



Relatório anual de progresso

Nº do grupo operacional: **PDR2020 - 101-031291 (Líder)**

Identificação de todas as entidades que integram o grupo operacional:

- ✓ ANPROMIS – PDR2020-101-031291
- ✓ AGROMAIS - PDR2020-101-031292
- ✓ Instituto de Soldadura e Qualidade - PDR2020-101-031293
- ✓ INIAV - PDR2020-101-031295
- ✓ Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja S.A. - PDR2020-101-031298
- ✓ Sociedade Agrícola de São João de Brito S.A. - PDR2020-101-031300
- ✓ Quinta da Cholda, S.A. - PDR2020-101-031302
- ✓ Arminda Aurora Domingos Henriques de Sousa Luz - PDR2020-101-031304
- ✓ Maria Francisca Henriques da Luz Lino Caetano - PDR2020-101-031306

Designação do plano de acção: **“QualiMilho - Novas estratégias de integração sustentáveis que garantam a qualidade e segurança na fileira do milho nacional”**

Data de início do plano de acção: **01/03/2017**

Data de conclusão do plano de acção: **28/02/2021**

Data do relatório de progresso: **28/02/2020**

A. Execução Física:

Neste terceiro ano, demos continuidade à instalação dos ensaios de milho na Estação Experimental António Teixeira (Coruche) e nas cinco explorações agrícolas localizadas na zona da Golegã, articulando com os diversos parceiros as variedades de milho a semear, o tipo de adubo e fungicida de solo a aplicar e o plano de herbicidas a implementar.

Para a monitorização das micotoxinas e deteção dos fungos no grão, definiram-se os pontos de recolha das amostras tanto no campo (campanha de 2019), como na armazenagem – Agromais onde foram colocadas 8 barricas com 25kg de milho (campanha de 2018).

Para além das amostras de grão de milho também foram recolhidas amostras de solo na Estação Experimental António Teixeira (Coruche) e em três explorações que foram sujeitos a análises físico-químicas e a bioensaios. A georreferenciação dos locais da recolha é apresentada no Anexo 1.

Face ao plano inicialmente previsto e na sequência das atividades descritas no relatório anterior, confirmamos a realização das ações a seguir discriminadas:

1. Definição do plano e método de amostragem

1.1. Ensaios de armazenamento e amostragem para quantificação de micotoxinas e deteção de fungos no grão

A amostragem do milho na campanha de 2018 para os ensaios de armazenamento incidiu no grão da variedade P0933 que foi recolhido em 3 explorações: Sociedade Agrícola Quinta da Labruja, Sociedade Agrícola de São João de Brito. e Quinta da Cholda

De acordo com as variáveis em estudo, foram selecionadas 8 amostras para monitorizar as micotoxinas durante o armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição das amostras da campanha de 2018 armazenadas em 8 barricas na AGROMAIS

Código	Exploração	Modalidade Fertilização
L01	Soc. Labruja	Nergetic (Fósforo)
L02	Soc. Labruja	Patentkali (Potássio, Magnésio e Enxofre)
L03	Soc. Labruja	Matéria Orgânica
JC 4 TEST	Cholda	Testemunha (Convencional)
SJB 8	São João de Brito	Nefusoil (Azoto, Fósforo e Potássio)
SJB 6 TEST	São João de Brito	Testemunha (Convencional)
JC 3 E	Cholda	F-BAC (Azoto, Fósforo e Zinco)
SJB 7 FB	São João de Brito	F-BAC (Azoto, Fósforo e Zinco)

O grão foi retirado diretamente dos vagões, deixado a secar ao ar e posteriormente foi colocado em barricas de 25 kg durante um período de 6 meses

nas instalações de armazenamento da AGROMAIS em Riachos. Durante o período de armazenagem e com a periodicidade de 2 meses (Dezembro 2018, Abril 2019, Junho 2019) foram retiradas amostras de 1kg para a quantificação das micotoxinas.

A deteção de fungos no grão foi realizada na altura da colheita e nas amostragens de Dezembro 2018 e Abril 2019.

1.2. Amostragem no campo para quantificação de micotoxinas

Em 2019, procurámos monitorizar as micotoxinas diretamente no campo, a recolha incidiu em diferentes modalidades dos ensaios conduzidos na Estação Experimental António Teixeira (EEAT) e em 2 explorações (Arminda da Luz e Quinta da Cholda) em diferentes fases de maturação do grão (12/09/2019, 01/10/2019, 10/10/2019, 23/10/2019, 06/11/2019). A tabela 2 apresenta a descrição das amostras recolhidas diretamente no campo na campanha de 2019 e em diferentes fases de maturação do grão.

Tabela 2: Descrição das amostras recolhidas diretamente no campo na campanha de 2019, em diferentes fases de maturação do grão

Exploração	Ensaio	Variedade	Modalidade	Código
EEAT	Porte-Labore	DKC6761	0 N; 50.000 sementes/ha	PL050
			0 N; 100.000 sementes/ha	PL0100
			100 N; 50.000 sementes/ha	PL10050
			100 N; 50.000 sementes/ha	PL100100
			400 N; 50.000 sementes/ha	PL40050
			400 N; 50.000 sementes/ha	PL400100
EEAT	Univ. Aveiro	DKC6761	UA1	UA1
			UA2	UA2
			UA3	UA3
			UA4	UA4
EEAT	Sementeira Direta	SY Hellium	Sementeira Direta	SD
EEAT	Sementeira Convencional	SY Hellium	Sementeira Convencional	SC
EEAT	Rega Gota a Gota	P0933	Rega Gota a Gota	RGG
EEAT	Baixo Pivot	P0933	Baixo Pivot	BP
EEAT	Testemunha	P0933	P0933	P0933
Arminda da Luz	Fertilizantes	P1049	Coragen 200mL/ha	AL1
			Testemunha	AL2
			Nergetic 30, 200kg/ha	AL3
			Patentkali, 200kg/ha	AL4
Cholda	Fertilizantes	P0933	F-BAC	JC3
			Testemunha	JC4
			Nefusoil	JC5

