

Pedro Miguel Inácio Matias

**Eficácia do sistema de filtração
lenta enriquecido com *Trichoderma
atroviride* no controlo de doenças
em cultivo sem solo**



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2022

Pedro Miguel Inácio Matias

**Eficácia do sistema de filtração
lenta enriquecido com *Trichoderma
atroviride* no controlo de doenças
em cultivo sem solo**

**Mestrado em Hortofruticultura
Trabalho efetuado sob a orientação de:
Mário Manuel Ferreira dos Reis**



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
2022

Declaração de autoria do trabalho

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

Copyright

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Em primeiro lugar os meus agradecimentos são ao meu Orientador, o Professor Mário Reis, por toda a disponibilidade, dedicação e paciência. Além disso, sua “engenheirice”, muito própria, foi fundamental e, que juntamente com toda a sua ajuda fizeram com este trabalho fosse possível.

À Luísa Coelho, colega e amiga, que foi como minha Professora e Orientadora, incansável e sempre pronta a ajudar. Sem ela, a realização deste trabalho não tinha sido possível.

Ao Professor Amílcar Duarte, pelas várias sugestões e dicas que melhoraram e facilitaram este trabalho. Também pelo conhecimento transmitido ao longo de alguns anos de atividade profissional sob a sua orientação, que em vários aspetos se refletiram na realização deste trabalho.

A todos os outros Professores da Licenciatura e do Mestrado, que tiveram um papel crucial na minha aprendizagem.

À Beatriz Duarte, à Ana Rita, à Rita Poeira e ao Tomás Magalhães, pelos incansáveis incentivos e por toda a ajuda.

Ao João Duarte e à Rosário Lopes por toda a ajuda e disponibilidade.

À minha Família e Amigos, por todo o apoio e suporte. Tornaram este processo mais fácil e divertido.

Resumo

O cultivo sem solo é uma técnica cada vez mais utilizada no cultivo das plantas. No entanto, quando o cultivo é feito em substrato, a drenagem, constituída por água e nutrientes, é frequentemente descartada, o que representa um desaproveitamento destes recursos. A drenagem pode ser reutilizada para a rega da mesma cultura ou de outras culturas. Para isso, a drenagem deve estar livre de agentes patogénicos, podendo ser necessário a utilização de um sistema de desinfeção. O sistema de filtração lenta em areia é um método de desinfeção da água, de baixo custo, ecológico e eficaz, que apresenta vários benefícios em relação a outras alternativas. No entanto, este sistema não é completamente eficaz no controlo de alguns patogénicos, como *Fusarium* spp., além da necessidade de espaço poder ser uma limitação. Neste sistema, a desinfeção ocorre principalmente pelo controlo biológico que ocorre no filtro. Por isso, levanta-se a questão: será possível melhorar a eficácia da filtração lenta em areia, através da adição de microrganismos antagonistas no filtro?

Para dar resposta a esta questão, instalou-se um ensaio onde se testou a eficácia de um sistema de filtração lenta em areia, melhorado, através da inoculação do fungo antagonista *Trichoderma atroviride*. Foi avaliada a sua capacidade supressiva sobre dois fungos fitopatogénicos: *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, inoculados na solução de rega num sistema fechado de cultivo sem solo.

Verificou-se um aumento da eficácia do filtro com *T. atroviride*, cerca de 25% superior no controlo de *R. solani*, do que o filtro não melhorado e 11% mais eficaz no controlo de *F. oxysporum*. Além disso, o antagonista *T. atroviride* teve, quase sempre, a mesma capacidade de controlo dos agentes patogénicos, quando aplicado na solução nutritiva, mesmo sem sistema de filtração. Isto pode contribuir para uma mais eficaz desinfeção da drenagem, permitindo a reutilização da mesma para melhorar eficiência de uso da água e dos nutrientes.

Palavras-chave: água, sustentabilidade, controlo biológico, drenagem, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma atroviride*

Abstract

Efficacy of slow filtration improved with *Trichoderma atroviride* in the diseases control on soilless cultivation

Soilless cultivation is an increasingly used technique in the cultivation of plants. However, when growing on substrate, drainage, which contains large amounts of water and nutrients, is often discarded. Discarding it represents a waste of these resources. However, the drainage can be reused for watering the same crop or other crops. For this, the drainage must be free of pathogens, and the use of a disinfection system may be necessary or safer. The slow sand filtration system is a low-cost, ecological, and effective method of water disinfection, which has several benefits over other alternatives. However, this system appears not to be completely effective in controlling some pathogens, such as *Fusarium* spp. and space occupation can be a limitation. Disinfection in this system occurs mainly by the biological control that takes place in the filter. However, the following question arises: is it possible to improve the efficiency of the slow sand filtration system by adding antagonistic microorganisms to the filter?

To answer this question, a trial was set up where the efficiency of a slow sand filtration system, improved by inoculation of the antagonistic fungus *Trichoderma atroviride*, was tested. Its suppressive capacity on two phytopathogenic fungi was evaluated: *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, inoculated in the irrigation solution in a closed soilless cultivation system.

There was an increase in the efficiency of the filter with *T. atroviride*, being about 25% more efficient in controlling *R. solani* than the non-improved filter and 11% more efficient in controlling *F. oxysporum*. Furthermore, the antagonist *T. atroviride* almost always had the same ability to control pathogens when applied only in the nutrient solution, even without a filtration system. These findings can contribute to more effective disinfection of the drainage, allowing its reuse, for better use of water and nutrients.

Keywords: water, sustainability, biological control, drainage, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma atroviride*.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de Figuras	x
Índice de Quadros	xv
Índice de Anexos	xix
Símbolos e Abreviaturas.....	xx
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O cultivo sem solo	23
2.1.1 Vantagens e inconvenientes do cultivo sem solo.....	23
2.1.2 O cultivo hidropónico e o cultivo em substrato	24
2.1.3 Classificação dos sistemas de cultivo em função do destino da drenagem	25
2.1.3.1 Vantagens e limitações do sistema aberto e do sistema fechado.....	26
2.1.4 Reutilização da drenagem	27
2.1.4.1 Estratégias para reutilização da drenagem.....	28
2.1.4.2 Controlo da drenagem	29
2.1.4.3 Patogénicos disseminados pela água	30
2.1.5 Sistemas de desinfeção da drenagem	31
2.2 Sistema de filtração lenta em areia	35
2.2.1 Breve enquadramento histórico	35
2.2.2 Vantagens e limitações do sistema de filtração lenta.....	36
2.2.3 Princípios fundamentais de um sistema de filtração lenta	36
2.2.4 Instalação e manutenção do sistema de filtração lenta	38

2.2.5	Material filtrante	40
2.2.6	Eficácia no controlo de agentes fitopatogénicos.....	41
2.3	O fungo <i>Trichoderma atroviride</i>	43
2.3.1	Características morfológicas e ecológicas	43
2.3.2	Propriedades de biocontrolo de <i>Trichoderma</i> spp. contra fungos fitopatogénicos.....	44
2.3.2.1	Micoparasitismo	45
2.3.2.2	Produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular.....	48
2.3.2.3	Síntese de antibióticos e de outros compostos.....	49
2.3.2.4	Competição por espaço e nutrientes	50
2.3.2.5	Indução da resistência das plantas em resposta a <i>stresses</i> bióticos	51
3	OBJETIVO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Ensaio preliminares	55
4.1.1	Escolha da cultivar do pepino	55
4.1.1.1	Modalidades e desenho experimental.....	55
4.1.1.2	Preparação dos alvéolos, sementeira e inoculação	55
4.1.2	Obtenção do patogénico <i>Fusarium oxysporum</i>	55
4.1.3	Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i>	56
4.1.4	Determinação da granulometria do material filtrante	57
4.2	Ensaio principais	58
4.2.1	Modalidades e desenho experimental	58
4.2.2	Sistema de cultivo	59
4.2.3	Manutenção das culturas de microrganismos	60
4.2.4	Preparação da suspensão de <i>Trichoderma atroviride</i>	61
4.2.5	Cultivo dos agentes patogénicos em substrato.....	62
4.2.6	Parâmetros medidos	63
4.2.6.1	Severidade da doença	63
4.2.6.2	Incidência da doença	64
4.2.6.3	Eficácia, consistência e índice de controlo biológico (BCI)	64
4.2.6.4	Cálculos e análise estatística.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	Ensaio preliminares	67

5.1.1	Sensibilidade de quatro cultivares de pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.) à doença causada por <i>Rhizoctonia solani</i>	67
5.1.1.1	Severidade da doença	67
5.1.1.2	Incidência da doença	68
5.1.1.3	Conclusões.....	68
5.1.2	Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i>	69
5.1.3	Determinação da granulometria do material filtrante	71
5.2	Ensaio com o agente patogénico <i>Rhizoctonia solani</i>	72
5.2.1	Severidade da doença.....	72
5.2.1.1	Efeito do sistema de filtração na severidade da doença	76
5.2.1.2	Efeito de <i>Trichoderma atroviride</i> na severidade da doença.....	77
5.2.1.3	Efeito do filtro melhorado com <i>Trichoderma atroviride</i> na severidade da doença.....	78
5.2.1.4	Efeito de <i>Rhizoctonia solani</i> na severidade da doença.....	79
5.2.2	Incidência da doença.....	80
5.2.2.1	Efeito do sistema de filtração na incidência da doença	83
5.2.2.2	Efeito de <i>Trichoderma atroviride</i> na incidência da doença	84
5.2.2.3	Efeito do filtro melhorado com <i>Trichoderma atroviride</i> na incidência da doença.....	85
5.2.2.4	Efeito de <i>Rhizoctonia solani</i> na incidência da doença	86
5.2.3	Correlação entre a severidade e a incidência da doença	87
5.2.4	Eficácia e índice de controlo biológico.....	87
5.3	Ensaio com o agente patogénico <i>Fusarium oxysporum</i>	90
5.3.1	Severidade da doença.....	90
5.3.1.1	Efeito do sistema de filtração na severidade da doença	94
5.3.1.2	Efeito de <i>Trichoderma atroviride</i> na severidade da doença.....	95
5.3.1.3	Efeito do filtro melhorado com <i>Trichoderma atroviride</i> na severidade da doença.....	96
5.3.1.4	Efeito de <i>Fusarium oxysporum</i> na severidade da doença.....	97
5.3.2	Incidência da doença.....	98
5.3.2.1	Efeito do sistema de filtração na incidência da doença	101
5.3.2.2	Efeito de <i>Trichoderma atroviride</i> na incidência da doença	102
5.3.2.1	Efeito do filtro melhorado com <i>Trichoderma atroviride</i> na incidência da doença.....	103
5.3.2.2	Efeito de <i>Fusarium oxysporum</i> na incidência da doença	104
5.3.3	Correlação entre a severidade e a incidência da doença	104
5.3.4	Eficácia e índice de controlo biológico.....	105

6	CONCLUSÕES	107
	Eficácia da filtração lenta melhorada no controlo de <i>Rhizoctonia solani</i>	107
	Eficácia da filtração lenta melhorada no controlo de <i>Fusarium oxysporum</i>	107
	Conclusões gerais e perspetivas futuras	108
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8	ANEXOS	119

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática de diferentes estratégias de gestão da drenagem. Fonte: Louro & Reis, 2020; Pardossi <i>et al.</i> , 2011.	28
Figura 2.2 – Esquema de um sistema de desinfecção por filtração lenta. Fonte: Louro & Reis, 2020.	38
Figura 2.3 – Cultura de <i>Trichoderma atroviride</i> em PDA, três dias após inoculação. Fotografia de Luísa Coelho.	43
Figura 2.4 – Cultura de <i>Trichoderma atroviride</i> observada ao microscópio. 1 – hifa; 2 – septo; 3 – conidióforo; 4 – fiálide (célula conidiogénica em forma de garrafa); 5 – conídio formado na extremidade da fiálide; 6 – conídio. Adaptado de Ranque <i>et al.</i> , 2008.	44
Figura 2.5 – Mecanismos diretos e indiretos de biocontrolo, usados pelo género <i>Trichoderma</i> contra fungos fitopatogénicos. Fonte: Tyśkiewicz <i>et al.</i> , 2022.	44
Figura 2.6 – Exemplo de micoparasitismo provocado por <i>Trichoderma virens</i> em <i>Rhizoctonia solani</i> . A – quimiotropismo (atração); B – conexão; C – enrolamento; D – lise celular de hifas do hospedeiro. Fonte: Mukherjee <i>et al.</i> , 2012.	46
Figura 2.7 – Micoparasitismo provocado por <i>Trichoderma atroviride</i> contra <i>Rhizoctonia solani</i> . <i>T. atroviride</i> liberta protéases (A) que provocam a libertação de pequenas moléculas de <i>R. solani</i> (B). <i>R. solani</i> também liberta espécies reativas de oxigénio (ROS) como resposta à presença de <i>Trichoderma</i> spp. (C). Estas moléculas ligam-se a recetores que estão em células de <i>Trichoderma</i> spp. (D), o que desencadeia produção de proteínas (E) e expressão de genes (F) que codificam enzimas responsáveis pela lise da parede celular de <i>R. solani</i> (G). Fonte: Abbas <i>et al.</i> , 2022.	47
Figura 4.1 – Esquema completo do sistema de cultivo utilizado. 1 – calha; 2 – vaso; 3 – plantas de pepino, (<i>Cucumis sativus</i> L. ‘Marketer’); 4 – microtubo; 5 – drenagem; 6 – substrato com o patogénico, somente nas modalidades P ⁺ ; 7 – tubo PVC com filtro nas modalidades F ⁺ e sem filtro nas modalidades F ⁻ ; 8 – estrutura de saída (tubo PE ½”); 9 – depósito de recolha da drenagem (10 L); 10 – bomba; 11 – tubo de rega. Setas pretas representam a direção da circulação da solução nutritiva.	59
Figura 4.2 – Suspensão de conídios de <i>Trichoderma atroviride</i>	61
Figura 4.3 – Esfregaço de uma cultura de <i>Trichoderma atroviride</i> , em água.	61

Figura 4.4 – Placas de Petri com turfa loura, esterilizadas.....	63
Figura 4.5 – Crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> em turfa loura (5 dias após inoculação).	63
Figura 4.6 – escala visual de sintomas usada para avaliação da severidade da doença. 1 – ausência de sintomas; 2 – lesões leves; 3 – lesões graves; 4 – morte pós-emergência; 5 – morte pré-emergência.	63
Figura 5.1 – Severidade média da doença de cada uma das quatro cultivares, em função da presença e da ausência de <i>Rhizoctonia solani</i> . Média \pm erro padrão; n=10; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan (p=0,05).	67
Figura 5.2 – Rt, média do raio de crescimento total do antagonista <i>Trichoderma atroviride</i> ; R1, média do raio de crescimento do patogénico que cresceu na presença do antagonista; e Rc, média do raio de crescimento do patogénico que cresceu isoladamente. Média \pm erro padrão; n=3.	69
Figura 5.3 – Percentagens de inibição de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> no confronto com o antagonista <i>Trichoderma atroviride</i>	70
Figura 5.4 – Percentagem, em peso, por classe de granulometria da areia e da gravilha utilizadas nos filtros.....	71
Figura 5.5 – Média da severidade da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=40; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan (p=0,05). F, filtro; T, <i>Trichoderma atroviride</i> ; P, <i>Rhizoctonia solani</i> ; +/-, presença ou ausência.	73
Figura 5.6 – Percentagem média de plantas de cada nível de severidade da doença (Nível), por modalidade. F, filtro; T, <i>Trichoderma atroviride</i> ; P, <i>Rhizoctonia solani</i> ; +/-, presença ou ausência.	74
Figura 5.7 – Média da severidade da doença, por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student (p=0,05).....	76
Figura 5.8 – Média da severidade da doença, por ensaio, em função da presença ou ausência de <i>Trichoderma atroviride</i> . Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20;	

- n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$)..... 77
- Figura 5.9** – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no sistema de filtração. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 80. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$). 78
- Figura 5.10** – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Rhizoctonia solani*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$)..... 79
- Figura 5.11** – Média da incidência da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=40; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência..... 81
- Figura 5.12** – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$)..... 83
- Figura 5.13** – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$)..... 84
- Figura 5.14** – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 80. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$)..... 85
- Figura 5.15** – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Rhizoctonia solani*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$)..... 86
- Figura 5.16** – Média da severidade da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=25. Médias com letras iguais não diferem significativamente

entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência. 91

Figura 5.17 – Percentagem média de plantas de cada nível de severidade da doença (Nível), por modalidade. F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência. 92

Figura 5.18 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante (areia) no tubo do filtro. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 100$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$). 94

Figura 5.19 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 100$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$). 95

Figura 5.20 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 10$; $n(\text{média}) = 50$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$). 96

Figura 5.21 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Fusarium oxysporum*. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 100$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$). 97

Figura 5.22 – Média da incidência da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; $n=25$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência. 99

Figura 5.23 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 100$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$). 101

Figura 5.24 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$;

n(média) = 100. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student (p=0,05).	102
Figura 5.25 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de <i>Trichoderma atroviride</i> no filtro. Média ± erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 50. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student (p=0,05).	103
Figura 5.26 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de <i>Fusarium oxysporum</i> . Média ± erro padrão; n=20; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student (p=0,05). ...	104
Figura 8.1 – Imagem e esquema do sistema de filtração usado. h – altura; d – diâmetro; dp – diâmetro das partículas (granulometria).	119
Figura 8.2 – Sistema de cultivo utilizado nos ensaios. 1 – calha de cultivo; 2 – tubo PE; 3 – microtubo; 4 – substrato; 5 – vaso; 6 – planta; 7 – vaso com patogénico, somente nas modalidades P ⁺ ; 8 – tubo PVC com filtro nas modalidades F ⁺ e sem filtro nas modalidades F ⁻	120
Figura 8.3 – Sistema de cultivo utilizado nos ensaios. A – calha de cultivo que serviu de suporte aos vasos; B – depósitos de armazenamento da drenagem, onde estava a bomba elétrica submersível; C – Tubos PVC.	120

Índice de Quadros

Quadro 2.1 – Quadro resumo das principais formas de cultivo hidropónico. Adaptado de Reis, 2014.	25
Quadro 2.2 – Quadro resumo das vantagens e limitações dos sistemas abertos e dos sistemas fechados. Fonte: Louro & Reis, 2020.	26
Quadro 2.3 – Principais agentes patogénicos disseminados pela água de rega.	30
Quadro 2.4 – Quadro resumo dos principais métodos de desinfeção da drenagem aplicados em cultivo sem solo. Adaptado de: Bergstrand, 2009; Ehret <i>et al.</i> , 2001; Louro & Reis, 2020; Postma <i>et al.</i> , 2001 e Stewart-Wade, 2011. * Descrito com mais pormenor nos subcapítulos seguintes.....	32
Quadro 2.5 – Principais vantagens e limitações do sistema de filtração lenta.....	36
Quadro 2.6 – Parâmetros indicadores da qualidade da areia do filtro. Fonte: Ehret <i>et al.</i> , 2001.	40
Quadro 2.7 – Diferentes materiais filtrantes e características recomendadas para a sua utilização no sistema de filtração lenta. Fonte: Wohanka <i>et al.</i> , 1999.	40
Quadro 2.8 – Resumo da variação de eficácia observada contra alguns agentes patogénicos em vários sistemas de filtração lenta.	41
Quadro 2.9 – Genes de <i>Trichoderma atroviride</i> que estão envolvidos na produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular de <i>Rhizoctonia solani</i> . Fonte: Abbas <i>et al.</i> , 2022.....	49
Quadro 4.1 – Modalidades dos ensaios principais	58
Quadro 5.1 – Incidência média da doença de cada uma das quatro cultivares, em função da presença ou ausência de <i>R. solani</i> . Em cada coluna, médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).....	68
Quadro 5.2 – Tamanho efetivo das partículas e coeficiente de uniformidade dos materiais utilizados no filtro.....	71
Quadro 5.3 – Severidade da doença causada por <i>Rhizoctonia solani</i> em cada um dos ensaios, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).....	72
Quadro 5.4 – Quadro resumo da análise da variância.....	75

Quadro 5.5 – Incidência da doença causada por <i>Rhizoctonia solani</i> em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).	80
Quadro 5.6 – Quadro resumo da análise da variância.	82
Quadro 5.7 – Coeficiente de correlação e respetiva significância, entre a severidade e a incidência da doença por ensaio e da média dos ensaios.	87
Quadro 5.8 – Eficácia (E), consistência (C) e índice de controlo biológico (BCI), por ensaio e média dos ensaios, em função da modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).	88
Quadro 5.9 – Média da severidade da doença causada por <i>Fusarium oxysporum</i> em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores as médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).	90
Quadro 5.10 – Quadro resumo da análise da variância.	93
Quadro 5.11 – Incidência da doença causada por <i>Fusarium oxysporum</i> em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).	98
Quadro 5.12 – Quadro resumo da análise da variância	100
Quadro 5.13 – Coeficiente de correlação e respetiva significância, entre a severidade e a incidência da doença por ensaio e da média dos ensaios.	105
Quadro 5.14 – Eficácia (E), consistência (C) e índice de controlo biológico (BCI), por ensaio e média dos ensaios, em função da modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).	105
Quadro 8.1 – Quadro resumo da análise da variância: Efeito de <i>Rhizoctonia solani</i> na severidade da doença em quatro variedades de pepino	121
Quadro 8.2 – Quadro resumo da análise da variância: Efeito de <i>Rhizoctonia solani</i> na incidência da doença em quatro variedades de pepino.	121
Quadro 8.3 - Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (1º ensaio).	122

Quadro 8.4 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (2º ensaio).	122
Quadro 8.5 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (3º ensaio).	122
Quadro 8.6 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (4º ensaio).	122
Quadro 8.7 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (5º ensaio).	123
Quadro 8.8 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (6º ensaio).	123
Quadro 8.9 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (7º ensaio).	123
Quadro 8.10 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (8º ensaio).	123
Quadro 8.11 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (média dos ensaios).	123
Quadro 8.12 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (1º ensaio).	124
Quadro 8.13 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (2º ensaio).	124
Quadro 8.14 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (3º ensaio).	124
Quadro 8.15 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (4º ensaio).	124
Quadro 8.16 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (5º ensaio).	124
Quadro 8.17 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (6º ensaio).	125
Quadro 8.18 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (7º ensaio).	125

Quadro 8.19 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (8º ensaio).	125
Quadro 8.20 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (média dos ensaios).....	125
Quadro 8.21 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (1º ensaio).	126
Quadro 8.22 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (2º ensaio).	126
Quadro 8.23 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (3º ensaio).	126
Quadro 8.24 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (4º ensaio).	126
Quadro 8.25 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (5º ensaio).	127
Quadro 8.26 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (média dos ensaios).....	127
Quadro 8.27 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (1º ensaio).	127
Quadro 8.28 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (2º ensaio).	127
Quadro 8.29 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (3º ensaio).	127
Quadro 8.30 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (4º ensaio).	128
Quadro 8.31 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (5º ensaio).	128
Quadro 8.32 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (média dos ensaios).....	128

Índice de Anexos

ANEXO I: Sistema de filtração lenta em areia.....	119
ANEXO II: Sistema de cultivo.....	120
ANEXO III: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio preliminares.....	121
ANEXO IV: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio principais com <i>Rhizoctonia solani</i>	122
ANEXO V: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio principais com <i>Fusarium oxysporum</i>	126

Símbolos e Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ArMV – *Arabis mosaic virus*

BCI – Índice de controlo biológico

C – Consistência

CE – Condutividade elétrica

CGMV – *Cucumber green mosaic virus*

CMA – *Corn Meal Agar*

CMV – *Cucumber mosaic virus*

E – Eficácia

LBVA – *Lettuce big vein agent*

MNSV – *Melon necrotic spot virus*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDA – *Potato Dextrose Agar*

PFBV – *Pelargonium flower break virus*

PLCV – *Pelargonium leaf curl virus*

RSA – Resistência Sistémica Adquirida

RSI – Resistência Sistémica Induzida

TMV – *Tobacco mosaic virus*

TNV – *Tobacco necrosis virus*

ToMV – *Tomato mosaic virus*

TSWV – *Tomato spotted wilt virus*

λ – Comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

A produção de hortícolas e de pequenos frutos é uma atividade agrícola de grande importância. A evolução tecnológica das últimas décadas permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo, mais eficientes quanto ao uso de fatores de produção, especialmente a água. Em particular, o cultivo sem solo é uma técnica cada vez mais utilizada naquelas culturas, podendo ser aplicado, essencialmente, de duas formas: em cultivo hidropónico ou em substratos.

Quando o cultivo sem solo é feito em substratos, a drenagem que ocorre após cada rega com solução nutritiva, é frequentemente descartada – funcionamento em sistema aberto. No entanto, esta drenagem consiste em água com uma quantidade importante de nutrientes. Por isso, descartar a drenagem representa um desaproveitamento destes recursos (água e nutrientes) do sistema, sendo a sua recuperação, para regar novamente a cultura, bastante interessante – funcionamento em sistema fechado.

Na prática, a drenagem pode ser reaproveitada para a rega da mesma ou de outra cultura. Para isso, deve estar livre de agentes fitopatogénicos e, pelo menos, até que a concentração de alguns elementos, principalmente Cl e Na, atinja níveis incompatíveis com a cultura. A preocupação crescente relacionada com a escassez de água leva, mais do que nunca, à importância de arranjar estratégias que permitam a otimização da utilização deste recurso, onde se insere a recuperação da solução nutritiva drenada.

Vários agentes fitopatogénicos têm a capacidade de serem disseminados pela água de rega e de infetar as plantas. Portanto, para reaproveitar a solução drenada é aconselhável a utilização de algum sistema de desinfecção, como pode ser o sistema de filtração lenta em areia. Este sistema é uma alternativa interessante para desinfecção da drenagem por ser simples e muito eficaz no controlo de diversos agentes patogénicos, além de ser um sistema ecológico e de baixo custo. No entanto, alguns autores verificaram que este sistema não é completamente eficaz em controlar alguns patogénicos, como *Fusarium* spp., vírus e nemátodos. Além disso, requer muito espaço para o filtro em áreas de cultivo de grande dimensão.

Por ser um sistema com enorme potencial, melhorar a eficácia do sistema de filtração lenta em areia pode ser interessante se permitir mitigar algumas das suas limitações.

A desinfecção neste sistema ocorre principalmente pelo controlo biológico que ocorre no material filtrante, e por isso, a adição de microrganismos benéficos no filtro surge como hipótese para aumentar a eficácia deste sistema.

O fungo antagonista *Trichoderma atroviride* apresenta um enorme potencial de biocontrolo contra vários agentes fitopatogénicos, através de vários mecanismos, tais como micoparasitismo, produção de antibióticos e a competição por espaço e nutrientes. A sua utilização na agricultura como agente biológico de controlo tem sido descrita em inúmeros trabalhos.

O patogénico *Rhizoctonia solani* é um fungo do solo, que pode ser disseminado através da água de rega, com capacidade em infetar as plantas em sistemas de cultivo sem solo. Alguns métodos de desinfecção vulgares, como o uso do cloro, por exemplo, mostraram-se ineficazes no controlo deste patogénico. Além disso, parecem não existir, na bibliografia, trabalhos acerca da eficácia do sistema de filtração lenta no controlo deste patogénico.

Vários trabalhos mostram que o sistema de filtração lenta em areia não é completamente eficaz no controlo de *Fusarium oxysporum*. Outros trabalhos referem que o seu controlo total ou quase total é possível através da melhoria do sistema de filtração, através da utilização de taxas de filtração mais baixas ou de outros materiais filtrantes, como lã de rocha. No entanto, taxas de filtração mais lentas vincam ainda mais uma das limitações do sistema de filtração lenta – a necessidade de espaço. Acresce que a lã de rocha é mais dispendiosa do que areia.

A utilização de *T. atroviride*, que tem enorme potencial de biocontrolo, no sistema de filtração lenta surgiu como uma hipótese interessante para tentar dar resposta a algumas das limitações deste sistema ecológico e de baixo custo, com enorme interesse na horticultura.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia de um sistema de filtração lenta em areia, melhorado com a introdução de um microrganismo benéfico no filtro, o fungo *Trichoderma atroviride*, num cultivo sem solo. Foi avaliada a sua capacidade supressiva sobre dois fungos fitopatogénicos: *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O cultivo sem solo

O cultivo de plantas fora do solo é feito desde há milhares de anos, desde o Antigo Egipto (1460 a.C.) e noutras civilizações (Louro & Reis, 2020). Com o desenvolvimento tecnológico das últimas décadas, o cultivo sem solo começou a ser cada vez mais utilizado devido às suas vantagens. Esta forma de cultivo permite, por um lado, ultrapassar os problemas associados ao cultivo no solo, tais como as doenças de solo e a salinização do mesmo. Por outro lado, permite maximizar a utilização dos fatores de produção, bem como melhorar a produtividade e a qualidade dos produtos (Louro & Reis, 2020; Soria & Olivert, 2002).

2.1.1 Vantagens e inconvenientes do cultivo sem solo

Os sistemas de cultivo sem solo incluem um conjunto de técnicas de intensificação da produção que apresentam as seguintes características (Louro & Reis, 2020; Morard *et al.*, 2000; Resh, 2012; Soria & Olivert, 2002):

- Manutenção de uma ótima relação ar/água no sistema radicular, o que favorece o desenvolvimento da cultura.
- Nutrição mais controlada do que no cultivo no solo.
- Diminuição das interações químicas e capacidade de troca catiónica, relativamente ao cultivo no solo, especialmente com a utilização de substratos inertes.
- Os sistemas fechados permitem a maximização da eficiência de utilização da água e nutrientes.
- A utilização controlada de nutrientes e a recuperação da drenagem evita ou minimiza a contaminação de solos e aquíferos.
- Pode permitir a reutilização e valorização de subprodutos de outras indústrias como substrato (e.g. fibra de coco).
- Ausência ou minimização de doenças típicas do solo; redução de pesticidas.
- Ausência de infestantes (não são necessários herbicidas).
- Obtenção de uma cultura uniforme; várias operações culturais tornam-se mais facilitadas (e.g. poda, tutoragem e colheita).

- Várias operações culturais praticadas em cultivo no solo deixam de ser necessárias (e.g. adubação de fundo, preparação do solo).
- Maior precocidade e produtividade da cultura; cada planta consome menos energia no seu desenvolvimento do que nos sistemas de cultivo no solo.
- Melhor qualidade da produção.

No entanto, o cultivo sem solo apresenta também algumas limitações (Louro & Reis, 2020; Soria & Olivert, 2002):

- Em sistemas abertos, o descarte da drenagem pode levar à contaminação de solos e aquíferos.
- A má gestão de substratos e plásticos pode levar à contaminação do ambiente.
- Possibilidade da ocorrência de doenças da raiz que se estendam rapidamente a todas as plantas.
- Necessidade de maior precisão na gestão da rega e da nutrição: reserva de água é bastante limitada devido ao baixo volume dos substratos e à elevada porosidade.
- A baixa inércia térmica dos substratos torna a cultura mais exposta às oscilações de temperatura.
- Elevados custos de instalação e funcionamento.
- Requer conhecimento técnico especializado.

2.1.2 O cultivo hidropónico e o cultivo em substrato

Designa-se por cultivo sem solo qualquer forma de cultivar plantas fora do solo *in situ*. Por isso, o cultivo hidropónico e o cultivo em substrato são duas formas diferentes de cultivo sem solo (Reis, 2014).

O **cultivo hidropónico** é feito somente com uma solução nutritiva, sem recurso a substratos, orgânicos ou inertes. A solução pode estar em circulação, constante ou não, e pode apresentar uma profundidade variável, desde 1 ou 2 mm até algumas dezenas de centímetros. Além disso, a solução nutritiva também pode ser aplicada por pulverização ou nebulização das raízes, sistema este designado por cultivo aeropónico (Louro & Reis, 2020; Reis, 2014). Existem diversas formas de concretização destes sistemas de cultivo (quadro 2.1).

Quadro 2.1 – Quadro resumo das principais formas de cultivo hidropónico. Adaptado de Reis, 2014.

