, designados P1 e P2, foram obtidos por processos de compostagem de resíduos agroindustriais, em pilhas com arejamento por revolvimento. O composto P1 foi obtido a partir de uma mistura de resíduos de laranja, de uma associação de agricultores, aparas de relva, de um campo de golfe e bagaço de uva de uma adega, na proporção de 0.9:1.1:1 (v/v), respetivamente. O composto P2 foi produzido com as mesmas matérias-primas, às quais foram adicionados resíduos da produção de cogumelos (*Shiitake*), com a relação final de 1.8:0.2:1.5:0.5 (v/v), de modo a obter uma relação C/N inicial semelhante em ambas as pilhas. O volume inicial de cada pilha de compostagem foi de cerca de 1 m³ e a compostagem ocorreu em recipientes de rede metálica, protegidos por uma rede plástica, para evitar perdas excessivas de calor e humidade, permitindo ventilação natural. A compostagem dessas misturas de resíduos foi repetida duas vezes, em dois anos consecutivos. Durante a compostagem foram monitorizados os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos, conforme descrito por Coelho et al. (2020).

Nos ensaios *in vivo*, os substratos P1, P2 e a turfa foram testados com e sem tratamento térmico e enriquecimento com *T. atroviride* (Coelho et al., 2021), resultando em doze tratamentos diferentes: turfa (P) (Hansa Torf Floragard, Alemanha); compostos P1 e P2; P1 e P2 com tratamento térmico (t) a 60 °C durante sete dias, denominados Pt, P1t e P2t; substratos enriquecidos com *T. atroviride* (E), com as designações PE, P1E e P2E, e os substratos submetidos a tratamento térmico e também previamente enriquecidos com *T. atroviride*, designados por PtE, P1tE e P2tE (Coelho et al., 2021).

6.3.2. Armazenamento dos compostos

Para avaliar a capacidade supressiva dos compostos ao longo do tempo, exceto para substratos tratados termicamente, os compostos foram mantidos em sacos que permitissem o arejamento e armazenados em local seco, no escuro à temperatura ambiente. Os substratos tratados termicamente não foram armazenados, sendo P, P1 e P2 tratados termicamente aos 0, 6 e 12 meses para obtenção de Pt, P1t e P2t. Em cada período de avaliação (0, 6 e 12 meses), as propriedades dos 12 substratos foram determinadas e sua capacidade supressiva avaliada.

6.3.3. Caracterização de substratos

Em cada um dos períodos de armazenamento (0, 6 e 12 meses), as propriedades químicas, físicas e microbiológicas dos substratos foram avaliadas: o pH foi determinado em extrato aquoso (1:2 p/v) com um potenciômetro (Crison Micro pH, 2001), e a condutividade elétrica foi medida no mesmo extrato, após filtração, com um condutivímetro (Crison 522). A matéria orgânica e mineral (Ramos et al., 1987), a matéria seca (Martinez, 1992), a relação C/N, o teor de azoto e as populações microbianas também foram avaliados. Os fungos totais e as populações de *Trichoderma* spp. foram quantificadas após o seu crescimento nos meios de cultura apropriados. Foram preparadas suspensões com as amostras dos substratos, usando solução salina tamponada com fosfato e feitas diluições decimais seriadas, as quais foram inoculadas no meio de cultura adequado para o crescimento do microrganismo a testar. Para a enumeração dos fungos, as suspensões foram inoculadas no meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Biokar, França), pela técnica de espalhamento em placa e incubação a 25 ± 2 °C por 24-48 h; *Trichoderma* spp.

foram cultivados em meios de cultura semi-seletivos (Chung e Hoitink, 1990) e incubados a 25 ± 2 °C por 72 h.

A atividade enzimática de todos os substratos foi determinada usando o sistema API-ZYM™ (bioMérieux Italia, Roma, Itália), o qual avalia a atividade de 19 enzimas (fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, α -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidase, α -fucosidase). As galerias específicas foram inoculadas com 65 μ L de uma suspensão de 1 g de substrato para 9 mL de solução salina estéril (NaCl 9,0 g L⁻¹). Após incubação, durante 24 h a 37 °C, as galerias foram ativadas pela adição de 30 μ L de reagente ZYM A e reagente ZYM B (bioMérieux Italia, Roma, Itália). A cada galeria foi atribuído um valor numérico, variando entre 0 e 5, de acordo com a cor desenvolvida em cada reação enzimática, utilizando a tabela de cores fornecida pelo fabricante. Os resultados foram expressos como atividade relativa da enzima. g⁻¹ de peso seco de compostos e turfa.

6.3.4. Avaliação de supressividade dos compostos armazenados

O efeito do período de armazenamento nos compostos enriquecidos, foi avaliado pela determinação de sua capacidade supressiva *in vivo*, em relva (*Agrostis stolonifera* L. cv. T1). Os substratos obtidos, enriquecidos ou não com *T. atroviride*, foram avaliados após 0, 6 e 12 meses de armazenamento. A relva foi semeada em vasos de 100 mL, em estufa não aquecida, e quando esta ocupou toda a área da superfície do vaso, procedeu-se à inoculação com um disco (6.5 mm de diâmetro) contendo o micélio dos fungos patogênicos, cultivados em meio de cultura PDA durante 7 dias. Para *S. rolfsii*, além do disco com micélio, foram adicionados dois esclerócios em cada vaso. Os substratos submetidos ao tratamento térmico e inoculados com os patógenos foram utilizados como controlo positivo; os substratos submetidos a tratamento térmico, mas não inoculados, foram o controlo negativo. Cada tratamento era constituído por cinco vasos, com quatro repetições. Para aumentar e estabilizar a humidade e a temperatura do ar, os vasos foram mantidos sob um túnel, coberto com geotêxtil, dentro da estufa. A temperatura e a humidade relativa do ar próximo às plantas foram registadas diariamente.

As plantas foram irrigadas por aspersão aérea, de modo a manter altos níveis de humidade. A adubação foliar foi aplicada semanalmente, usando um fertilizante orgânico-mineral (Ret-Sul, Eibol, Espanha, com 18 % N-total, 0.75 % Fe, 0.1 % Mn, 9 % aminoácidos livres) na concentração recomendada pelo fabricante, de 150 mL 100L⁻¹.

Para cada período de armazenamento, os ensaios foram repetidos duas vezes, com os compostos obtidos em cada ano.

Quando os sintomas das doenças começaram a ser visíveis nas plantas, a área afetada por cada doença foi determinada semanalmente, em todos os vasos, para determinação da severidade e da incidência da doença. A severidade da doença foi avaliada tendo em conta a gravidade dos sintomas, adaptada de Baayen e Van der Plas (1992), onde: 0 = planta assintomática (0 % doença); 1 = planta muito pouco infetada (5 % de doença); 2 = sintomas ligeiros (20 %); 3 = sintomas bem desenvolvidos (50 %); 4 = fortes sintomas da doença em toda a área (80 %); 5 = plantas mortas (100 %).

O índice de controlo biológico (BCI) e a eficácia foram calculados de acordo com Byrne et al. (2005). O BCI consiste na combinação eficácia-consistência da redução da doença, conforme:

$$BCI = \frac{Eficácia}{Consistência}$$

A eficácia é indicada pela percentagem média de redução da doença e a consistência pelo desvio padrão dessas médias.

A área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) foi determinada de acordo com Campbell e Madden (1990), mostrando uma velocidade crescente de desenvolvimento da doença. A AUDPC foi calculada através da severidade da doença integrada entre o início dos sintomas e o final do ensaio e dividindo pelo total da duração da doença, em dias, em cada ensaio, a fim de comparar os vários ensaios, que tiveram uma variedade de durações epidémicas, de acordo com:

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

y = lesão provocada pela doença

t = tempo.

6.3.5. Análise estatística

As propriedades químicas e microbiológicas dos substratos foram comparadas por análise de variância multifatorial (ANOVA), seguida pelo teste de amplitudes múltiplas de Duncan (*New Multiple-Range Test*). Os resultados dos ensaios *in vivo*, como a área afetada pela doença, a AUDPC e o índice de controlo biológico foram analisados por uma ANOVA e comparados usando o teste de amplitudes múltiplas de Duncan. A severidade da doença foi analisada e realizadas comparações múltiplas (todas aos pares) usando o teste de Kruskal-Wallis. A normalidade da distribuição amostral e a homogeneidade das variâncias foram verificadas antes dos testes ANOVA e Kruskal-Wallis (Zar, 1999; Field, 2009). Para avaliar o efeito no armazenamento dos compostos na sua capacidade supressiva, fez-se uma regressão linear e uma correlação de Spearman. Os dados dos dois anos consecutivos, foram tratados estatisticamente usando o software IBM SPSS Statistics ver. 26 (IBM Corp., 1989-2017, EUA).