1.3. Amostragem no campo para deteção de fungos no grão

A amostragem da campanha de 2019 foi realizada na exploração da Quinta da Cholda, de forma a garantir a individualização das subamostras. A colheita do milho foi realizada nas parcelas das 3 modalidades com recurso a uma sonda de amostragem vertical segmentada (com 7 câmaras), do tipo da representada na **Figura 1**, que permitiu uma amostragem representativa do grão acumulado na tremonha da ceifeira.



Figura 1 – Sonda de amostragem de grão com 3 câmaras.

Este tipo de sonda permitiu a amostragem do milho em profundidade e não somente à superfície, ou seja, permitiu uma amostragem mais representativa da heterogeneidade do campo.

Cada modalidade, composta por 48 linhas, foi dividida em quatro porções de 12 linhas cada. No fim da colheita de cada 12 linhas de milho (corresponde à capacidade da tremonha) foi feita uma amostragem, dentro da tremonha da ceifeira, totalizando-se 4 réplicas para cada modalidade. Cada amostragem compôs-se de 2 incrementos, permitindo em cada um retirar 7 tomas representativas da profundidade da tremonha, contabilizando no total 14 tomas por réplica, ou seja, 56 tomas por modalidade. A realização de réplicas, para além de nos permitir avaliar a heterogeneidade dos campos, também nos possibilita fazer uma análise estatística dos resultados obtidos, resultando numa avaliação mais coerente e realista, facilitando a tomada de decisões futuras.

2. Monitorização das micotoxinas

No decorrer da campanha, as amostras foram recolhidas de acordo com o plano previsto em 1.1 e 1.2 e remetidas para os laboratórios do INIAV localizados no Vairão (Vila do Conde) e Oeiras, onde foram efetuadas as análises.

As micotoxinas foram analisadas pelo método de triagem validado (Freitas *et al*, 2019) e em simultâneo quantificadas as várias micotoxinas com recurso à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (UHPLC-ToF-MS), pelo método implementado (Silva *et al*, 2019).

As micotoxinas avaliadas foram as explicitadas para milho ou cereais no anexo do Reg. (CE) N.º 1881/2006: aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona, fumoninsina B1, fumonisina B2, toxina T2, toxina HT-2.

As micotoxinas detetadas foram as Fumonisinias B1 e B2, produzidas essencialmente por espécies do género *Fusarium*.

2.1 Armazenamento do grão da campanha de 2018

No que respeita à monitorização do armazenamento do grão colhido em 2018, ocorreram situações adversas no acondicionamento do grão após a colheita, nomeadamente as deficientes condições de secagem do grão. As concentrações de micotoxinas revelaram-se logo no início do armazenamento muito elevadas, valores esses que se mantiveram ou aumentaram durante o período monitorizado (Tabela 3).

Tabela 3: Monitorização das micotoxinas durante o armazenamento do grão da campanha de 2018 colocado em 8 barricas na AGROMAIS

		Dezembro 2018							
		L1	L2	L3	JC3	JC4	SJB6	SJB7	SJB8
Fumonisinias (B1+B2)	µg/kg	1119	2656	>4000	1709	2140	>4000	>4000	>4000
Fumonisinias (B1)	µg/kg	830	2037	>4000	1297	1666	3606	>4000	>4000
Fumonisinias (B2)	µg/kg	289	619	1360	412	474	1728	2059	2286
		Abril 2019							
		L1	L2	L3	JC3	JC4	SJB6	SJB7	SJB8
Fumonisinias (B1+B2)	µg/kg	1592	>4000	>4000	3312	2118	>4000	>4000	>4000
Fumonisinias (B1)	µg/kg	1251	3641	>4000	2648	1719	>4000	>4000	>4000
Fumonisinias (B2)	µg/kg	341	961	1524	664	399	2470	1647	1521
		Junho 2019							
		L1	L2	L3	JC3	JC4	SJB6	SJB7	SJB8
Fumonisinias (B1+B2)	µg/kg	1372	3277	>4000 (aprox. 9480)	2883	3456	>4000 (aprox. 13545)	>4000 (aprox. 11109)	>4000 (aprox. 9825)
Fumonisinias (B1)	µg/kg	1055	2548	>4000 (aprox. 7087)	2242	2731	>4000 (aprox. 10684)	>4000 (aprox. 8873)	>4000 (aprox. 7633)
Fumonisinias (B2)	µg/kg	317	729	2394	640	725	2861	2236	2192

2.2 Monitorização da campanha de 2019

No que se refere à colheita do grão em 2019, foram analisadas 54 amostras de milho provenientes da Estação Experimental António Teixeira (33) e das explorações Quinta da Cholda (9) e Arminda da Luz (12). Foram ainda selecionadas 12 espigas suspeitas provenientes dos 3 locais que também foram analisadas.

Realizaram-se no total 200 determinações distribuídas pelos 2 métodos, 66 no de triagem e 134 pelo UHPLC-ToF-MS sendo que neste último várias réplicas da mesma amostra foram analisadas.

A maior parte das amostras analisadas revelam concentrações de fumonisinias negligenciáveis e abaixo do limite de deteção. Não se detetaram amostras com valores superiores ao limite permitido no Reg. (CE) N.º 1881/2006 para o milho não

transformado e em apenas 3 amostras as concentrações são próximas ao limite previsto para os cereais de consumo humano direto (Tabela 4).