Sistema de cultivo hidropónico	Breve descrição
Cultivo em água (DWC – <i>Deepwater culture</i>)	Cultivo numa solução nutritiva com algumas dezenas de centímetros de profundidade, normalmente estática e com arejamento forçado.
Cultivo flutuante (<i>Float hydroponics</i>)	As plantas são suportadas por estruturas flutuantes.
Cultivo em lâmina de água (NFT – <i>Nutrient film technique</i>)	A solução nutritiva circula em canais, a uma altura entre 1 e 2 mm e permite, simultaneamente, o fornecimento de água e oxigénio às raízes.
Cultivo em água em circulação (DFT – <i>Deepflow technique</i>)	A solução nutritiva está em constante recirculação, para promoção do seu arejamento.
Cultivo aeropónico (<i>Aeroponics</i>)	A solução nutritiva é aplicada por pulverização ou nebulização intermitente, em intervalos de tempo curtos. Isto facilita o arejamento das raízes.

No **cultivo em substrato** recorre-se a um meio sólido e poroso como substrato, que é regado com uma solução nutritiva. O substrato pode ser orgânico (e.g. fibra de coco, turfas) ou inorgânico (e.g. areia, lã de rocha), inerte ou ativo, natural ou sintético, e pode ser acondicionado em sacos, vasos ou calhas, para instalar as plantas (Louro & Reis, 2020; Reis, 2014).

2.1.3 Classificação dos sistemas de cultivo em função do destino da drenagem

O destino da drenagem pode ser distinto nos diferentes sistemas de cultivo sem solo, classificando-se como sistemas abertos, fechados ou semifechados (Louro & Reis, 2020; Reis, 2014):

Quando o **sistema é aberto**, a drenagem sai continuamente do sistema, à medida que vai correndo. Esta é descartada e pode ter destinos diversos, mas não volta a ser utilizada para a rega. O sistema aberto é frequentemente utilizado quando o cultivo é feito em substrato.

Quando o **sistema é fechado**, a drenagem é sempre reutilizada para novas regas. A solução nutritiva drenada deve ser desinfetada, refrescada com água-doce e reequilibrada quimicamente, com uma periodicidade variável consoante as condições de cultivo.

Um **sistema** diz-se **semifechado**, quando funciona habitualmente como sistema fechado, mas as condições fazem com que seja necessária a renovação periódica da solução nutritiva. A qualidade da água doce é um dos fatores principais pelos quais é necessária a renovação da solução nutritiva. Normalmente, quando é atingido um limite crítico da concentração de algum elemento para a cultura (e.g. Na e Cl), é necessária a renovação da solução nutritiva.

2.1.3.1 Vantagens e limitações do sistema aberto e do sistema fechado

As diferenças entre os sistemas aberto e fechado são várias e, muitas vezes, a facilidade da sua aplicação depende de vários aspetos, sobretudo da qualidade da água, dos aspetos legais para o tratamento da drenagem, de entre outros (Louro & Reis, 2020; Reis, 2014). O quadro 2.2 resume as vantagens e as limitações destes dois sistemas.

Quadro 2.2 – Quadro resumo das vantagens e limitações dos sistemas abertos e dos sistemas fechados. Fonte: Louro & Reis, 2020.

<i>Vantagens</i>	
<i>Sistema aberto</i>	<i>Sistema fechado</i>
<ul style="list-style-type: none">• Maior simplicidade tecnológica;• Maior segurança fitossanitária;• Gestão mais fácil da solução nutritiva;• Gestão mais fácil quando a água-doce disponível é de baixa qualidade (CE elevada);	<ul style="list-style-type: none">• Utilização muito mais eficiente da água e nutrientes;• Promoção da sustentabilidade e da economia circular;• Permite o cumprimento das normas legais;• Reduz o impacto ambiental que a drenagem pode provocar;
<i>Limitações</i>	
<i>Sistema aberto</i>	<i>Sistema fechado</i>
<ul style="list-style-type: none">• Desperdício de água e nutrientes;• Eventual contaminação de solos e aquíferos;• Limitações legais para o destino da drenagem;	<ul style="list-style-type: none">• Não é viável quando a água de rega é de má qualidade (alta CE – salina);• A salinização crescente ao longo do ciclo cultural limita a adição de nutrientes à solução;

Apesar das suas limitações, o **sistema fechado** apresenta muito interesse do ponto de vista ambiental, devido à eficiência de utilização dos recursos naturais:

- Permite **reduzir o impacto ambiental** que ocorre quando o tratamento da drenagem não é feito corretamente em sistemas abertos. O incorreto tratamento da drenagem pode levar à contaminação de solos e aquíferos (Louro & Reis, 2020; Tüzel *et al.*, 2001)
- Solução para **cumprimento das normas legais** de gestão da drenagem. As normas de proteção do ambiente, como a relativa à proteção das águas subterrâneas (diretiva nitratos-91/676/EEC) e à proteção das águas superficiais (WFD- Diretiva-Quadro 2000/60/EC), podem vir a condicionar ou impossibilitar o cultivo em sistemas abertos (Louro & Reis, 2020).
- Este sistema permite também a **utilização muito mais eficiente da água**. Um sistema fechado pode gastar entre 20-24% menos água do que um sistema aberto, na primavera e menos 8-16%, no outono (Tüzel *et al.*, 2001). Outros autores verificaram poupanças de água entre 19-30% no cultivo ornamentais (Van Os, 1999) e de 21% no cultivo de pepino (Tüzel *et al.*, 1999), em sistema fechado.
- Este sistema permite também a **utilização muito mais eficiente de nutrientes**. Um sistema aberto pode gastar mais 32-34% de nutrientes do que um sistema fechado (Tüzel *et al.*, 2001). Noutros casos, foram reportadas economias entre 15-48% no cultivo de ornamentais (Van Os, 1999) e de 34% no cultivo de pepino (Tüzel *et al.*, 1999), em sistemas fechados.
- **Não ocorre redução na produtividade**. Alguns autores verificaram que a produtividade foi semelhante em sistema aberto e fechado (Tüzel *et al.*, 1999; Tüzel *et al.*, 2001).

2.1.4 Reutilização da drenagem

Quando o cultivo é feito em substrato, a água aplicada na rega é superior à necessidade imediata da cultura. Isto é feito para manter condições ideais na rizosfera, nomeadamente quanto à facilidade de absorção de água e nutrientes, e à disponibilidade de oxigénio. Este excesso no fornecimento de água leva à formação de um volume importante de drenagem, cuja reutilização é importante, por questões económicas, ambientais e legais (Louro & Reis, 2020; Tüzel *et al.*, 2001).

2.1.4.1 Estratégias para reutilização da drenagem

Apesar de semelhante, a composição química da drenagem nunca é igual à da solução nutritiva usada na rega. Após uma rega, a drenagem apresenta uma composição diferente em nutrientes e maior concentração de elementos não absorvidos (Na e Cl), que a solução nutritiva. A contínua reutilização da drenagem leva à crescente salinização da solução de rega, devido ao aumento da concentração dos elementos não absorvidos. A qualidade da água doce é muito importante, sendo melhor quanto menor for a sua condutividade elétrica (CE) (Louro & Reis, 2020).

A gestão da solução de rega pode ser feita de várias formas, destacando-se as estratégias descritas a seguir, na figura 2.1 (Louro & Reis, 2020; Pardossi *et al.*, 2011).

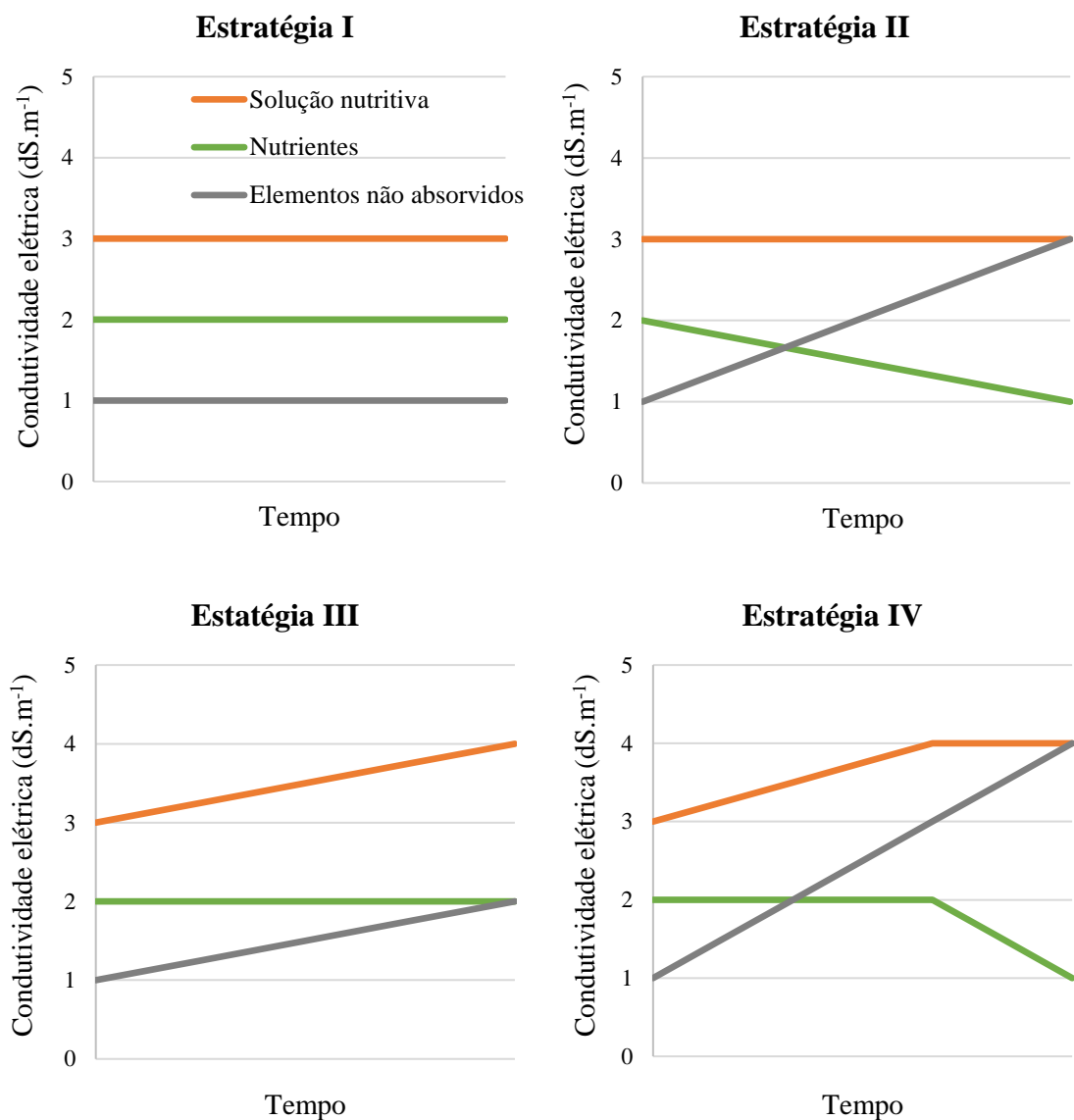


Figura 2.1 – Representação esquemática de diferentes estratégias de gestão da drenagem. Fonte: Louro & Reis, 2020; Pardossi *et al.*, 2011.

A **estratégia I** representa o funcionamento em sistema aberto, onde não ocorre reutilização da drenagem para a rega da mesma cultura. Como a solução nutritiva é sempre nova, a concentração de nutrientes e de elementos não absorvidos é constante.

Na **estratégia II**, a drenagem vai sendo complementada com a adição de água doce para formar a solução de reconstituição, que funciona como a nova solução nutritiva. A concentração de nutrientes vai diminuindo com as utilizações e a concentração de elementos não absorvidos vai aumentando. Esta solução permite manter a CE desejada na solução nutritiva.

Na **estratégia III**, a drenagem vai sendo complementada com a adição de nova solução nutritiva. Neste caso, a solução de rega mantém a quantidade de nutrientes adequada. No entanto, a CE da solução de rega aumenta progressivamente, devido à crescente concentração de elementos não absorvidos.

Na **estratégia IV**, a drenagem vai sendo complementada com água doce e com nova solução nutritiva. Quando for atingida a CE limite para a cultura, ou quando a concentração máxima de algum ião não absorvido for atingida, deixa de ser adicionada nova solução nutritiva à drenagem. A partir deste ponto, a nova solução de rega é constituída somente por drenagem e água doce. Esta nova solução de rega é completamente descartada quando o nível dos nutrientes for insuficiente.

2.1.4.2 Controlo da drenagem

No entanto, para que a drenagem possa ser reutilizada, devem ser controlados pelo menos quatro aspetos: (i) presença de agentes fitopatogénicos; (ii) nível de salinidade; (iii) teor e equilíbrio de nutrientes e (iv) teor de oxigénio (Louro & Reis, 2020).

O controlo de agentes fitopatogénicos deve ser feito através da desinfeção da drenagem, que pode ser feita de diversas formas (Bergstrand, 2009; Louro & Reis, 2020; Stewart-Wade, 2011).

O controlo do nível de salinidade, do teor e equilíbrio de nutrientes e de oxigénio pode ser feito através de diversas estratégias, que podem incluir a adição de água doce, de nova solução nutritiva e do arejamento forçado (Louro & Reis, 2020).

2.1.4.3 Patogénicos disseminados pela água

Existem diversos agentes fitopatogénicos que podem ser facilmente disseminados pela água, pertencentes a vários grupos taxonómicos, como oomicetes, fungos, bactérias, vírus e nemátodos (Bergstrand, 2009).

Os oomicetes produzem zoósporos, que são esporos flagelados capazes de circular facilmente na água. Por isso, de entre todos os patogénicos, os oomicetes, especialmente *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp., disseminam-se facilmente e rapidamente em sistemas de cultivo sem solo (Vallance *et al.*, 2009).

Estes microrganismos podem provocar grandes perdas económicas (Ehret *et al.*, 2001). A desinfecção da drenagem permite o controlo destes microrganismos e por isso é crucial em sistemas de cultivo fechados e semifechados (Bergstrand, 2009; Louro & Reis, 2020). Os principais agentes fitopatogénicos capazes de circular pela água de rega estão sistematizados no quadro 2.3.

Quadro 2.3 – Principais agentes patogénicos disseminados pela água de rega.

Grupo	Organismo
Oomicetes	<i>Pythium</i> spp. ^{1,3,4}
	<i>Phytophthora</i> spp. ^{1,3,4}
	<i>Olpidium</i> spp. ¹
Fungos	<i>Fusarium oxysporum</i> ^{1,4}
	<i>Verticillium</i> spp. ^{1,4}
	<i>Rhizoctonia solani</i> ^{2,4}
	<i>Botrytis</i> spp. ⁴
	<i>Alternaria</i> spp. ⁴
	<i>Colletotrichum coccodes</i> ⁴
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ⁴
<i>Phomopsis sclerotioides</i> ⁴	
Bactérias	<i>Clavibacter michiganensis</i> ^{1,4}
	<i>Pseudomonas corrugata</i> ¹
	<i>Pseudomonas solanacearum</i> ⁴
	<i>Ralstonia</i> spp. ¹
	<i>Erwinia</i> spp. ⁴
<i>Xanthomonas campestris</i> ^{3,4}	

Grupo	Organismo
Vírus	<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV) ⁴
	<i>Cucumber green mosaic virus</i> (CGMV) ^{1,4}
	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) ^{1,4}
	<i>Lettuce big vein agent</i> (LBVA) ⁴
	<i>Melon necrotic spot virus</i> (MNSV) ⁴
	<i>Pelargonium flower break virus</i> (PFBV) ⁴
	<i>Pelargonium leaf curl virus</i> (PLCV) ⁴
	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) ⁴
	<i>Tobacco necrosis virus</i> (TNV) ⁴
	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV) ^{1,4}
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) ⁴	
Nemátodos	<i>Pratylenchus</i> spp. ¹
	<i>Meloidogyne</i> spp. ¹

1: Bergstrand, 2009; 2: Lévesque *et al.*, 2019; 3: Dong *et al.*, 2020; 4: Stewart-Wade, 2011.

2.1.5 Sistemas de desinfeção da drenagem

O controlo da presença de agentes patogénicos é um aspeto fundamental, especialmente quando o sistema de cultivo sem solo funciona em regime fechado ou semifechado. Estes regimes apresentam elevado risco de propagação de agentes patogénicos (Bergstrand, 2009; Stewart-Wade, 2011).

A utilização de boas medidas sanitárias gerais, equipamentos de desinfeção adequados e medidas de antagonismo ou supressão de agentes patogénicos, reduzem o risco de propagação de doenças. Estas medidas preventivas são importantes para evitar a dispersão de agentes patogénicos no sistema de cultivo e devem ser aplicadas em todos os tipos e regimes de cultivo (Stewart-Wade, 2011).

Existem diversos métodos que podem ser adotados para desinfeção da drenagem, que podem atuar por ação física, química ou biológica. O quadro 2.4 resume as principais características dos métodos mais utilizados.

Quadro 2.4 – Quadro resumo dos principais métodos de desinfeção da drenagem aplicados em cultivo sem solo. Adaptado de: Bergstrand, 2009; Ehret *et al.*, 2001; Louro & Reis, 2020; Postma *et al.*, 2001 e Stewart-Wade, 2011. * Descrito com mais pormenor nos subcapítulos seguintes.

Ação física				
Método	Doses / Custos	Eficaz no controlo de	Vantagens	Desvantagens
Térmico	<u>Dose/intensidade:</u> • 95°C por 30 s • 85°C por 3 min <u>Custos:</u> • 0,8 – 0,9 €.m ⁻³	<u>Oomicetes:</u> • <i>Pythium</i> spp. • <i>Phytophthora</i> spp. <u>Fungos:</u> • <i>Fusarium oxysporum</i> • <i>Verticillium dahliae</i> <u>Bactérias:</u> • <i>Erwinia chrysanthemi</i> • <i>Pseudomonas corrugata</i> • <i>Erwinia</i> spp. • <i>Xanthomonas</i> spp. <u>Vírus:</u> • TMV; ToMV; CGMV	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada eficácia (o mais eficaz para vírus, bactérias e fungos); • Simples (utilização; tecnicamente); • Não utiliza produtos químicos; • Não produz resíduos nem subprodutos prejudiciais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispendioso – investimento e funcionamento (0,8 – 0,9 €.m⁻³) – equipamentos e consumo energético; • Requer filtração prévia – remoção de matéria orgânica. • Arrefecer a água antes da rega; • Acidificar drenagem antes do tratamento (para pH 4) – evitar precipitação de calcário no permutador de calor; • Erradica microrganismos benéficos;
	<ul style="list-style-type: none"> • $\lambda = 254$ nm é o mais eficaz; <u>Intensidade de radiação:</u> • Bactérias e fungos: 100 mJ.cm ⁻² • <i>Pythium</i> spp.: 220 mJ.cm ⁻² • Vírus: 250 mJ.cm ⁻² <u>Custos:</u> • 0,3 – 0,4 €.m ⁻³	<u>Oomicetes:</u> • <i>Pythium</i> spp. • <i>Phytophthora</i> spp. <u>Fungos:</u> • <i>Alternaria</i> spp. • <i>Colletotrichum</i> spp. • <i>Fusarium</i> spp. <u>Vírus:</u> • ToMV <u>Bactérias</u> <u>Nemátodos</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Eficácia moderada; • Custos de investimento moderados. • Não utiliza produtos químicos; • Não requer correções prévias de pH; • Não corrosivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados não confiáveis, por vezes; • Necessidade prévia de filtração (<80 μm) – remoção de matéria orgânica; • Necessidade de substituição das lâmpadas regularmente; • Destrói quelatos de ferro; • Erradica microrganismos benéficos;

Ação física				
Método	Doses / Custos	Eficaz no controle de	Vantagens	Desvantagens
Osmose inversa	<u>Tamanho dos poros:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 0,05 µm – <i>Fusarium</i> spp. • 0,1 µm – <i>Verticillum</i> spp. • 0,01 µm zoósporos (oomicetes) e bactérias • 0,5 µm zoósporos <u>Custos:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 0,7 – 0,8 €.m⁻³ 	<u>Oomicetes:</u> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pythium</i> spp. • <i>Phytophthora</i> spp. <u>Fungos:</u> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusarium</i> spp. • <i>Verticillum</i> spp. <u>Bactérias</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada eficácia; • Reduz também a salinidade; • Não utiliza produtos químicos; • Não requer correções prévias de pH; • Não produz subprodutos fitotóxicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Muito dispendioso; • Baixo período de vida útil da membrana de filtração; • Afetado por sólidos na água - necessidade de filtração prévia.
Ação química				
Método	Doses / Custos	Eficaz no controle de	Vantagens	Desvantagens
Iodo	<ul style="list-style-type: none"> • Iodo fornecido através de resinas de troca de iões. <u>Doses:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Fungos: 0,7 ppm • Vírus: > 14 ppm 	<u>Fungos:</u> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusarium oxysporum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Dosagem automatizada; • Resíduos removidos automaticamente; • Sem fitotoxicidade; • Não é afetado por variações na água. 	<ul style="list-style-type: none"> • Possíveis falhas técnicas; • Requer filtração prévia – remoção de matéria orgânica • Dificuldade de utilização.
Cloro	<i>Phytophthora cinnamomi</i> : 2 ppm	<u>Oomicetes:</u> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Phytophthora</i> spp. <u>Fungos:</u> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusarium</i> spp. • <i>Colletotrichum</i> spp. • <i>Rhizoctonia</i> spp. • <i>Alternaria</i> spp. • <i>Botrytis</i> spp. <u>Algas</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada eficácia; • Sanitização da estufa, estrutura e dispositivos; • Elimina algas; 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade em estabelecer doses eficazes; • Afetado por sólidos na água; • Requer acidificação prévia; • Possível fitotoxicidade; • Subprodutos com riscos para a saúde e para o ambiente.

Ação química				
Método	Doses / Custos	Eficaz no controlo de	Vantagens	Desvantagens
Peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	<u>Dose/Intensidade:</u> Fungos: 100 ppm Vírus: 400 ppm (acima de 200 ppm – risco de toxicidade) <u>Custos:</u> 0,2 – 0,35	<u>Fungos:</u> • <i>Fusarium</i> spp.	• Baixos custos de investimento; • Simples.	• Não elimina completamente nemátodos • Requer filtração prévia – remoção de matéria orgânica • Afetado por variações na água; • Perigo potencial para a saúde e para o ambiente; • Fitotóxico; • Corrosivo; • Despesas de manuseio, entrega e armazenamento.
Ozono	<u>Dose/Intensidade:</u> Injeção na solução reciclada: 10 g.m ⁻³ <u>Custos:</u> 0,2 – 0,35	<u>Oomicetes:</u> • <i>Pythium</i> spp. • <i>Phytophthora cinnamomi</i> <u>Fungos:</u> • <i>Fusarium oxysporum</i> • <i>Verticillium</i> spp. <u>Vírus:</u> • CGMV	• Elevada eficácia; • Degrada pesticidas;	• Dispendioso – Investimento e tratamento de resíduos; • Requer filtração prévia – remoção de matéria orgânica; • Necessidade prévia de acidificação (a pH 4); • Perigo potencial para a saúde; • Potencialmente fitotóxico; • Afetado por variações na água; • Corrosivo;
Ação biológica				
Método	Doses / Custos	Eficaz no controlo de	Vantagens	Desvantagens
Filtração lenta*	<u>Quociente de fluxo:</u> 100 a 300 L.m ⁻³ .h ⁻¹ <u>Custos:</u> 0,13 €.m ⁻³	<u>Oomicetes:</u> • <i>Phytophthora</i> spp. • <i>Pythium</i> spp. <u>Fungos:</u> • <i>Verticillium</i> spp. <u>Bactérias:</u> • <i>Xanthomonas</i> spp.	• Baixos custos; • Sistema simples; • Não utiliza produtos químicos; • Não produz subprodutos fitotóxicos.	• Necessidade de espaço; • Controlo parcial de <i>Fusarium</i> spp., vírus e nemátodos.

2.2 Sistema de filtração lenta em areia

A filtração lenta é um método antigo de desinfecção de água, utilizado para desinfecção da drenagem em sistemas de cultivo sem solo desde os anos 80 do séc. XX. A desinfecção ocorre pela ação física de filtração por areia e pela ação biológica dos microrganismos antagonistas que colonizam a areia (Wohanka, 1995).

Este sistema é uma alternativa interessante para desinfecção da drenagem, por ser simples e muito eficaz no controlo de diversos agentes patogénicos, além de ser um sistema ecológico e de baixo custo. Não requer a utilização de produtos químicos e apresenta baixo custo energético. A filtração no sistema de filtração lenta ocorre por gravidade e o consumo energético necessário está associado somente à bombagem da água. O recurso à energia solar pode surgir como solução para manter o filtro em funcionamento. Os baixos custos deste sistema estão relacionados com a simplicidade de funcionamento e dos componentes e com o baixo custo de manutenção (Louro & Reis, 2020).

2.2.1 Breve enquadramento histórico

O sistema de filtração lenta em areia é um dos métodos mais antigos para o tratamento de água (Wohanka, 1995). Este sistema foi desenvolvido em 1804 por John Gibbs, na Escócia, que o utilizou como técnica de purificação para obter água limpa. Nessa altura não era conhecida a existência de bactérias patogénicas na água e o sistema era usado somente pela sua ação física de remoção de sólidos suspensos. Mais tarde, em 1829, a mesma técnica começou a ser utilizada para a limpeza de água para consumo público. A utilização generalizada deste sistema ocorreu a partir de 1885 (Huisman & Wood, 1974; Österdahl, 2015).

Em 1895, foi comprovada a eficácia do sistema no controlo de agentes patogénicos. Nesta altura, a água do rio Elba (Alemanha) ficou infetada com a bactéria *Vibrio cholerae*, causadora da doença cólera. A água do rio era usada para o abastecimento de algumas cidades. Em Hamburgo, a epidemia de cólera infetou 1/30 habitantes e causou a morte a pelo menos 7500 pessoas. No entanto, em Altona (distrito nobre de Hamburgo), onde o sistema de filtração lenta em areia era utilizado para limpeza da água, ninguém ficou infetado com a doença (Österdahl, 2015; Tyrrell, 2011).

Posteriormente, no final dos anos 80 do séc. XX, o sistema de filtração lenta em areia começou a ser usado em horticultura, como método de desinfeção da drenagem (Wohanka, 1995).

2.2.2 Vantagens e limitações do sistema de filtração lenta

O sistema de filtração lenta não é completamente eficaz no controlo de alguns patogénicos e a necessidade de espaço pode ser uma limitação. Diversas vantagens e limitações deste sistema estão resumidas no quadro 2.5.

Quadro 2.5 – Principais vantagens e limitações do sistema de filtração lenta.

<i>Vantagens</i>	<i>Limitações</i>
<ul style="list-style-type: none">• Baixos custos de instalação e de manutenção (cerca de 0,13 €.m⁻³); ^{1,4}• Baixo consumo energético; ^{2,4}• Não requer utilização de produtos químicos; ²• Sistema simples; funcionamento e manutenção simples; ²• Não é afetado por variações na água; ²• Não produz resíduos nem subprodutos prejudiciais; ²• Não requer correções prévias de pH nem filtração prévia; ^{2,4}• Não é fitotóxico. ²	<ul style="list-style-type: none">• Para grandes quantidades de água é necessário muito espaço para o filtro ⁴• Controlo parcial de <i>Fusarium</i> spp., vírus e nemátodos; ^{3,5}• Podem ocorrer quebras na eficácia; ²• Podem surgir entupimentos no material filtrante; ²• Dificuldades em mudar de lugar – transporte de grandes quantidades de areia. ²

1: Delcour, 2020; 2: Stewart-Wade, 2011; 3: Ehret *et al.*, 2001; 4: Louro & Reis, 2020; 5: Lee & Oki, 2013.

2.2.3 Princípios fundamentais de um sistema de filtração lenta

O princípio fundamental de um sistema de filtração lenta consiste em deixar percolar lentamente a drenagem através de um material filtrante. Algum tempo após o início da utilização do filtro, começa a formar-se uma camada superficial no topo do filtro (Ehret *et al.*, 2001). Esta camada apresenta uma intensa atividade biológica, a qual inclui algas, protozoários, bactérias, fungos, actinomicetes, diatomáceas, entre outros (Ellis, 1985).

O processo de filtração é feito pela ação física do material filtrante (sedimentação, adsorção e outros), ação química e ação biológica dos microrganismos que se desenvolvem no filtro, sobretudo próximo da superfície (Huisman & Wood, 1974).

A ação biológica neste método é considerada a componente mais importante no sistema de desinfecção. Além disso, a ação biológica não existe nos outros métodos de desinfecção (quadro 2.4). O sistema de filtração lenta pode ser considerado um ecossistema aberto onde ocorre a entrada de nutrientes e a saída de metabolitos (Ehret *et al.*, 2001).

O filtro apresenta uma fase inicial de maturação / colonização, durante a qual se forma a camada de material orgânico à superfície. Durante esta fase, ocorre a formação de microcolónias de microrganismos, alguns com papel antagonista, o que caracteriza o desempenho do filtro. Além disso, formam-se biofilmes (comunidades biológicas organizadas) na superfície do filtro e na superfície das partículas que constituem o material filtrante (Ehret *et al.*, 2001).

A maioria da matéria em suspensão na drenagem fica retida na superfície do filtro, acumulando-se à superfície. Estas partículas orgânicas são decompostas pelos microrganismos presentes na camada superficial. Devido ao baixo caudal de circulação mantido no filtro, as partículas inorgânicas e orgânicas, incluindo os agentes patogénicos, aderem à superfície das partículas do material filtrante (Ehret *et al.*, 2001; Huisman & Wood, 1974; Wohanka, 1995; Wohanka *et al.*, 1999).

O caudal de circulação da solução no filtro deve ser de 100 a 300 L.m⁻².h⁻¹ (Wohanka, 1995). O baixo caudal de circulação no filtro permite que ocorram estes processos biológicos, sendo necessário que haja oxigénio suficiente no efluente (> 3 mg.L⁻¹) (Ehret *et al.*, 2001) e temperatura adequada à atividade microbiológica, entre 10-20°C. Além disso, temperaturas acima de 20°C promovem a atividade biológica no filtro. No entanto, à medida que as temperaturas aumentam, a concentração de oxigénio dissolvido na água diminui, o que pode limitar a eficácia (Logsdon *et al.*, 2002).

A atividade microbiológica no filtro diminui com a profundidade. Nas camadas superficiais, a densidade bacteriana normal é de 10⁷ a 10⁸ ufc.cm⁻³ e alguns centímetros abaixo é de 10⁶ ufc.cm⁻³, permanecendo assim até às camadas mais profundas do filtro. A eliminação de agentes fitopatogénicos que ocorre devido à atividade biológica no filtro depende dos microrganismos envolvidos, parecendo ser menos eficaz a controlar fungos do que bactérias (Brand & Wohanka, 2001; Calvo-Bado *et al.*, 2003).

2.2.4 Instalação e manutenção do sistema de filtração lenta

A construção de um sistema de filtração lenta para utilização em horticultura segue as linhas principais de um projeto para estações de obtenção de água potável em pequena escala. No entanto, são necessárias algumas alterações no desenho do sistema para que se adapte às necessidades da horticultura (Ehret *et al.*, 2001).

O esquema geral de um sistema de desinfecção por filtração lenta está representado na figura 2.2.