6.4. Resultados e discussão

6.4.1. Caracterização dos compostos

O enriquecimento com composto (0 meses) aumentou a teor em matéria orgânica, conforme observado por Pang et al. (2017), bem como o seu teor de azoto (Quadro 6.1).

Quadro 6.1: Algumas propriedades dos substratos testados.

ST	P1	P1t	P1E	P1tE	P2	P2t	P2E	P2tE	P	Pt	PE	PtE	
N	0-M	2.05a	1.83a	2.22a	2.17a	1.78b	1.65b	1.95a	1.88a	1.18a	1.13a	1.23a	1.17a
	6-M	1.94a	1.09b	2.06a	1.79b	2.18a	1.95a	2.00a	1.92a	1.17a	0,99a	1.39a	1.19a
	12-M	0.94b	0.95b	0.94b	0.97c	0.90c	0.98c	0.91b	0.95b	1.54a	0.91a	1.28a	1.35a
MO	0-M	72.0b	61.8a	77.0a	72.1ab	83.5a	74.1a	86.9a	78.9a	93.5a	93.5a	94.7a	95.7a
	6-M	81.5a	62.8a	67.9b	66.3b	78.1a	74.6a	75.3b	69.0b	94.4a	94.1a	95.6a	94.8a
	12-M	62.3c	67.0a	65.3b	76.5a	69.9a	64.4a	70.7b	79.0a	94.4a	93.9a	95.3a	95.3a
MS	0-M	56.4c	56.9c	51.2c	59.6c	54.6b	54.1c	56.2c	53.1c	77.2a	76.5a	70.4b	76.4c
	6-M	83.3b	85.0b	85.4b	87.2b	82.9a	81.9b	81.3b	85.2b	35.8b	45.5b	84.8a	81.4b
	12-M	88.5a	88.8a	92.1a	90.7a	83.3a	85.6a	83.8a	87.9a	35.5b	40.8b	84.7a	91.0a
pH	0-M	7.08a	7.60a	7.08a	7.52a	7.35a	7.79a	7.23a	7.79a	5.00a	4.93a	5.05a	4.77a
	6-M	7.18a	6.71b	7.18a	7.11a	7.01b	6.71b	7.18a	7.18b	5.2a	4.85a	4.55b	4.45a
	12-M	7.16a	7.22a	7.04a	7.24a	7.08b	7.13b	7.19a	7.22b	5.51a	4.28b	4.40b	3.93b
CE	0-M	1.58a	1.71a	1.68a	1.90a	2.33a	2.27a	2.28a	2.21a	0.09a	0.12a	0.10ab	0.10b
	6-M	1.75a	1.55a	1.77a	1.91a	1.62aa	1.75a	2.06a	2.18a	0.10a	0.10b	0.12a	0.12ab
	12-M	1.88a	1.86a	1.87a	2.36a	1.65a	1.40a	1.51a	1,47a	0.09a	0.10b	0.08b	0.13a

P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico (60 °C durante 7 dias); E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*; 0-M, composto armazenado durante 0 meses; 6-M, composto armazenado durante 6 meses; 12-M, composto armazenado durante 12 meses; N, azoto; MO, matéria orgânica; MS, matéria seca; CE, condutividade elétrica. Para cada parâmetro, em cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0.05$), segundo o teste de amplitudes múltiplas de Duncan.

Neste período, as maiores populações de fungos totais e de *Trichoderma* spp. foram enumeradas nos compostos enriquecidos e na turfa (Figura 6.1).

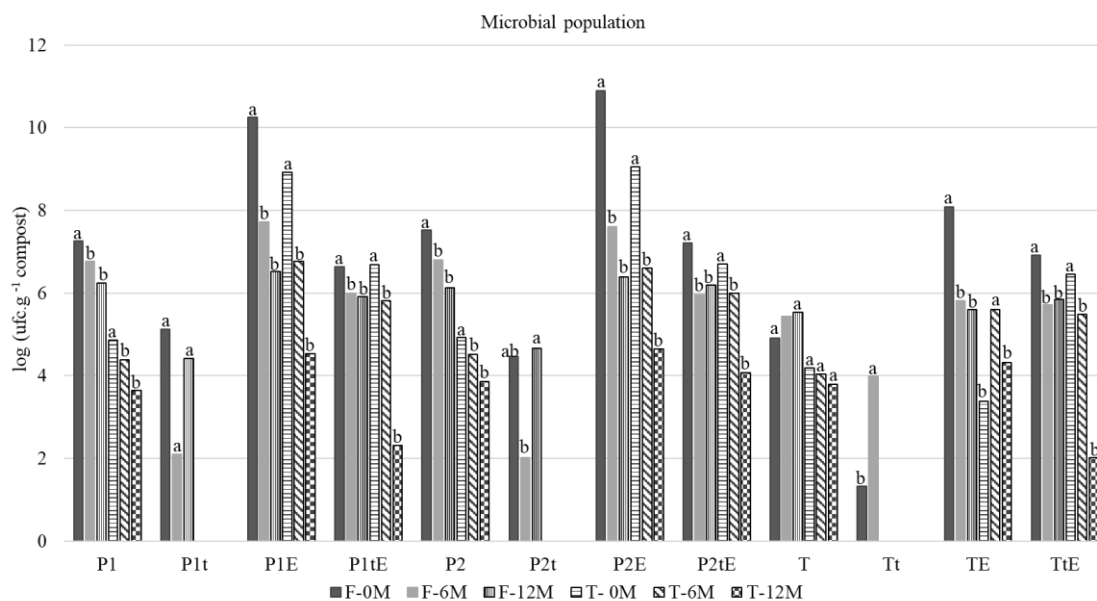


Figura 6.1: Populações microbianas aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico a 60 °C por sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. Para cada substrato e microrganismo (fungos totais (F) e *Trichoderma* spp. (T)) as barras com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

As alterações verificadas na microbiota, nomeadamente o aumento das populações de *Trichoderma* spp., podem ter contribuído para as alterações do pH, conforme descrito por Machado et al. (2012).

Após seis meses de armazenamento, nos compostos P2 verificou-se um aumento significativo do azoto, enquanto nos compostos P1 (P1 e P1E) não se verificaram diferenças significativas ($p > 0.05$) (Quadro 6.1). Nesse período, o teor de matéria orgânica diminuiu significativamente em P1E, P2E e P2tE ($p < 0.05$) (Quadro 6.1). A matéria seca aumentou significativamente dos 0 para os 6 meses ($p < 0.05$), em todos os compostos P1 e P2, para valores superiores a 80 % (Quadro 6.1), causando diminuição significativa das populações de fungos ($p < 0.05$) (Figura 6.1). Observou-se que *Trichoderma* spp. continuou a mostrar as maiores populações nos compostos enriquecidos, P1E e P2E (Figura 6.1). Aos 6 meses de armazenamento, as populações de microrganismos diminuíram, como foi também observado por Saadi et al. (2010), provavelmente devido à redução da humidade. Além disso, a diminuição dos recursos energéticos e nutrientes afetou negativamente as populações microbianas. Após 12 meses de armazenamento, nos compostos enriquecidos, verificou-se a diminuição das