Nessas 3 amostras verificou-se que a concentração de fumonisinas aumentou com a evolução da data de colheita.

Tabela 4: Fumonisinas B1+B2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) obtidas pelos métodos do imunoensaio e UHPLC-ToF-MS das amostras de milho colhidas em diferentes datas de maturação do grão durante a campanha de 2019

Código	Data	Variedade	Fumonisinas B1+B2 - Imunoensaio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Fumonisinas B1+B2-UHPLC-ToF-MS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
PL050	12/09/2019	DKC6761	173	248
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
	10/10/2019	DKC6761	<125	254
	06/11/2019	DKC6761	----	462
PL0100	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	210	332
PL10050	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
PL100100	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
PL40050	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
PL400100	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
UA1	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
UA2	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
UA3	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
UA4	12/09/2019	DKC6761	429	500
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
SD	12/09/2019	SY Hellium	n.d.	n.d.
	01/10/2019	SY Hellium	<125	n.d.
SC	12/09/2019	SY Hellium	n.d.	n.d.
	01/10/2019	SY Hellium	<125	n.d.
RGG	12/09/2019	P0933	n.d.	n.d.
	01/10/2019	P0933	<125	<125
BP	12/09/2019	DKC6761	n.d.	n.d.
	01/10/2019	DKC6761	<125	n.d.
P0933	01/10/2019	P0933	<125	n.d.
	10/10/2019	P0933	<125	n.d.
	05/11/2019	P0933	----	n.d.

AL1	01/10/2019	P1049	235	429
	10/10/2019	P1049	394	529
	23/10/2019	P1049	241	325
AL2	01/10/2019	P1049	321	404
	10/10/2019	P1049	<125	n.d.
	23/10/2019	P1049	<125	304
AL3	01/10/2019	P1049	153	324
	10/10/2019	P1049	<125	n.d.
	23/10/2019	P1049	<125	227
AL4	01/10/2019	P1049	229	264
	10/10/2019	P1049	306	525
	23/10/2019	P1049	>1000	942
JC3	01/10/2019	P0933	>1000	742
	10/10/2019	P0933	530	476
	23/10/2019	P0933	530	800
JC4	01/10/2019	P0933	586	438
	10/10/2019	P0933	933	1170
	23/10/2019	P0933	>1000	1678
JC5	01/10/2019	P0933	<125	n.d.
	10/10/2019	P0933	273	293
	23/10/2019	P0933	802	668

É de realçar ainda que os valores de fumonisinas obtidos para as espigas suspeitas, são muito superiores às amostras respetivas e também superam os limites legais (Tabela 5), o que evidencia a necessidade de identificar estratégias de mitigação no campo e também no pós colheita, nomeadamente, a separação precoce do grão contaminado.

Tabela 5: Fumonisins B1+B2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) por UHPLC-ToF-MS de 9 amostras comparativamente com as respetivas espigas suspeitas

Amostra	Fumonisinas B1+B2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
UA1	n.d.
Espiga suspeita	22437
JC3	742
Espiga suspeita	12503
JC5-1	n.d.
Espiga suspeita	4648
JC5-2	n.d.
Espiga suspeita	8285
AL1	429
Espiga suspeita	2239
AL3	324
Espiga suspeita	3810
P0933-1	n.d.
Espiga suspeita	238
P0933-2	n.d.
Espiga suspeita	373
P0933-3	n.d.
Espiga suspeita	669

2.3 Resultados da campanha 2018 vs 2019

Na Quinta da Cholda foi possível repetir em 2019 o ensaio de 2018, com a mesma variedade (P0933) e o mesmo tratamento (F-BAC).

Na colheita de 2018 as amostras foram analisadas a diferentes datas de armazenamento (Dez 2018 a Junho 2019), na colheita de 2019 as amostras foram colhidas no campo em diferentes datas em Outubro e analisadas. Detetaram-se em ambos os anos níveis de fumonisinas elevados, mas sempre inferiores aos limites legais admitidos para o milho não transformado. Verificou-se ainda que a concentração de fumonisinas aumentou com o armazenamento e com a data de colheita sendo esta evolução mais evidente na testemunha do que no grão obtido na parcela tratada com F-BAC. (Figura 2).

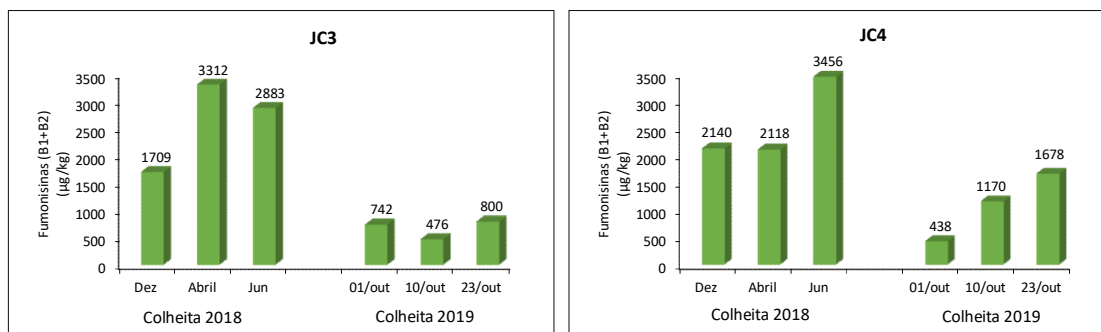


Figura 2 - Fumonisin B1+B2 (µg/kg) por UHPLC-ToF-MS das amostras da variedade de milho P0933 recolhidas das parcelas tratadas com F-BAC (JC3) e testemunha (JC4) na Quinta da Cholda a diferentes datas de armazenamento (colheita 2018) e a diferentes datas de colheita (colheita 2019),

3. Monitorização dos fungos no grão

Tendo em conta que as micotoxinas que apresentaram valores mais elevados foram as Fumonisin B1 e B2, produzidas essencialmente por espécies do género *Fusarium*, decidimos avaliar somente as espécies que pertencem a este género, dando especial ênfase a *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, por serem aquelas que são descritas como as principais produtoras de Fumonisin.