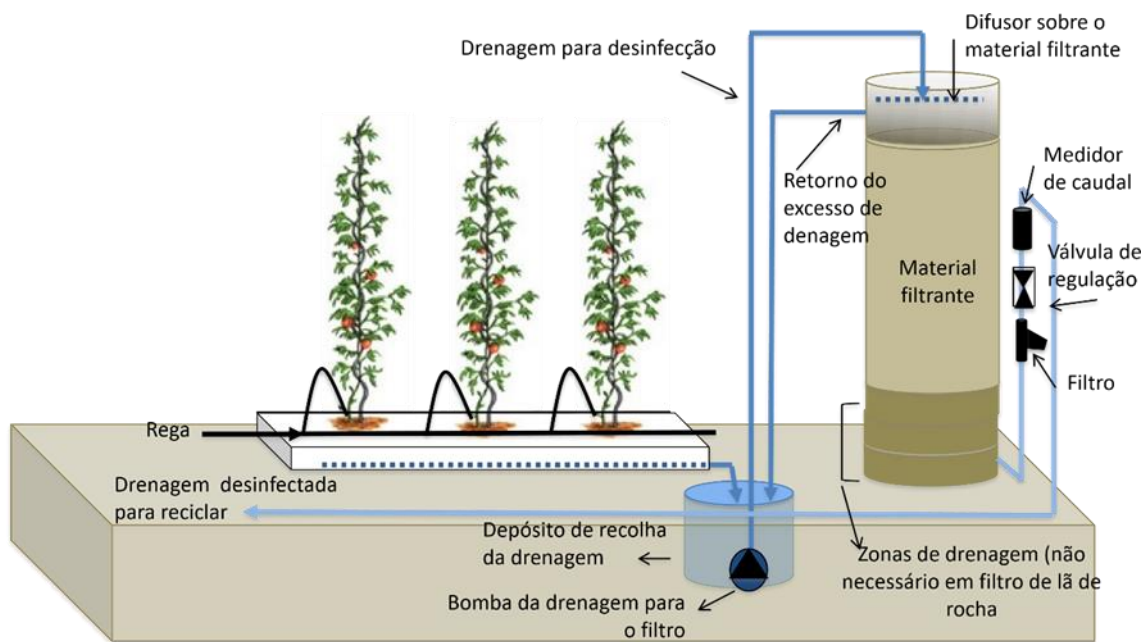


Figura 2.2 – Esquema de um sistema de desinfecção por filtração lenta. Fonte: Louro & Reis, 2020.

Os componentes essenciais do sistema incluem (Ehret *et al.*, 2001):

- **Recipiente do filtro:** Caixa que serve de suporte ao material filtrante. O seu tamanho varia com a capacidade do filtro. Pode ser construído com materiais vários.
- **Estrutura de entrada:** Constituída por uma bomba e por tubagem, que permitem a transferência da drenagem desde o depósito até à zona superior do filtro.
- **Camada de material filtrante:** Parte constituinte da maioria do filtro.
- **Camada de drenagem do filtro:** Camada com material mais grosseiro do que o material filtrante principal. Facilita a saída da solução. Não é necessária quando o material filtrante é lã de rocha.

- **Estrutura de saída:** Constituída por um pequeno filtro (para reter algumas partículas de areia), uma válvula de regulação, um medidor de caudal e por tubagem. Permite o retorno da solução para o sistema de rega.

Os sistemas de filtração lenta são essencialmente uma caixa com o material filtrante onde a filtração ocorre por gravidade. A construção e o material filtrante podem ser vários, dependendo essencialmente da capacidade de filtração pretendida, que varia conforme a dimensão e a tipologia do sistema de cultivo. Quando se pretende um filtro de capacidade reduzida, para pequenas estufas, recorre-se geralmente a um tanque plástico. Para dimensões e capacidades superiores, associados a maiores áreas de produção, é usado, geralmente um tanque de chapa metálica ondulada com tela plástica no interior (Ehret *et al.*, 2001).

O caudal baixo é particularmente necessário para que o controlo biológico funcione. Geralmente, o caudal de saída é controlado por uma válvula de regulação e por um medidor de caudal na estrutura de saída. Em sistemas mais simples, uma válvula é suficiente para controlar o caudal de saída. O caudal de saída não deve ser superior ao caudal de entrada, evitando que o filtro seque (Brand & Wohanka, 2001; Calvo-Bado *et al.*, 2003; Ehret *et al.*, 2001).

É recomendado que a parte superior do filtro seja mantida ao abrigo da luz para evitar o desenvolvimento de algas, o que se acontecer em excesso, obriga à eliminação periódica da camada superficial (Louro & Reis, 2020).

A área de filtro necessária pode ser calculada de acordo com equação 2.1.

Equação 2.1:
$$A = \frac{V_d}{Q_f}$$

Sendo,

A – Área (m²)

V_d – Volume de drenagem que se pretende desinfetar (L)

Q_f – Caudal de filtração (L.h⁻¹).

2.2.5 Material filtrante

O material filtrante padrão utilizado num sistema de filtração lenta é a areia, que deve estar de acordo com alguns requisitos, nomeadamente quanto à natureza e granulometria. É preferível a areia de sílica, com granulometria entre 0 – 2 mm, mas muitas vezes é utilizada areia com outras granulometrias (Ehret *et al.*, 2001; Wohanka *et al.*, 1999).

A espessura mínima da camada filtrante deve ser de 50 cm, mas é recomendada que seja entre 80 e 120 cm. Idealmente, a parte de baixo do filtro deve ser constituída por três camadas de cascalho: (i) granulometria 2-8 mm; (ii) granulometria 8-16 mm; e (iii) 16-32 mm, que irão funcionar facilitar a drenagem do filtro (Ehret *et al.*, 2001). A areia fina (0,15 – 0,30 mm) é mais eficiente do que areia média (0,5 – 1,6 mm) (Van Os *et al.*, 1998). Alguns parâmetros indicados para a areia do filtro estão apresentados no quadro 2.6.

Quadro 2.6 – Parâmetros indicadores da qualidade da areia do filtro. Fonte: Ehret *et al.*, 2001.

Parâmetro	Valores
Tamanho das partículas	0,15 – 0,30 mm
Coefficiente de uniformidade	< 3, máx. 5
Conteúdo de limo	< 1%

Tamanho efetivo das partículas (D_{10}): diâmetro das partículas abaixo do qual 10% das mesmas são as mais pequenas.
Coefficiente de uniformidade (CU): D_{60}/D_{10} .

A areia é o material filtrante mais utilizado nos sistemas de filtração lenta, mas podem ser usados outros materiais (quadro 2.7), que podem apresentar vantagens em relação à areia (Wohanka *et al.*, 1999).

Quadro 2.7 – Diferentes materiais filtrantes e características recomendadas para a sua utilização no sistema de filtração lenta. Fonte: Wohanka *et al.*, 1999.

Material	Características
Antracite	Granulometria: 0,8 – 1,6 mm
Lã de rocha	Massa específica após instalação $\approx 136 \text{ Kg.m}^{-3}$
Pedra pomes	Granulometria: 0,4 – 0,8 mm

2.2.6 Eficácia no controlo de agentes fitopatogénicos

O quadro 2.8 resume alguns resultados de eficácia do sistema de filtração lenta, obtidos por diferentes autores, no controlo de diferentes agentes patogénicos.

Quadro 2.8 – Resumo da variação de eficácia observada contra alguns agentes patogénicos em vários sistemas de filtração lenta.

Organismo	Material filtrante / Granulometria	Caudal de filtração	Eficácia
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Areia: 0,15 – 0,35 mm	100 L.m ⁻² .h ⁻¹	100% ¹
	ou 0,20 – 0,8 mm	300 L.m ⁻² .h ⁻¹	Parcial ¹
<i>Phytophthora capsici</i>	Areia	150 L.m ⁻² .h ⁻¹	100% ³
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Areia: 0,3 mm	150 L.m ⁻² .h ⁻¹	100% ⁶
<i>Pythium sterilum</i>	Areia: 2 mm	480 L.m ⁻² .h ⁻¹	91 – 96% ⁴
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Lã de rocha	300 L.m ⁻² .h ⁻¹	100% ⁷
<i>Fusarium oxisporum</i>	Areia: 0,15 – 0,35 mm; 0,20 – 0,8 mm ou 0,50 – 1,6 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	Parcial ¹
	Lã de rocha	200 L.m ⁻² .h ⁻¹	99 % ⁵
	Areia	150 L.m ⁻² .h ⁻¹	Ineficaz ³
<i>Fusarium solani</i>	Areia: 2 mm	480 L.m ⁻² .h ⁻¹	82 – 89% ⁴
<i>Botrytis cinerea</i>	Areia: 0,5 – 0,75 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	100% ⁸
ToMV	Areia: 0,15 – 0,35 mm; 0,20 – 0,8 mm ou 0,50 – 1,6 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	Parcial ¹
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Areia: 0,5 – 0,75 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	99,6% ⁸
<i>Xanthomonas campestris</i>	Areia: 2 mm	480 L.m ⁻² .h ⁻¹	71 – 76% ⁴
	Lã de rocha	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	99% ²
	Areia: 0,2 – 2,0 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	83% ²
	Pedra pomes: 0,4 – 0,8 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	85% ²
	Antracite: 0,8 – 1,6 mm	100 – 300 L.m ⁻² .h ⁻¹	82% ²
<i>Pseudomonas syringae</i>	Areia: 2 mm	480 L.m ⁻² .h ⁻¹	72 – 73% ⁴

1: Van Os *et al.*, 1998; 2: Wohanka *et al.*, 1999; 3: Lee & Oki, 2013; 4: Kubiak *et al.*, 2015; 5: Ehret *et al.*, 2001; 6: Calvo-Bado *et al.*, 2003; 7: Bergstrand *et al.*, 2011; 8: Ferreira *et al.*, 2012.

Fluxos de filtração e materiais filtrantes adequados parecem permitir o controlo total de Oomicetes, especialmente *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp. (Bergstrand *et al.*, 2011). No entanto, a eficácia contra outros patogénicos pode ser variável.

Relativamente a *Fusarium oxysporum* e outras espécies do mesmo género, o sistema de filtração lenta em areia parece não ser completamente eficaz (Lee & Oki, 2013; Van Os *et al.*, 1998). No entanto, fluxos de filtração mais lentos ($\approx 100 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$) ou outros materiais filtrantes, como lã de rocha, podem permitir o controlo total do patogénico (Bergstrand *et al.*, 2011).

Lã de rocha mostrou ser mais eficaz no controlo de *Fusarium oxysporum* do que areia, além de ser mais fácil de utilizar por ser um material muito menos denso e não entupir tão frequentemente. Outros materiais, como antracite e pedra pomes, apresentaram eficácia semelhante à areia (Wohanka *et al.*, 1999).

Além disso, parecem não existir na bibliografia trabalhos acerca da eficácia do sistema de filtração lenta no controlo de *Rhizoctonia solani*.

2.3 O fungo *Trichoderma atroviride*

As espécies do género *Trichoderma* são fungos do solo, filamentosos, pertencentes à divisão Ascomycota e apresentam uma dispersão generalizada. Os fungos deste género são organismos necrotróficos (Ranque *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2019).

2.3.1 Características morfológicas e ecológicas

Macroscopicamente, as colónias de *Trichoderma atroviride* são densas e semelhantes a lã (figura 2.3) (Ranque *et al.*, 2008). A temperatura ótima de crescimento é 25°C. Durante as fases iniciais de crescimento, a colónia apresenta uma coloração esbranquiçada, que gradualmente se altera para uma coloração verde-amarelada, à medida que os conídios vão sendo formados. Mais tarde, quando a colónia está mais madura, a coloração torna-se verde intensa, devido ao elevado número de conídios (Yan *et al.*, 2019).

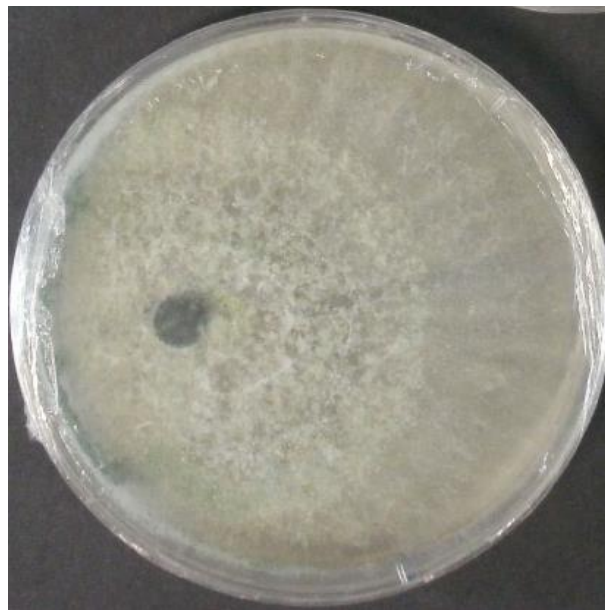


Figura 2.3 – Cultura de *Trichoderma atroviride* em PDA, três dias após inoculação. Fotografia de Luísa Coelho.

Esta espécie apresenta micélio septado e ramificado (figura 2.4). O conidióforo é septado e ramificado (Yan *et al.*, 2019), formando em ângulos retos. O conidióforo é formado por várias células conidiogénicas em forma de garrafa – fiálides (8 – 10 μm \times 2 μm). Estas, arranjam-se em espirais de dois, três ou quatro verticilos. Na extremidade de cada fiálide, formam-se os conídios (esporos assexuados, formados por mitose) (Ranque

et al., 2008). Os conídios ($3,5 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$) são unicelulares, de coloração verde-escuro, de paredes lisas, subsféricos a ovóides (Ranque *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2019).

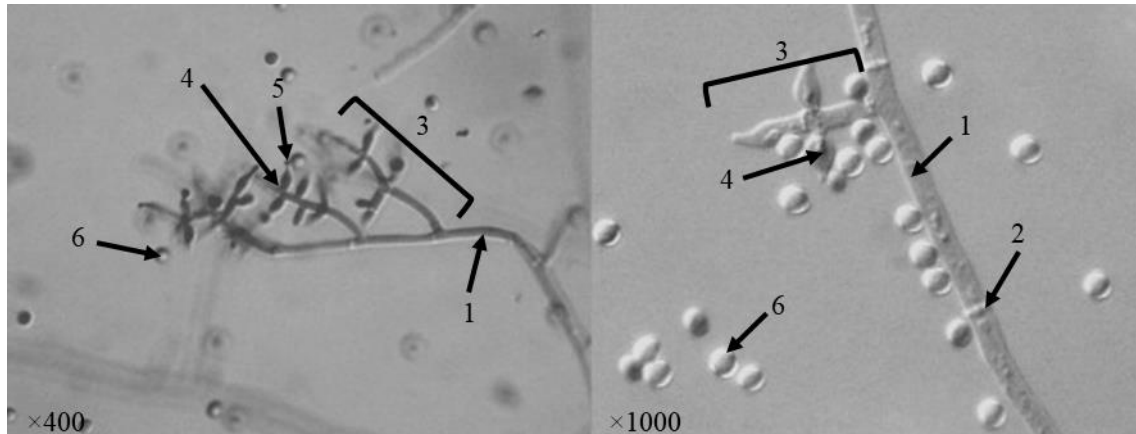


Figura 2.4 – Cultura de *Trichoderma atroviride* observada ao microscópio. 1 – hifa; 2 – septo; 3 – conidióforo; 4 – fiálide (célula conidiogénica em forma de garrafa); 5 – conídio formado na extremidade da fiálide; 6 – conídio. Adaptado de Ranque *et al.*, 2008.

2.3.2 Propriedades de biocontrolo de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogénicos

Os fungos do género *Trichoderma* e a espécie *Trichoderma atroviride* em particular, apresentam diversos mecanismos, que diretamente ou indiretamente apresentam um potencial de biocontrolo (figura 2.5).

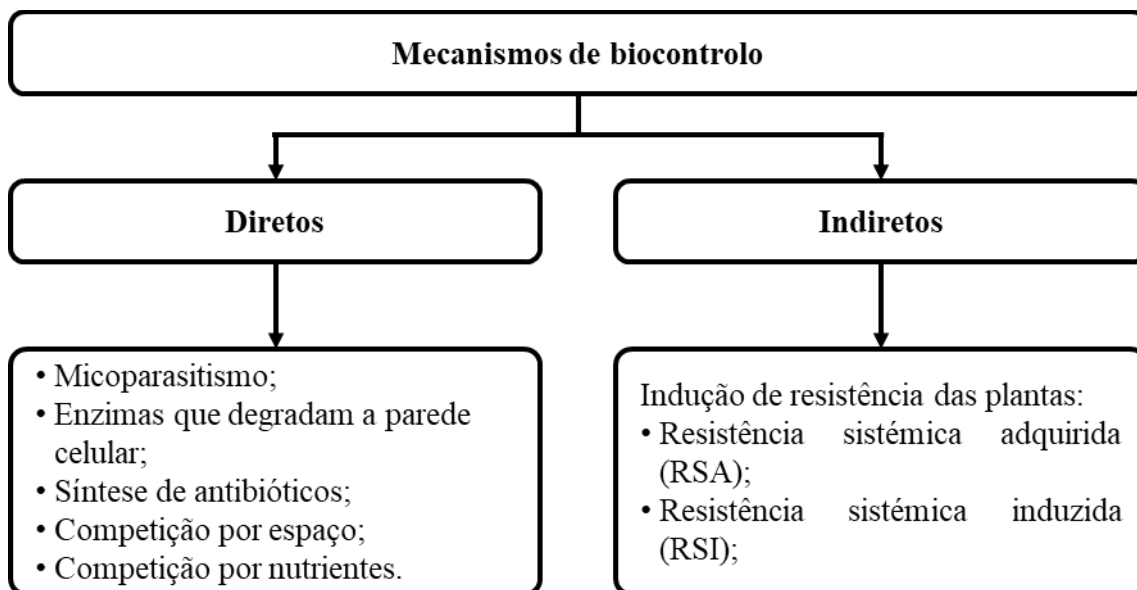


Figura 2.5 – Mecanismos diretos e indiretos de biocontrolo, usados pelo género *Trichoderma* contra fungos fitopatogénicos. Fonte: Tyśkiewicz *et al.*, 2022.

Os mecanismos diretos contra fungos patogénicos incluem: micoparasitismo, produção de enzimas que degradam a parede celular; síntese de antibióticos; competição por espaço; estabelecimento de uma relação direta de parasitismo com o patogénico; e competição por nutrientes, principalmente carbono, azoto e ferro (Rai *et al.*, 2016; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Além disso, *Trichoderma* spp. induz resistência à planta, através de indutores (moléculas relacionadas com a indução de resistência) (Saravanakumar *et al.*, 2016; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

O tipo de mecanismos envolvidos depende da interação entre o microrganismo antagonista (*Trichoderma* spp.), o patogénico e a planta (Ghorbanpour *et al.*, 2018; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

A espécie *Trichoderma atroviride*, bem como outras no mesmo género, têm a capacidade de detetar e estabelecer uma relação antagonista com o fungo patogénico *Rhizoctonia solani* (Dubey *et al.*, 2021). Esta relação antagonista pode resultar na morte de *R. solani* ou no seu controlo, através de reprogramação genética da sua expressão de genes (Yu *et al.*, 2022).

2.3.2.1 Micoparasitismo

O micoparasitismo consiste no parasitismo de um fungo (hospedeiro) por outro fungo (micoparasita) (Ghorbanpour *et al.*, 2018).

Análises ao genoma da espécie *Trichoderma atroviride* comprovaram a sua capacidade micoparasita. Além disso, a comparação do genoma de *T. atroviride* com o genoma das espécies *Trichoderma virens* e *Trichoderma reesei* mostrou que o micoparasitismo é o estilo de vida do género *Trichoderma*, desde as espécies mais ancestrais (Kubicek *et al.*, 2011).

Uma interação micoparasita típica envolve as seguintes fases: deteção do hospedeiro, quimiotropismo (atração), conexão, enrolamento e lise de células do hospedeiro (Mukherjee *et al.*, 2012; Mukherjee, 2011).

Alguns autores verificaram que o antagonista *Trichoderma atroviride* tem a capacidade em estabelecer fortes relações de micoparasitismo contra *Rhizoctonia solani* (Abbas *et al.*, 2022) e contra *Fusarium oxysporum* (Nofal *et al.*, 2021).

Quimiotropismo e reconhecimento do hospedeiro

O antagonista *Trichoderma atroviride*, bem como outras espécies do mesmo género, apresentam diversas respostas quimiotrópicas, em função da existência de compostos químicos no meio, tais como nutrientes e metabolitos secundários libertados por fungos hospedeiros (presas). Estes compostos são utilizados pelo micoparasita para identificação de presas. Dependendo do composto e da sua concentração, pode ser estimulado o crescimento (quimiotropismo positivo) ou este ser limitado (quimiotropismo negativo). O quimiotropismo positivo leva ao aumento da extensão da colónia e da densidade de hifas do micoparasita em direção ao hospedeiro (presa) (Moreno-Ruiz *et al.*, 2020). O crescimento em direção ao hospedeiro ocorre até que haja conexão (figura 2.6 – A) (Mukherjee *et al.*, 2012).

Conexão e enrolamento

A conexão com o hospedeiro (figura 2.6 – B) leva ao crescimento e enrolamento de hifas do micoparasita à volta das hifas do hospedeiro (figura 2.6 – C). Entretanto, o micoparasita desenvolve apressórios nas hifas, que são órgãos especializados, que permitem a penetração nas células do hospedeiro (Druzhinina *et al.*, 2011).

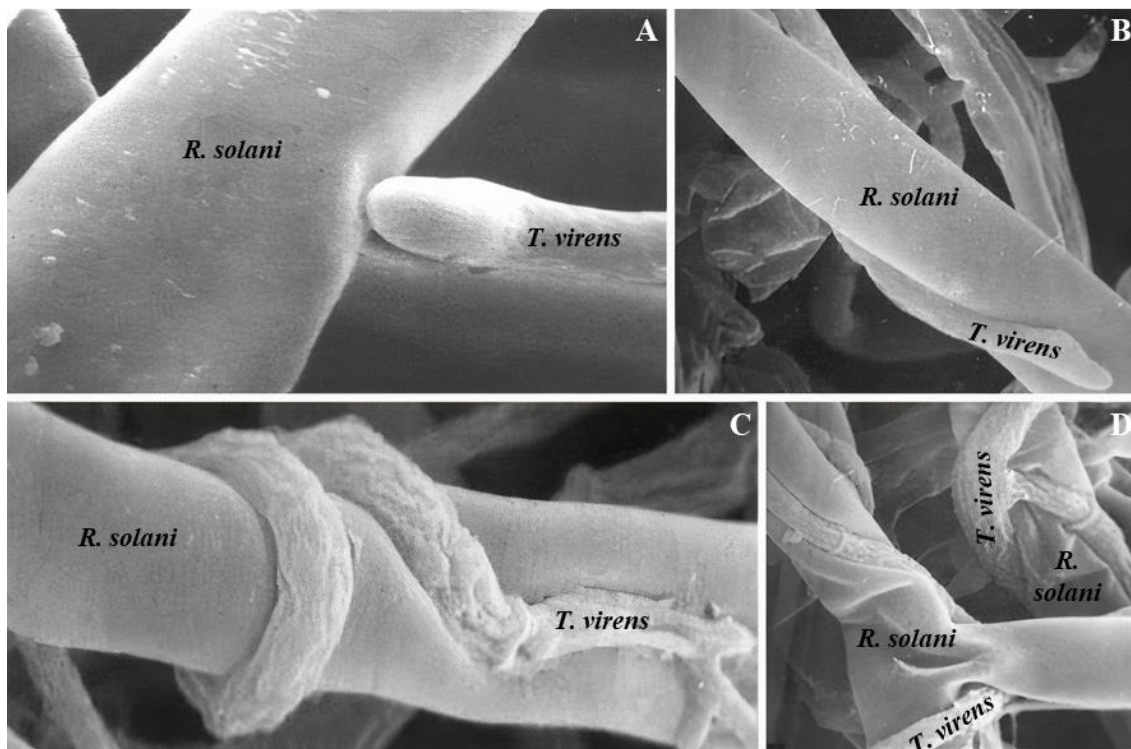


Figura 2.6 – Exemplo de micoparasitismo provocado por *Trichoderma virens* em *Rhizoctonia solani*. A – quimiotropismo (atração); B – conexão; C – enrolamento; D – lise celular de hifas do hospedeiro. Fonte: Mukherjee *et al.*, 2012.

Lise celular de células do hospedeiro

A lise celular (figura 2.6 – D) ocorre pela ação de enzimas hidrolíticas e, muitas vezes, em combinação com a ação de metabolitos secundários. Esta é a última fase da interação micoparasita, levando, muitas vezes, à morte do hospedeiro (Mukherjee *et al.*, 2012; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Caso concreto *Trichoderma atroviride* × *Rhizoctonia solani*

No caso concreto da presa *Rhizoctonia solani* (figura 2.7), o antagonista *T. atroviride* é capaz de reconhecer compostos como oligopéptidos e oligossacáridos, que são produzidos pela presa como reação a enzimas hidrolíticas libertadas pelo antagonista, tais como proteases e quitinases (figura 2.7 – A, B) (Abbas *et al.*, 2022; Sood *et al.*, 2020).

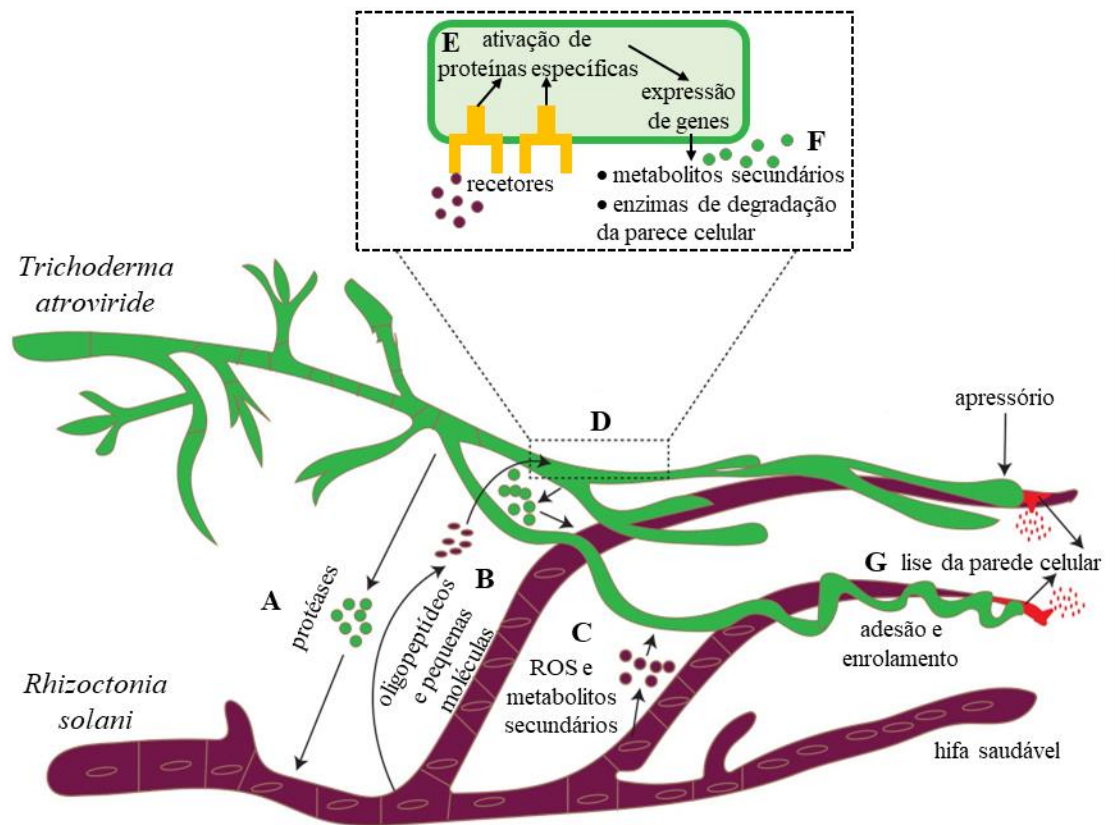


Figura 2.7 – Micoparasitismo provocado por *Trichoderma atroviride* contra *Rhizoctonia solani*. *T. atroviride* liberta proteases (A) que provocam a libertação de pequenas moléculas de *R. solani* (B). *R. solani* também liberta espécies reativas de oxigénio (ROS) como resposta à presença de *Trichoderma* spp. (C). Estas moléculas ligam-se a receptores que estão em células de *Trichoderma* spp. (D), o que desencadeia produção de proteínas (E) e expressão de genes (F) que codificam enzimas responsáveis pela lise da parede celular de *R. solani* (G). Fonte: Abbas *et al.*, 2022.

Além de compostos como oligopéptidos e oligossacáridos, *R. solani* liberta espécies reativas de oxigénio (ROS) e metabolitos secundários (figura 2.7 – C). Estas moléculas ligam-se a recetores específicos que existem nas células das hifas de *T. atroviride* (ou outras espécies do mesmo género) (figura 2.7 – D). Após a ligação aos recetores, desencadeia-se uma série de processos bioquímicos, que envolvem a produção de proteínas específicas (figura 2.7 – E), que, por sua vez, levam à expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na produção de metabolitos secundários (figura 2.7 – F) e na lise da parede celular de *R. solani* (figura 2.7 – G) (Abbas *et al.*, 2022).

Foram identificados vários genes de *T. atroviride* envolvidos no reconhecimento de *R. solani* e na transdução de sinal, que incluem os seguintes: *gpr1*, *tga1*, *tga3*, *tmk1*, *xyr1*, *Sfp2* e *tsc1* (Abbas *et al.*, 2022).

2.3.2.2 Produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular

A produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular faz parte da fase final de micoparasitismo (Ghorbanpour *et al.*, 2018; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

A parede celular dos fungos é, em cerca de 90%, constituída por polissacarídeos (Tyśkiewicz *et al.*, 2022), que são hidratos de carbono hidrolisáveis, formados por mais de dez moléculas de monossacarídeos (Brás, 2015). Entre os polissacarídeos envolvidos, incluem-se quitina, α -glucanos, β -glucanos, proteínas, de entre outros (Kang *et al.*, 2018).

Os fungos do género *Trichoderma* têm capacidade de libertar diversas enzimas extracelulares, tais como quitinases, β -glucanases e proteases (Ribeiro *et al.*, 2019). Estas enzimas hidrolisam os principais constituintes da parede celular, onde se incluem quitina, β -glucanos e proteínas (Alizadeh *et al.*, 2020; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

A espécie *T. atroviride*, particularmente, apresenta genes que codificam a produção de enzimas capazes de destruir quitina – quitinases (Zamani & Motallebi, 2008). Além disso, esta espécie é capaz de produzir diferentes protéases, capazes de destruir a parede celular de *Rhizoctonia solani* (Błaszczuk *et al.*, 2014; Grinyer *et al.*, 2005). Foram identificados vários genes de *T. atroviride* (quadro 2.9), cuja função é codificar enzimas que estão relacionadas com o controlo de *R. solani* (Abbas *et al.*, 2022).

Quadro 2.9 – Genes de *Trichoderma atroviride* que estão envolvidos na produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular de *Rhizoctonia solani*. Fonte: Abbas *et al.*, 2022.

Gene	Enzimas/proteínas codificadas pelo gene	Função da enzima
<i>chit42</i>	endoquitinases	destroem quitina
<i>nag1</i> <i>eng18B</i>	glicosaminidases	destroem glicosídeos
<i>papA</i>	protéases	destroem proteínas
<i>agl1</i>	proteínas formadoras de poros	formam poros

2.3.2.3 Síntese de antibióticos e de outros compostos

Antibiose é um processo mediado por compostos de baixa massa molecular, que interagem com microrganismos e afetam negativamente o seu crescimento. Nas interações entre fungos, a antibiose ocorre, fundamentalmente, devido à produção de metabolitos secundários, que têm capacidade inibitória ou fatal sobre outro fungo (Sood *et al.*, 2020). As espécies do género *Trichoderma* têm a capacidade de produzir diversos metabolitos secundários com esta capacidade. Dependendo da sua biossíntese, estes compostos podem ser classificados em *peptaibols*, policetídeos ou terpenos (Sood *et al.*, 2020; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Peptaibols são péptidos lineares (Tamandegani *et al.*, 2020), biologicamente ativos, produzidos por alguns fungos, como *Trichoderma* spp., com função antibiótica e antifúngica. Estas moléculas são capazes de formar canais nas membranas citoplasmáticas, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana, levando, consequentemente, à morte celular por vazamento citoplasmático (Castro & Micaêlo, 2014; Tamandegani *et al.*, 2020).

A espécie *Trichoderma atroviride* é capaz de produzir vários antibióticos, que incluem *atroviridins* A~C e *neotatroviridins* A~D, que pertencem ao grupo dos *peptaibols*. Estes antibióticos apresentam forte atividade antifúngica contra alguns patogénicos, que incluem *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum dematium* e *Curvularia inaequalis*; e moderada atividade antifúngica contra *Verticillium dahliae*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium* sp. (Oh *et al.*, 2002).

Policetídeos estão relacionados com respostas de defesa, apresentado um papel importante na defesa, resistência ao stress e estabilidade mecânica, pela estabilização da parede celular. Além disso, alguns parecem estar envolvidos no desenvolvimento sexual (Atanasova *et al.*, 2013).