populações de *Trichoderma* spp. (Figura 6.1). Um ano após o armazenamento, o teor de azoto diminuiu em todos os compostos ($p < 0.05$) (Quadro 6.1). A matéria orgânica também diminuiu em todos os substratos, exceto em P1tE e P2tE ($p < 0.05$). Tal como foi observado por Bernal et al. (2009), o consumo de fontes de carbono pela atividade microbiana, terá contribuído para essa diminuição, o que não foi observado nos substratos tratados e enriquecidos, pois houve uma redução significativa na microbiota desses substratos. Dos 6 para os 12 meses, o teor de matéria seca aumentou para valores muito elevados, criando condições favoráveis para a redução das populações microbianas, juntamente com a redução das fontes de carbono (Bernal et al., 2009). Neste período, o teor de azoto diminuiu significativamente ($p < 0.05$). Em todos os substratos P1 e P2 o teor de azoto foi inferior a 1 % (Quadro 6.1). A reduzida atividade microbiana pode ter conduzido à não imobilização do $N-NH_4^+$ pelos microrganismos, aumentando consequentemente a emissão de NH_3 , causando a perda de azoto (Bernal et al., 2009, Brito et al., 2008). No entanto, as perdas de azoto não são comuns nos compostos maduros e nos estabilizados (Sikora e Szmidt, 2005). Nestes compostos, o azoto encontra-se principalmente na forma orgânica, o azoto inorgânico está na forma nítrica, sendo o azoto amoniacal característico da fase termofílica da compostagem (Sikora e Szmidt, 2005). Por esta razão, o azoto nítrico (NO_3^-) é frequentemente usado como indicador da estabilidade do composto (Chefetz et al., 1998). Na forma nítrica, o azoto é mais suscetível à lixiviação (Bernal et al., 2009), mas essa perda não terá ocorrido nestes compostos devido ao seu baixo teor de humidade (Quadro 6.1), conforme descrito por Brito et al. (2008). No entanto, os processos de desnitrificação também podem contribuir para perdas de $N-NO_3^-$ (Brito et al., 2008). A volatilização da amónia pode ser responsável por perdas de $N-NH_3$ na forma gasosa (Eghball et al., 1997; Raviv et al., 2004; Sikora e Szmidt, 2005; Brito et al., 2008). As características dos compostos, com 12 meses de armazenamento, também contribuíram para as perdas de azoto por volatilização, ao contrário do que foi citado por Hubbe et al. (2010). Verificou-se que a relação C/N apresentou valores entre 38 e 48 e a humidade valores muito baixos (entre 7.9 e 16.7 %). O facto de os compostos terem sido armazenados em sacos de polipropileno tecido poderá ter levado a um mau arejamento, contribuindo para as perdas de azoto por volatilização. Durante o armazenamento dos compostos, a diminuição da humidade e a possível falta de arejamento, terão contribuído para a redução das populações microbianas, levando a perdas de azoto.

6.4.2. Atividade enzimática

A atividade da N-acetil- β -glucosamina pode estar relacionada com as elevadas populações de *Trichoderma* spp., com resultados positivos no controlo biológico dos fungos patogénicos estudados. Aos 0 e aos 6 meses de armazenamento dos substratos, registou-se uma alta atividade desta enzima, com destaque para os compostos enriquecidos com *T. atroviride*, P1E e P2E (Quadro 6.2).

Após 12 meses, a enzima N-acetil- β -glucosamina apresentou atividade decrescente, com destaque para os P1E, P1tE e P2E (Quadro 6.2), justificando a perda de supressividade nos substratos, conforme verificado por Avilés e Borrero (2017).

Trichoderma spp. são eficientes produtores de enzimas como amilases, proteases e lipases, que podem ter aplicações industriais, ou na natureza, sendo conhecidos na degradação da parede celular de fitopatogénicos (Chérif e Benhamou, 1990). A lipase diminuiu em muitos substratos, após um período de armazenamento de 6 meses, provavelmente devido a uma diminuição das populações microbianas (Quadro 6.2).

A leucina arilamidase está envolvida na libertação de aminoácidos N-terminais de peptídeos, amidas ou arilamidases. Esta enzima aumentou após 6 meses de armazenamento e diminuiu aos 12 meses (Quadro 6.2), o que pode ter influenciado na perda do azoto (Quadro 6.1).

Houve também diminuição da β -glicosidase após 6 meses de armazenamento, com aumento aos 12 meses. De acordo com Borrero et al. (2009), a β -glicosidase pode ser um indicativo de competição por compostos de carbono. Aos 12 meses, quando foram registados os menores valores de matéria orgânica, terá aumentado a competição por carbono e consequentemente de β -glicosidase.

Quadro 6.2: Atividade enzimática nos diferentes substratos (atividade relativa de enzima.g⁻¹).

Enzyme ^{2/} Time	Substrates ¹												
	P1	P1t	P1E	P1tE	P2	P2t	P2E	P2tE	P	Pt	PE	PtE	
1	0-M	4.0a	0.0a	4.0a	3.0a	5.0a	4.0a	5.0a	1.5a	0.0a	0.0a	2.0a	1.0a
	6-M	0.5a	0.0a	1.0b	1.0a	0.5b	0.5b	2.0a	0.5a	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a
	12-M	2.0a	0.0a	3.5a	2.0a	0.0b	0.0b	2.0a	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a
2	0-M	4.0a	4.0a	4.0a	3.0b	4.0	4.0a	4.0	2.5a	1.0a	1.0a	2.0a	0.5a
	6-M	5.0a	4.0a	5.0a	4.0ab	5.0	2.5a	5	3.5a	2.5a	2.0a	4.0a	0.0a
	12-M	4.5a	5.0a	4.5a	4.5a	4.0	0.0a	4	4.5a	1.0a	1.0a	4.0a	0.0a
3	0-M	4.0a	2.0a	4.0	3.0b	4.0a	3.0a	4.0a	2.0a	0.0a	0.0a	2.5a	1.0a
	6-M	3.5a	1.5a	3	3.0b	4.0a	3.5a	4.0a	1.5a	0.0a	0.0a	0.5b	0.0a
	12-M	3.0a	3.0a	4	4.5a	3.5a	3.0a	3.5a	3.5a	0.0a	0.0a	3.0a	0.0a
4	0-M	4.5a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	2.5a	1.0a	1.0a	4.0a	2.5a
	6-M	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	5.0a	4.5a	5.0a	4.0a	2.5a	2.0a	4.0a	4.0a
	12-M	4.0a	5.0a	4.5a	4.5a	4.5a	5.0a	4.5a	4.5a	1.0a	1.0a	5.0a	4.0a
5	0-M	4.0a	2.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0a	4.0ab	0.5b	1.0a	1.0a	1.5a	0.5a
	6-M	3.5a	1.5a	4.0a	3.0ab	5.0a	1.5b	5.0a	4.0a	2.5a	2.0a	4.0a	3.0a
	12-M	3.0a	2.0a	3.5a	2.5b	2.5a	1.0b	2.0b	0.0b	1.0a	1.0a	3.0a	1.5a
6	0-M	2.5a	3.0a	3.0b	3.0a	4.0a	2.0a	4.0a	1.5ab	0.0a	1.0a	2.5a	1.5a
	6-M	0.0b	2.0a	0.0c	0.0a	1.5a	1.5a	0.0b	0.0b	0.0a	2.0a	2.0a	1.0a
	12-M	3.5a	4.0a	4.5a	2.5a	3.5a	3.0a	4.5a	4.0a	0.0a	1.0a	0.0a	1.5a
7	0-M	5.0a	5.0a	5.0	4.0ab	5.0a	3.0	4.0a	2.5a	1.0a	1.0a	3.0a	1.5ab
	6-M	2.5b	3.0a	3.0	3.0b	4.0a	4.0	4.0a	3.5a	2.5a	2.0a	4.5a	3.0a
	12-M	4.0a	4.0a	4.0	4.5a	4.5a	4.0	4.5a	4.5a	1.0a	1.0a	3.0a	0.5b
8	0-M	4.0a	3.0a	4.0a	4.0a	4.0a	3.0a	4.0a	2.5a	0.0a	0.0a	3.0a	2.0a
	6-M	1.5a	1.5a	0.0b	0.0b	2.0a	1.5a	0.0b	1.5a	0.0a	0.0a	2.0a	0.0a
	12-M	4.0a	3.0a	3.5a	4.5a	2.5a	3a	4.5a	5.0a	0.0a	0.0a	4.5a	1.0a
9	0-M	4.0a	0.0a	5.0a	4.0a	4.5a	4.0	5.0a	2.5a	0.0a	0.0a	4.0a	2.5a
	6-M	4.0a	2.5a	5.0a	4.0a	4.5a	3	5.0a	4.0a	0.0a	1.0a	3.5a	1.0a
	12-M	4.0a	4.0a	3.0a	3.5a	4.5a	3	4.5a	4.0a	0.0a	0.0a	4.0a	2.0a

¹ t, substratos submetidos a tratamento térmico, a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. ² 1 – Lipase (C 14); 2 – Leucina arilamidase; 3 – Valina arilamidase; 4 – Fosfatase ácida; 5 – Naftol-AS-BI-fosfohidrolase; 6 – α -galactosidase; 7 – β -galactosidase; 8 – β -glicosidase; 9 – N-acetil- β -glucosaminidase; 0-M, composto armazenado durante 0 meses; 6-M, composto armazenado durante 6 meses; 12-M, composto armazenado durante 12 meses. Para cada linha, os valores seguidos da mesma letra não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0.05$), segundo o teste de amplitudes múltiplas de Duncan.