Foram desenvolvidas e implementadas metodologias para a deteção e identificação de *Fusarium* spp. A deteção das espécies de *Fusarium* presentes nos grãos de milho foi feita recorrendo aos métodos de micologia clássica por plaqueamento de 50 grãos de cada amostra, previamente desinfetados superficialmente, no meio de cultura seletivo MGA (*Malachite Green Agar*).

A identificação das culturas foi feita por observação das suas características macro e microscópicas, após a sua purificação (pela técnica do esporo-único) e repicagem para os meios de cultura adequados à sua identificação – PDA (*Potato Dextrose Agar*), CLA (*Carnation Leaf-piece Agar*) e SNA (*Spezieller Nährstoffarmer Agar*).

A identificação morfológica foi, sempre que necessário, confirmada por técnicas de biologia molecular como a amplificação por PCR convencional e sequenciação do gene *TEF-1α* (*Translation elongation factor-1α*). Para além disso, para controlo interno da qualidade das identificações morfológicas, foram selecionados, ao acaso e regularmente, alguns isolados para confirmação por biologia molecular.

3.1. Resultados das amostras da campanha de 2018

Na campanha de 2018, verificou-se um aumento da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp. sempre que foram aplicados tratamentos, comparando com as respetivas testemunhas. No entanto, quando o tratamento foi o reforço da fertilização com Nefusoil (N, P K) ou Patentkali (K, Mg S), a percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp. diminuiu drasticamente nas barricas, comparando com o valor da amostra na colheita do milho (**Fig. 3**).

Efetivamente, a testemunha colhida na propriedade da Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja apresentou uma diminuição drástica da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp., de forma muito semelhante ao milho tratado (K, Mg e S) (**Fig. 3 – B**). Isto sugere que o solo na Soc. Agr. Quinta da Labruja possa, já à partida, estar saturado de K, Mg e S, pois com a sua aplicação não houve qualquer alteração de comportamento. Desta forma, é possível que o uso de Patentkali não acrescente qualquer efeito benéfico nestes terrenos, antes pelo contrário, atendendo à elevada percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp.

Por outro lado, na Sociedade Agrícola São João de Brito parece ser possível observar o efeito real da fertilização com Nefusoil na presença de *Fusarium* spp. nos grãos de milho. Assim, o aumento da quantidade de N, P e K disponível no solo aparenta facilitar a presença de *Fusarium* spp. nos grãos de milho (**Fig. 3 – A**).

A diminuição de grãos contaminados com *Fusarium* spp. após o seu armazenamento não significa, no entanto, necessariamente, uma diminuição do teor de micotoxinas. Após a colheita, a alteração das condições ambientais e do teor de humidade do grão pode levar a um aumento, por um lado do *stress* exercido sobre os *Fusarium* spp. e, por outro, da suscetibilidade do grão. Assim, as estirpes de *Fusarium* capazes de produzir micotoxinas podem ser selecionadas positivamente (com a eliminação das restantes estirpes não produtoras), ou simplesmente motivadas a produzir mais micotoxinas, levando ao aumento das quantidades de fumonisinas no grão, apesar do decréscimo da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp.

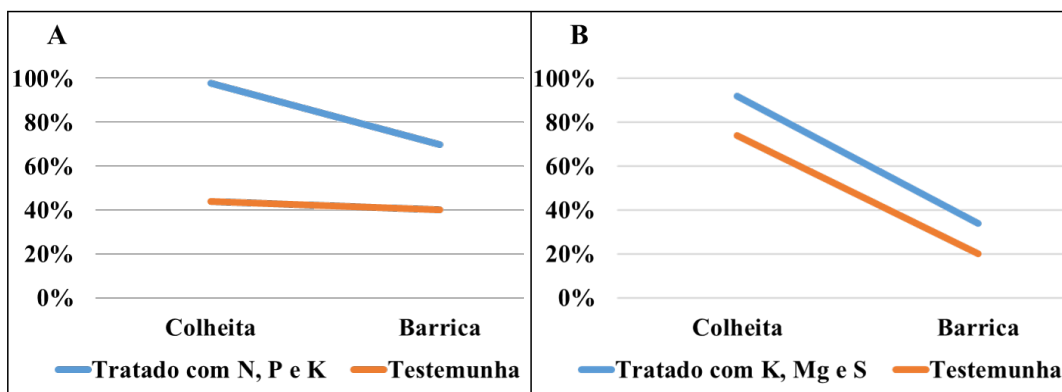


Figura 3 - Resultados da campanha de 2018 sobre o efeito da fertilização na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium* spp. A - Resultados da fertilização com azoto, fósforo e potássio (Nefusoil), em São João de Brito; B - Resultados da fertilização com potássio, magnésio e enxofre (Patentkali), na Sociedade da Labruja.

Relativamente ao uso de fertilizante à base de azoto, fósforo e zinco (F-BAC), verificou-se um aumento da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp., aquando da colheita e nas barricas, comparando com as respetivas testemunhas, quer na Sociedade Agrícola de São João de Brito (SJB; mais acentuado) quer na Quinta da Cholda (JC; menos acentuado) (Fig. 4).