A espécie *T. atroviride* contém pelo menos um gene (*pks4*) relacionado com a produção de policetídeos, que são especialmente tóxicos para *Rhizoctonia solani* (Abbas *et al.*, 2022).

A espécie *T. atroviride* consegue emitir diversos compostos orgânicos voláteis que apresentam atividade anti-fúngica contra *Fusarium oxysporum*. Estes compostos incluem: 3-heptanona, 2-pentil-furano, β -felandreno (terpeno), 3,5,5-trimetil-ciclohexano, entre outros (Rao *et al.*, 2022).

2.3.2.4 Competição por espaço e nutrientes

Os microrganismos necessitam de espaço e de nutrientes para crescer e completar o seu ciclo biológico. Quando os recursos são limitados, microrganismos com necessidades fisiológicas semelhantes competem pela nutrição (Sarma *et al.*, 2014).

Os fungos antagonistas e em particular *Trichoderma* spp., podem privar os agentes patogénicos de nutrientes e de espaço ao colonizar um habitat comum, o qual pode incluir tecidos vegetais, rizosfera ou a filosfera (Ghorbanpour *et al.*, 2018).

De modo geral, até certo ponto, todos os fungos apresentam capacidade de competir por nutrientes e espaço. Esta capacidade depende das propriedades do organismo e da adaptação à planta hospedeira e ao ambiente. No entanto, algumas espécies fazem-no mais eficazmente do que outras (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Algumas espécies antagonistas, como é o caso de *Trichoderma* spp., são mais eficazes que as espécies patogénicas a competir por espaço e nutrientes. Neste caso, o antagonista tem estratégias eficazes de colonização das plantas e permanece em alta densidade populacional na zona de sobreposição de habitat (Ghorbanpour *et al.*, 2018; Sood *et al.*, 2020).

Espécies do género *Trichoderma* colonizam vários tipos de substrato mais rapidamente que alguns patogénicos, limitando o seu crescimento (Oszust *et al.*, 2020). Os fungos do género *Trichoderma*, em particular, crescem rapidamente em glucose e sacarose (Jaroszuk-ściseł *et al.*, 2019). A utilização eficaz dos nutrientes depende da habilidade de *Trichoderma* spp. em produzir energia a partir do metabolismo de hidratos de carbono, tais como celulose, quitina, glucano e glucose (Mahmood & Kataoka, 2018). Os exsudatos radiculares são particularmente abundantes em hidratos de carbono,

aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, ferro, entre outros (Alabouvette *et al.*, 2009; Sarrocco *et al.*, 2009).

Trichoderma spp. apresentam maior habilidade em mobilizar e absorver nutrientes do solo do que muitos outros microrganismos (Gajera & Domadiya, 2013). Este aspeto está relacionado com a biossíntese de ácido glucónico, cítrico e de outros ácidos orgânicos, que diminuem o pH do solo e aumentam a solubilização de nutrientes, essencialmente ferro, manganês e magnésio (Vinale *et al.*, 2008).

O ferro é um elemento essencial para o desenvolvimento dos fungos patogénicos. *Trichoderma* spp. é capaz de produzir moléculas com a capacidade de captar metais (sideróforos), com a capacidade de formar quelatos muito mais estáveis com o ferro. Isto altera a disponibilidade de ferro para os outros microrganismos, o que faz aumentar a competição pelo elemento (Abbas *et al.*, 2022; Santos, 2012). A capacidade de biocontrolo de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* é influenciada pela competição pelo ferro, conseguindo o antagonista aceder mais eficazmente às quantidades limitadas de ferro disponíveis na rizosfera (Abbas *et al.*, 2022).

2.3.2.5 Indução da resistência das plantas em resposta a *stresses* bióticos

As plantas têm a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência, em resposta a fatores de *stress* bióticos e abióticos (Avilés *et al.*, 2011). Dependendo da circunstância, as respostas de defesa da planta são desencadeadas pela ativação de uma complexa rede de transdução de sinal, através da produção de ácido salicílico, ácido jasmónico, por vezes etileno ou outras fitohormonas (Abbas *et al.*, 2022).

Um dos mecanismos de defesa desenvolvido é a **resistência sistémica adquirida** (RSA), pela qual o ataque inicial de um agente patogénico desencadeia respostas de defesa locais e a formação de um sinal sistémico pela planta. Após a receção interna deste sinal, outras partes da planta tornam-se mais resistentes a ataques de vários patogénicos. A RSA depende da produção e da resposta ao ácido salicílico (Avilés *et al.*, 2011). A RSA é ativada, geralmente contra doenças provocadas por microrganismos biotróficos, ou seja, que dependem da planta viva (Abbas *et al.*, 2022).

Outro mecanismo que pode ocorrer é a **resistência sistémica induzida** (RSI), em que não são observados efeitos diretos da colonização pelo agente de controle biológico. No entanto, posteriormente, as estratégias de infeção dos patogénicos são neutralizadas

pelos respostas de defesa da planta. A RSI depende da resposta ao ácido jasmônico e ao etileno (Avilés *et al.*, 2011). A RSI é ativada, geralmente contra doenças provocadas por microrganismos necrotróficos, ou seja, que se alimentam de células mortas ou que provocam a morte da planta (Abbas *et al.*, 2022).

Espécies do género *Trichoderma* são capazes de induzir, às plantas, um tipo de resposta de defesa híbrida de RSA e RSI (Abbas *et al.*, 2022; Avilés *et al.*, 2011), através da colonização da rizosfera e do estabelecimento de uma relação estável com a planta hospedeira (Sood *et al.*, 2020; Zeilinger *et al.*, 2016).

Trichoderma spp. liberta enzimas que degradam polissacarídeos das plantas, colonizam as raízes, usam a sacarose como fonte de carbono e produz indutores (moléculas relacionadas com a indução de resistência) que induzem os mecanismos de resistência na planta (Abbas *et al.*, 2022). A ativação de respostas nas plantas através de indutores leva a alterações físicas, bioquímicas e moleculares, que funcionam como mecanismos de defesa (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Estas alterações levam, por exemplo, à indução de lignificação e deposição de calose, reforçando a parede celular das plantas, que funciona como barreira física contra os agentes patogénicos (Abbas *et al.*, 2022; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Diversas espécies de plantas, apresentaram maior resistência na presença de *Trichoderma* spp., incluindo *T. atroviride* (Harman *et al.*, 2004). *T. atroviride*, em cevada, levou à expressão do gene *Ech42* (que codifica a enzima endoquitinase), por parte da planta, o que a tornou mais resistente a *Fusarium* spp. (Benítez *et al.*, 2004). Igualmente, *T. harzianum*, em tabaco e batata, levou à expressão do gene *Chit42* (que codifica a enzima quitinase), pela planta, o que levou à formação de plantas tolerantes ou totalmente resistentes a *Rhizoctonia solani* (Sood *et al.*, 2020). Outros autores reportaram que *T. atroviride* é capaz de induzir, às plantas, resistência contra *Rhizoctonia solani* (Abbas *et al.*, 2022) e contra *Fusarium oxysporum* (Kappel *et al.*, 2022).

3 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia do sistema de filtração lenta em areia pela introdução de um microrganismo antagonista no filtro – o fungo *Trichoderma atroviride*. Pretende-se estudar a capacidade supressiva do filtro melhorado, sobre dois fungos fitopatogénicos, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, integrado num sistema de cultivo sem solo de pepino (*Cucumis sativus* L.).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensaio preliminares

4.1.1 Escolha da cultivar do pepino

Inicialmente, foi necessário encontrar uma variedade suscetível a *Rhizoctonia solani*, para poder avaliar os resultados a nível de controlo da doença. Para determinar a cultivar mais sensível à doença, foi feito um ensaio preliminar onde foram testadas quatro variedades comerciais de pepino: ‘Marketer’, ‘Odys’, ‘Sagro’ e ‘Triumpf’ (Semillas Fitó, Espanha).

4.1.1.1 Modalidades e desenho experimental

Este ensaio preliminar incluiu duas modalidades:

1. (P⁻) – Sem adição de nenhum agente patogénico.
2. (P⁺) – Com inoculação de *Rhizoctonia solani*,

4.1.1.2 Preparação dos alvéolos, sementeira e inoculação

Cada modalidade foi constituída por um tabuleiro com 4 filas, com 10 alvéolos cada uma. Os alvéolos foram cheios com turfa loura (Hansa Torf, Floragard, Alemanha), com o pH ajustado a 7, através da adição e mistura de 3 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃) (Merck, Alemanha).

Na modalidade 1 (P⁻) não foi adicionado nenhum agente patogénico. No tabuleiro da modalidade 2 (P⁺) foi adicionado um disco, com 6,5 mm de diâmetro interno, de PDA contendo micélio de *Rhizoctonia solani* em cada um dos alvéolos.

De seguida, foi feita a sementeira em ambos os tabuleiros. Em cada fila de cada tabuleiro foi semeada uma das cultivares, colocando 5 sementes por alvéolo.

4.1.2 Obtenção do patogénico *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum foi isolado a partir de plantas de espinafre infetadas de ensaios que decorreram paralelamente no Horto da Universidade do Algarve. Primeiramente, a cultura foi identificada macro e microscopicamente com o auxílio de uma chave dicotómica para identificação de fungos (Watanabe, 2002). Para confirmar os resultados, foi feita análise molecular. Foi feita a extração do ADN, através da utilização de um *kit*

de extração (DNeasy® Plant Pro Kit, Qiagen). Após a extração, o ADN foi amplificado por *polymerase chain reaction* (PCR). O produto do PCR foi depois enviado para um laboratório para obtenção da sequenciação do ADN. A partir da sequenciação, comprovou-se que a espécie era de facto *Fusarium oxysporum*.

4.1.3 Ensaios de antagonismo *in vitro*

Para avaliar a capacidade antagonista do fungo *Trichoderma atroviride* contra os patogénicos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, foram primeiramente feitos ensaios de antagonismo *in vitro*.

O fungo *T. atroviride* foi isolado de composto de resíduos agro-industriais, obtido na Universidade do Algarve (Coelho *et al.*, 2020). O patogénico *R. solani* foi cedido pela Universidade de Barcelona e *F. oxysporum* foi isolado a partir de plantas de espinafre infetadas e identificado através de análise molecular.

A avaliação foi feita através do método de confronto direto, em placas de Petri contendo *potato dextrose agar* (PDA). Foram inoculados dois discos (6,5 mm de diâmetro) por placa: um com micélio do agente patogénico (*R. solani* ou *F. oxysporum*) e o outro com o micélio do antagonista (*T. atroviride*), distanciados 3 cm entre si. Os raios das zonas de crescimento de cada fungo foram medidos diariamente. A percentagem de inibição (IP) foi calculada de acordo com a equação 4.1.

Equação 4.1:
$$IP = \frac{(Rc - R1)}{Rc} \times 100$$

Onde,

Rc – Raio da zona de crescimento do patogénico que cresceu isoladamente (mm);

R1 – Raio da zona de crescimento do patogénico que cresceu na presença do antagonista (mm).

No final do ensaio, avaliou-se o tipo de interação entre colónias de acordo com uma classificação definida por Magan e Lacey (1984).

4.1.4 Determinação da granulometria do material filtrante

A granulometria do material filtrante foi previamente determinada por crivagem. Para tal, utilizou-se uma série de crivos com as seguintes dimensões da malha (mm): 16; 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 (Martinez, 1992).

Crivaram-se, em triplicado, cerca de 200 g de amostra de material filtrante (areia e gravilha), com um agitador mecânico (Retsch, A5200 digit) durante 10 minutos, com agitação intermitente. No final da crivagem, o material recolhido em cada crivo foi pesado.

4.2 Ensaios principais

4.2.1 Modalidades e desenho experimental

Os ensaios principais foram constituídos por oito modalidades. As modalidades dos ensaios estão sistematizadas no quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Modalidades dos ensaios principais

Modalidade*	Filtro de areia	<i>Trichoderma atroviride</i>	Patogénico
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	+	+	+
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	+	+	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	+	-	+
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	+	-	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	-	+	+
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	-	+	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	-	-	+
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	-	-	-

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, patogénico; +/-, presença ou ausência.

Foram feitos oito ensaios com *Rhizoctonia solani*, que decorreram entre novembro de 2019 e janeiro de 2021 e foram instalados cinco ensaios com *Fusarium oxysporum*, que decorreram entre fevereiro e julho de 2021. Cada ensaio teve a duração aproximada de três semanas.

O filtro de areia consistiu num tubo de PVC com 1 m de altura e 10 cm de diâmetro, preenchido com o material filtrante (6 dm³), constituído por areia fina (areia de sílica calibrada, Maxmat), deixando 5 cm no topo do tubo por preencher. Na base do tubo foi colocada uma camada de gravilha com 10 cm de altura (anexo I). Nas modalidades sem filtro (5 – 8) foram instalados tubos de PVC com as mesmas características, mas vazios.

O antagonista *Trichoderma atroviride* foi adicionado em suspensão aquosa, na concentração de 10⁶ conídios.mL⁻¹, calculada de acordo com o volume do filtro (6 L). Nas modalidades com filtro (1 e 2), a suspensão foi aplicada diretamente no filtro. Nas modalidades sem filtro (5 e 6), a suspensão foi aplicada na solução nutritiva.

O agente patogénico (*R. solani* ou *F. oxysporum*) foi adicionado a jusante da calha de drenagem, antes da entrada da drenagem no tubo PVC, em vasos com o mesmo substrato usado nas plantas.

4.2.2 Sistema de cultivo

O sistema de cultivo foi instalado em estufa, no Horto da Universidade do Algarve no *Campus* de Gambelas (figura 4.1; anexo II).

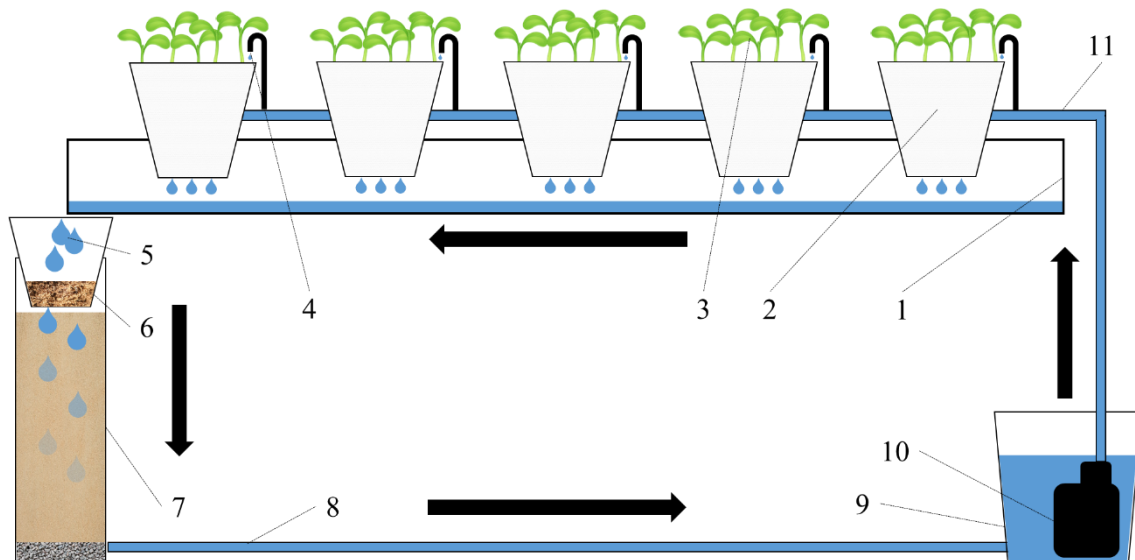


Figura 4.1 – Esquema completo do sistema de cultivo utilizado. 1 – calha; 2 – vaso; 3 – plantas de pepino, (*Cucumis sativus* L. ‘Marketer’); 4 – microtubo; 5 – drenagem; 6 – substrato com o patogénico, somente nas modalidades P⁺; 7 – tubo PVC com filtro nas modalidades F⁺ e sem filtro nas modalidades F⁻; 8 – estrutura de saída (tubo PE ½”); 9 – depósito de recolha da drenagem (10 L); 10 – bomba; 11 – tubo de rega. Setas pretas representam a direção da circulação da solução nutritiva.

O sistema de cultivo foi composto por oito calhas (figura 4.1 – 1), uma por modalidade. Cada calha serviu de suporte a cinco vasos (figura 4.1 – 2). No início de cada ensaio, os vasos foram cheios com turfa loira (Hansa Torf, Floragard, Alemanha), esterilizada e com o pH ajustado para um valor próximo de 7, através da adição de 3 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃). O tratamento térmico aos substratos consistiu na colocação numa estufa de secagem a 105°C, durante pelo menos 24 horas. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes biológicas de pepino (*Cucumis sativus* L. ‘Marketer’) (Semillas Fitó, Espanha) (figura 4.1 – 3).

A rega foi feita por gota-a-gota, com um gotejador por vaso (figura 4.1 – 4), com o seu débito ajustado de modo a manter um caudal constante de drenagem (figura 4.1 – 5) através do filtro (para impedir que este secasse).

As calhas foram posicionadas sobre uma bancada ligeiramente inclinada e elevada em relação aos filtros. Os vasos com o agente patogénico (modalidades P+) foram colocados a jusante das calhas (figura 4.1 – 6). Os tubos PVC, com ou sem material filtrante, foram alinhados com as calhas, de modo a receberem a drenagem de cada calha (figura 4.1 – 7). O sistema de cultivo foi instalado em regime fechado, ou seja, a drenagem foi constantemente reutilizada.

A drenagem circulou pelos filtros, por gravidade através da areia nos filtros (modalidades 1 a 4) ou através do tubo sem areia (modalidades 5 a 8), até à saída. A estrutura de saída era constituída por um tubo de PE ½” (figura 4.1 – 8), que ligava o fundo do filtro a um depósito (10 L) (figura 4.1 – 9), onde se encontrava uma bomba elétrica submersível (figura 4.1 – 10). A partir desse depósito, a solução nutritiva foi constantemente recirculada pela bomba, até aos gotejadores, mantendo a rega constante (figura 4.1 – 11).

4.2.3 Manutenção das culturas de microrganismos

Para que pudessem ser testados, os fungos utilizados nos ensaios foram sendo replicados, procurando mantê-los em culturas puras, sem contaminações e virulentas. Para tal, os fungos foram cultivados em laboratório, em placas de Petri, em meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) e CMA (*Corn Meal Agar*). As culturas foram mantidas numa estufa de incubação a 26°C.

Para a sua preparação, os meios de cultura foram pesados em pó, para um balão de *Erlenmeyer*, de acordo com o volume de meio pretendido. Foi adicionada água destilada, seguindo-se a sua esterilização na autoclave, a 120°C, durante 20 minutos. Após a esterilização, o meio de cultura foi distribuído para placas de Petri de 90 mm, na câmara de fluxo laminar (BH-EN 2005, FASTER).

4.2.4 Preparação da suspensão de *Trichoderma atroviride*

Previamente à instalação de cada ensaio foi feita uma suspensão de conídios de *T. atroviride* (figura 4.2). A suspensão foi obtida através do esfregaço e lavagem de culturas puras que cresceram em placas de Petri, em meio de cultura PDA (figura 4.3).

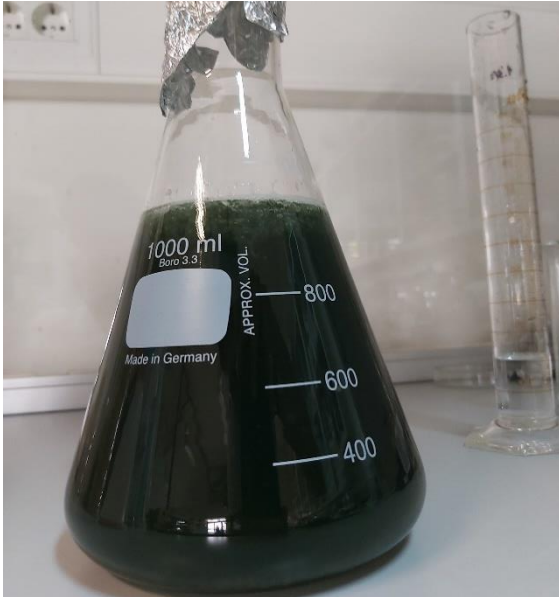


Figura 4.2 – Suspensão de conídios de *Trichoderma atroviride*.



Figura 4.3 – Esfregaço de uma cultura de *Trichoderma atroviride*, em água.

A suspensão foi preparada mediante a adição de 50 mL de água à placa de Petri com *T. atroviride* suficientemente desenvolvida. Com uma ansa de vidro esterilizada, o fungo foi separado do meio de cultura (figura 4.3). Este processo foi repetido até que se obtivesse o volume de suspensão necessário, que dependeu da concentração de conídios que se obteve ao fazer a suspensão.

A concentração de conídios da suspensão foi medida através da sua contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer, ao microscópio ($\times 400$) (Labovert FS, Leitz, Alemanha). Após contagem dos conídios de cada quadrado pequeno alternando a direção de linha para linha, foi determinada a sua concentração, recorrendo à equação 4.2.

Equação 4.2:
$$C = \frac{\text{Número total de conídios}}{\text{Número total de quadrados pequenos}} \times 4 \times 10^6$$

Após o cálculo da concentração de conídios, calculou-se o volume total de suspensão necessário, de modo a obter uma concentração final de 10^6 conídios.mL⁻¹ no filtro. Para o que se usou a seguinte equação 4.3.

Equação 4.3:
$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde,

C_i – Concentração inicial (conídios.mL⁻¹);

V_i – Volume inicial (mL);

C_f – Concentração final (conídios.mL⁻¹);

V_f – Volume final (mL).

A concentração inicial foi obtida através da contagem na câmara de Neubauer. O volume final da suspensão foi calculado para o volume dos filtros (6 L), para as modalidades 1 e 2 (ambas F⁺T⁺) e modalidades 5 e 6 (ambas F⁻T⁺). A concentração final desejada era 10^6 conídios.mL⁻¹. O volume inicial obtido foi o volume de suspensão necessário a preparar.

4.2.5 Cultivo dos agentes patogénicos em substrato

Os agentes patogénicos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* foram cultivados *in vitro*, em placas de Petri de vidro com turfa loura, 7 dias antes da instalação de cada ensaio.

O pH da turfa loura foi corrigido através da adição de 3 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃). Foram colocados 40 mL de turfa por placa de Petri (figura 4.4). As placas de Petri de vidro com a turfa loura foram depois esterilizadas em autoclave, a 120°C, durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização foram colocados assepticamente 4 fragmentos de micélio do agente patogénico por placa de Petri, em pelo menos 4 placas. As placas foram seladas com *parafilm* e colocadas numa estufa de incubação a 26°C. Uma semana após a inoculação, o agente patogénico tinha ocupado grande parte da placa de Petri (figura 4.5) e em condições para ser utilizado no respetivo ensaio.



Figura 4.4 – Placas de Petri com turfa loura, esterilizadas.



Figura 4.5 – Crescimento de *Rhizoctonia solani* em turfa loura (5 dias após inoculação).

4.2.6 Parâmetros medidos

4.2.6.1 Severidade da doença

A severidade da doença foi avaliada em cada ensaio, cerca de duas semanas após a emergência das plantas. Para tal, estas foram removidas dos vasos e as suas raízes separadas do substrato.

A severidade da doença de cada planta foi avaliada segundo uma escala visual de sintomas (figura 4.6).



Figura 4.6 – escala visual de sintomas usada para avaliação da severidade da doença. 1 – ausência de sintomas; 2 – lesões leves; 3 – lesões graves; 4 – morte pós-emergência; 5 – morte pré-emergência.

4.2.6.2 Incidência da doença

A ausência ou presença da doença, de cada planta, foi avaliada segundo uma escala visual: 0 – ausência da doença; e 1 – presença da doença.

Foi calculado o número de plantas infetadas, por vaso, pela contagem das plantas com presença de doença. Foi calculada a percentagem de plantas infetadas por vaso (p), de acordo com a equação 4.4.

Equação 4.4:
$$p = \frac{\text{Número de plantas infetadas}}{\text{Número de plantas germinadas}} (\%)$$

A incidência da doença (DI) foi depois calculada a partir do valor da percentagem (p), que foi depois transformado, utilizando a equação 4.5, para análise estatística com análise da variância e teste de Duncan.

Equação 4.5:
$$DI = \arcsen(\sqrt{p})$$

Esta transformação dos valores obtidos foi feita devido ao facto dos resultados estarem expressos em percentagem. Quando valores de 0% ou 100% são frequentes, é recomendado utilizar a transformação dos valores. O efeito desta transformação ocorre essencialmente nas extremidades da distribuição, expandindo as extremidades da escala (Holland, 2017).

4.2.6.3 Eficácia, consistência e índice de controlo biológico (BCI)

A eficácia (E), por vaso, foi calculada através da equação 4.6.

Equação 4.6:
$$E = 100 - p (\%)$$

A consistência (C) foi igual ao desvio padrão da eficácia, considerando a média por modalidade, calculada segundo a equação 4.7.

Equação 4.7:
$$C = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - M_A)^2}{n}}$$

Onde,

\sum – Somatório de todos os termos, desde a primeira posição ($i=1$) até à posição n ;

X_i – Valor na posição i no conjunto dos dados;

M_A – média aritmética dos dados;

n – quantidade de dados.

O índice de controlo biológico (BCI), por modalidade, foi calculado segundo a equação 4.8.

Equação 4.8:
$$BCI = \frac{E}{C}$$

4.2.6.4 Cálculos e análise estatística

Os cálculos das médias, erros padrão, índices e outros, bem como os quadros e os gráficos foram realizados usando o *Software Microsoft® Excel 2012 (Microsoft Corporation)*.

A análise estatística foi feita recorrendo ao programa estatístico *IBM® SPSS® Statistics 26*, para efetuar as análises de variância e os testes de Duncan, quando se compararam mais do que duas médias; e os testes t-Student quando se compararam somente duas médias. Neste programa foram também calculadas as correlações e as análises de variância multifatoriais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio preliminares

5.1.1 Sensibilidade de quatro cultivares de pepino (*Cucumis sativus* L.) à doença causada por *Rhizoctonia solani*

5.1.1.1 Severidade da doença

Foi calculada a severidade da doença, por alvéolo, para cada uma das quatro cultivares de pepino testadas, em função da presença e da ausência de *Rhizoctonia solani* e feita a análise da variância dos resultados (figura 5.1). O quadro resumo da análise da variância está apresentado em anexo (anexo III).

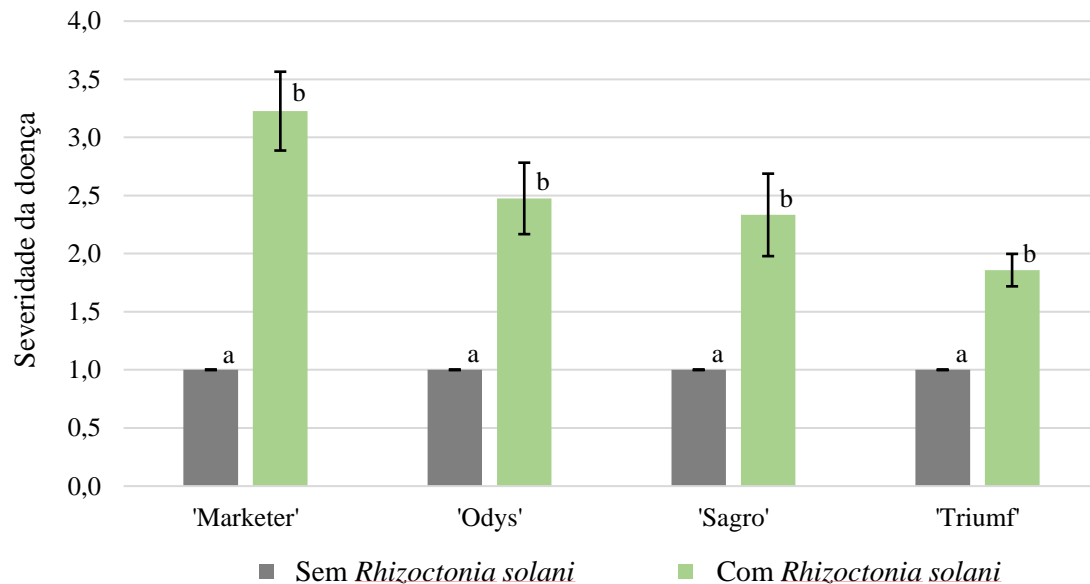


Figura 5.1 – Severidade média da doença de cada uma das quatro cultivares, em função da presença e da ausência de *Rhizoctonia solani*. Média \pm erro padrão; n=10; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan (p=0,05).

De acordo com os resultados, foi evidente que a severidade da doença foi superior na cultivar 'Marketer'. Isto sugere que esta cultivar é, de entre as quatro testadas, a que apresentou sintomas mais severos na presença da mesma quantidade de inóculo de *R. solani*.

5.1.1.2 Incidência da doença

Foi calculada a incidência da doença, por alvéolo, para cada uma das quatro cultivares de pepino, em função da presença e da ausência de *Rhizoctonia solani* (quadro 5.1). O quadro resumo da análise da variância está apresentado em anexo (anexo III).

Quadro 5.1 – Incidência média da doença de cada uma das quatro cultivares, em função da presença ou ausência de *R. solani*. Em cada coluna, médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Cultivar	Sem <i>Rhizoctonia solani</i>	Com <i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Cucumis sativus</i> cv. ‘Marketer’	0,00 a	1,20 a
<i>Cucumis sativus</i> cv. ‘Odys’	0,00 a	1,26 a
<i>Cucumis sativus</i> cv. ‘Sagro’	0,00 a	1,10 a
<i>Cucumis sativus</i> cv. ‘Triumpf’	0,00 a	1,20 a

De acordo com estes resultados, é possível observar que nenhuma planta da modalidade sem *R. solani* foi infetada, tal foi indicado também pelos resultados da severidade da doença.

Por outro lado, na modalidade com *R. solani* não se verificaram diferenças na incidência da doença entre cultivares. Isto indica que, independentemente da cultivar, a taxa de plantas infetadas foi idêntica.

5.1.1.3 Conclusões

Apesar de se terem verificado diferenças entre as cultivares de pepino testadas quanto à severidade da doença, o mesmo não aconteceu para a incidência da doença. Isto indica que, apesar da taxa de plantas infetadas ter sido idêntica, os sintomas foram mais severos na ‘Marketer’.

Por isso, decidiu-se utilizar plantas de ‘Marketer’ nos ensaios principais deste trabalho, pois de acordo com os resultados, as plantas desta cultivar parecem ser melhor indicadoras da severidade da doença, de entre as quatro cultivares testadas.

5.1.2 Ensaio de antagonismo *in vitro*

A média do raio de crescimento do micélio nas placas de Petri, ao terceiro dia após a inoculação, está apresentado na figura 5.2.

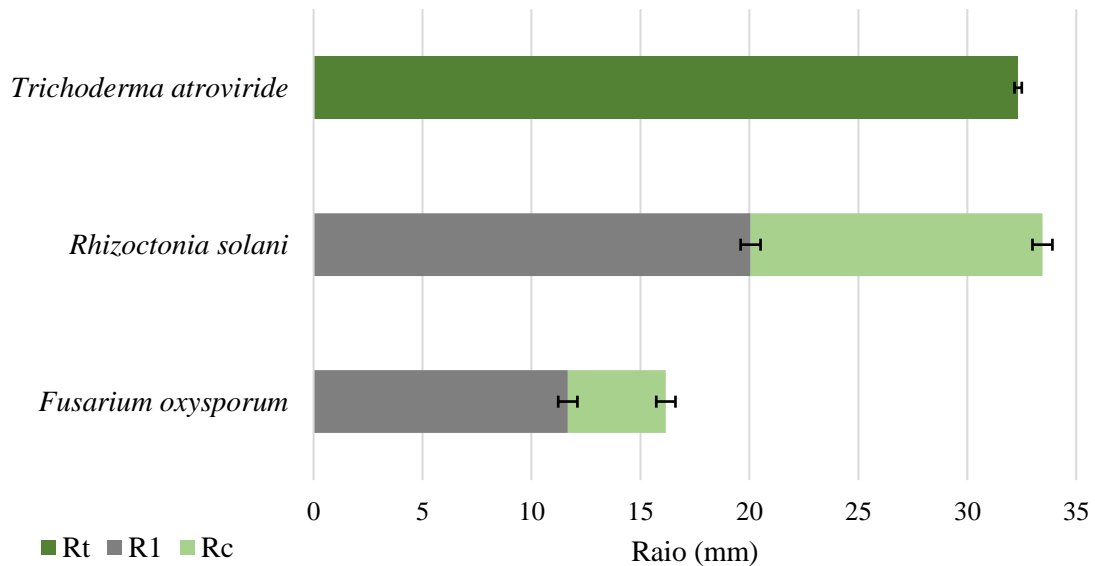


Figura 5.2 – Rt, média do raio de crescimento total do antagonista *Trichoderma atroviride*; R1, média do raio de crescimento do patógeno que cresceu na presença do antagonista; e Rc, média do raio de crescimento do patógeno que cresceu isoladamente. Média \pm erro padrão; n=3.