6.4.3. Avaliação da supressividade dos compostos

Fatores abióticos, como o pH, o cálcio, as formas de azoto e outros nutrientes, podem desempenhar um papel importante na capacidade supressiva dos compostos (Kariuki et al., 2015).

Nestes ensaios, verificamos que o composto armazenado manteve a sua capacidade supressiva, principalmente nos compostos enriquecidos. Para as doenças estudadas, a severidade da doença diminuiu em alguns compostos com seis meses de armazenamento (Figura 6.2).

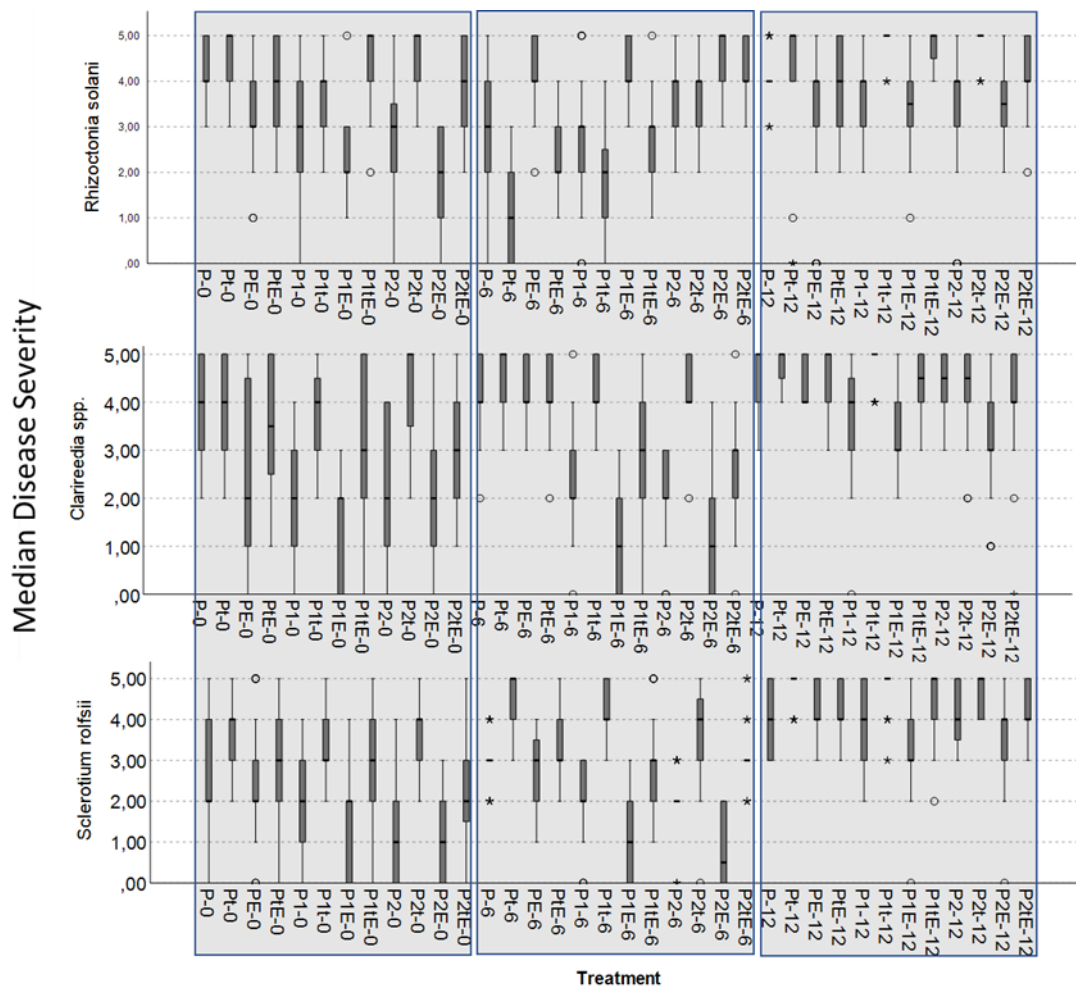


Figura 6.2: Severidade da doença aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico, a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. Para cada substrato, as barras com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

Nesse período, as populações de fungos e de *Trichoderma* spp. também diminuíram (Figura 6.1), tendo sido a atividade enzimática um parâmetro importante para explicar a supressividade da doença. Segundo Martin (2015), a presença de protease, quitinase, lipase e β -1,3-glucanase, enzimas que degradam a parede celular, pode indicar a possível ocorrência de micoparasitismo. No período de armazenamento, a lipase diminuiu, mas foi observada atividade em P1E após 12 meses de armazenamento (Quadro 6.2). A quitina é um polímero ligado à β -(1,4)-N-acetil-B-glucosamina (Brzezinska et al., 2014), e a atividade da N-acetil- β -glucosaminidase apresentou valores elevados aos 0 e 6 meses de armazenamento. Aos 12 meses de armazenamento esses valores diminuíram, mas a sua atividade continuou a ser registrada em todos os substratos com os compostos P1 e P2 (Quadro 6.2). A atividade dessas enzimas pode indicar micoparasitismo em substratos, principalmente nos enriquecidos, onde a atividade foi superior. A severidade da doença aumentou após 12 meses de armazenamento, quando a atividade enzimática diminuiu (Quadro 6.2). Além disso, Lorito et al. (1994) observaram interações sinérgicas entre enzimas que degradam as paredes celulares de fungos e substâncias antifúngicas que inibem a germinação de esporos.

Para *R. solani* e *S. rolfsii*, os melhores resultados foram observados com P2E após 6 meses de armazenamento. *Trichoderma* spp. produz enzimas líticas, não afetando diretamente o agente fitopatogênico. Quando a celulose e a glicose estão em concentrações mais baixas, *Trichoderma* spp. pode ativar os genes da quitinase e parasitar *R. solani* (Martin, 2015). Assim, a possível diminuição da concentração dessas substâncias, pode ter contribuído para o aumento do parasitismo de *R. solani*, após 6 meses de armazenamento. Na matéria orgânica fresca, a síntese de enzimas líticas envolvidas no biocontrole por *Trichoderma* spp. é reprimido, devido ao alto teor de glicose (Jambhulkar et al., 2015). Nos compostos imaturos, *R. solani*, continua a desenvolver doenças nas plantas, devido à inatividade de *Trichoderma* spp., não se verificando controle biológico (Avilés et al., 2011). No composto maduro, as baixas concentrações de nutrientes como a glicose, conduzem à morte dos esclerócios pelos agentes de biocontrole, verificando o biocontrole de *R. solani* (Hoitink et al., 2001). No entanto, nos compostos excessivamente estabilizados a capacidade supressiva é perdida porque não há condições favoráveis para a atividade microbiana (Jambhulkar et al., 2015).

Após 12 meses de armazenamento, observou-se que as populações de fungos diminuíram devido à falta de recursos de carbono (Quadro 6.1).

Capítulo 6

O substrato P1E apresentou os melhores resultados no controlo de *Clariireedia* spp. aos 0 e 6 meses de armazenamento (Figura 6.2, Figura 6.3 e Figura 6.4).