Desta forma, podemos interrogar-nos se também essa fertilização facilita a presença de *Fusarium* spp. nas plantas do milho.

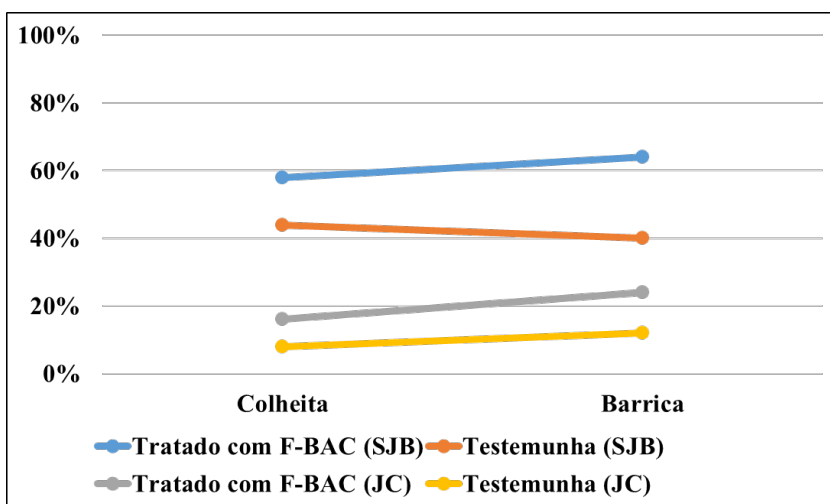


Figura 4 - Resultados da campanha de 2018 sobre o efeito da aplicação de fertilizante à base de azoto, fósforo e zinco na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium* spp. SJB - São João de Brito; JC - Quinta da Cholda.

No que respeita à diversidade de espécies de *Fusarium* encontradas nos grãos de milho, verificou-se que em todas as amostras, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* foram as mais frequentemente isoladas (Figura 5). Para além destas duas espécies, foi também possível obter e identificar alguns isolados de *F. proliferatum*, *F. graminearum* e *F. oxysporum*. Em todas as amostras de milho sujeitas aos tratamentos verificou-se o aumento da diversidade de espécies com o armazenamento, à semelhança do já reportado para *Aspergillus* em amendoim.

Os grãos de milho que à colheita se apresentam contaminados deverão contribuir para a acumulação de fumonisinas durante o armazenamento. Nas amostras em que o teor de fumonisinas, logo na altura da colheita, foi superior a 4000 µg/kg, não foi possível relacionar este parâmetro com a presença e a diversidade de *Fusarium* spp. Isto aconteceu nos casos específicos da Soc. Agr. São João de Brito e na testemunha da Soc. Agr. Quinta da Labruja.

No entanto, no caso do milho tratado (Patentkali) da Sociedade da Labruja foi possível verificar que com o armazenamento ocorreu um aumento significativo de fumonisinas (Tabela 3, de 2656 em dezembro 2018 passa para > 4000 em abril 2019), acompanhado de um decréscimo da presença de grãos infetados com *Fusarium* spp. e um aumento da diversidade de espécies encontradas (Fig. 3-A e 5-A/B). O mesmo acontece com o milho tratado (F-BAC) na Quinta da Cholda, em que, com o armazenamento houve um aumento de fumonisinas (Tabela 3, passa de 1709 em dezembro 2018 para 3312 em abril 2019), acompanhado de um decréscimo da presença de *Fusarium* spp. e um aumento da diversidade de espécies encontradas (Figuras 4 e 5-K/L).