O antagonista *T. atroviride* teve um raio médio de crescimento de 32 mm.

O patógeno *R. solani* teve um raio de 33 mm na ausência do antagonista, e de 20 mm na sua presença. Por isso, na presença do antagonista, *R. solani* teve o seu crescimento limitado, tendo apresentado um raio de crescimento 13 mm mais pequeno.

O patógeno *F. oxysporum*, este patógeno teve um raio de crescimento de 16 mm na ausência de *T. atroviride* e de 11 mm, na presença. Na presença do antagonista, o patógeno teve o seu crescimento limitado, tendo apresentado um raio de crescimento 5 mm mais pequeno.

A percentagem de inibição (figura 5.3) foi diferente nos dois patogénicos, tendo sido cerca de 28% para *Fusarium oxysporum* e 40% para *Rhizoctonia solani*. Estes resultados sugerem que o antagonista *Trichoderma atroviride* tem melhor capacidade em controlar o crescimento de *Rhizoctonia solani* do que o de *Fusarium oxysporum*.

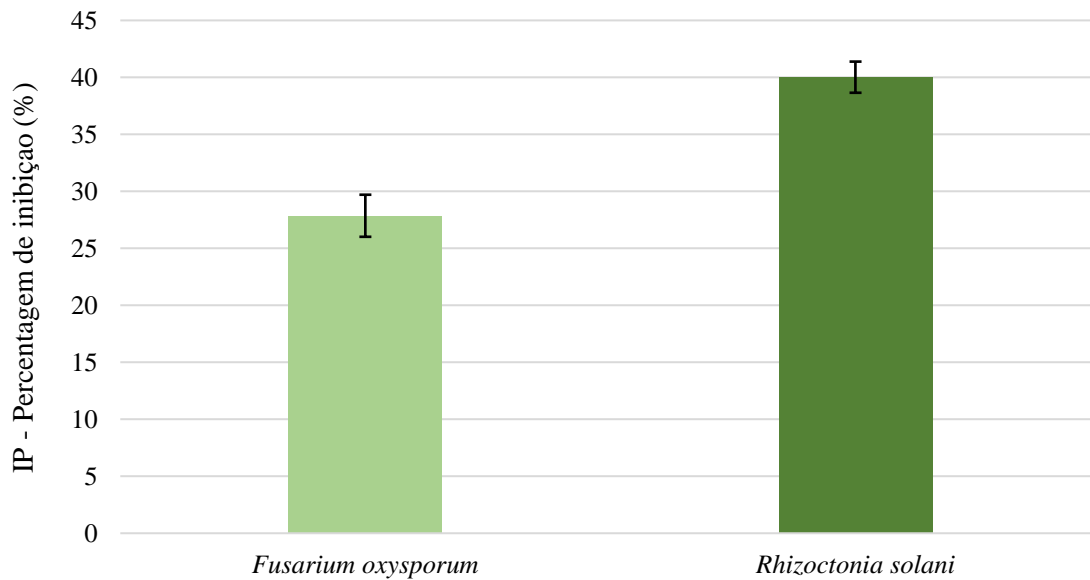


Figura 5.3 – Percentagens de inibição de *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* no confronto com o antagonista *Trichoderma atroviride*.

Outros autores verificaram que o antagonista *T. atroviride* foi capaz de inibir *R. solani* com uma percentagem de inibição ainda maior, cerca de 60%. Além disso, vários antagonistas testados, *T. atroviride* foi o que causou a maior percentagem de inibição de *R. solani* (Coelho *et al.*, 2020). Isto mostra, a forte capacidade antagonista de *T. atroviride* contra esse patogénico.

Aos 7 dias após a inoculação, o tipo de interação entre o antagonista e os agentes patogénicos foi de tipo E, de acordo com a classificação de Magan e Lacey (1984). Este tipo de interação caracteriza-se pela inibição de uma das espécies em contacto, continuando o antagonista a crescer, a uma taxa mais reduzida sobre a colónia inibida.

5.1.3 Determinação da granulometria do material filtrante

A figura 5.4 representa a percentagem, em peso, por classe de granulometria da areia e da gravilha utilizadas nos filtros.

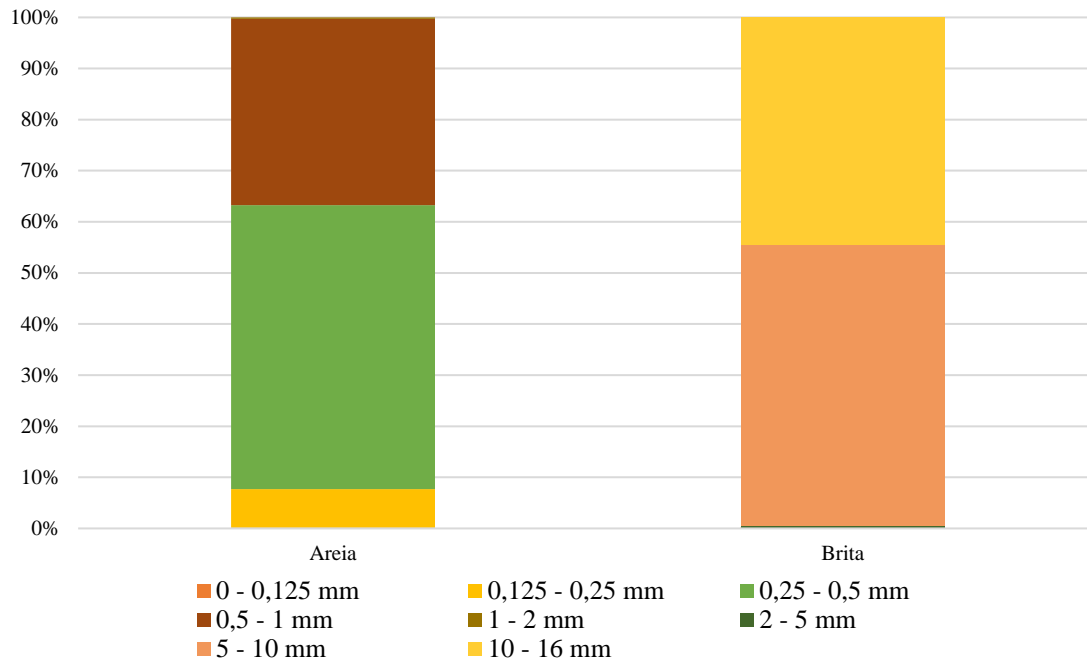


Figura 5.4 – Percentagem, em peso, por classe de granulometria da areia e da gravilha utilizadas nos filtros.

De acordo com os resultados, cerca de 55% (p/p) da areia era constituída por partículas com granulometria entre 0,25 e 0,5 mm e cerca de 35%, por partículas entre 0,5 e 1 mm. No caso da gravilha, cerca de 55% (p/p) das partículas apresentaram uma granulometria entre 5 e 10 mm e cerca de 45%, entre 10 e 16 mm.

Além disso, com base nestes resultados, foi calculado o tamanho efetivo das partículas (D_{10}) e o coeficiente de uniformidade (CU) para a areia e para a gravilha usadas no filtro (quadro 5.2). Verificou-se que o tamanho efetivo das partículas da areia foi ligeiramente inferior ao recomendado (quadro 2.6).

Quadro 5.2 – Tamanho efetivo das partículas e coeficiente de uniformidade dos materiais utilizados no filtro.

Parâmetro	Areia	Gravilha
Tamanho efetivo das partículas (D_{10})	0,13 mm	2,53 mm
Coeficiente de uniformidade (CU)	1,46	1,04

Tamanho efetivo das partículas (D_{10}): diâmetro das partículas abaixo do qual 10% das mesmas são as mais pequenas.
Coeficiente de uniformidade (CU): D_{60}/D_{10} .

5.2 Ensaios com o agente patogénico *Rhizoctonia solani*

5.2.1 Severidade da doença

Para cada ensaio com *Rhizoctonia solani*, foi calculada a severidade da doença, por modalidade (quadro 5.3). Os quadros resumo da análise da variância estão apresentados em anexo (anexo IV).

Quadro 5.3 – Severidade da doença causada por *Rhizoctonia solani* em cada um dos ensaios, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Modalidade*	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	6º ensaio	7º ensaio	8º ensaio	Média
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	1,5 ab	1,0 a	1,0 a	1,3 a	1,0 a	1,0 a	1,1 a	1,2 ab	1,12 a
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,00 a
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	2,3 b	3,3 b	1,8 b	4,0 b	2,7 b	2,1 b	1,0 a	1,4 ab	2,24 b
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,00 a
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	1,3 a	1,0 a	1,0 a	1,3 a	1,0 a	1,0 a	1,1 a	1,3 ab	1,11 a
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,00 a
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	4,2 c	3,0 b	3,9 c	1,0 a	3,9 c	2,5 b	1,5 b	1,6 b	2,77 c
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,00 a

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

A partir destes resultados é possível observar que a severidade da doença foi sempre 1,00 nas modalidades 2, 4, 6 e 8 (P⁻), em todos os ensaios. Isto significa que as plantas destas modalidades nunca apresentaram sintomas de rizoctónia, o que está de acordo com o facto de nestas modalidades não ter sido inoculado o patogénico *R. solani*, e por isso, as plantas não foram infetadas. Isto permite comprovar que não existiram contaminações entre as modalidades.

Verificou-se que no primeiro, terceiro e quinto ensaios (quadro 5.3), ocorreu um padrão semelhante ao registado para a média de todos os ensaios. Nestes ensaios, a modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺) apresentou uma severidade significativamente superior às restantes, exceto em relação à modalidade 7. A modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), apresentou uma severidade significativamente superior à de qualquer outra modalidade. Estas modalidades, 3 e 7, não continham *T. atroviride* e continham *R. solani*. No entanto, a modalidade 3 dispunha de areia no filtro, e a modalidade 7 não. Isto sugere que o sistema de filtração permitiu a redução da severidade da doença, ainda que parcialmente. Por

outro lado, nas modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺), a severidade foi significativamente inferior à das modalidades 3 e 7, e igual à das modalidades 2, 4, 6 e 8 (P⁻). Isto sugere que a presença de *T. atroviride* permitiu controlar completamente a severidade de *R. solani*.

Nos restantes ensaios (segundo, quarto, sexto, sétimo e oitavo), este padrão não foi tão pronunciado. Contudo, as modalidades 3 (F⁺T⁻P⁺) e 7 (F⁻T⁻P⁺) apresentaram, quase sempre, uma severidade significativamente superior à das restantes modalidades (1, 2, 4, 5, 6, e 8), mesmo que não tenham apresentado diferenças significativas entre si.

A média da severidade da doença de todos os ensaios, por modalidade está representada na figura 5.5.

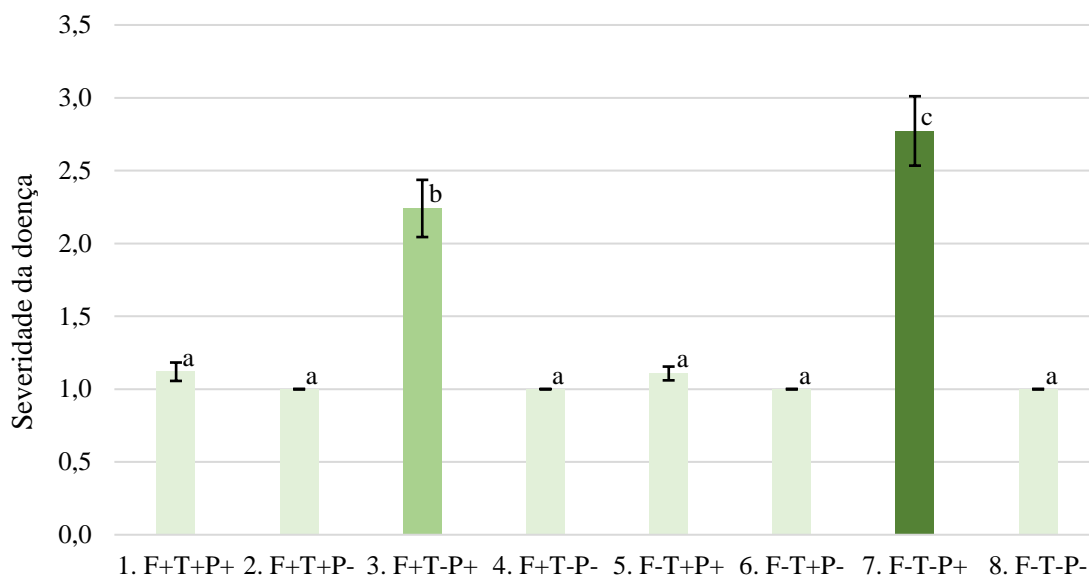


Figura 5.5 – Média da severidade da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=40; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

Considerando a média de todos os ensaios (figura 5.5), a severidade da doença foi significativamente inferior na presença do antagonista *T. atroviride*, independentemente da presença do filtro. Além disso, a severidade não foi significativamente diferente da observada na ausência do patogénico (modalidades 2, 4, 6 e 8), onde foi sempre igual a 1,00. Isto sugere que o antagonista *T. atroviride* teve a capacidade de controlar completamente a severidade do patogénico *R. solani*, mesmo na ausência do filtro. Vários outros autores (Abbas *et al.*, 2022) verificaram que o antagonista *T. atroviride* é bastante

eficiente em controlar o patógeno *R. solani*, através de vários mecanismos de biocontrole. Além disso, os resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* corroboram esta observação, evidenciando a capacidade supressiva de *T. atroviride* sobre *R. solani*, que apresentou uma percentagem de inibição de cerca de 40% (figura 5.3).

Na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), a severidade média foi 2,77 e significativamente superior a todas as outras modalidades. Este valor representa, provavelmente, a severidade máxima que o patógeno *R. solani* conseguiu provocar nas plantas. Isto comprova também que este patógeno tem a capacidade de se disseminar através da água de rega (quadro 2.3) e infectar as plantas, como foi verificado por outros autores (Lévesque *et al.*, 2019; Stewart-Wade, 2011). Além disso, o valor de severidade (2,77) foi significativamente superior ao das modalidades sem o patógeno (1,00), indicando a importância de desinfetar a solução de rega, sempre que este patógeno ocorra ou para prevenir a sua disseminação.

Na modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺), a severidade média foi 2,24, significativamente superior a todas as modalidades, exceto em relação à modalidade 7. Isto sugere que o filtro sem *T. atroviride*, teve, algum efeito, ainda que parcial, de controlar a severidade de *R. solani*.

Foi ainda calculada a percentagem de plantas com cada nível de severidade da doença, por modalidade (figura 5.6).

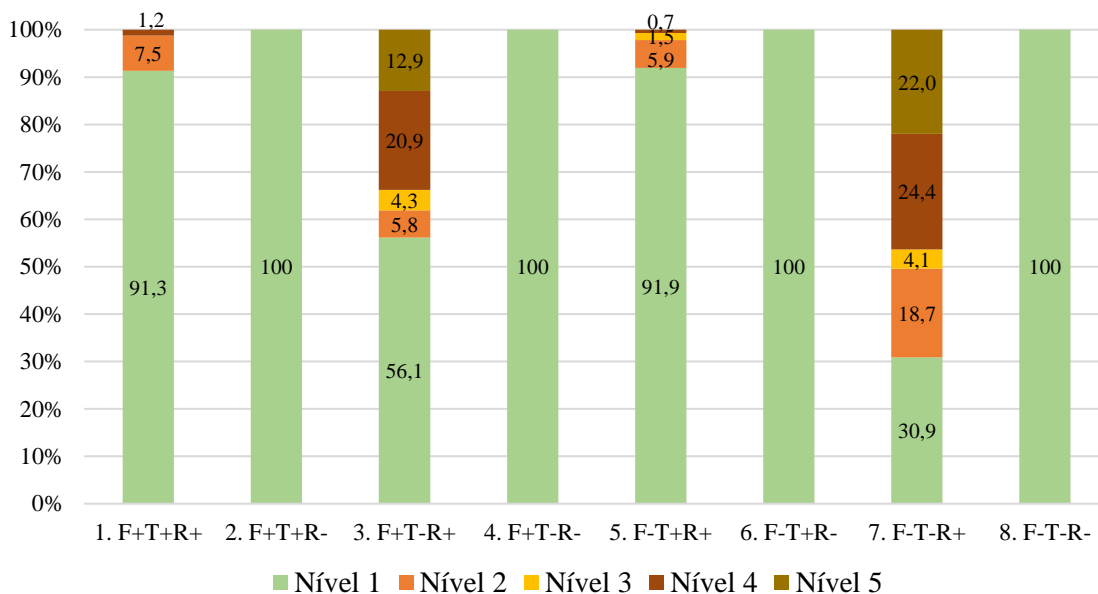


Figura 5.6 – Percentagem média de plantas de cada nível de severidade da doença (Nível), por modalidade. F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

De acordo com estes resultados, é possível observar que o nível de severidade foi 1 em todas as plantas nas modalidades 2, 4, 6 e 8 (P⁻), como já foi verificado anteriormente (figura 5.5).

Nas modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺), mais de 90% das plantas apresentaram nível 1 de severidade de doença e nunca apresentaram o nível 5. Na modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺), cerca de 44% das plantas apresentaram um nível de severidade superior a 1, tendo sido 21 % de nível 4 e 13 % de nível 5. Isto significa que a percentagem de mortalidade devido à doença foi cerca de 34%. Na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), cerca de 70% das plantas apresentaram um nível de severidade superior a 1, tendo quase 50% das plantas apresentado um nível de 4 ou 5. Isto significa que quase metade das plantas acabaram por morrer devido à doença. Comparando a modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺) com a 7 (F⁻T⁻P⁺), os dados sugerem que a presença do filtro teve influência na redução da percentagem de plantas com severidade da doença superior a 1, embora esta percentagem seja maior do que nas modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺). Além disso, a percentagem de mortalidade foi também inferior na modalidade 3, relativamente à 7.

Para averiguar se existiram diferenças na severidade da doença em função de vários fatores em estudo, foi feita uma análise da variância multifatorial (quadro 5.4). Os resultados foram calculados, considerando os dados de todos os ensaios, para os 3 fatores: filtro, *Trichoderma atroviride* e *Rhizoctonia solani*. Cada um destes fatores teve dois níveis (0 – ausência e 1 – presença).

Quadro 5.4 – Quadro resumo da análise da variância.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Subgrupos	124,524	7	17,789	40,733	< 0,001
Filtro	1,260	1	1,260	2,886	0,090
<i>T. atroviride</i>	36,131	1	36,131	82,731	< 0,001
<i>R. solani</i>	48,845	1	48,845	111,843	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i>	1,379	1	1,379	3,157	0,077
Filtro × <i>R. solani</i>	1,260	1	1,260	2,886	0,090
<i>T. atroviride</i> × <i>R. solani</i>	36,131	1	36,131	82,731	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i> × <i>R. solani</i>	1,379	1	1,379	3,157	0,077
Devido ao erro	127,087	291	0,437		
Total	251,611	298			

De acordo com estes resultados, é possível verificar que, tanto o fator *T. atroviride*, como o fator *R. solani* tiveram efeitos significativos sobre a severidade da doença. Isto significa que a severidade da doença variou com estes fatores, ou seja, a sua ausência e a sua presença. Por outro lado, o filtro parece não ter tido efeito na severidade da doença.

Além disso, há evidência suficiente nos dados para que se possa concluir a existência de uma interação significativa entre o fator *T. atroviride* e o fator *R. solani*. Isto significa que a severidade da doença na presença ou ausência de *R. solani*, depende da presença de *T. atroviride*. Por outro lado, parece não existir uma interação significativa entre os fatores filtro e *T. atroviride*; nem entre os fatores filtro e *R. solani*, e nem entre os 3 fatores.

5.2.1.1 Efeito do sistema de filtração na severidade da doença

Para cada ensaio com *Rhizoctonia solani* foi calculada a média da severidade da doença, em função da presença e da ausência de areia no tubo do filtro (figura 5.7).

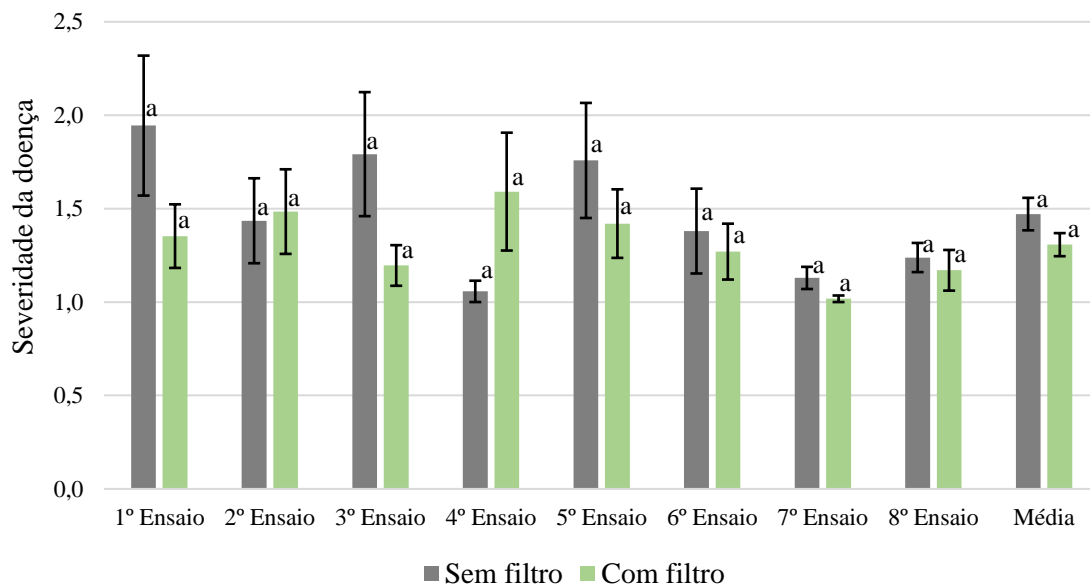


Figura 5.7 – Média da severidade da doença, por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 160$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

Estes resultados estão de acordo com o que foi observado através da análise da variância multifatorial (quadro 5.4), isto é, a presença do filtro não teve influência na severidade da doença. Assim, o elemento filtrante por si só não foi capaz de controlar a severidade de *R. solani*.

5.2.1.2 Efeito de *Trichoderma atroviride* na severidade da doença

Para cada ensaio com *Rhizoctonia solani* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *Trichoderma atroviride* (figura 5.8).

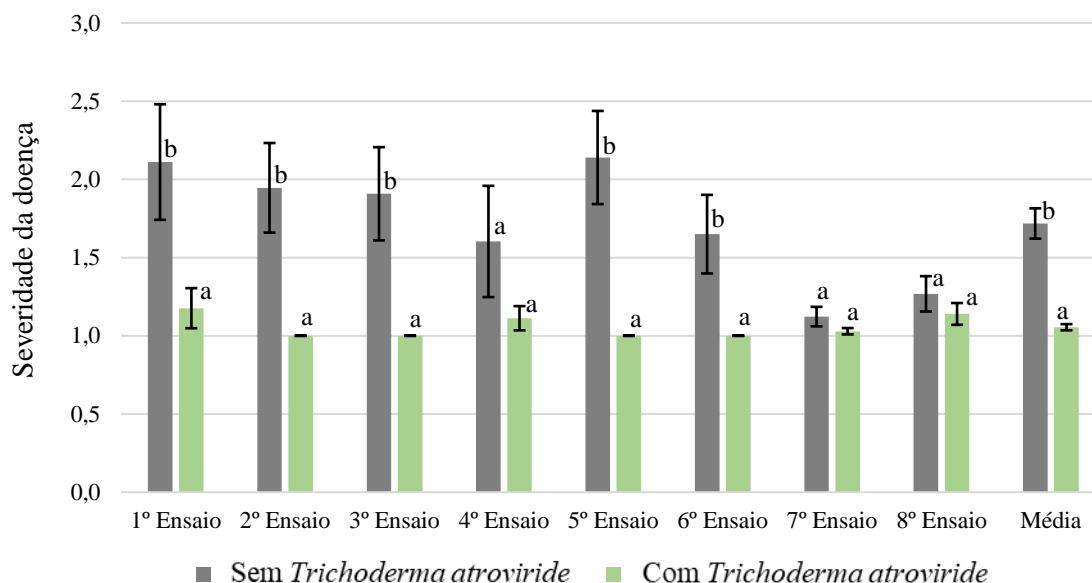


Figura 5.8 – Média da severidade da doença, por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

Estes resultados estão de acordo com o que foi observado através da análise da variância (quadro 5.4), que indicava que a severidade da doença foi diferente em função da ausência e da presença de *T. atroviride*. É possível verificar que a severidade da doença foi significativamente inferior quando o antagonista *T. atroviride* estava presente, em todos os ensaios à exceção do quarto, sétimo e oitavo ensaios (figura 5.8). Isto poderá ter acontecido porque, mesmo sem o antagonista, o patogénico não foi suficientemente agressivo para provocar diferenças na severidade. É provável que, nestes ensaios, o patogénico não estivesse suficientemente virulento, visto que quase não foram observadas diferenças na severidade da doença entre as diferentes modalidades (quadro 5.3).

Nos ensaios de antagonismo *in vitro*, observou-se que o antagonista *T. atroviride* foi capaz de limitar o crescimento de *R. solani*, que apresentou uma percentagem de inibição de 40% (figura 5.3). Alguns autores (Abbas *et al.*, 2022; Daryaei *et al.*, 2016; Grinyer *et al.*, 2005; Kullnig *et al.*, 2000), verificaram que *T. atroviride* é capaz de controlar *R. solani* eficazmente.

5.2.1.3 Efeito do filtro melhorado com *Trichoderma atroviride* na severidade da doença

Para cada ensaio com o agente patogénico *Rhizoctonia solani* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *Trichoderma atroviride* no sistema de filtração e foi feita a comparação de médias para cada ensaio (figura 5.9).

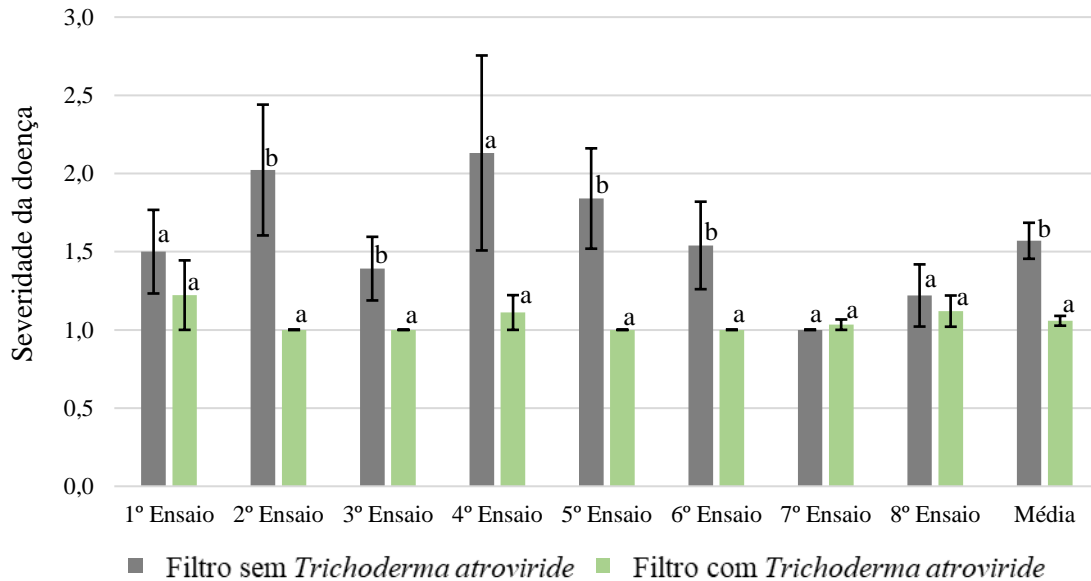


Figura 5.9 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no sistema de filtração. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 80. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

No primeiro, quarto, sétimo e oitavo ensaios não se verificaram diferenças significativas na severidade da doença entre o filtro melhorado com *T. atroviride* e o filtro sem o antagonista.

No entanto, no segundo, terceiro, quinto e sexto ensaios, a severidade da doença foi inferior quando foi adicionado o antagonista *T. atroviride* no filtro. Globalmente, verificou-se esta resposta, o que sugere que o filtro foi mais eficaz no controlo da severidade do patogénico quando o antagonista estava presente no material filtrante.

Estes resultados demonstram mais uma vez a capacidade antagonista de *T. atroviride*, sugerindo que este agente de controlo biológico pode ser utilizado no filtro para melhoria da sua eficácia contra *R. solani*.

5.2.1.4 Efeito de *Rhizoctonia solani* na severidade da doença

Para cada ensaio com o agente patogénico *Rhizoctonia solani* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *R. solani*, e comparadas as médias, para cada ensaio (figura 5.10).

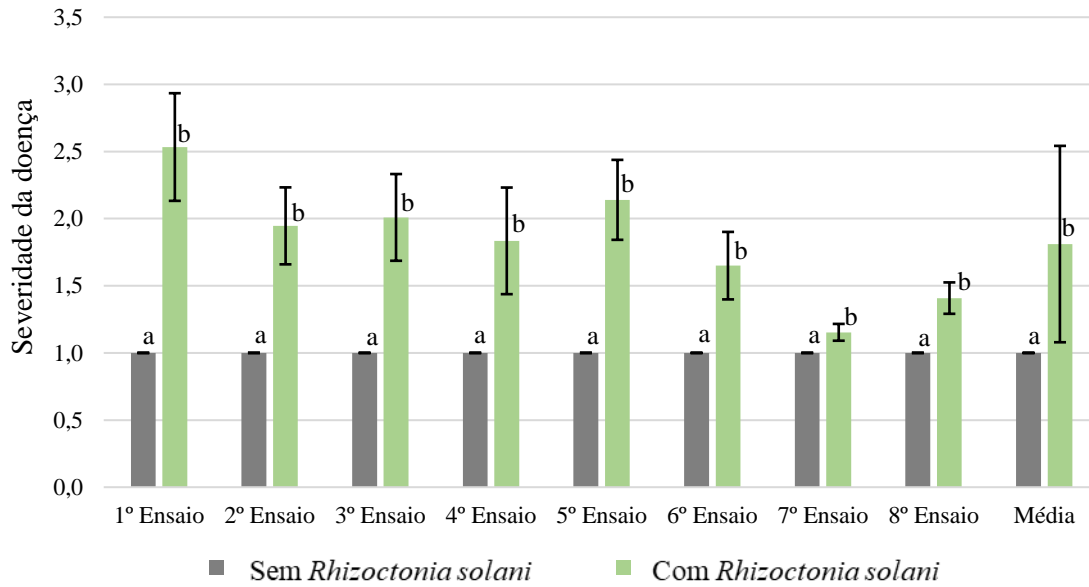


Figura 5.10 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Rhizoctonia solani*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

De acordo com estes resultados, a severidade da doença foi sempre significativamente maior na presença de *R. solani*, o que era expectável, e indica que não ocorreram contaminações entre modalidades.

Além disso, comprova-se novamente que o patogénico *R. solani* foi capaz de circular na solução nutritiva e infetar as plantas, tal como verificado por outros autores (Lévesque *et al.*, 2019; Stewart-Wade, 2011). Por isso, na presença deste patogénico é necessário desinfetar a drenagem para poder reutilizá-la para rega.

5.2.2 Incidência da doença

Para cada ensaio com o agente patogénico *Rhizoctonia solani* foi calculada a incidência da doença, por modalidade (quadro 5.5). Os quadros resumo da análise da variância estão apresentados em anexo (anexo IV).