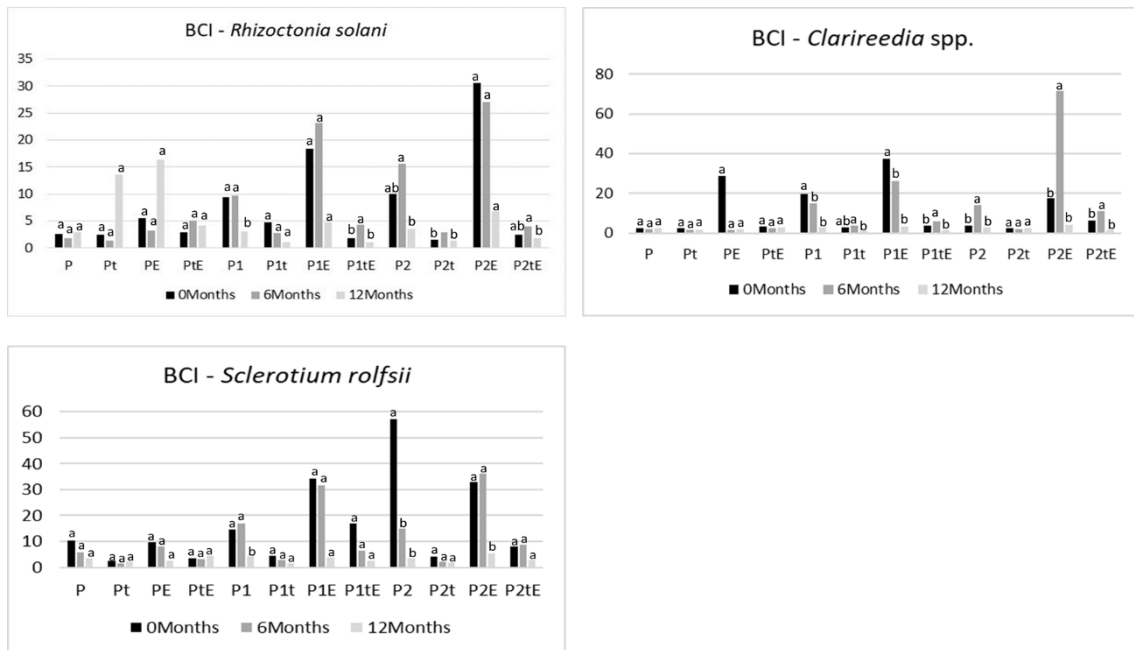


Figura 6.3: Índice de controlo biológico aos 0, 6 e 12 meses de armazenamento. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico, a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. Para cada substrato, barras com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

Capítulo 6

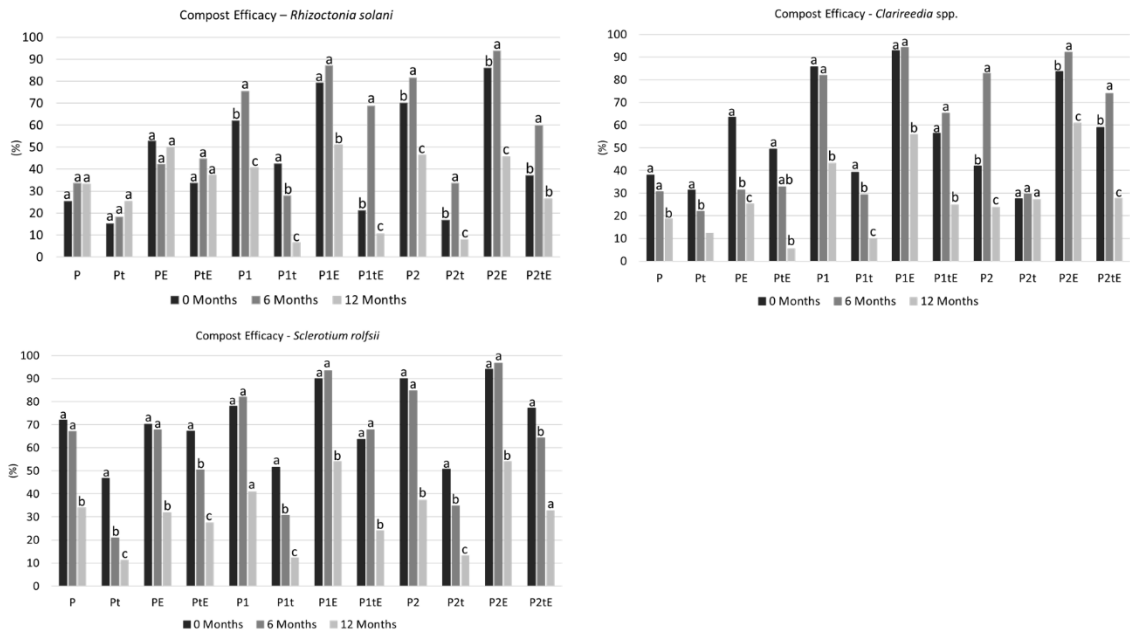


Figura 6.4: Eficácia do composto em 0, 6 e 12 meses de armazenamento. P1, composto P1; P2, composto P2; P, turfa; t, substratos submetidos a tratamento térmico, a 60 °C durante sete dias; E, substratos enriquecidos com *Trichoderma atroviride*. Para cada substrato, as barras com a mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$ (Teste de Duncan).

Após um ano de armazenamento, os compostos apresentaram aumento na severidade da doença. As populações de fungos totais e de *Trichoderma* spp. diminuíram à medida que o teor de matéria seca aumentou. No entanto, observou-se que os compostos enriquecidos (P1E e P2E) apresentaram os menores valores de severidade, principalmente devido às populações microbianas. Após 12 meses, os melhores resultados no controlo de *Clariireedia* spp. foram observados em P2E. Esse resultado pode ter ocorrido devido à diminuição do teor de azoto em P1E (Quadro 6.1). Além disso, as maiores populações de fungos, incluindo *Trichoderma* spp. (Figura 6.1), terão contribuído para o sucesso do P2E no controlo de *Clariireedia* spp. aos 12 meses de armazenamento (Figura 6.2). O BCI, nos compostos enriquecidos, apresentou os valores mais elevados aos 0 e aos 6 meses, quando a atividade enzimática foi maior, com uma queda acentuada aos 12 meses ($p < 0.05$) (Figura 6.3).

De acordo com a análise de componentes principais (Quadro 6.3), *Trichoderma* spp., apesar de um declínio populacional, continuou a ter um forte impacto no controlo biológico, nomeadamente aos 6 meses ($p = 0.000$) e 12 meses, mas apenas para controlar *Clariireedia* spp. ($p = 0.000$)

Quadro 6.3: Análise de componentes principais avaliando os parâmetros com efeito supressivo das doenças pelos compostos.

	<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Clariireedia</i> spp.				
	Coef	Sig	Coef	Sig	Coef	Sig			
0 Months									
Efficacy	Constant	0.010	Constant	0.010	Constant	0.006			
	DM	-0.547	0.015	DM	-0.547	0.015	N	0.224	0.052
	N	0.366	0.016	N	0.366	0.016	Tric	0.258	0.026
	pH	-0.554	0.025	pH	-0.554	0.025			
	Tric	0.238	0.036	Tric	0.238	0.036			
BCI	Constant	0.000	Constant		-	-	-		
	Fungi	0.768	0.000	Fungi	0.768	0.000			
DS	Constant	0.471	Constant	0.039	Constant	0.000			
	DM	0.237	0.044	DM	0.255	0.027	N	-0.270	0.019
	Tric	-0.256	0.030	Tric	-0.294	0.011	Tric	-0.231	0.043
AUDPC	Constant	0.000	Constant	0.000	Constant	0.000			
	N	0.237	0.012	Tric	-0.243	0.029	EC	-0.295	0.012
	Tric	-0.306	0.006	C/N	0.331	0.003			
6 Months									
Efficacy	Constant	0.154	Constant	0.855	Constant	0.002			
	DM	0.226	0.054	pH	0.382	0.001	OM	0.296	0.019
	pH	0.318	0.009	Tric	0.279	0.010	pH	0.763	0.000
	Tric	0.268	0.010				Tric	0.304	0.001
BCI	Constant	0.000	Constant	0.000	Constant	0.085			
	Tric	0.000	Tric	0.406	0.000	pH	0.219	0.016	
			C/N	-0.243	0.027	Fungi	-1.210	0.002	
					Tric	1.738	0.000		
DS	Constant	0.000	Constant	0.000	Constant	0.000			
	Tric	-0.275	0.019	Tric	-0.371	0.001	N	-0.386	0.000
			C/N	0.360	0.001	Tric	-0.426	0.000	
AUDPC	Constant	0.000	Constant	0.000	Constant	0.000			
	Tric	-0.254	0.031	Tric	-0.243	0.034	Tric	-0.3443	0.003
			C/N	-0.318	0.006	N	-0.238	0.036	
12 Months									
Efficacy	Constant	0.000	Constant	0.232	Constant	0.956			
	N	-0.286	0.022	DM	0.431	0.000	DM	0.259	0.025
	Fungi	0.417	0.001	Tric	0.292	0.005	Tric	0.251	0.030
BCI	Constant	0.010	Constant	0.003	-	-	-		
	pH	-0.242	0.041	OM	-0.250	0.021			
			Tric	0.394	0.000				
DS	Constant	0.000	Constant	0.124	Constant	0.000			
	EC	0.414	0.000	OM	0.326	0.001	Fungi	-0.411	0.000
			Tric	-0.543	0.000				
AUDPC	Constant	0.000	Constant	0.064	Constant	0.000			
	OM	-0.262	0.010	C/N	0.413	0.000	Fungi	-0.400	0.001
	N	-0.497	0.000	Tric	-0.271	0.012			