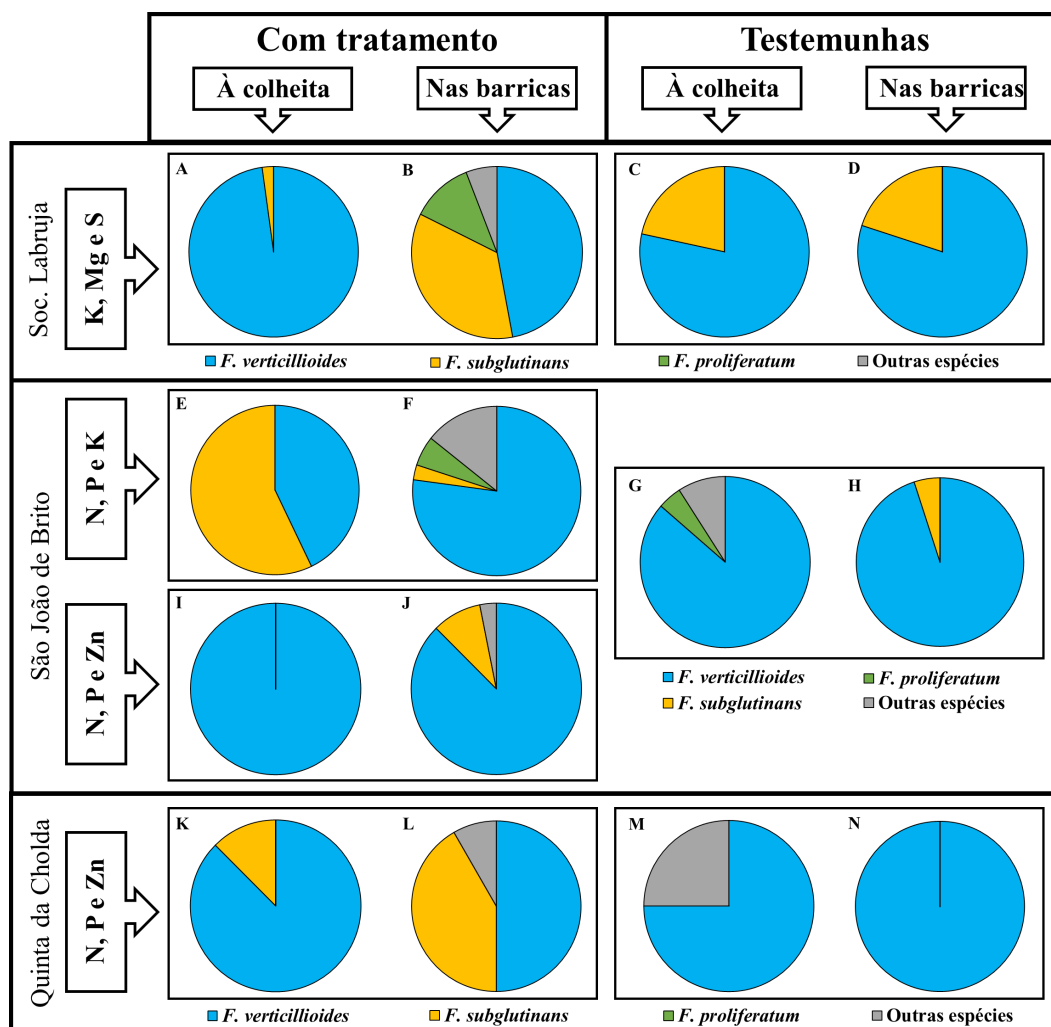


Figura 5 - Resultados da campanha de 2018 sobre a diversidade de espécies de *Fusarium*: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e outras espécies de *Fusarium*. A e B - Grãos de

milho da Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja (L) tratados com potássio, magnésio e enxofre (Patentkali), amostrados à colheita e nas barricas, respetivamente; C e D – Testemunhas da Sociedade da Labruja, amostradas à colheita e nas barricas, respetivamente; E e F – Grãos de milho da Sociedade Agrícola de São João de Brito (SJB) tratados com azoto, fósforo e potássio (Nefusoil), amostrados à colheita e nas barricas, respetivamente; G e H – Testemunhas de São João de Brito, amostradas à colheita e nas barricas, respetivamente; I e J – Grãos de milho de São João de Brito (SJB) tratados com azoto, fósforo e zinco (F-BAC), amostrados à colheita e nas barricas, respetivamente; K e L – Grãos de milho da Quinta da Cholda (JC) tratados com azoto, fósforo e zinco (F-BAC), amostrados à colheita e nas barricas, respetivamente; M e N – Testemunhas da Quinta da Cholda, amostradas à colheita e nas barricas, respetivamente.

Por outro lado, na Quinta da Cholda, a testemunha manteve os níveis de fumonisinas (Tabela 3, de 2140 em dezembro 2018 passa para 2118 em abril 2019) e de contaminação por *Fusarium* spp. assim como a sua diversidade.

Estes resultados sugerem que o aumento na diversidade de espécies de *Fusarium*, talvez causado pela junção dos tratamentos do milho e as condições específicas de armazenamento, possa levar a mais competição entre as espécies contaminantes, o que conduz a um aumento da produção de fumonisinas por parte das estirpes capazes de as produzir, com o objetivo de eliminar as restantes.

3.2. Resultados das amostras da campanha de 2019

Relativamente à campanha de 2019, ainda apenas foi possível averiguar sobre a presença de *Fusarium* spp. nos grãos de milho e proceder à sua identificação morfológica, estando em processamento a sua confirmação via biologia molecular.

Para despiste da origem da contaminação com *Fusarium* spp., foram também analisadas duas réplicas das sementes utilizadas na campanha de 2019, tendo ambas sido negativas para a presença de isolados de *Fusarium* spp. viáveis.

Foi realizada a análise micológica aos grãos de milho amostrados na Quinta da Cholda, não se tendo verificado um aumento significativo da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium* spp. devido à aplicação dos tratamentos (fertilização com Nefusoil e F-BAC), contrariamente à campanha anterior (**Figura 6**).

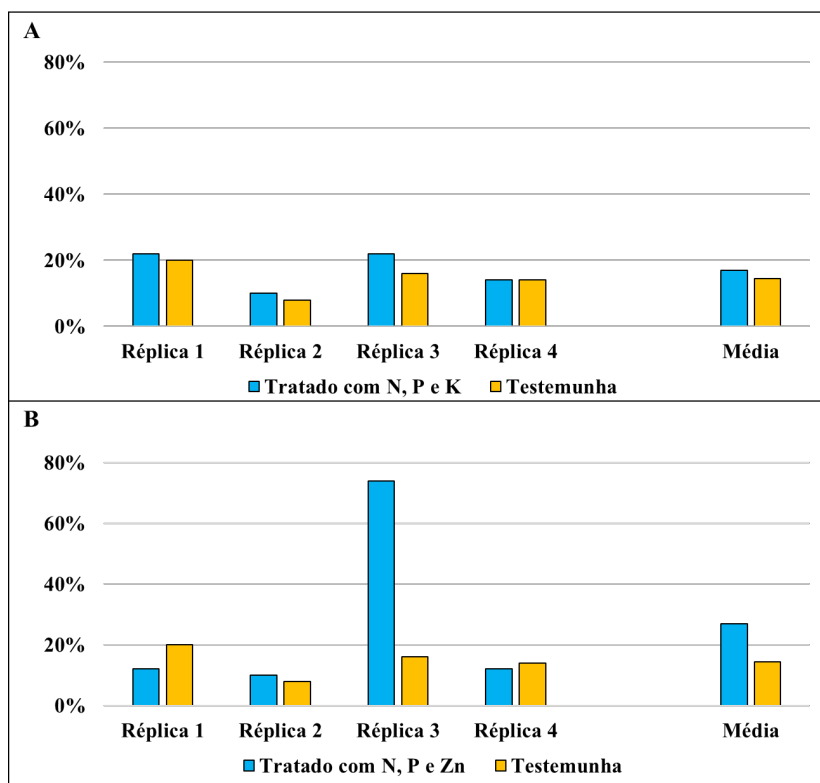


Figura 6 - Resultados da campanha de 2019 sobre o efeito da aplicação de Nefusoil (A) e de F-BAC (B) na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium* spp., na Quinta da Cholda.