Quadro 5.5 – Incidência da doença causada por *Rhizoctonia solani* em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Modalidade *	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	6º ensaio	7º ensaio	8º ensaio	Média
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	0,39 a	0,00 a	0,00 a	0,39 a	0,00 a	0,00 a	0,12 a	0,41 ab	0,15 a
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	1,57 b	1,07 b	0,61 b	1,31 b	0,81 b	0,49 b	0,00 a	0,41 ab	0,73 b
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	0,26 a	0,00 a	0,00 a	0,17 a	0,00 a	0,00 a	0,10 a	0,54 ab	0,13 a
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	1,57 b	1,33 c	1,41 c	0,00 a	1,20 c	0,67 b	0,75 b	0,98 b	1,03 c
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

É possível observar que a incidência da doença foi sempre 0,00 nas modalidades 2, 4, 6 e 8 (P⁻). Tal como observado com a severidade da doença (quadro 5.3), estes resultados indicam que as plantas destas modalidades nunca apresentaram sintomas de *R. solani*, o que era expectável dado não ter sido inoculado o patogénico nestas modalidades. Por isso, as plantas destas modalidades não foram infetadas.

Destes resultados destacam-se duas modalidades: 3 (F⁺T⁻P⁺) e 7 (F⁻T⁻P⁺), onde a incidência da doença foi, em praticamente todos os ensaios, significativamente superior relativamente à das restantes modalidades, indicando que nestas modalidades, a quantidade de plantas infetadas foi superior. No segundo, terceiro e quinto ensaios, a incidência foi ainda maior na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺) do que em qualquer outra modalidade. Portanto, a presença do filtro na modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺) parece ter reduzido a presença de inóculo do agente patogénico.

Nas modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺), a incidência foi, em alguns ensaios, superior a 0,0, mas nunca de forma significativa, o que sugere, mais uma vez, a eficácia de *T. atroviride* no controlo ou limitação de *R. solani*.

A média da incidência da doença de todos os ensaios, por modalidade, está representada na figura 5.11.

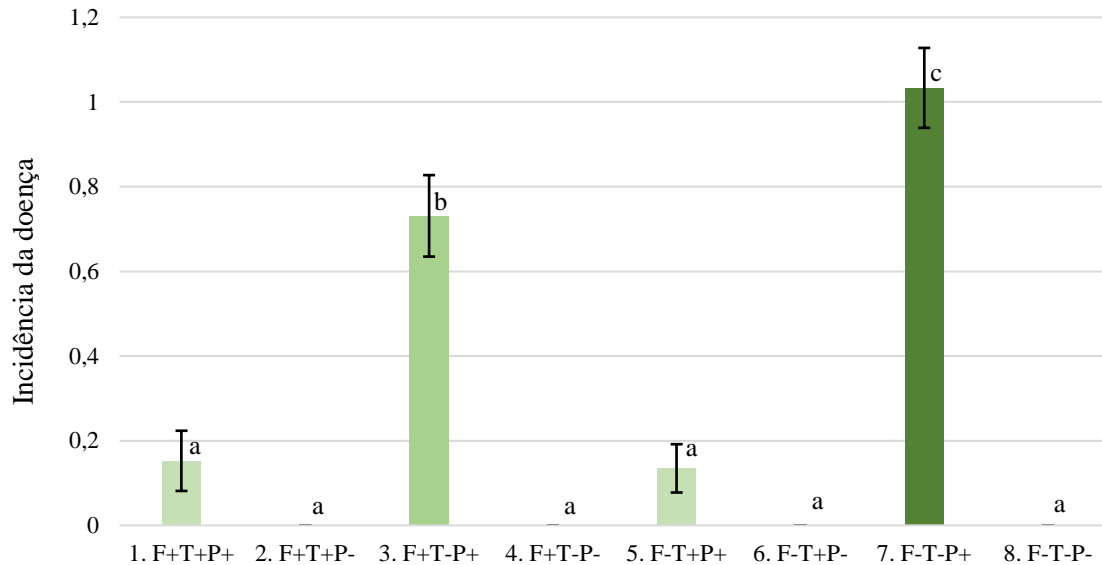


Figura 5.11 – Média da incidência da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=40; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

A média de todos os ensaios (figura 5.11) segue um padrão semelhante ao que foi verificado para a média da severidade de todos os ensaios (figura 5.6). Neste caso, a incidência foi máxima na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), conforme esperado, visto que nesta modalidade não existia nenhum fator de controlo do patogénico.

A modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺) apresentou menor incidência da doença que a modalidade 7, mas maior do que as restantes modalidades. Isto parece indicar que, o filtro teve alguma influência na limitação da dispersão de *R. solani*.

As modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺), apresentaram menor incidência da doença que as restantes modalidades com presença de *R. solani* (3. F⁺T⁻P⁺ e 7. F⁻T⁻P⁺). Além disso, a incidência nas modalidades 1 e 5 não foi estatisticamente diferente da incidência nas modalidades sem o patogénico (2, 4, 6 e 8), onde foi mínima (0,00). Isto comprova,

mais uma vez, que o antagonista *T. atroviride* teve a capacidade em controlar a dispersão *R. solani*, tal como verificado por outros autores (Abbas *et al.*, 2022) e tal como observado nos ensaios de antagonismo *in vitro* (figura 5.3).

Para averiguar se existiram diferenças na incidência da doença em função de vários fatores, foi feita a análise da variância multifatorial (quadro 5.6), tal como para a severidade da doença. Os resultados foram calculados considerando os dados de todos os ensaios, para os 3 fatores: filtro, *Trichoderma atroviride* e *Rhizoctonia solani*. Cada um destes fatores tinha dois níveis (0 – ausência e 1 – presença).

Quadro 5.6 – Quadro resumo da análise da variância.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Subgrupos	41,436	7	5,919	51,358	<0,001
Filtro	0,381	1	0,381	3,306	0,070
<i>T. atroviride</i>	10,273	1	10,273	89,128	<0,001
<i>R. solani</i>	19,809	1	19,809	171,866	<0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i>	0,482	1	0,482	4,182	0,042
Filtro × <i>R. solani</i>	0,381	1	0,381	3,306	0,070
<i>T. atroviride</i> × <i>R. solani</i>	10,273	1	10,273	89,128	<0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i> × <i>R. solani</i>	0,482	1	0,482	4,182	0,042
Devido ao erro	33,886	294	0,115		
Total	75,323	301			

De acordo com os resultados, tanto o fator *T. atroviride*, como o fator *R. solani* tiveram efeitos significativos sobre a incidência da doença. Isto significa que a incidência da doença foi diferente nos diferentes níveis destes fatores, ou seja, na sua ausência e na sua presença. Por outro lado, o filtro parece não ter tido efeito na incidência da doença.

Além disso, há evidência suficiente nos dados para que se possa concluir a existência de uma interação significativa entre os fatores *T. atroviride* e filtro; entre *T. atroviride* e *R. solani*; e entre os três fatores ao mesmo tempo. Isto significa que a incidência da doença em função de cada um destes fatores depende da presença do outro fator com o qual se analisou a interação. Por outro lado, não se verificou a existência de uma interação significativa entre os fatores filtro e *R. solani*.

5.2.2.1 Efeito do sistema de filtração na incidência da doença

Para cada ensaio com *R. solani* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência do filtro e comparados os resultados para cada ensaio (figura 5.12).

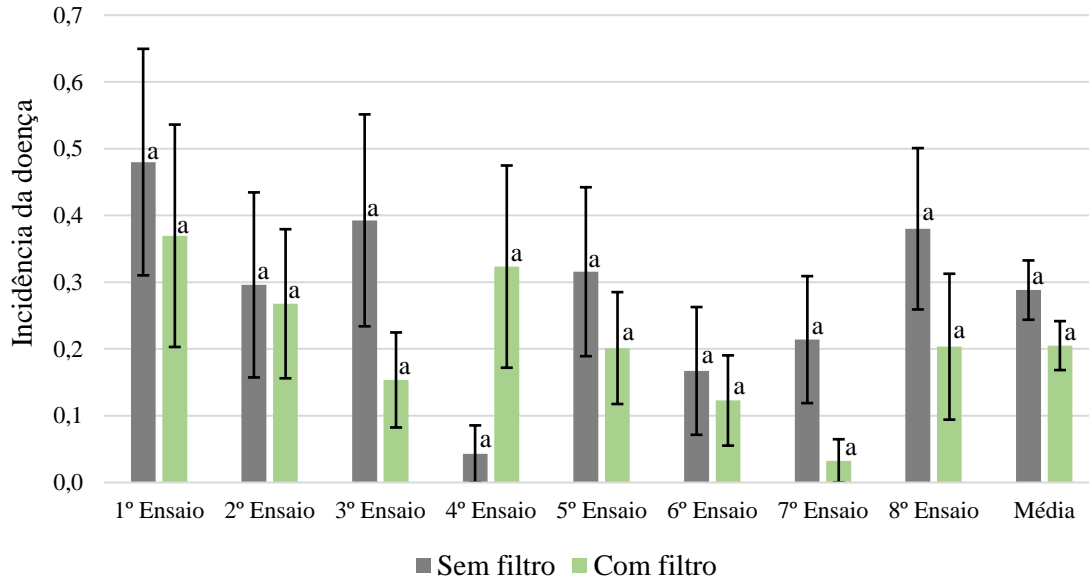


Figura 5.12 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 160$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

A partir destes resultados, é possível observar que a incidência da doença não foi estatisticamente diferente na presença ou na ausência do filtro. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado através da análise da variância multifatorial (quadro 5.6), que sugerem que o filtro de areia não teve influência significativa na incidência da doença.

Tal como foi observado para a severidade da doença, estes dados sugerem que o filtro de areia, por si só, não teve a capacidade em limitar a dispersão de *R. solani*.

A aparente falta de eficácia do filtro no controlo de *R. solani* precisa ser comprovada através de ensaios com outros desenhos experimentais. É provável que taxas de filtração mais lentas, ou outros materiais filtrantes, apresentem resultados melhores, tal como foi verificado no controlo de vários outros organismos fitopatogénicos (quadro 2.8).

5.2.2.2 Efeito de *Trichoderma atroviride* na incidência da doença

Para cada ensaio com *R. solani* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência de *T. atroviride* e comparados os resultados de cada ensaio (figura 5.13).

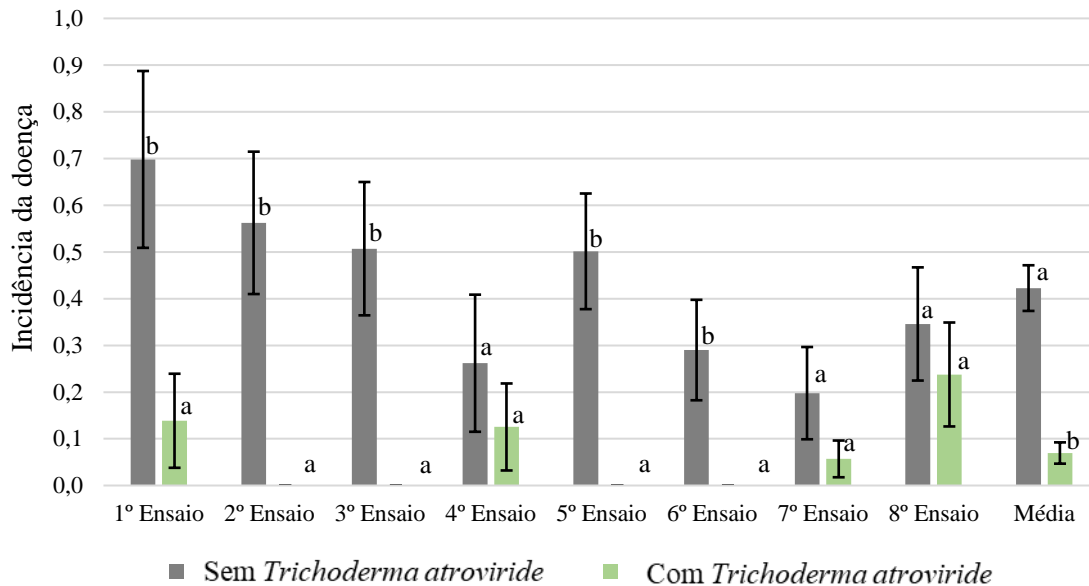


Figura 5.13 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

Os resultados indicam que a incidência da doença foi globalmente inferior na presença de *T. atroviride*. Isto surge de acordo com o que foi observado através da análise da variância multifatorial (quadro 5.6), que indica que a incidência da doença foi diferente em função da presença ou ausência de *T. atroviride*.

No segundo, terceiro, quinto e sexto ensaios, a incidência da doença foi 0,0 e significativamente inferior onde *T. atroviride* esteve presente. Isto significa que nenhuma planta ficou infetada quando existia *T. atroviride*, sugerindo que este antagonista teve a capacidade de controlar completamente o patogénico *R. solani*, evitando que as plantas fossem infetadas.

No primeiro ensaio e na média global, apesar de superior a 0,0, a incidência da doença foi significativamente inferior quando existia *T. atroviride*. Estes resultados comprovam mais uma vez que o antagonista *T. atroviride* foi eficaz em controlar a

dispersão de *R. solani*, tal como outros autores verificaram (Abbas *et al.*, 2022) e como foi observado nos ensaios de antagonismo *in vitro* (figura 5.3).

No entanto, nos ensaios 4, 7 e 8, não se verificaram diferenças significativas na incidência da doença em função da presença ou ausência de *T. atroviride*. Este facto pode indicar que, nestes ensaios, *R. solani* foi pouco eficaz a infetar as plantas; ou, pode indicar que o antagonista *T. atroviride* não foi tão eficaz em controlar o patogénico.

Apesar de tudo, parece seguro afirmar que menos plantas foram infetadas por *R. solani* na presença de *T. atroviride*.

5.2.2.3 Efeito do filtro melhorado com *Trichoderma atroviride* na incidência da doença

Para cada ensaio com *Rhizoctonia solani* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência de *T. atroviride* no filtro e comparada para cada ensaio (figura 5.14).

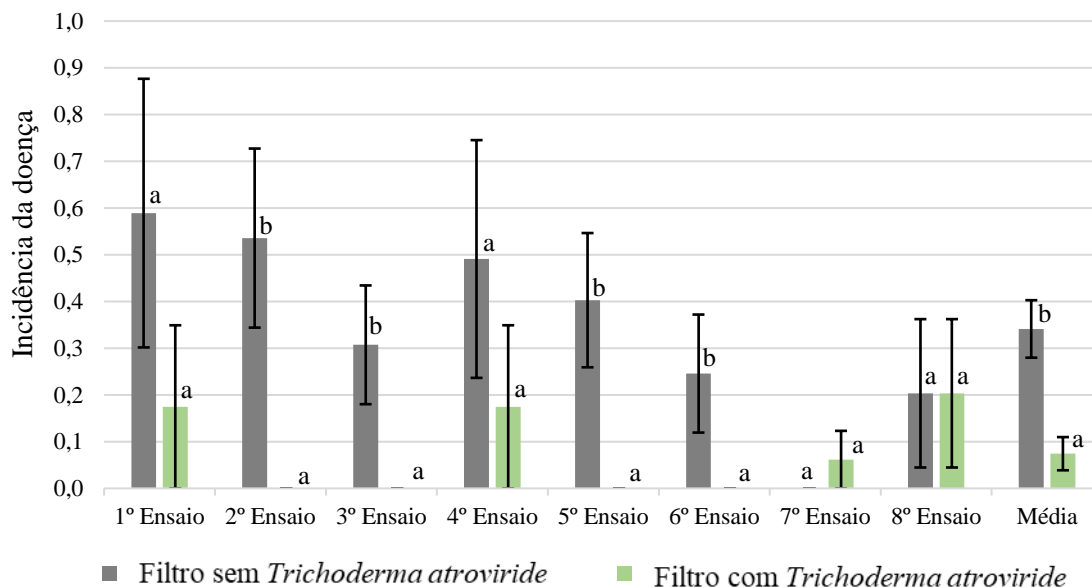


Figura 5.14 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 80. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

Globalmente, a incidência da doença foi inferior onde o filtro de areia continha *T. atroviride*. Isto significa que menos plantas foram infetadas quando o filtro continha o antagonista. Foram observadas diferenças no segundo, terceiro, quinto e sexto ensaios.

No entanto, este padrão não se confirmou estatisticamente no primeiro, quarto, sétimo e oitavo ensaios, onde não se verificaram diferenças devido à heterogeneidade de resultados.

Ainda assim, estes resultados sugerem que o filtro foi mais eficaz quando continha *T. atroviride*, tal como foi verificado para a severidade da doença (figura 5.9).

5.2.2.4 Efeito de *Rhizoctonia solani* na incidência da doença

Nos ensaios com *Rhizoctonia solani* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência de *R. solani* e feita a comparação de médias para cada ensaio (figura 5.15).

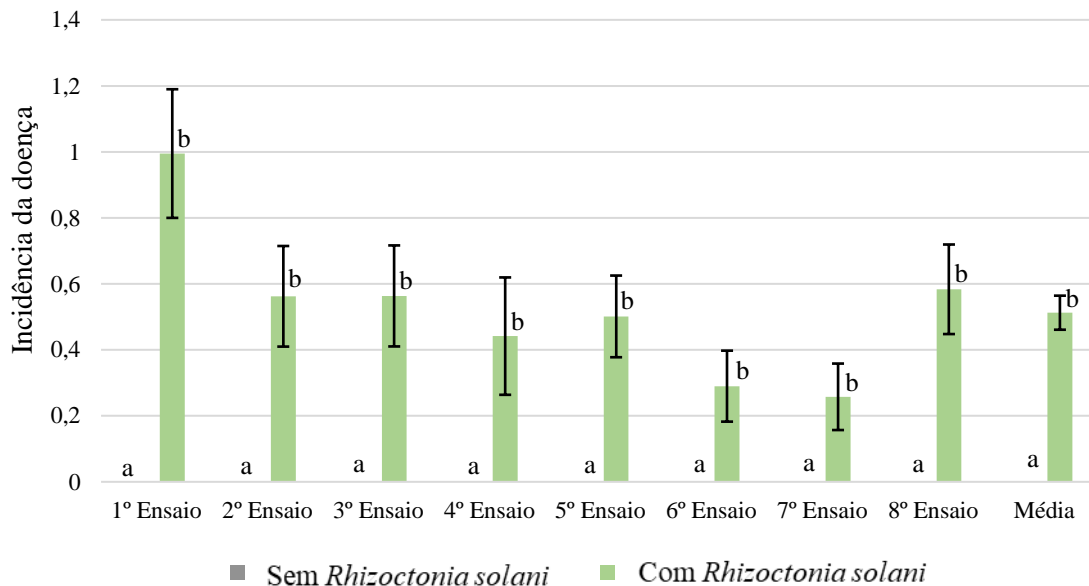


Figura 5.15 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Rhizoctonia solani*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 160. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de t-Student ($p=0,05$).

Os resultados indicam que a incidência da doença foi sempre maior na presença de *R. solani* e sempre 0,0 na sua ausência. Enquanto estes resultados, de acordo com o esperado, (quadro 5.1), indicam também que o patógeno inoculado foi sempre capaz de circular na água de rega e infetar as plantas, tal como foi verificado para a severidade da doença (figura 5.10).

5.2.3 Correlação entre a severidade e a incidência da doença

Para os ensaios com *Rhizoctonia solani* foi calculado o coeficiente de correlação entre a severidade e a incidência da doença (quadro 5.7). A análise da correlação permitiu perceber o quão forte é a relação entre estas duas variáveis.

Quadro 5.7 – Coeficiente de correlação e respetiva significância, entre a severidade e a incidência da doença por ensaio e da média dos ensaios.

	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
Coeficiente de correlação	0,857	0,954	0,949
Significância	<0,001	<0,001	<0,001
	4º ensaio	5º ensaio	6º ensaio
Coeficiente de correlação	0,859	0,992	0,995
Significância	<0,001	<0,001	<0,001
	7º ensaio	8º ensaio	Média
Coeficiente de correlação	0,997	0,935	0,881
Significância	<0,001	<0,001	<0,001

O coeficiente de correlação mede a força da associação entre as duas variáveis e varia entre -1 e 1 .

O quadro 5.7 mostra que o coeficiente de correlação variou entre 0,857 e 0,997 e a significância foi sempre $<0,001$. Estes resultados indicam que ocorreu uma correlação forte e significativa entre a severidade e a incidência da doença. Isto significa que quanto maior foi a incidência, maior foi a severidade, ou seja, quanto mais plantas estavam infetadas, mais severos foram os sintomas da doença.

Outros autores observaram o mesmo padrão de correlação entre estas duas variáveis (Suárez-Estrella *et al.*, 2013). Isto permite explicar a semelhança no padrão que se verificou entre a média da severidade da doença (figura 5.5) e a média da incidência da doença (figura 5.11).

5.2.4 Eficácia e índice de controlo biológico

Além da incidência da doença, foi calculada a redução da doença. Para cada modalidade e ensaio foi calculada a eficácia, consistência (desvio padrão da eficácia) e índice de controlo biológico (BCI) (quadro 5.8).

Quadro 5.8 – Eficácia (E), consistência (C) e índice de controlo biológico (BCI), por ensaio e média dos ensaios, em função da modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Modalidade *	1º Ensaio			2º Ensaio			3º Ensaio		
	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	80 ab	44,72	1,79	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	100 b	0,00	-	28,0 a	22,80	1,22	61,3 b	23,64	2,59
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	90 ab	22,36	4,02	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	60 a	54,77	1,10	33,3 a	47,14	0,71	10 a	22,36	0,45
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-

Modalidade *	4º Ensaio			5º Ensaio			6º Ensaio		
	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	80 ab	44,72	1,79	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	50 a	50,00	1,00	48,0 b	22,80	2,10	68,0 b	30,33	2,24
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	92,0 b	17,89	5,14	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	100 b	0,00	-	16,0 a	8,94	1,79	56,0 a	43,36	1,29
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-	100 b	0,00	-

Modalidade *	7º Ensaio			8º Ensaio			Média		
	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	93 b	14,90	6,26	76 a	43,36	1,75	91,17 c	26,98	3,38
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	100 b	0,00	-	76 a	43,36	1,75	66,42 b	35,77	1,86
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	95,0 b	11,18	8,50	68 ab	41,47	1,64	93,13 c	19,50	4,77
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	53 a	36,13	1,48	36 a	24,72	1,48	45,67 a	41,43	1,10
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	100 b	0,00	-	100 b	0,00	-	100 c	0,00	-

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Rhizoctonia solani*; +/-, presença ou ausência.

É possível verificar que as modalidades 2, 4, 6 e 8 apresentaram, em todos os ensaios, uma eficácia igual a 100, o que significa que as plantas nunca ficaram infetadas nestas modalidades. Isto surge de acordo com os resultados da severidade (quadro 5.3) e da incidência da doença (quadro 5.5).

Considerando a média de todos os ensaios, a eficácia nas modalidades com *R. solani* (P⁺), variou entre 45,67 e 93,13. As modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺) foram as que apresentaram a melhor eficácia, e a modalidade 5 foi a que apresentou melhor consistência. Além disso, a eficácia das modalidades 1 e 5, não foi significativamente diferente das modalidades sem o patogénico (P⁻), onde foi máxima. O índice de controlo biológico (BCI) variou entre 1,10 e 4,77, sendo o valor mais elevado observado na modalidade 5 (F⁻T⁺P⁺).

O valor mais baixo de eficácia foi observado na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), cerca de 46%, significativamente inferior a qualquer outra modalidade. Além disso, o índice de controlo biológico foi também o mais baixo nesta modalidade.

O filtro sem *T. atroviride* (3. F⁺T⁻P⁺) foi cerca de 21% mais eficaz do que ausência de qualquer meio de controlo (7. F⁻T⁻P⁺). Adicionalmente, as modalidades de filtro melhorado com o antagonista (1. F⁺T⁺P⁺) e *T. atroviride* apenas na solução nutritiva (5. F⁻T⁺P⁺) foram cerca de 46% e 47% mais eficazes do que a ausência de qualquer meio de controlo (7. F⁻T⁻P⁺), respetivamente.

Ao comparar a eficácia do filtro sem *T. atroviride* (3. F⁺T⁻P⁺) com o filtro com *T. atroviride* (1. F⁺T⁺P⁺), observa-se que o filtro com o antagonista foi cerca de 25% mais eficaz. Tal como mostraram os resultados relativos à severidade (figura 5.5, figura 5.9) e à incidência da doença (figura 5.11, figura 5.14), o filtro com *T. atroviride* foi significativamente mais eficaz no controlo de *R. solani*.

5.3 Ensaios com o agente patogénico *Fusarium oxysporum*

5.3.1 Severidade da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a severidade da doença, por modalidade (quadro 5.9). Os quadros resumo da análise da variância estão apresentados em anexo (anexo V).

Quadro 5.9 – Média da severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores as médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan (p=0,05).

Modalidade*	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	Média
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	1,9 b	1,5 a	1,4 b	1,0 a	1,4 ab	1,4 b
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	1,8 b	2,3 b	1,8 c	1,2 a	1,5 b	1,7 c
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	1,7 ab	1,4 a	1,6 bc	1,4 a	2,1 c	1,6 bc
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	2,4 b	2,7 b	2,7 d	2,9 b	2,5 c	2,6 d
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

A severidade da doença foi sempre 1,00 nas modalidades 2, 4, 6 e 8, em todos os ensaios. Isto significa que as plantas destas modalidades nunca apresentaram sintomas de doença, tal como esperado, visto que nestas modalidades não foi inoculado o patogénico *F. oxysporum*, e por isso, as plantas não foram infetadas. Isto mostra também que não existiram contaminações entre modalidades.

As modalidades que continham *F. oxysporum* (1, 3, 5 e 7) apresentaram, quase sempre severidade superior às modalidades sem o patogénico. Além disso, em alguns dos ensaios a severidade foi maior quando não existia nenhum meio de controlo (isto é, quando não existia nem filtro, nem *T. atroviride*).

Por vezes, na presença de *T. atroviride*, não se verificaram diferenças em relação às modalidades sem o patogénico.

A média da severidade da doença de todos dos ensaios, por modalidade está graficamente representada na figura 5.16.

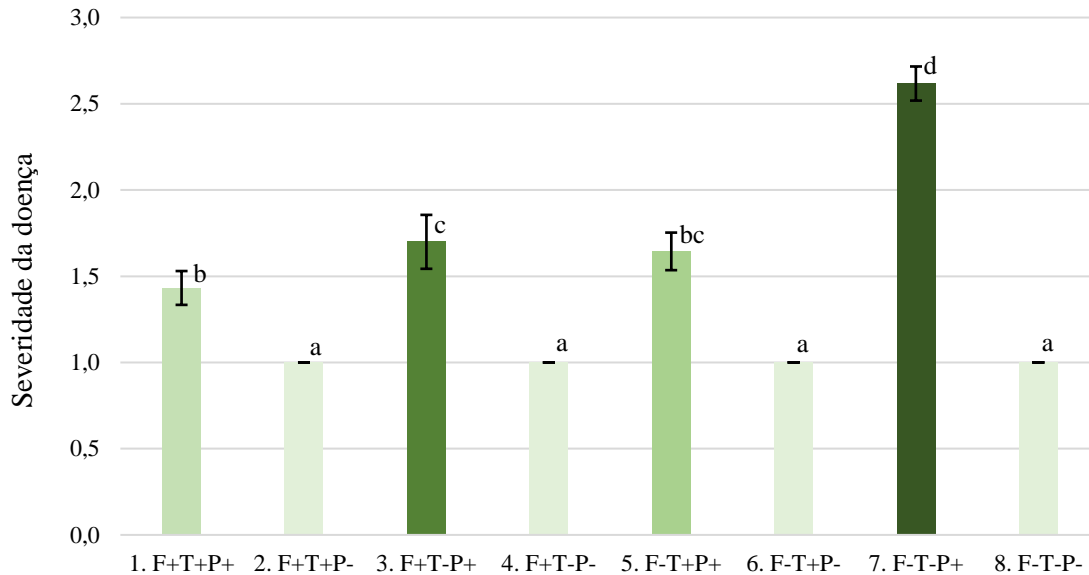


Figura 5.16 – Média da severidade da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=25. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

A médias dos ensaios sugere que existem quatro graus de severidade da doença. No primeiro grau, com severidade 1,00, estão as modalidades sem *F. oxysporum* (2, 4, 6 e 8), onde não surgiram sintomas de doença, tal como discutido anteriormente.

Num segundo grau está a modalidade 1 (F⁺T⁺P⁺), com severidade média de 1,4. Apresenta, severidade da doença superior às modalidades sem *F. oxysporum* (2, 4, 6 e 8), mas inferior a todas as outras modalidades. A modalidade 5 (F⁻T⁺P⁺) é comum ao segundo e ao terceiro graus.

No terceiro grau está a modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺), com severidade acima da do segundo grau, sugerindo que a severidade da doença é superior quando não há *Trichoderma atroviride* no filtro. No entanto, é inferior ao nível quatro grau, onde se situa a modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), com severidade média de 2,6, a mais alta de todas. Este foi o pior cenário possível e ocorre na ausência de filtro e de *T. atroviride*.

De qualquer forma, a presença de formas de controlo, seja *Trichoderma atroviride*, o filtro ou ambos, não se revelou suficiente no controlo total da severidade de *Fusarium oxysporum*. No entanto, de entre as modalidades com o patogénico, foi no filtro com *Trichoderma atroviride* (1. F⁺T⁺P⁺) que a severidade da doença foi inferior.

Foi ainda calculada a média da percentagem de plantas de cada nível de severidade da doença, por modalidade (figura 5.17).

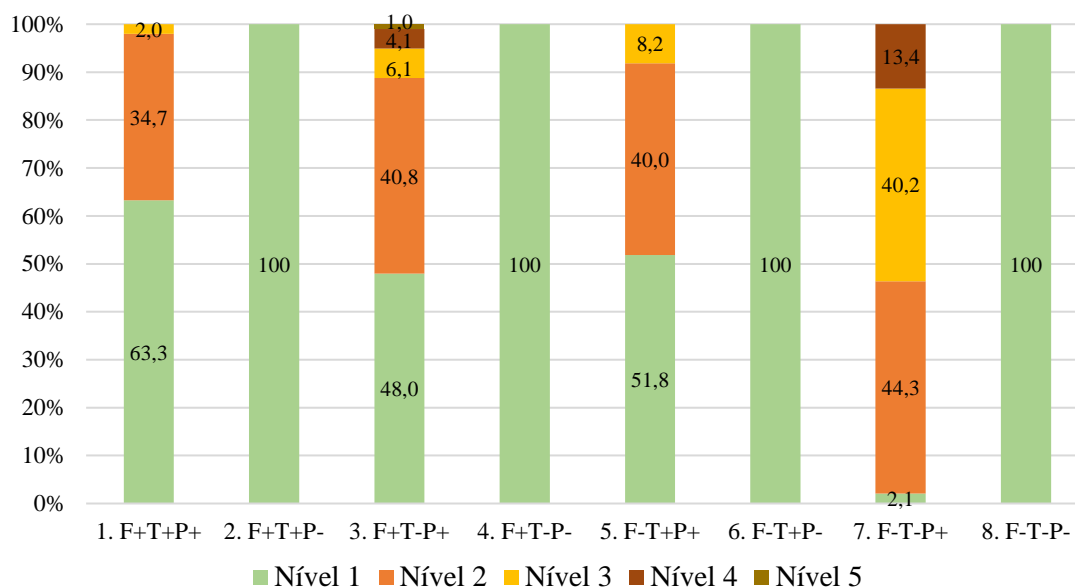


Figura 5.17 – Percentagem média de plantas de cada nível de severidade da doença (Nível), por modalidade. F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

De acordo com estes resultados, é possível observar que o nível de severidade foi 1 em 100% das plantas nas modalidades 2, 4, 6 e 8 (P⁻), o que indica que estas plantas nunca apresentaram sintomas da doença. Isto faz sentido, visto que nestas modalidades não foi inoculado o patogénico *Fusarium oxysporum*, e indica simultaneamente que não ocorreram contaminações entre as modalidades.

Na modalidade 1 (F⁺T⁺P⁺), mais de 63% das plantas e mais de 51% na modalidade 5 (F⁻T⁺P⁺), apresentaram nível 1 de severidade de doença e nunca apresentaram os níveis 4 ou 5. De entre as modalidades com inoculação do patogénico (P⁺), estas foram as que apresentaram as maiores percentagens no nível 1. Na modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺), cerca de 52% das plantas apresentaram um nível de severidade superior a 1, tendo sido 4,1 % de nível 4 e 1 % de nível 5.