BCI, biological control index; DS, disease severity; AUDPC, area under disease progress curve; N, nitrogen; OM, organic matter; DM, dry matter; EC, electrical conductivity; C/N, carbon – nitrogen ratio; Tric, *Trichoderma* spp. populations.

A Figura 6.4 mostra um aumento na eficácia dos substratos enriquecidos aos 6 meses, com uma diminuição sucessiva aos 12 meses. De acordo com a regressão linear e correlação de Spearman (Quadro 6.3), aos 12 meses, verificou-se que o controlo biológico foi fortemente afetado pela redução de recursos e diminuição das populações de *Trichoderma* spp. e de fungos totais.

Através dos dados registados no Quadro 6.3 observa-se que, vários parâmetros foram responsáveis pela supressividade dos compostos, tanto P1 quanto P2, enriquecidos e tratados termicamente e enriquecidos com *T. atroviride*. P1tE e P2tE mostraram o efeito que *T. atroviride* tem no controlo de fungos fitopatogénicos. O tratamento térmico teria sido responsável pela eliminação de antagonistas em P1t e P2t, e conseqüente incapacidade supressiva desses substratos. No entanto, a adição de um antagonista restaurou a sua supressividade e comprovou o papel fundamental de *Trichoderma* spp. no controlo biológico. Vários autores verificaram um efeito positivo de *Trichoderma* spp. no controlo de *R. solani* (Trillas-Gay et al., 2006, Pugliese et al., 2008, De Corato et al., 2019), *S. rolfisii* (Zmora-Nahum et al., 2008; Reis, 2016) e de *Clariireedia* spp. com *T. gamsii* (Coelho et al., 2016) e *T. atroviride* (Coelho et al., 2020).

Aos 6 meses de armazenamento, foi observada uma correlação positiva entre *Trichoderma* spp. e a supressividade dos compostos, para os três fungos patogénicos estudados. Essa correlação também foi observada para o BCI, sendo negativa para DS e AUDPC (Quadro 6.3). Apesar de se ter verificado uma diminuição das populações de *Trichoderma* spp. dos 0 para 6 meses, os compostos continuaram a ser capazes de controlar os fungos patogénicos dos relvados.

Por outro lado, a diminuição do teor de azoto (Quadro 6.1) apresentou uma correlação negativa com a severidade da doença provocada por *Clariireedia* spp., destacando a importância deste nutriente como medida de controlo cultural da doença (Tani e Beard, 1997). Situação semelhante foi observada na AUDPC (Quadro 6.3).

Aos 6 meses, o teor de matéria orgânica manteve-se elevado, suportando a atividade dos microrganismos, e o aumento da matéria seca terá sido gradual, não tendo ainda impacto na sua atividade (Quadro 6.1 e Figura 6.1). Aos 12 meses, a diminuição do teor de matéria orgânica terá tido impacto na diminuição da população de fungos e de *Trichoderma* spp. (Quadro 6.1, Figura 6.1), devido à falta de nutrientes, nomeadamente as fontes de carbono, como verificado por outros autores (Bernal et al., 2009; De Corato, 2020), que

referiram que o número de UFC.g⁻¹ nos compostos está positivamente correlacionado com a atividade enzimática e respiratória.

Segundo De Corato (2020), a matéria orgânica tem papel fundamental nas populações de microrganismos e na sua diversidade, sendo considerada como o suporte natural para a supressividade. Este autor verificou também que o hiperparasitismo, nomeadamente por *Trichoderma* spp. no controlo de *R. solani* e *S. rolfsii* é fortemente afectado pelo nível de decomposição da matéria orgânica, nomeadamente devido à presença de glucose e de nutrientes hidrossolúveis, que em conjunto reprimem a produção de enzimas ou o efeito lítico para matar *R. solani* (De Corato, 2020). No entanto, alguns microrganismos saprófitos competitivos, hiperparasitas facultativos e simbioses podem colonizar e induzir o biocontrolo, se posicionados em níveis baixos da cadeia trófica, sobrevivendo em matéria orgânica decomposta (van Bruggen e Termorskuizen, 2003; Pal e Gardener, 2006).

Após 12 meses de armazenamento, a diminuição das populações microbianas estudadas (Figura 6.1) também levou à redução da atividade enzimática, nomeadamente enzimas líticas como β -glucanase, quitosiose e quitinase, como verificado por De Corato (2020). No Quadro 6.2, pode ser observada a diminuição de N-acetil- β -glucosamina, leucina e Naftol-AS-BI-fosfohidrolase. β -glicosidase que aumentou de 6 para 12 meses e deve ser um indicador de microbiotase e evidência de competição por carbono entre microrganismos com redução de matéria orgânica (Borrero et al. 2009; Coelho et al., 2021).

Verificou-se que, aos 6 meses de armazenamento, a eficácia para o controlo de *R. solani* aumentou em P1, P1E, P2 e P2E, com valores superiores nos substratos enriquecidos (Figura 6.4). Nos compostos tratados termicamente e enriquecidos, observou-se um declínio, no controlo de *R. solani*, aos 12 meses devido à diminuição significativa de *Trichoderma* spp.. Os resultados foram semelhantes no controlo de *S. rolfsii* e *Clavireedia* spp. (Figura 6.4).

6.5. Conclusões

Os compostos P1 e P2 mostraram-se supressivos para as doenças estudadas, nos intervalos de tempo testados. Verificou-se um aumento no controlo biológico dos fungos

fitopatogénicos testados aos 0 para os 6 meses, seguindo-se uma diminuição. No entanto, aos 12 meses, os compostos enriquecidos apresentaram melhor capacidade supressiva quando comparados com os restantes substratos.

Os substratos P2 e P2E foram mais eficazes no controlo de *R. solani* e *S. rolfii* nos três períodos de armazenamento estudados. Para *Clavireedia* spp., os substratos P1 e P1E apresentaram melhores resultados aos 0 e aos 6 meses. Aos 12 meses, o controlo desta doença foi maior no substrato P2E.

De acordo com os resultados obtidos, os compostos enriquecidos mantêm a sua capacidade supressiva pelo menos durante 12 meses, embora os melhores resultados tenham sido alcançados aos 6 meses de armazenamento.

Um ano após o armazenamento, a capacidade dos compostos para controlar doenças das plantas permaneceu superior nos compostos enriquecidos, mostrando que mesmo em condições mais desfavoráveis, esses compostos permanecem com maior capacidade supressiva do que os compostos não enriquecidos.

6.6. Referências

- Al-Bataina, B.B., Young, T.M., Ranieri, E., 2016. Effects of compost age on the release of nutrients. *International Soil and Water Conservation Research* 4: 230-236. Doi: 10.1016/j.iswcr.2016.07.003
- Alfano, G., Lustrato, G., Lima, G., Vitullo, D., Ranalli, G., 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biol. control* 58, 199-207. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.05.001
- Antil, R.S., Raj, D., Abdalla, N., Inubushi, K., 2014. Physical, Chemical and Biological Parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. In: Maheshwari, D. K. (Ed.). *Composting for Sustainable Agriculture*. Springer. Pp. 83-102.
- Avilés, M., Borrero, C., 2017. Identifying characteristics of *Verticillium* wilt suppressiveness in olive mill composts. *Plant disease* 101 : 1568-1577. doi : 10.1094/PDIS- 08- 16- 1172- RE
- Avilés, M., Borrero, C., Trillas, M.I., 2011. Review on Compost as an Inducer of Disease Suppression in Plants Grown in Soilless Culture. *Dyn. Soil Dyn. Plant. Special Issue* 2: 1-11
- Baayen, R.P., Van der Plas, C.H., 1992. Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to *Fusarium* wilt. *Euphytica* 59, 165-174.