No entanto, houve uma réplica de milho tratado com F-BAC que apresentou uma prevalência de grãos contaminados com *Fusarium* spp. muito superior às restantes réplicas (mais 60 a 62%). Este resultado sugere que o campo de milho onde foi experimentada esta modalidade não é homogêneo, realçando a necessidade e importância de fazer réplicas aquando da amostragem.

Assim, é nosso objectivo cruzar os dados disponíveis na exploração agrícola (imagens NDVI, cartas de condutividade do solo, etc...) com os respetivos resultados, na expectativa de encontrar algum fator explicativo do aumento da contaminação dos grãos de milho por *Fusarium* spp.

3.3. Resultados das amostras da campanha de 2018 vs 2019

Quando cruzamos os resultados das campanhas de 2018 e 2019, é possível verificar-se uma discrepância nos efeitos dos tratamentos com Nefusoil e F-BAC. Enquanto em 2018, aparentou existir uma relação entre a aplicação destes tratamentos e o aumento de grãos contaminados com *Fusarium* spp., em 2019, esta correlação não parece existir.

Esta disparidade de resultados pode, na nossa opinião, dever-se a três grandes fatores:

- 1) Em 2018 não se fizeram réplicas, pelo que a amostragem pode não ser representativa do que realmente aconteceu no campo, podendo a amostra

analisada corresponder por exemplo a um *outlier* (como aparenta acontecer com a réplica 3 do milho tratado com F-BAC na Quinta da Cholda em 2019);

- 2) As condições e fatores bióticos e abióticos presentes em São João de Brito não são iguais aos existentes na Quinta da Cholda, pelo que a sua influência nos efeitos dos tratamentos pode também ser diferente, gerando resultados díspares (mesmo em 2018, o aumento da presença de *Fusarium* spp. em São João de Brito foi mais intenso do que na Quinta da Cholda);
- 3) Tratando-se de campanhas agrícolas diferentes, as condições climatéricas e os fatores bióticos e abióticos não são, necessariamente, os mesmos, influenciando e gerando resultados provavelmente diferentes, o que justifica a necessidade de mais um ano de observações.

4. Análises de solos

As amostras de solos recolhidas em 2018 foram provenientes de 5 parcelas de 3 explorações agrícolas: Estação Experimental António Teixeira; Quinta da Cholda (Testemunha); Quinta da Cholda (F-BAC); Arminda da Luz e Labruja. A qualidade dos solos foi avaliada através de análises físico-químicas e de um bioensaio com feijão para avaliar a sanidade radicular.

4.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas dos solos foram realizadas no laboratório de análises de solos do INIAV e os resultados apresentados na tabela 6 evidenciam níveis de fósforo extraível muito elevados, em especial na parcela da Quinta da Cholda tratada com F-BAC.

Este resultado é extremamente relevante para o agricultor. Tendo em conta que o F-BAC é um fertilizante rico em fósforo, revela-se desaconselhável o seu uso neste tipo de solo.

Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas de amostras de solo recolhidas de 5 parcelas de 3 explorações agrícolas: Estação António Teixeira; Quinta da Cholda (Testemunha), Quinta da

Cholda (F-BAC), Arminda da Luz e Labruja.

Parâmetros	Estação António Teixeira	Quinta Cholda (Test)	Quinta Cholda (FB)	Arminda Luz	Labruja
Fósforo extraível (P ₂ O ₅ mg/Kg)	250	492	1098	204	277
Potássio Extraível (K ₂ O mg/kg)	130	283	283	259	151
Magnésio extraível (Mg mg/kg)	92	>220	209	129	83
Matéria Orgânica (%)	1,55	1,60	1,73	1,60	1,03
Textura	Grosseira	Fina	Fina	Fina	Média
pH (H ₂ O)	5,7	8,1	7,6	6,2	6
Nec. Cal (CaCO ₃ t/ha)	0	0	0	0	0
Ferro extraível (Fe mg/Kg)	12	278	344	294	109
Manganês extraível (Mn mg/Kg)	76	192	194	210	64
Zinco extraível (Zn mg/Kg)	14	4,5	8,3	4,9	2,5
Cobre extraível (Cu mg/Kg)	1,8	13	19	2,6	0,8
Boro extraível (B mg/kg)	<0,20	0,71	0,70	0,51	<0,20

4.2 Bioensaio com feijão

O teste de bioensaio para avaliar a sanidade radicular é uma medida do grau dos sintomas que as raízes de plantas sensíveis apresentam quando cultivadas por um determinado período em condições controladas. É avaliado por inspeção visual após a lavagem das raízes, pelo tamanho da raiz, cor, textura e presença ou ausência de danos potencialmente causados por organismos patogénicos radiculares. A pressão patogénica é classificada de 2 a 9 e os números mais altos indicam um maior dano induzido por organismos patogénicos, como o *Fusarium*. Uma elevada pressão patogénica indica que os organismos causadores de doenças estão presentes sem que outros organismos sejam capazes de os suprimir, revelando um desequilíbrio do micro e/ou microbioma do solo.