Na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), cerca de 98% das plantas apresentaram um nível de severidade superior a 1, tendo cerca 13% das plantas apresentado nível 4, e morreram devido à doença. A modalidade 7 foi a que apresentou maior percentagem de plantas nos níveis 4 e 5 e, por isso, maior percentagem de mortalidade. Além disso, somente 2% das plantas permaneceram saudáveis, sem sintomas, um valor muito mais baixo do que em qualquer outra modalidade. A modalidade com o segundo valor mais baixo de nível 1 foi a modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺), com 48%.

Comparando a modalidade 3 (F⁺T⁻P⁺) com a 7 (F⁻T⁻P⁺), as percentagens de severidade da doença superior a nível 1, foram 52% e 98% respetivamente. Além disso, a taxa de mortalidade foi de 5,1% na modalidade 3, menor que na modalidade 7, apesar de ter sido a segunda modalidade com maior percentagem de plantas que morreram. Isto indica que a presença do filtro teve influência na redução da percentagem de plantas com severidade da doença superior a 1, ainda que esta percentagem seja maior do que nas modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺).

Para averiguar se existiram diferenças na severidade da doença em função de vários fatores, foi feita a análise da variância multifatorial (quadro 5.10). Os resultados foram calculados considerando os dados de todos os ensaios, para os 3 fatores: filtro, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium oxysporum*. Cada um destes fatores tinha dois níveis (0 – ausência e 1 – presença).

Quadro 5.10 – Quadro resumo da análise da variância.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Subgrupos	56,686	7	8,098	46,544	< 0,001
Filtro	3,990	1	3,990	22,935	< 0,001
<i>T. atroviride</i>	4,810	1	4,810	27,647	< 0,001
<i>F. oxysporum</i>	35,969	1	35,969	206,740	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i>	1,558	1	1,558	8,953	0,003
Filtro × <i>F. oxysporum</i>	3,990	1	3,990	22,935	< 0,001
<i>T. atroviride</i> × <i>F. oxysporum</i>	4,810	1	4,810	27,647	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i> × <i>F. oxysporum</i>	1,558	1	1,558	8,953	0,003
Devido ao erro	33,405	192	0,174		
Total	90,090	199			

De acordo com estes resultados, é possível verificar que os três fatores isolados, filtro, *T. atroviride* e *F. oxysporum* tiveram efeitos significativos na severidade da doença. Isto significa que a severidade da doença foi diferente em função do nível desses fatores, ou seja, na sua ausência e na sua presença.

Além disso, há evidência suficiente para concluir a existência de uma interação significativa entre os três fatores, em todas as conjunções possíveis. Isto significa que a severidade da doença, na presença ou ausência de um fator, depende da presença ou ausência do outro fator.

5.3.1.1 Efeito do sistema de filtração na severidade da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a severidade da doença em função da presença e da ausência do elemento de filtração (areia) (figura 5.18).

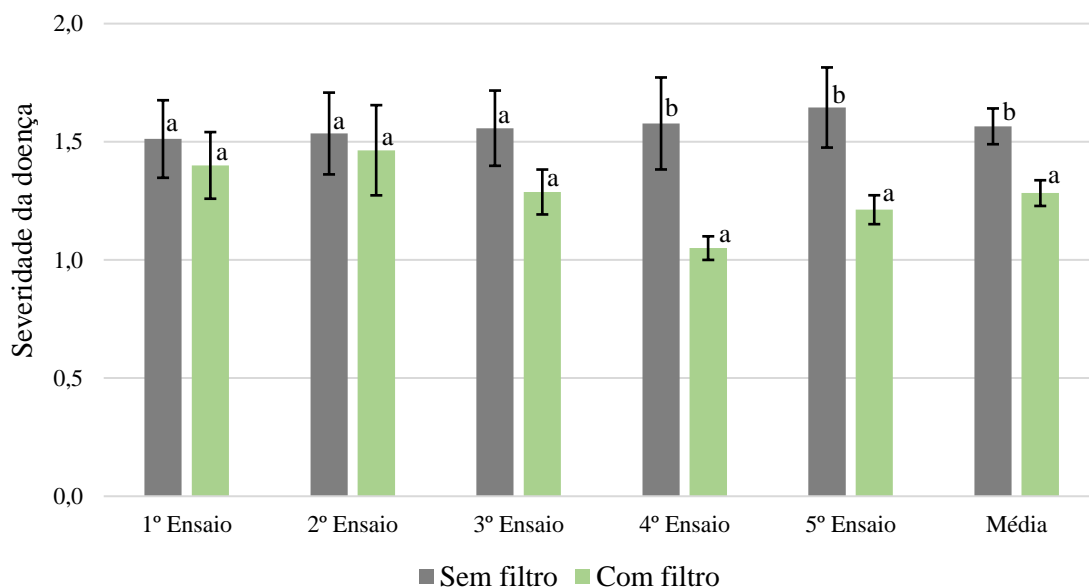


Figura 5.18 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante (areia) no tubo do filtro. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 100. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

Ao observar a média de todos os ensaios verifica-se que a severidade da doença foi significativamente inferior na presença do filtro. Contudo, no primeiro, segundo e terceiro ensaios, não se verificaram diferenças significativas na severidade da doença devido ao filtro, ou seja, a presença do filtro de areia, por si só, não teve influência no controle da severidade de *F. oxysporum*. Alguns autores verificaram que o sistema de filtração lenta foi ineficaz no controle de *F. oxysporum* (Lee & Oki, 2013).

No entanto, no quarto e quinto ensaios, a severidade da doença foi significativamente inferior quando o sistema de filtração estava presente, indicando que a presença da areia teve um efeito positivo na redução da severidade de *F. oxysporum*. (quadro 5.10). Vários autores verificaram que o sistema de filtração lenta em areia pode controlar *F. oxysporum*, pelo menos parcialmente (Van Os *et al.*, 1998).

5.3.1.2 Efeito de *Trichoderma atroviride* na severidade da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *Trichoderma atroviride* (figura 5.19).

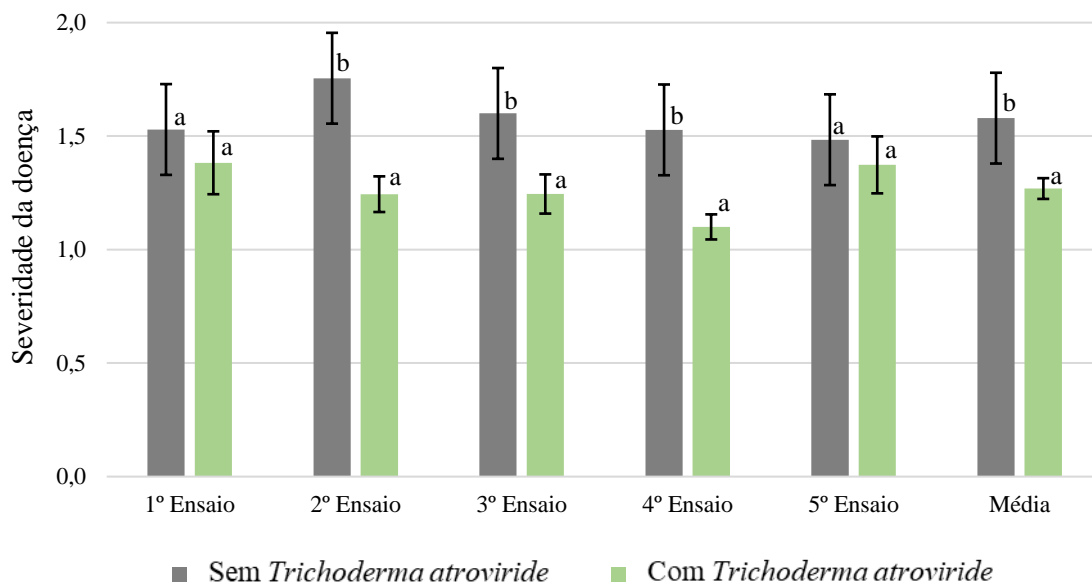


Figura 5.19 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 100. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

De acordo com os resultados, no primeiro e quinto ensaios, não se verificaram diferenças significativas na severidade da doença em função da presença de *T. atroviride*. Nestes ensaios, o antagonista parece não ter tido capacidade em controlar a severidade de *F. oxysporum*.

No entanto, no segundo, terceiro e quarto ensaios, a severidade da doença foi significativamente inferior quando o antagonista *T. atroviride* estava presente. A média de todos os ensaios segue o mesmo padrão, indicando que a severidade da doença é significativamente inferior na presença de *T. atroviride*. Isto surge de acordo com os resultados da análise da variância (quadro 5.10), segundo os quais o fator *T. atroviride*

apresentou um efeito significativo na severidade da doença. Além disso, estes resultados surgem de acordo com outros autores, que verificaram que *T. atroviride* é capaz de controlar, através de vários mecanismos, *F. oxysporum* (Nofal *et al.*, 2021; Rao *et al.*, 2022).

5.3.1.3 Efeito do filtro melhorado com *Trichoderma atroviride* na severidade da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro (figura 5.20).

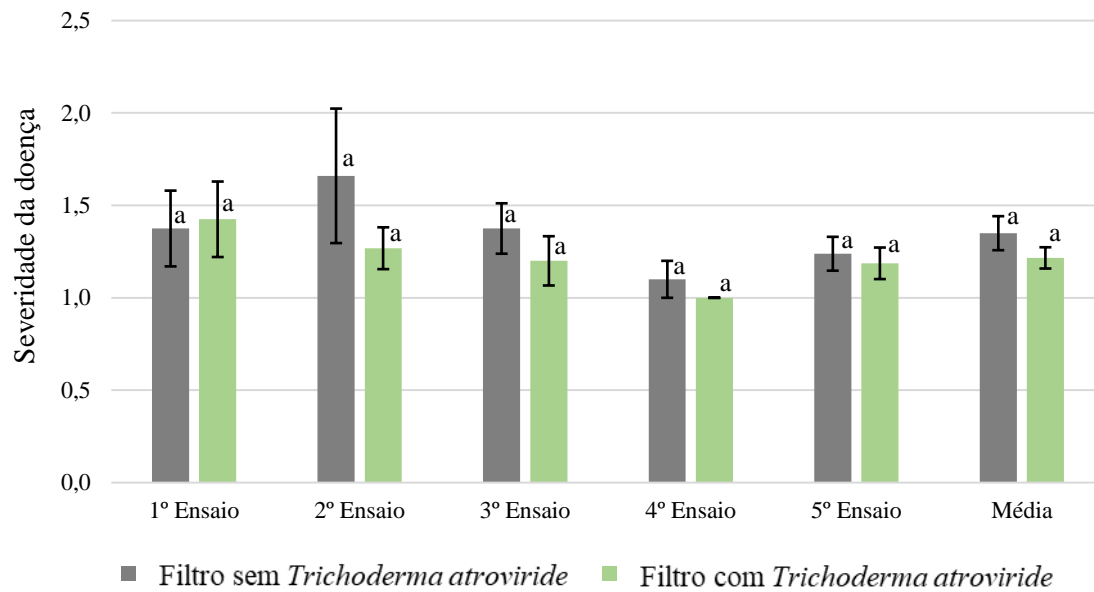


Figura 5.20 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 10; n(média) = 50. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

A severidade da doença foi idêntica nos filtros com ou sem *Trichoderma atroviride*. Isto sugere que a presença do antagonista no filtro não melhorou a capacidade do filtro em controlar a severidade de *Fusarium oxysporum*.

5.3.1.4 Efeito de *Fusarium oxysporum* na severidade da doença

Nos ensaios com *Fusarium oxysporum* foi calculada a severidade da doença, em função da presença e da ausência de *F. oxysporum* (figura 5.21).

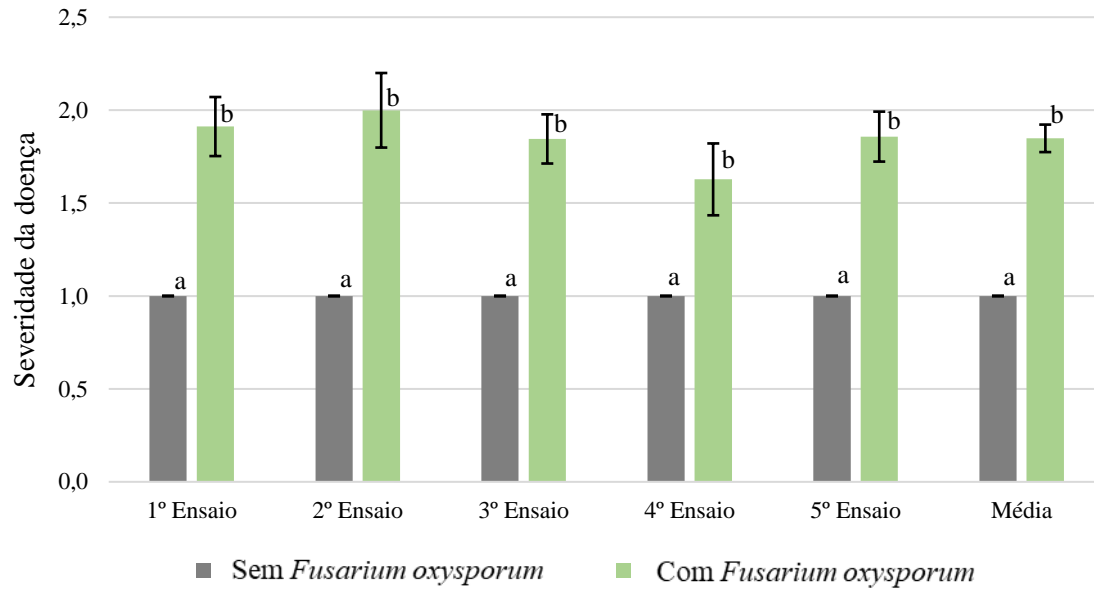


Figura 5.21 – Média da severidade da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Fusarium oxysporum*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 100. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

A severidade da doença foi, em todos os ensaios, significativamente maior na presença de *F. oxysporum*, e igual a 1,00 na sua ausência. Isto surge de acordo com os resultados da análise da variância (quadro 5.10), que sugerem que o fator *F. oxysporum* apresenta um efeito significativo na severidade da doença. Estes resultados surgem de acordo com o esperado e mostram, por um lado, que o patogénico foi eficaz em infetar as plantas e por outro, que não existiram contaminações entre modalidades.

Além disso, estes resultados comprovam que o patogénico *F. oxysporum* é capaz de se disseminar através da água de rega, tal como foi reportado por outros autores (Bergstrand, 2009; Stewart-Wade, 2011). Por isso, quando presente na drenagem é necessário desinfetá-la para que se possa voltar a utilizar para rega.

5.3.2 Incidência da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a incidência da doença, em função da modalidade (quadro 5.11). Os quadros resumo da análise da variância estão apresentados em anexo (anexo V).

Quadro 5.11 – Incidência da doença causada por *Fusarium oxysporum* em cada ensaio, por modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Modalidade*	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	Média
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	1,05 b	0,88 b	0,63 b	0,0 a	0,60 b	0,63 b
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	0,79 b	0,94 b	1,15 cd	0,31 ab	0,76 b	0,79 b
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	0,77 b	0,58 b	0,92 bc	0,68 b	1,26 c	0,84 b
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	1,29 b	1,57 c	1,57 d	1,57 c	1,57 c	1,51 c
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

* F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

Observando os resultados de todos os ensaios de uma forma integrada (quadro 5.11), destacam-se as modalidades com *Fusarium oxysporum* (P⁺), que apresentaram uma incidência superior às modalidades sem o patógeno (P⁻). Isto observou-se sempre, com exceção da modalidade 1 (F⁺T⁺P⁺), do quarto ensaio, que apresentou a mesma incidência que as modalidades sem *Fusarium oxysporum* (P⁻). De entre as modalidades com o patógeno (P⁺), a modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺) apresentou incidência superior, ou pelo menos igual às restantes, mas nunca inferior.

As modalidades sem *F. oxysporum* apresentaram sempre uma incidência igual a 0,0, indicando que as plantas nunca ficaram infetadas, tal como já tinha sido comprovado através dos resultados da severidade da doença (quadro 5.9).

Por vezes, a incidência foi significativamente superior quando não existia nenhum meio de controlo. Por outro lado, na presença do patógeno, raramente se verificaram diferenças na incidência entre as modalidades com T. atroviride ou com ambos. Isto sugere que as três condições foram igualmente eficazes, apesar de não completamente, no controlo do patógeno.

A média da incidência da doença de todos dos ensaios, por modalidade está graficamente representada na figura 5.22.

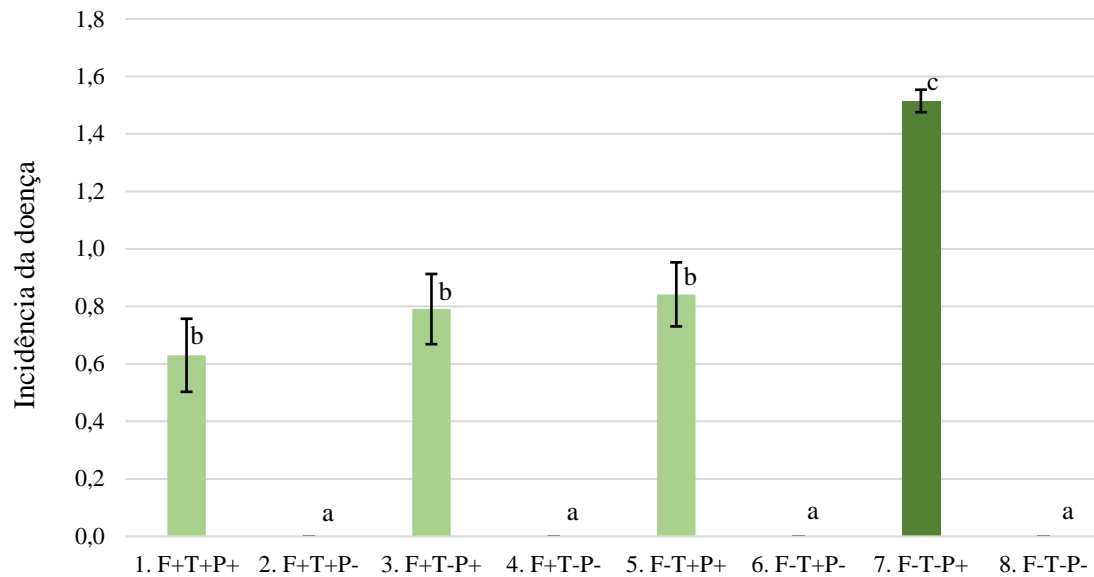


Figura 5.22 – Média da incidência da doença, de todos os ensaios, por modalidade. Média \pm erro padrão; n=25. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$). F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

De acordo com a média de todos os ensaios (figura 5.22), na presença de *F. oxysporum* (P⁺), a incidência da doença foi a mesma nas modalidades com filtro (3. F⁺T⁻P⁺), com *T. atroviride* (5. F⁻T⁺P⁺) e com ambos (1. F⁺T⁺P⁺).

Na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺) a incidência da doença foi superior à das restantes modalidades, indicando que, tanto o filtro como o antagonista *T. atroviride* foram igualmente capazes em reduzir, pelo menos parcialmente, a dispersão de *F. oxysporum*. Além disso, não se verificou melhoria no controlo do patogénico quando estes dois fatores estavam simultaneamente presentes, o que sugere que a sua eficácia não foi aditiva.

Resumidamente, nas modalidades com patogénico e com algum meio de controlo (1. F⁺T⁺P⁺; 3. F⁺T⁻P⁺ e 5. F⁻T⁺P⁺), a incidência, apesar de ter sido maior do que nas modalidades sem patogénico (P⁻), foi inferior à modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺), onde não existiu nenhum meio de controlo.

Para averiguar se existiram diferenças na incidência da doença em função de vários fatores, foi feita a análise da variância multifatorial (quadro 5.12). Os resultados foram calculados considerando os dados de todos os ensaios, para os 3 fatores: filtro, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium oxysporum*. Cada um destes fatores tinha dois níveis (0 – ausência e 1 – presença).

Quadro 5.12 – Quadro resumo da análise da variância

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Subgrupos	56,045	7	8,006	56,902	< 0,001
Filtro	2,737	1	2,737	19,454	< 0,001
<i>T. atroviride</i>	2,172	1	2,172	15,436	< 0,001
<i>F. oxysporum</i>	44,586	1	44,586	316,882	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i>	0,820	1	0,820	5,827	0,017
Filtro × <i>F. oxysporum</i>	2,737	1	2,737	19,454	< 0,001
<i>T. atroviride</i> × <i>F. oxysporum</i>	2,172	1	2,172	15,436	< 0,001
Filtro × <i>T. atroviride</i> × <i>F. oxysporum</i>	0,820	1	0,820	5,827	0,017
Devido ao erro	27,015	192	0,141		
Total	83,060	199			

De acordo com os resultados, os três fatores isolados, filtro, *T. atroviride* e *F. oxysporum* tiveram efeitos significativos na incidência da doença. Isto significa que a incidência da doença foi diferente nos diferentes níveis desses fatores, ou seja, na sua ausência e na sua presença.

Além disso, existiu uma interação significativa entre os três fatores, em todas as conjugações possíveis. Isto significa que a incidência na presença ou ausência de um fator depende da presença ou ausência do outro fator.

5.3.2.1 Efeito do sistema de filtração na incidência da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência do filtro e feita a comparação de médias para cada ensaio (figura 5.23).

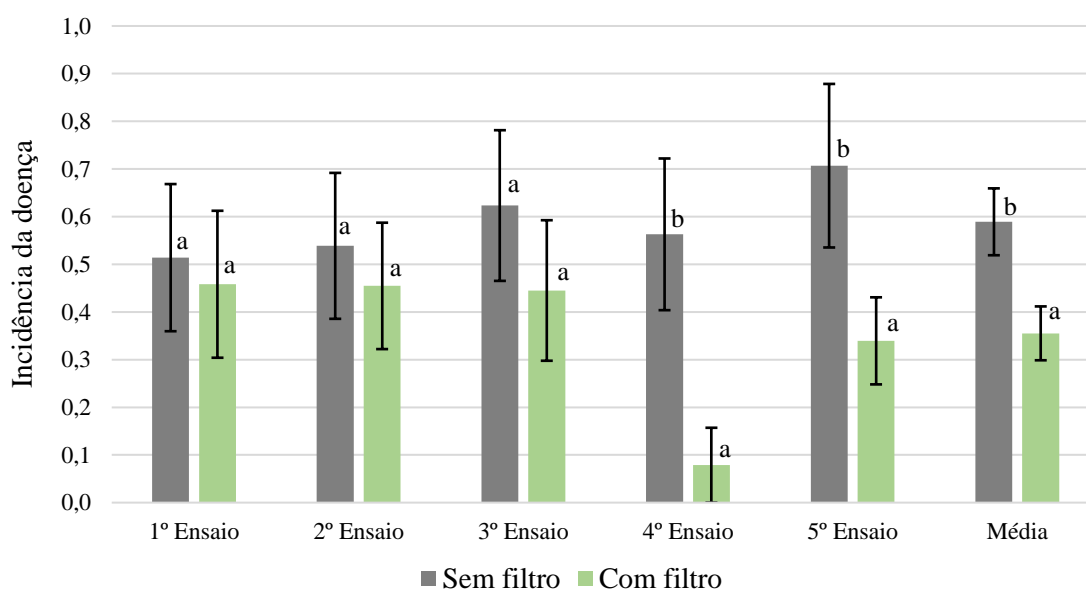


Figura 5.23 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência do elemento filtrante. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 20$; $n(\text{média}) = 100$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

No primeiro, segundo e terceiro ensaios não se verificaram diferenças na incidência da doença em função da presença do filtro, o que mostra que, nestes ensaios, o filtro foi ineficaz no controle da incidência da doença. Um padrão semelhante foi observado para a severidade da doença.

No entanto, de acordo com os resultados globais, a incidência da doença foi significativamente inferior na presença do filtro. Este padrão verificou-se no quarto e quinto ensaios. Além disso, os resultados da análise da variância (quadro 5.12) corroboram o que se verificou na média de todos os ensaios, ao sugerir que o filtro reduziu a incidência da doença.

5.3.2.2 Efeito de *Trichoderma atroviride* na incidência da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* foi calculada a incidência da doença, em função da presença e da ausência de *Trichoderma atroviride* (figura 5.24).

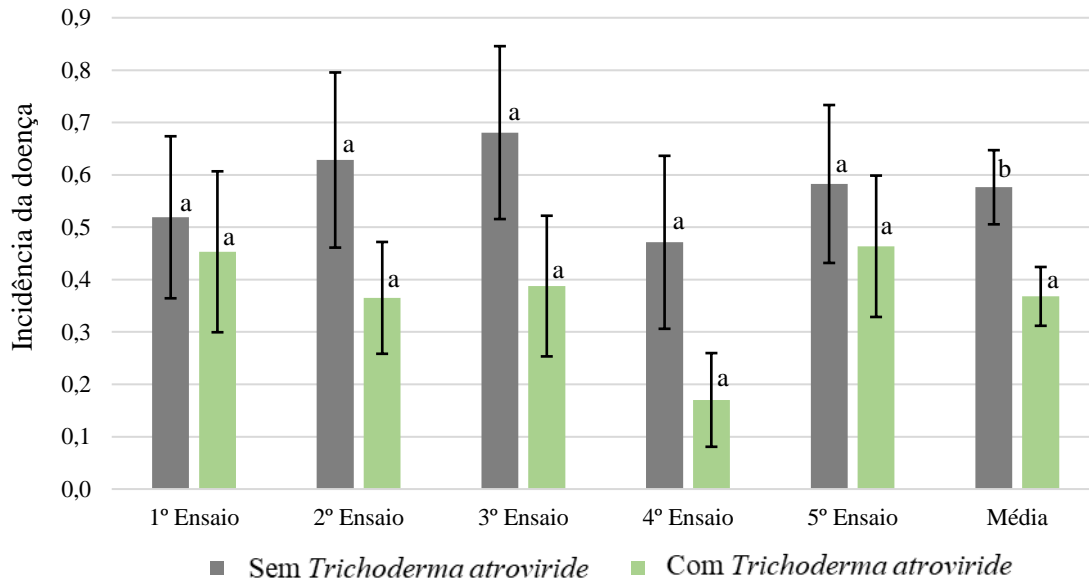


Figura 5.24 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride*. Média \pm erro padrão; n(ensaio) = 20; n(média) = 100. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

Ao analisar os ensaios individualmente, não se verificaram diferenças na incidência da doença na presença ou na ausência de *Trichoderma atroviride*. Esta resposta diferiu do observado para a severidade da doença, pelo menos no segundo, terceiro e quarto ensaios, onde a severidade foi inferior na presença de *T. atroviride*.

Contraditoriamente, globalmente, a incidência da doença foi significativamente inferior na presença de *T. atroviride*. Adicionalmente, os resultados da análise da variância mostram que o fator *T. atroviride* teve um efeito significativo na incidência da doença.

Os resultados globais sugerem que a diferença entre de incidência da doença na presença e na ausência do antagonista não foi claramente diferente, apesar da tendência em sua presença ter algum efeito.

5.3.2.1 Efeito do filtro melhorado com *Trichoderma atroviride* na incidência da doença

Para os ensaios com *Fusarium oxysporum* foi calculada a incidência da doença, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro (figura 5.25).

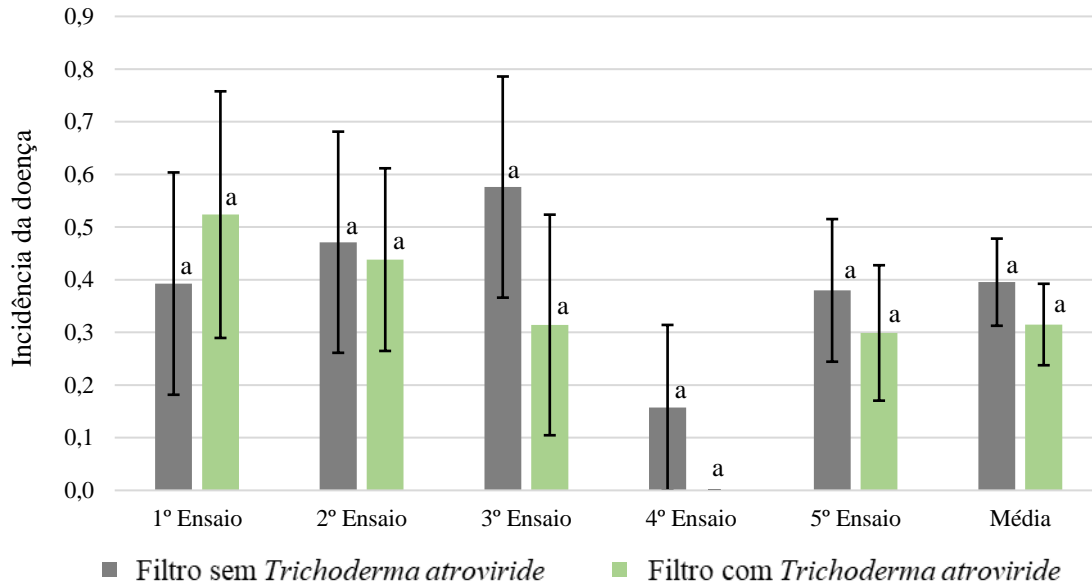


Figura 5.25 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Trichoderma atroviride* no filtro. Média \pm erro padrão; $n(\text{ensaio}) = 10$; $n(\text{média}) = 50$. Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

É possível verificar que não existiram diferenças na incidência da doença, em todos os ensaios, entre filtro com *T. atroviride* e filtro sem *T. atroviride*. Isto sugere que a presença do antagonista no filtro não melhorou a capacidade do filtro em controlar a presença de *Fusarium oxysporum*, contrariamente ao que foi observado no controlo de *R. solani*.

Tal como para as médias por modalidade (figura 5.22), parece não ter havido um aumento da eficácia do filtro, no controlo da incidência da doença, pela adição de *T. atroviride* no material filtrante. Outros autores também não verificaram diferenças entre um filtro de areia esterilizado e outro biologicamente ativo, no controlo de *F. oxysporum* (Brand & Wohanka, 2001).

Apesar de parecerem existir algumas diferenças na incidência com e sem filtro e com e sem *T. atroviride*, a sua eficácia parece não ter sido adicional, de acordo com estes resultados.

5.3.2.2 Efeito de *Fusarium oxysporum* na incidência da doença

Para os ensaios com *Fusarium oxysporum* foi calculada a incidência da doença, em função da presença ou ausência de *F. oxysporum* (figura 5.26).

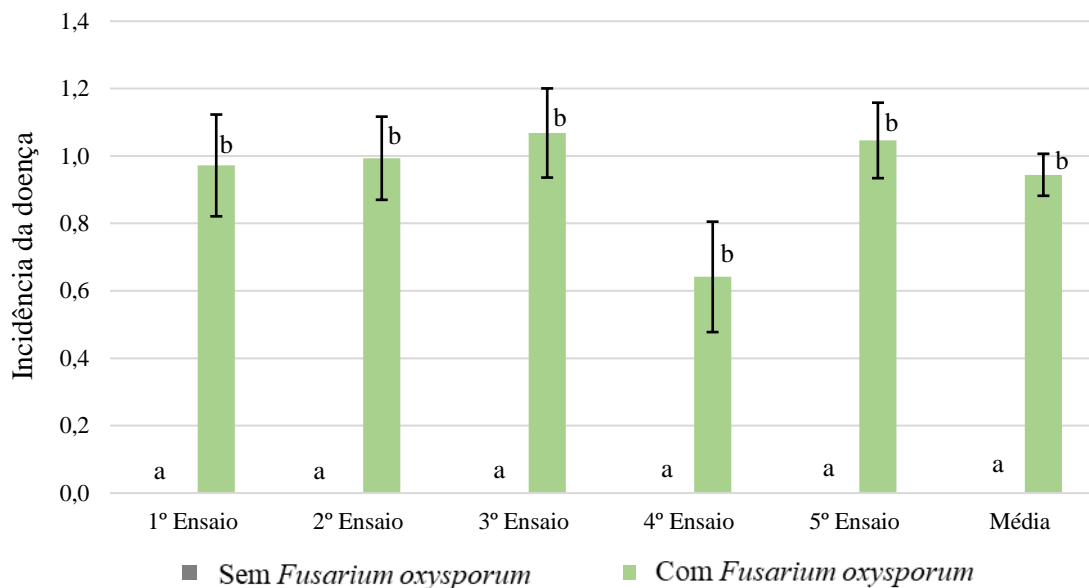


Figura 5.26 – Média da incidência da doença por ensaio, em função da presença ou ausência de *Fusarium oxysporum*. Média \pm erro padrão; n=20; médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student ($p=0,05$).