- Barker, A.V., 2001. Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), Compost utilization in horticultural cropping systems. Lewis Publications, Boca Raton, pp.201-225
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Intrigliolo, F., Pascual, A., 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutriactive and biocontrol effects. *Bioresour. Technol.* 99 (18), 8722-8728. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.019
- Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100: 5444-5453. doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.027
- Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J.A., Ros, M., 2013. Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 112-119. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.06.001
- Brito, L.M., Mourão, I., Coutinho, J., 2008. Transformação da matéria orgânica e do nitrogênio durante a compostagem da fração sólida do chorume bovino. *R. Bras. Ci. Solo* 32, 1959-1968. doi: 10.1590/S0100-06832008000500017
- Byrne, J.M., Dianase, A.C., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control* 32, 408-418. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.12.001
- Bohem, M.J., Hoitink, H.A.J., 1992. Sustenance of microbial activity and severity of Pythium root rot Poinsettia. *Phytopathol* 82: 259-264.
- Borrero, C., Trillas, I., Avilés, M., 2009., Carnation Fusarium wilt suppression in four compost. *Eur J Plant Pathol* 123, 425-433. doi: 10.1007/s10658-008-9380-4
- Boulter, J.I, Boland, G.J., Trevors, J.T., 2000. Compost: A study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 115-134.
- Butler, T.A., Sikora, L.J., Steinhilber, P.M., Douglass, L.W., 2001. Compost age and sample storage effects on maturity indicators of biosolids compost. *Journal of Environmental Quality* 30, 2141–2148.
- Borrero, C., Trillas, I., Avilés, M., 2009. Carnation Fusarium wilt suppression in four compost. *Eur J Plant Pathol* 123, 425-433. doi: 10.1007/s10658-008-9380-4
- Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience, New York.
- Chérif, M., Benhamou, N., 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Rsciscislycopersici*. *Phytopathol* 80, 1406-1414.
- Chung, Y.R., Hoitink, H.A.J., 1990. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in a bark compost-amended container médium. *Phytopathology* 80: 73-77.

- Coelho, L., Dionísio, L., Bueno, F., Reis, M., Duarte, J., Guerrero, C., 2016. *Trichoderma gamsii* as a biological control agent of turfgrass diseases. In: Guerrero, C., editor, Book of Abstracts of the 5th European Turfgrass Society Conference – Turfgrass – Towards Sustainability and Perfection for Aesthetic, recreational and Sports, Albufeira, Portugal, pp. 145-146.
- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M., 2020. Use of organic composts to suppress turfgrass diseases in *Agrostis stolonifera*. Biol. Control, 141, 104154 doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104154
- Coelho, L., Dionísio, L., Guerrero, C., Reis, M., 2021. Biological control of turfgrass diseases with organic composts enriched with *Trichoderma atroviride*. Biol. Control, 159, 104620 doi: 10.1016/j.biocontrol.2021.104620
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use a sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. Soil Biol. Biochem. 34, 467-476.
- Danon, M., Zmora-Nahum, S., Chen, Y., Hadar, Y., 2007. Prolonged compost curing reduces suppression of *Sclerotium rolfsii*. Soil Biology and Biochemistry, 39 (8): 1936-1946.
- De Corato, U., 2020. Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. Rhizosphere. 13, 100192. doi: 10.1016/j.rhisph.2020.100192
- Eghball, B., Power, J.F., Gilley, J.E., Doran, J.W., 1997. Nutrient, carbon, and mass loss of beef cattle feedlot manure during composting. J. Environ. Qual. 26, 189–193.
- Field, A., 2009. Discovering Statistics using SPSS, 3rd Edition. SAGE, Los Angeles, London, New Dehli, Singapore, Washington DC, pp 821.
- Golueke, C. G., 1991. Understanding the process, 14-27. In: The Biocycle guide to the Art & Science of Composting. The Staff of BioCycle (eds.). The JG Press, Inc. Emmaus, Pennsylvania, EUA.
- Hadar, Y., 2011. Suppressive compost: when plant pathology met microbial ecology. Phytoparasitica 39: 311-314
- Hermosa, R., Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S., 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. International Microbiology 16, 69-80. doi: 10.2436 / 20.1501.01.181
- Hoitink, H.A.J., Krause, M.S., Han, Y., 2001. Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts. In: Hoitink, H., Keener, H. (Eds.). Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 263–274.
- Jambhulkar, P.J., Sharma, M., Lakshman, D., Sharma, P., 2015. Natural Mechanisms of soil suppressiveness against diseases caused by *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, and *Phytophthora*. In: M.K. Meghvansi, A. Varma (eds), Organic amendments and soil suppressiveness in plant disease management. Springer. Switzerland.
- Kariuki, G.M., Muriuki, L.K., Kibiro, E.M., 2015. The Impact of Suppressive Soils on Plant Pathogens and Agricultural Productivity. In: Meghvansi, M.K., Varma, A.

- (Eds.). Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Springer, pp. 175-184.
- Liu, L., Sun, C., He, X., Liu, X., Wu, H., Liu, M., Tang, C., Zhang, Y., 2016. The secondary compost products enhances soil suppressive capacity against bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. Eur. J. Soil Biol. 75, 70-78. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.04.005
- Lorito, M., Hayes, C.K., Dipietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E., 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 84: 398-405.
- Machado, D.F.M., Parzianello, F.R., Silva, A.C.F., Antonioli, Z.I., 2012. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o Bioagente. Revista de Ciências Agrárias 26, 274-288.
- Machado, D.F.M., Parzianello, F.R., Silva, A.C.F., Antonioli, Z.I., 2012. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o Bioagente. Revista de Ciências Agrárias 26, 274-288.
- Mahatma, M.K., Mahatma, L., 2015. Soil Suppressive Microorganisms and Their Impact on Fungal Wilt Pathogens. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.) Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Springer. Pp. 249-276.
- Martin, C.C.G.St., 2015. Enhancing Soil Suppressiveness Using Compost and Compost Tea. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.). Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Springer, pp. 175-184.
- Martinez, F.X., 1992. Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los substratos. Actas de las I Jornadas de Substratos de la SECH 294, 55-65.
- Pang, G., Cai, F., Li, R., Zhao, Z., Li, R., Gu, X., Shen, Q., Chen, W., 2017. *Trichoderma*-enriched organic fertilizer degeneration of monocropped soil to maintain better plant growth. Plant soil. 416, 181-192. doi: 10.1007/s11104-017-3178-0
- Pesaro, M., Nicollier, G., Zeyer, J., Widmer, F., 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. Applied and Environmental Microbiology 70, 2577-2587.
- Raviv, M., Medin, S., Krasnovsky, A., Ziadna, H., 2004. Organic matter and nitrogen conservation in manure compost for organic agriculture. Compost Sci. Util., 12:6-10. doi: 10.1080/1065657X.2004.10702151
- Ram, R.M., Tripathi, R., Birla, H., Dilnashin, H., Singh, S.P., Keswani, C., 2019. Mixed PGPR consortium: an effective modulator of antioxidant network for management of collar rot in cauliflower. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 52 (7-8), 844-862.
- Ramos, J.C.M., Vilaseca, J.S., Ramon, A.C., 1987. Control analític de la qualitat del compost i estudi de la seva maduració, In: Server del Medi Ambient, Diputació de Barcelona, (Ed.). Experiències amb el compost. Estudis I monografies: 12, pp. 31-69.
- Reis, M., 2016. Os compostos no controlo das doenças das plantas. Revista de Ciências Agrárias 39 (1), 25-35. doi:10.19084/RCA15111
- Salgado-Salazar, C., Beirn, L.A., Ismaiel, A., Boehm, M.J., Carbone, I., Putman, A.I., Tredway, L.P., Clarke, B.B., Crouch, J.A., 2018. *Clarireedia*: A new fungal genus

- comprising four pathogenic species responsible for dollar spot disease of turfgrass. *Fungal Biol.* 122, 761-773. doi: 10.1016/j.funbio.2018.04.004
- Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., Trillas, I., 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (1): 77-83.
- Segarra, G., Casanova, E., Borrero, C., Avilés, M., Trillas, M., 2007. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 117, 393-402. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-11242
- Sikora, L.J., Szmidt, R.A.K., 2001. Los compost como fuentes de nitrogen, aportación a la mineralización y ventajas para la nutrición nitrogenada de las plantas. In: Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (Eds.), *Compost utilization in horticultural cropping systems*. Lewis Publications, Boca Raton, pp.287-306
- Tani, T., Beard, J.B., 1997. *Color Atlas of Turfgrass Diseases*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés M., 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol Control* 39, 32-38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.05.007
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampally, R.Y., Valero, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp., Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37, 1-20.
- Zmora-Nahum, S., Danon, M., Hadar, Y., Chen, Y., 2008. Chemical properties of compost extracts inhibitory to germination of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biol Biochem* 40, 2523-2529. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.06.025
- Val-Moraes, S.P., 2015. Suppressiveness in Different Soils for *Rhizoctonia solani*. In: Meghvansi, M.K., Varma, A. (Eds.). *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Springer, pp. 175-184.
- van Bruggen, A.H., Termorskuizen, A.J., 2003. Integrated approaches to root disease management in organic farming systems. *Australas. Plant Pathol.*, 32 (2): 141-156.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zhang, W., Han, D.Y., Dick, W.A., Davis, K.R., Hoitink, H.A.J., 1998. Compost and Compost Water Extract-Induced Systemic Acquired Resistance in Cucumber and *Arabidopsis*. *Phytopathology* 88 (5), 450-455.

7. CAPÍTULO 7

Conclusões Gerais

Compostagem de resíduos agroindustriais

A compostagem permitiu valorizar desperdícios agroindustriais, tais como laranja de refugo, bagaço de uva, aparas de relva e restos da produção de cogumelos, transformando-os em compostos estáveis sob o ponto de vista microbiológico e físico-químico, com elevada aptidão agrícola.

A adição de resíduos ricos em quitina originou compostos com propriedades físicas, químicas e biológicas mais vantajosas no controlo de doenças do solo, nomeadamente maiores e mais diversas populações de microrganismos e maior atividade enzimática. Dos dois compostos obtidos foi isolado *T. atroviride*, que foi usado para enriquecer os compostos posteriormente testados.

Capacidade supressiva dos compostos obtidos

Os compostos provenientes de resíduos agroindustriais usados apresentaram características que permitiram o desenvolvimento de um elevado número de microrganismos antagonistas contra fungos patogénicos do solo, nomeadamente *Clariireedia* spp., *S. rolfii* e *R. solani*. Dos antagonistas isolados, o que apresentou melhores resultados *in vitro* foi *Trichoderma atroviride*, com uma taxa de inibição do crescimento dos patogénicos, entre 56 e 68 %. Nos ensaios *in vivo*, com relva, o composto P1 apresentou a maior capacidade supressiva contra *Clariireedia* spp.. O composto P2, com menor teor de azoto e maior população de *Trichoderma* spp., apresentou maior capacidade no controlo de *R. solani*.

Estes resultados demonstraram que as propriedades biológicas e físico-químicas do composto influenciaram a sua capacidade supressiva.

No caso da cultura de estévia, no final do ensaio a incidência das doenças foi elevada. No entanto, os compostos conseguiram controlar a sua severidade e conseqüentemente a mortalidade das plantas, destacando-se o composto P2, no controlo de *R. solani*.

Enriquecimento dos compostos obtidos

O enriquecimento dos compostos obtidos com *T. atroviride* aumentou os teores de alguns nutrientes, como o potássio e o ferro. O aumento das populações de microrganismos

permitiu o aumento da atividade enzimática, particularmente de N-acetil- β -glucosaminidase. Os compostos enriquecidos foram mais eficazes no controlo biológico de *S. rolfsii*, *Clariireedia* spp. e *R. solani*. O composto P1E proporcionou a diminuição da área afetada de *Clariireedia* spp., enquanto P2E, com maior população de *Trichoderma* spp., foi mais eficaz no controlo de *R. solani* e *S. rolfsii*.

Efeito da duração do armazenamento na capacidade supressiva dos compostos

As propriedades supressivas dos compostos mantiveram-se durante o período do ensaio, apesar de se terem verificado alterações no desempenho dos compostos, nomeadamente um aumento do controlo biológico das doenças dos 0 para os 6 meses, seguido de uma diminuição.

Para ambas as doenças testadas, os melhores resultados foram observados aos 6 meses de armazenamento. Aos 12 meses de armazenamento, os compostos enriquecidos apresentaram melhor capacidade de controlo biológico.

Os compostos P2 e P2E foram mais eficazes no controlo de *R. solani* e *S. rolfsii* nos três períodos de armazenamento estudados. Contra *Clariireedia* spp., os compostos P1 e P1E apresentaram melhores resultados aos 0 e aos 6 meses. Após 12 meses, o controlo desta doença foi mais eficaz em P2E.

De acordo com os resultados obtidos, os compostos enriquecidos com *T. atroviride* isolado mantêm a sua capacidade supressiva durante pelo menos 12 meses para as doenças estudadas, embora os melhores resultados tenham sido alcançados após 6 meses de armazenamento.

Conclusões finais

- A adição de quitina na compostagem proporcionou o desenvolvimento de compostos com maiores e mais diversas populações de microrganismos antagonistas;
- Na relva, o composto P1 foi mais eficaz no controlo de *Clariireedia* spp. e o P2 (com quitina) no controlo de *R. solani* e *S. rolfsii*; evidenciando que as propriedades biológicas e físico-químicas do composto influenciam a sua

capacidade supressiva. Na cultura de estévia, o composto P2 destacou-se no controlo de *R. solani*;

- O enriquecimento dos compostos com *T. atroviride* tornou os compostos mais supressivos para as doenças estudadas e durante mais tempo;
- A supressividade dos compostos foi afetada pelo armazenamento, verificando-se perda de capacidade de controlo das doenças após 12 meses de armazenamento.

Perspetivas Futuras

No decorrer deste trabalho encontraram-se respostas às questões levantadas. No entanto, o enriquecimento dos compostos requer conhecimentos mais aprofundados que permitam maximizar o seu efeito no cultivo das plantas e na proteção do ambiente.

Será muito importante testar a compostagem de resíduos de outras culturas e materiais, nomeadamente de origem agroindustrial, determinando o valor agronómico dos compostos obtidos. Também o estudo do efeito da incorporação, na compostagem, de resíduos específicos, como os ricos em quitina deverá ser desenvolvido.

A expansão de algumas doenças de solo e o surgimento de novas doenças das plantas, exige respostas sustentáveis para minimizar os seus efeitos. Nesse contexto, é fundamental aprofundar o estudo da capacidade de controlo destas doenças, através do uso de compostos enriquecidos com antagonistas, que poderão ser aplicados ao solo como agentes melhoradores, como substratos hortícolas ou aplicados à parte aérea das plantas. A nível das doenças da parte aérea das plantas, é essencial avaliar a capacidade supressiva dos compostos e os mecanismos de ação envolvidos, aumentando o conjunto de técnicas sustentáveis para o seu controlo.

A aplicação de extratos líquidos obtidos a partir dos compostos, é uma via de aplicação a desenvolver, sendo necessário estudar em que culturas e contra que fungos patogénicos esta forma de aplicação poderá ser viável e eficaz.

Nos campos de golfe, a forma de aplicação dos compostos ao solo, também deverá ser estudada, de forma a não causar alterações estéticas nos relvados.

Capítulo 7

Apesar do vasto conhecimento já existente sobre o processo da compostagem e o efeito dos compostos, a sua aplicação a resíduos agroindustriais, levanta ainda muitas questões às quais é necessário responder para valorizar os resíduos gerados pela atividade agrícola, florestal e industrial, e assim maximizar a circularidade na agricultura e a sua sustentabilidade.

**CONTROLO BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO EM PLANTAS
CULTIVADAS, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE
RESÍDUOS ORGÂNICOS ENRIQUECIDOS COM ANTAGONISTAS**

LUÍSA ISABEL GUERREIRO DAVID COELHO

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

2022