A incidência da doença foi, em todos os ensaios, significativamente maior na presença de *Fusarium oxysporum*, e igual a 0,0 na sua ausência, de acordo com os resultados da análise da variância (quadro 5.12), que sugerem que o fator *Fusarium oxysporum* apresenta um efeito significativo na severidade da doença.

Estes resultados comprovam novamente que o patogénico *F. oxysporum* tem a capacidade de circular através da água de rega e infectar as plantas, tal como verificado por outros autores (Bergstrand, 2009; Stewart-Wade, 2011), o que reforça a necessidade de desinfetar a drenagem.

5.3.3 Correlação entre a severidade e a incidência da doença

Para cada ensaio com *Fusarium oxysporum* e para a média dos ensaios, foi calculado o coeficiente de correlação entre a severidade e a incidência da doença (quadro 5.13). A análise da correlação permitiu perceber o quão forte é a relação entre estas duas variáveis.

Quadro 5.13 – Coeficiente de correlação e respetiva significância, entre a severidade e a incidência da doença por ensaio e da média dos ensaios.

	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
Coeficiente de correlação	0,975	0,897	0,948
Significância	<0,001	<0,001	<0,001
	4º ensaio	5º ensaio	Média
Coeficiente de correlação	0,916	0,938	0,924
Significância	<0,001	<0,001	<0,001

O quadro 5.13 mostra que o coeficiente de correlação variou entre 0,897 e 0,975 e a significância foi sempre <0,001. Estes resultados mostram que houve sempre uma correlação forte e significativa entre a severidade e a incidência da doença. Isto significa que quanto maior foi a incidência, maior foi a severidade, ou seja, quanto mais plantas estavam infetadas, mais severos foram os sintomas da doença. Outros autores observaram o mesmo padrão de correlação entre estas duas variáveis (Suárez-Estrella *et al.*, 2013).

5.3.4 Eficácia e índice de controlo biológico

Além da incidência da doença foi calculada a redução da doença. Para cada modalidade e ensaio foi calculada a eficácia, consistência (desvio padrão da eficácia) e índice de controlo biológico (BCI) (quadro 5.14).

Quadro 5.14 – Eficácia (E), consistência (C) e índice de controlo biológico (BCI), por ensaio e média dos ensaios, em função da modalidade. Em cada coluna, os valores das médias com letras iguais não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($p=0,05$).

Modalidade *	1º Ensaio			2º Ensaio			3º Ensaio		
	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	35,0 a	48,73	0,72	46,3 b	32,92	1,41	60,0 c	54,77	1,10
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	100 b	0,0	-	100 c	0,0	-	100 d	0,0	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	50,0 a	50,00	1,00	40,0 b	42,43	0,94	25,0 ab	25,98	0,96
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	100 b	0,0	-	100 c	0,0	-	100 d	0,0	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	52,0 a	50,20	1,04	64,0 b	30,70	2,08	42,0 bc	29,71	1,41
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	100 b	0,0	-	100 c	0,0	-	100 d	0,0	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	16,7 a	23,57	0,7	0,0 a	0,0	-	0,0 a	0,0	-
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	100 b	0,0	-	100 c	0,0	-	100 d	0,0	-

Modalidade *	4º Ensaio			5º Ensaio			Média		
	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI	E (%)	C	BCI
1. F ⁺ T ⁺ P ⁺	100 c	0,0	-	62,7 b	27,73	2,26	60,8 b	41,33	1,47
2. F ⁺ T ⁺ P ⁻	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-
3. F ⁺ T ⁻ P ⁺	80,0 bc	44,72	1,79	52,3 b	21,65	2,42	49,5 b	39,75	1,24
4. F ⁺ T ⁻ P ⁻	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-
5. F ⁻ T ⁺ P ⁺	60,0 b	37,42	1,60	20,0 a	34,64	0,58	47,6 b	37,61	1,27
6. F ⁻ T ⁺ P ⁻	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-
7. F ⁻ T ⁻ P ⁺	0,0 a	0,0	-	0,0 a	0,0	-	3,3 a	11,79	0,28
8. F ⁻ T ⁻ P ⁻	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-	100 c	0,0	-

*F, filtro; T, *Trichoderma atroviride*; P, *Fusarium oxysporum*; +/-, presença ou ausência.

De acordo com estes resultados, a eficácia foi sempre máxima (100%) nas modalidades sem *F. oxysporum* (P⁻), e significativamente maior do que nas restantes modalidades. Isto significa que, nestas modalidades, as plantas nunca foram infetadas pelo patogénico.

Considerando a média de todos os ensaios, a eficácia, para plantas infetadas com *F. oxysporum* (P⁺), variou entre 3,3 e 60,8. As modalidades 1 (F⁺T⁺P⁺), 3 (F⁺T⁻P⁺) e 5 (F⁻T⁺P⁺) foram as que apresentaram melhor eficácia entre as modalidades com o patogénico (P⁺), apesar de inferior às modalidades sem patogénico. A modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺) apresentou o valor de eficácia mais baixo do que qualquer outra modalidade.

O índice de controlo biológico (BCI) variou entre 0,28 e 1,47, sendo que o valor mais baixo foi observado na modalidade 7 (F⁻T⁻P⁺) e o mais alto, na modalidade 1 (F⁺T⁺P⁺).

As modalidades com filtro, com *T. atroviride* ou com ambos (1, 3 e 5) foram, em média, cerca de 50% mais eficazes do que a modalidade sem filtro e sem o antagonista (7. F⁻T⁻P⁺).

6 CONCLUSÕES

Eficácia da filtração lenta melhorada no controlo de *Rhizoctonia solani*

Confirmou-se a capacidade de disseminação deste patogénico na água de rega e de infeção das plantas, conforme reportado na bibliografia. Por isso, o seu controlo é importante para que a drenagem possa ser reutilizada com segurança.

A introdução do antagonista *Trichoderma atroviride* aumentou a eficácia de controlo de *R. solani*, pois tanto a sua severidade como a incidência foram significativamente inferiores quando o antagonista foi introduzido, independentemente da existência do material filtrante (areia). O antagonista demonstrou ter tido a capacidade de controlar completamente a dispersão e a severidade do patogénico *R. solani*. Na ausência do antagonista e/ou do material filtrante, a severidade e a incidência de *R. solani* foram significativamente maiores no pepino.

Com inoculação de *R. solani*, o filtro sem *T. atroviride* foi cerca de 21% mais eficaz do que na ausência de qualquer meio de controlo o que sugere que, mesmo sem o antagonista, o filtro teve a capacidade de controlar *R. solani*, embora parcialmente. Com introdução de *T. atroviride*, na areia ou apenas na solução recirculada, a eficácia de controlo aumentou para 46% e 47%, respetivamente. A filtração em areia com *T. atroviride* foi cerca de 25% mais eficaz do que a filtração em areia sem o antagonista.

Eficácia da filtração lenta melhorada no controlo de *Fusarium oxysporum*

Confirmou-se que este patogénico teve a capacidade de se disseminar na água de rega e de infetar as plantas, conforme referido na bibliografia, que refere com frequência, que a filtração lenta em areia é insuficiente no seu controlo.

Na presença do patogénico, e na ausência de filtro e de *T. atroviride*, a severidade e a incidência da doença foram maiores do que em qualquer outra circunstância. Na presença de *F. oxysporum*, a severidade da doença foi inferior quando o antagonista estava presente. Quando apenas existia material filtrante, *F. oxysporum* induziu uma severidade intermédia, indicando que o filtro, mesmo sem *T. atroviride* exerceu algum controlo, da severidade de *F. oxysporum*. Quanto à incidência da doença, esta foi idêntica quando o filtro, o antagonista ou ambos estiveram presentes.

O aumento da eficácia do filtro inoculado com *T. atroviride*, no controlo de *F. oxysporum* não foi tão evidente, como para o controlo de *R. solani*. Foi cerca de 40% menos eficaz do que na ausência do patogénico, o que sugere que o filtro com o antagonista não foi capaz de controlar *F. oxysporum* completamente. Apesar de menos eficazes, o filtro só com areia, ou o antagonista *T. atroviride* na solução nutritiva não diferiram significativamente do filtro com o antagonista. Ainda assim, a presença de algum meio de controlo foi entre 44% - 58% mais eficaz do que quando não existia nenhum meio de controlo.

Apesar de tudo, estes resultados mostraram que o antagonista adicionado ao filtro apresenta algum potencial no controlo de *F. oxysporum*. É possível que taxas de fluxo mais lentas da drenagem pelo filtro possibilitem o controlo biológico bem mais eficaz.

Conclusões gerais e perspetivas futuras

Este trabalho demonstra que é possível melhorar a eficácia da desinfeção por filtração lenta, pela adição do antagonista *Trichoderma atroviride*, para o controlo completo de *Rhizoctonia solani* e para melhor controlo de *Fusarium oxysporum*.

O antagonista *T. atroviride* teve, quase sempre, uma capacidade semelhante de controlo dos patogénicos, quando aplicado na solução nutritiva (sem areia), evidenciando um grande potencial como agente de controlo biológico.

Espera-se que o presente trabalho contribua para a divulgação e melhoria da desinfeção da drenagem por filtração lenta, tão importante para a utilização mais eficiente da água e dos nutrientes, em particular nos cultivos sem solo.

Trabalhos futuros podem complementar estes resultados, testando-se o antagonista em sistemas com menor velocidade da percolação no filtro, visando o aumento da capacidade de controlo biológico; avaliando o efeito da temperatura e da oxigenação da drenagem durante a filtração e testando outros organismos com capacidade de controlo biológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Mubeen, M., Zheng, H., Sohail, M. A., Shakeel, Q., Solanki, M. K., Iftikhar, Y., Sharma, S., Kashyap, B. K., Hussain, S., del Carmen Zuñiga Romano, M., Moya-Elizondo, E. A., & Zhou, L. (2022). *Trichoderma* spp. Genes Involved in the Biocontrol Activity Against *Rhizoctonia solani*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.884469>.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. In *New Phytologist* (Vol. 184, Issue 3, pp. 529–544). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x>.
- Alizadeh, M., Vasebi, Y., & Safaie, N. (2020). Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. In *Open Agriculture* (Vol. 5, Issue 1, pp. 404–440). De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0031>.
- Atanasova, L., Knox, B. P., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S., & Baker, S. E. (2013). The polyketide synthase gene *pks4* of *Trichoderma reesei* provides pigmentation and stress resistance. *Eukaryotic Cell*, 12(11), 1499–1508. <https://doi.org/10.1128/EC.00103-13>.
- Avilés, M., Borrero, C., & Trillas, M. I. (2011). Review on Compost as an Inducer of Disease Suppression in Plants Grown in Soilless Culture. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 5(2), 1–11.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. C., & Codón, A. (2004). Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249–260. <https://www.researchgate.net/publication/8065870>.
- Bergstrand, K.-J. (2009). Variables limiting efficacy of slow filters integrated into closed hydroponic growing systems. Dept. of Horticulture, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Bergstrand, K.-J., Khalil, S., Hultberg, M., & Alsanius, B. W. (2011). Cross Response of Slow Filters to Dual Pathogen Inoculation in Closed Hydroponic Growing Systems. *The Open Horticulture Journal*, 4, 1–9.
- Błaszczuk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., & Jędrzycka, M. (2014). *Trichoderma* spp. -application and prospects for use in organic farming and

industry. In JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH (Vol. 54, Issue 4). <http://www.isth.info/biodiversity//index.php>.

Brand, T., & Wohanka, W. (2001). IMPORTANCE AND CHARACTERIZATION OF THE BIOLOGICAL COMPONENT IN SLOW FILTERS. *Acta Horticulturae*, 554, 313–322. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.554.34>.

Brás, N. (2015). Polissacarídeos. *Revista de Ciência Elementar*, 3(4). <https://doi.org/10.24927/rce2015.231>.

Calvo-Bado, L. A., Pettitt, T. R., Parsons, N., Petch, G. M., Morgan, J. A. W., & Whipps, J. M. (2003). Spatial and temporal analysis of the microbial community in slow sand filters used for treating horticultural irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2116–2125. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2116-2125.2003>.

Castro, T. G., & Micaêilo, N. M. (2014). Modeling of peptaibol analogues incorporating nonpolar α,α - dialkyl glycines shows improved α -helical preorganization and spontaneous membrane permeation. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(3), 649–658. <https://doi.org/10.1021/jp4074587>.

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

Daryaei, A., Jones, E. E., Glare, T. R., & Falloon, R. E. (2016). PH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 92, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.001>.

Delcour, I. (2020). Trage zandfiltratie voor het elimineren van algen en ziekten in de tuinbouw.

Dong, C. J., Li, Q., Wang, L. L., & Shang, Q. M. (2020). Dynamic changes in bacterial communities in the recirculating nutrient solution of cucumber plug seedlings cultivated in an ebb- and-flow subirrigation system. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232446>.

- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. v., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 749–759). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>.
- Dubey, M., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2021). Functional characterization of the AGL1 aegerolysin in the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* reveals a role in conidiation and antagonism. *Molecular Genetics and Genomics*, 296(1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01732-3>.
- Ehret, D., Alsanius, B., Wohanka, W., Menzies, J., & Utkhede, R. (2001). Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie, EDP Sciences*, 21, 322–339. <https://doi.org/10.1051/agro:2001127i>.
- Ehret, D. L., Alsanius, B., Wohanka, W., Menzies, J. G., & Utkhede, R. (2001). Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. In *Agronomie* (Vol. 21, Issue 4, pp. 323–339). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/agro:2001127>.
- Ellis, K. v. (1985). SLOW SAND FILTRATION. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 15(4), 315–255.
- Ferreira, M. A., Alfenas, A. C., Binoti, D. H. B., Machado, P. S., & Munteer, A. H. (2012). Slow sand filtration eradicates eucalypt clonal nursery plant pathogens from recycled irrigation water in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 37(5), 319–325. www.sbfito.com.br.
- Gajera, H., & Domadiya, R. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system-a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 133–142. <https://www.researchgate.net/publication/267571641>.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. In *Biological Control* (Vol. 117, pp. 147–157). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>.

- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B. R., & Nevalainen, H. (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 47(6), 381–388. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0575-3>.
- Huisman, L., & Wood, W. E. (1974). *Slow Sand Filtration*. World Health Organization.
- Jaroszuk-ściseł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTKZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>.
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0>.
- Kappel, L., Kosa, N., & Gruber, S. (2022). The Multilateral Efficacy of Chitosan and *Trichoderma* on Sugar Beet. *Journal of Fungi*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/jof8020137>.
- Kubiak, K., Błaszczak, M., Sierota, Z., Tkaczyk, M., & Oszako, T. (2015). Slow sand filtration for elimination of phytopathogens in water used in forest nurseries. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 30(8), 664–677. <https://doi.org/10.1080/02827581.2015.1048716>.
- 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., Grigoriev, I. v. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>.

- Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M., & Kubicek, C. P. (2000). Enzyme Diffusion from *Trichoderma atroviride* (T. harzianum P1) to *Rhizoctonia solani* Is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma* ech42 Gene Expression before Mycoparasitic Contact. In APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY (Vol. 66, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/aem>.
- Lee, E., & Oki, L. R. (2013). Slow sand filters effectively reduce Phytophthora after a pathogen switch from *Fusarium* and a simulated pump failure. *Water Research*, 47(14), 5121–5129. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.054>.
- Lévesque, S., Graham, T., Bejan, D., Lawson, J., Zhang, P., & Dixon, M. (2019). Inactivation of *Rhizoctonia solani* in fertigation water using regenerative in situ electrochemical hypochlorination. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50600-7>.
- Logsdon, G. S., Kohne, R., Abel, S., & LaBonde, S. (2002). Slow sand filtration for small water systems. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 1(5), 339–348. <https://doi.org/10.1139/S02-025>.
- Louro, M., & Reis, M. (2020). Manual de Cultivo sem Solo (Quântica E). agrobook.
- Magan, N., & Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4).
- Mahmood, A., & Kataoka, R. (2018). Potential of biopriming in enhancing crop productivity and stress tolerance. In *Advances in Seed Priming* (pp. 127–145). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_9.
- 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.
- Morard, P., Lacoste, L., & Silvestre, J. (2000). Effect of oxygen deficiency on uptake of water and mineral nutrients by tomato plants in soilless culture. *Journal of Plant Nutrition*, 23(8), 1063–1078. <https://doi.org/10.1080/01904160009382082>.

- Moreno-Ruiz, D., Lichius, A., Turrà, D., di Pietro, A., & Zeilinger, S. (2020). Chemotropism Assays for Plant Symbiosis and Mycoparasitism Related Compound Screening in *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601251>.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G., & Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. In *Indian Journal of Microbiology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 522–529). <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0308-5>.
- Mukherjee, P. K. (2011). Genomics of biological control-whole genome sequencing of two mycoparasitic *Trichoderma* spp. In *CURRENT SCIENCE* (Vol. 101, Issue 3). <http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2>.
- Nofal, A. M., El-Rahman, M. A., Abdelghany, T. M., & Abd El-Mongy, M. (2021). Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00450-1>.
- Oh, S.-U., Yun, B.-S., Lee, S.-J., Kim, J.-H., & Yoo, I.-D. (2002). Atroviridins A~C and neoatroviridins A~D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 55(6), 557–564.
- Österdahl, M. (2015). Slow sand filtration as a water treatment method [Tese de bacharelato, Universidade de Karlstad]. www.kau.se.
- Oszust, K., Cybulska, J., & Frąc, M. (2020). How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21124235>.
- Pardossi A, Carmassi G, Diara C, Incrocci L, Maggini R, & Massa D. (2011). Fertigation and Substrate Management in Closed Soilless Culture.
- Postma, J., Bonants, P. J., & van Os, E. A. (2001). Population dynamics of *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown in closed systems. *Mededelingen (Rijksuniversiteit Te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 66(2a), 47–59.

- Rai, S., Kashyap, P. L., Kumar, S., Srivastava, A. K., & Ramteke, P. W. (2016). Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3657-4>.
- Ranque, S., Garcia-Hermoso, D., Michel-Nguyen, A., & Dumon, H. (2008). Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. *Journal de Mycologie Medicale*, 18(4), 234–236. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.09.002>.
- Rao, Y., Zeng, L., Jiang, H., Mei, L., & Wang, Y. (2022). *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02511-3>.
- Reis, M. (2014). Sugestões para a uniformização das designações relativas aos sistemas de cultivo sem solo. *Revista Da APH*, 115, 16–19. http://www.aphorticultura.pt/uploads/4/8/0/3/48033811/revista_115_sumario.pdf.
- Resh, H. M. (2012). *Hydroponic food production: a definitive guidebook for the advanced home gardener and the commercial hydroponic grower*. CRC Press, Boca Raton.
- Ribeiro, M. S., de Paula, R. G., Voltan, A. R., de Castro, R. G., Carraro, C. B., de Assis, L. J., Steindorff, A. S., Goldman, G. H., Silva, R. N., Ulhoa, C. J., & Monteiro, V. N. (2019). Endo- β -1,3-glucanase (GH16 family) from *Trichoderma harzianum* participates in cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. *Biomolecules*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120781>.
- Santos, S. (2012). *Produção de sideróforo pela bactéria Bacillus megaterium*. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., & Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Patel, J. S., & Singh, H. B. (2014). Molecular Mechanisms of Interactions of *Trichoderma* with other Fungal Species. *The Open Mycology Journal*, 8, 140–147.

- Sarrocco, S., Guidi, L., Fambrini, S., Degl'Innocenti, E., & Vannacci, G. (2009). COMPETITION FOR CELLULOSE EXPLOITATION BETWEEN *RHIZOCTONIA SOLANI* AND TWO *TRICHODERMA* ISOLATES IN THE DECOMPOSITION OF WHEAT STRAW. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 331–338.
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitaled biocontrol agent. In *Plants* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>.
- Soria, C., & Olivert, J. (2002). Cultivo sin suelo de hortalizas: aspectos prácticos y experiencias. *Conselleria d'Agricultura, Peixca i Alimentació*.
- Stewart-Wade, S. M. (2011). Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: Their detection and management. In *Irrigation Science* (Vol. 29, Issue 4, pp. 267–297). <https://doi.org/10.1007/s00271-011-0285-1>.
- 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. *Biological Control*, 67(3), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.10.008>.
- Tamandegani, P. R., Marik, T., Zafari, D., Balázs, D., Vágvölgyi, C., Szekeres, A., & Kredics, L. (2020). Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during in vitro antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050730>.
- Tüzel, İ. H., İrget, M. E., Gül, A., Tuncay, Ö., & Eltez, R. Z. (1999). Soilless culture of cucumber in glasshouses: II. A comparison of open and closed systems on water and nutrient consumption. *Proc. of the Int. Symp. Acta Horticulturae*, 486, 395–400.
- Tüzel, İ. H., Tüzel, Y., Gül, A., Meriç, M. K., Yavuz, Ö., & Eltez, R. Z. (2001). COMPARISON OF OPEN AND CLOSED SYSTEMS ON YIELD, WATER AND NUTRIENT CONSUMPTION AND THEIR ENVIRONMENTAL IMPACT. *Proc. ISOSC Congress 2000. Acta Horticulturae*, 554, 221–228.

- Tyrrell, S. (2011). From London Soup and “chimera dire” to clear, bright, agreeable and palatable.
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.
- Vallance, J., Déniel, F., Floch, G. le, Guérin-Dubrana, L., Blancard, D., & Rey, P. (2009). Pathogenic and beneficial microorganisms in soilless cultures. In *Sustainable Agriculture* (Vol. 2, pp. 711–726). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_31.
- van Os, E. A. (1999). Closed soilless growing systems: a sustainable solution for dutch greenhouse horticulture. *Water Science and Technology*, 39(5), 105–112. <https://doi.org/10.2166/wst.1999.0228>.
- van Os, E. A., van Kuik, F. J., Runia, W. Th., & van Buuren, J. (1998). PROSPECTS OF SLOW SAND FILTRATION TO ELIMINATE PATHOGENS FROM RECIRCULATING NUTRIENT SOLUTIONS. *Acta Horticulturae*, 458, 377–384. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.458.49>.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species (2a)*. CRC Press.
- Wohanka, W. (1995). Disinfection of recirculating nutrient solutions by slow sand filtration. *Acta Horticulturae*, 382, 246–255. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.382.28>.
- Wohanka, W., Luedtke, H., Ahlers, H., & Luebke, M. (1999). Optimization of slow filtration as a means for disinfecting nutrient solutions. *Acta Horticulturae*, 481, 539–544.

- Yan, Y., Zhang, C., Moodley, O., Zhang, L., & Xu, J. (2019). Green mold caused by *Trichoderma atroviride* on the lingzhi medicinal mushroom, *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(5), 515–521. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019030352>.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. In *Plants* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>.
- Zamani, M. S., & Motallebi, M. R.; (2008). MOLECULAR CLONING OF CHITINASE 33 (CHIT33) GENE FROM *TRICHODERMA ATROVIRIDE*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 433–437.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 30, Issue 2, pp. 74–90). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.

8 ANEXOS

ANEXO I: Sistema de filtração lenta em areia

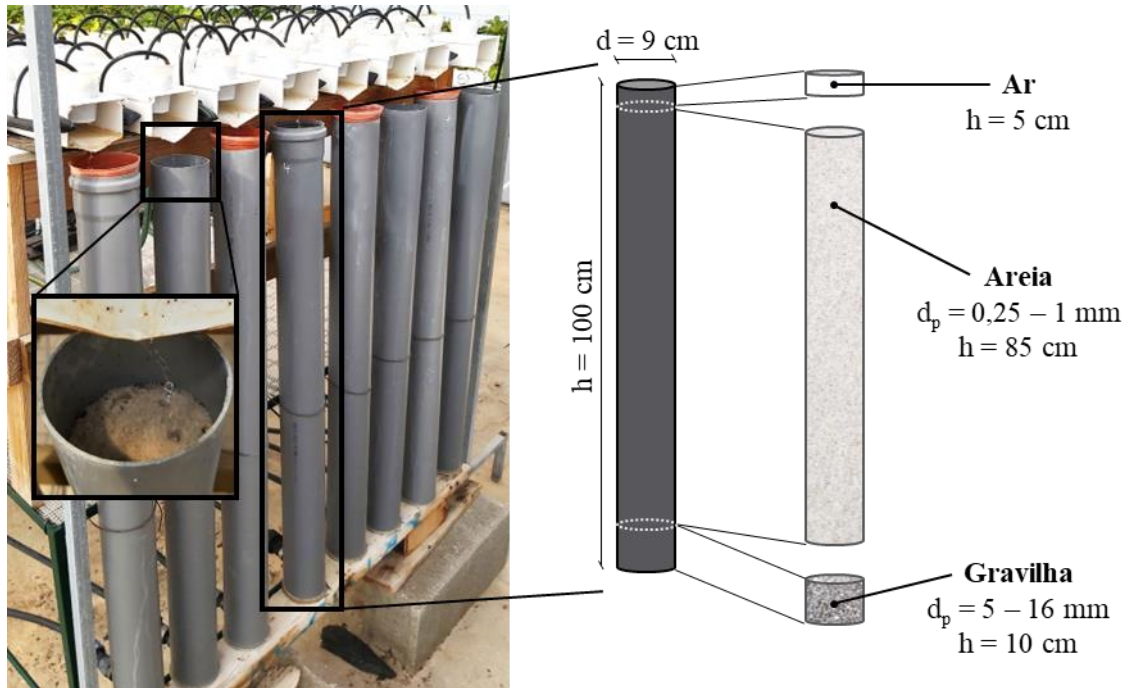


Figura 8.1 – Imagem e esquema do sistema de filtração usado. h – altura; d – diâmetro; d_p – diâmetro das partículas (granulometria).

ANEXO II: Sistema de cultivo



Figura 8.2 – Sistema de cultivo utilizado nos ensaios. 1 – calha de cultivo; 2 – tubo PE; 3 – microtubo; 4 – substrato; 5 – vaso; 6 – planta; 7 – vaso com patogénico, somente nas modalidades P⁺; 8 – tubo PVC com filtro nas modalidades F⁺ e sem filtro nas modalidades F⁻.



Figura 8.3 – Sistema de cultivo utilizado nos ensaios. A – calha de cultivo que serviu de suporte aos vasos; B – depósitos de armazenamento da drenagem, onde estava a bomba elétrica submersível; C – Tubos PVC.

ANEXO III: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio preliminares

Quadro 8.1 – Quadro resumo da análise da variância: Efeito de *Rhizoctonia solani* na severidade da doença em quatro variedades de pepino

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Entre modalidades	9,061	3	3,020	3,540
Devido ao erro	29,860	35	0,853	
Total	28,921	38		

Quadro 8.2 – Quadro resumo da análise da variância: Efeito de *Rhizoctonia solani* na incidência da doença em quatro variedades de pepino

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Entre modalidades	0,126	3	0,042	0,104
Devido ao erro	14,582	36	0,405	
Total	14,708	39		

ANEXO IV: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio principal com *Rhizoctonia solani***Quadro 8.3** - Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (1º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	42,752	7	6,107		<0,001
Devido ao erro	11,133	27	0,412		
Total	53,886	34			

Quadro 8.4 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (2º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	28,659	7	4,094		<0,001
Devido ao erro	4,736	29	0,163		
Total	33,395	36			

Quadro 8.5 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (3º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	34,996	7	4,999		<0,001
Devido ao erro	6,569	30	0,219		
Total	41,565	37			

Quadro 8.6 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (4º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	23,967	7	3,424	13,396	<0,001
Devido ao erro	5,878	23	0,256		
Total	29,845	30			

Quadro 8.7 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (5º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	42,255	7	6,036	45,686	<0,001
Devido ao erro	4,096	31	0,132		
Total	46,351	38			

Quadro 8.8 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (6º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	13,159	7	1,880	3,995	0,003
Devido ao erro	15,056	32	0,471		
Total	28,215	39			

Quadro 8.9 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (7º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	0,905	7	0,129		<0,001
Devido ao erro	0,661	31	0,021		
Total	1,567	38			

Quadro 8.10 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (8º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	2,106	7	0,301		0,082
Devido ao erro	4,756	32	0,149		
Total	6,863	39			

Quadro 8.11 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (média dos ensaios).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	124,524	7	17,789		<0,001
Devido ao erro	127,087	291	0,437		
Total	251,611	298			

Quadro 8.12 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (1º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	14,199	7	2,028		<0,001
Devido ao erro	2,262	27	0,084		
Total	16,461	34			

Quadro 8.13 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (2º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig.
Entre modalidades	9,830	7	1,404		<0,001
Devido ao erro	1,120	30	0,037		
Total	10,950	37			

Quadro 8.14 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (3º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	9,175	7	1,311	39,192	<0,001
Devido ao erro	1,003	30	0,033		
Total	10,178	37			

Quadro 8.15 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (4º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	4,716	7	0,674	6,445	<0,001
Devido ao erro	2,613	25	0,105		
Total	7,330	32			

Quadro 8.16 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (5º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	7,865	7	1,124	85,494	<0,001
Devido ao erro	0,407	31	0,013		
Total	8,272	38			

Quadro 8.17 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (6º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	2,601	7	0,372	4,514	<0,001
Devido ao erro	2,634	32	0,082		
Total	5,236	39			

Quadro 8.18 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (7º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	2,339	7	0,334	5,822	<0,001
Devido ao erro	1,779	31	0,057		
Total	4,118	38			

Quadro 8.19 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (8º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	4,497	7	0,642	3,483	0,007
Devido ao erro	5,903	32	0,184		
Total	10,399	39			

Quadro 8.20 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (média dos ensaios).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	41,436	7	5,919	51,358	<0,001
Devido ao erro	33,886	294	0,115		
Total	75,323	301			

ANEXO V: Quadros resumo da análise da variância – Ensaio principal com *Fusarium oxysporum*

Quadro 8.21 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (1º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	9,765	7	1,395	5,484	<0,001
Devido ao erro	8,140	32	0,254		
Total	17,904	39			

Quadro 8.22 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (2º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	15,587	7	2,227	7,351	<0,001
Devido ao erro	9,694	32	0,303		
Total	25,280	39			

Quadro 8.23 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (3º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	11,767	7	1,681	26,590	<0,001
Devido ao erro	2,023	32	0,063		
Total	13,790	39			

Quadro 8.24 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (4º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	15,303	7	2,186	24,702	<0,001
Devido ao erro	2,832	32	0,088		
Total	18,135	39			

Quadro 8.25 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (5º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	11,410	7	1,630	18,528	<0,001
Devido ao erro	2,815	32	0,088		
Total	14,225	39			

Quadro 8.26 – Quadro resumo da análise da variância: Severidade da doença por modalidade (média dos ensaios).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	56,686	7	8,098	46,544	<0,001
Devido ao erro	33,405	192	0,174		
Total	90,090	199			

Quadro 8.27 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (1º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	10,374	7	1,482	6,128	<0,001
Devido ao erro	7,739	32	0,242		
Total	18,113	39			

Quadro 8.28 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (2º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	12,455	7	1,779	17,799	<0,001
Devido ao erro	3,199	32	0,100		
Total	15,654	39			

Quadro 8.29 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (3º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	13,785	7	1,969	14,717	<0,001
Devido ao erro	4,282	32	0,134		
Total	18,067	39			

Quadro 8.30 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (4º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	11,033	7	1,576	15,393	<0,001
Devido ao erro	3,277	32	0,102		
Total	14,310	39			

Quadro 8.31 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (5º ensaio).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	13,959	7	1,994	36,488	<0,001
Devido ao erro	1,749	32	0,055		
Total	15,708	39			

Quadro 8.32 – Quadro resumo da análise da variância: Incidência da doença por modalidade (média dos ensaios).

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Sig
Entre modalidades	56,045	7	8,006	56,902	<0,001
Devido ao erro	27,015	192	0,141		
Total	83,060	199			