O protocolo adotado foi o do Soil Health Laboratory, University of Cornell, USA (adaptado de Abawi, G.S., J.W. Ludwig, C.H. Petzoldt. 2004. Assessing root

health by a soil bioassay with beans as an indicator of soil health. *Phytopathology* 94:(Suppl.):S1) em que aproximadamente 200 ml de solo fresco de cada uma das 5 amostras provenientes das parcelas foram colocados em vasos. Cada amostra de solo foi ensaiada em 10 vasos e em cada vaso foi plantada uma semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*, variedade Wyatt de Harris-Moran, USA). As 50 plantas foram mantidas em estufa sob condições controladas e regadas regularmente durante 4 semanas. As plantas foram posteriormente removidas dos seus recipientes e as raízes lavadas e classificadas como descrito no protocolo.

Os resultados obtidos mostraram que as raízes das plantas cultivadas nos solos das parcelas da Estação Experimental António Teixeira e Quinta da Cholda (Testemunha) apresentam textura branca grossa e aspeto saudável. Em contrapartida, as raízes das plantas cultivadas nos solos das parcelas da Labruja e Arminda da Luz apresentam lesões e sintomas de presença de organismos patogénicos (Fig. 7).

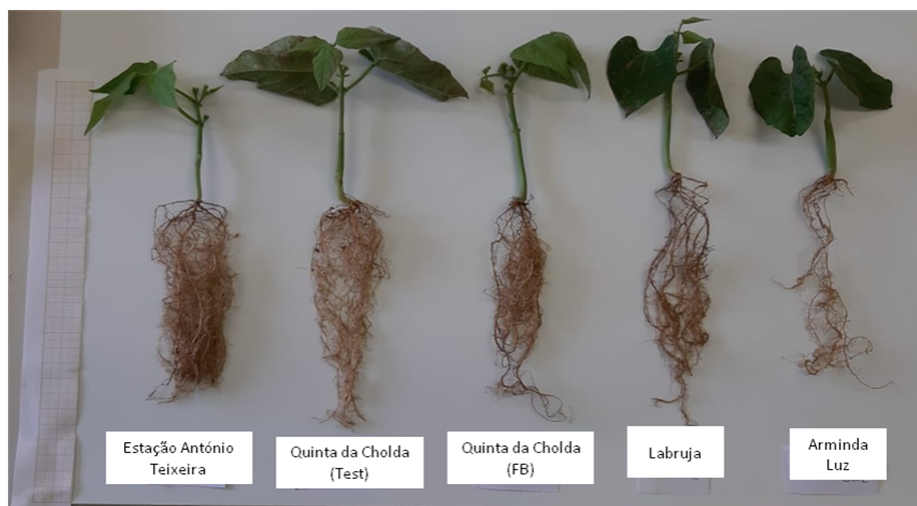


Figura 7: Bioensaio com feijão que evidencia a sanidade radicular das amostras de solos das 5 parcelas.

4.2.1 Detecção de *Fusarium* spp.

A deteção de *Fusarium* spp. foi realizada nas raízes e caules dos feijoeiros. Cortou-se e isolou-se 10 fragmentos das raízes e 5 dos caules de cada amostra de feijoeiros e seguiu-se o mesmo procedimento definido para a análise dos grãos de milho. Nestas amostras apenas foi feita identificação morfológica, tendo sido identificadas apenas 2 espécies de *Fusarium*: *F. verticillioides* e *F. oxysporum* (Figura 8). As plantas das quais foi possível obter mais isolados de *Fusarium* foram as provenientes da Quinta da Cholda.

Por outro lado, as plantas provenientes da Soc. Agr. São João de Brito foram as com menos isolados de *Fusarium* detetados. Estes resultados quantitativos, no entanto, não são extrapoláveis atendendo a que o número de plantas de feijoeiro recebidas não foi o mesmo para todas as propriedades e não foram feitos nem

controles, nem réplicas que nos permitam compreender o significado e veracidade dos resultados obtidos.

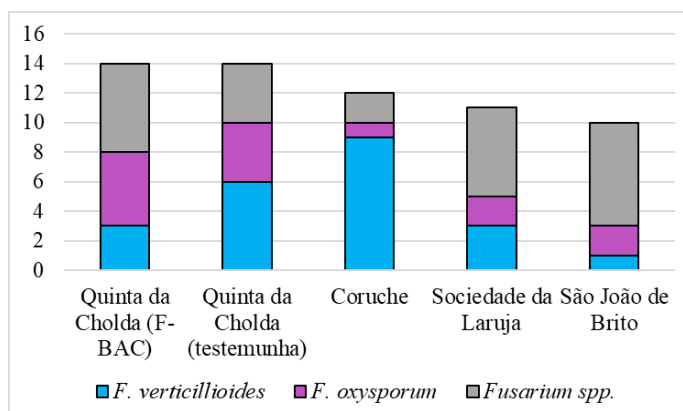


Figura 8 – Resultados da análise micológica para *Fusarium* spp. às plantas de feijoeiro provenientes das diferentes propriedades.

5. Plano de ação para 2020

5.1. Ensaio de armazenamento da campanha de 2019

Do material recolhido em 2019, foram selecionadas amostras para a realização do ensaio de armazenamento. Onze amostras de 10Kg (P0933, AL3 e JC5 com monitorização sondas; AL4 com e sem Novimold® CP98; JC4 com e sem tratamento de óleo; JC3 com e sem tratamento de mostarda (3) foram colocadas em barricas nas instalações da AGROMAIS a dezembro de 2019 e as micotoxinas irão ser monitorizadas em 5 datas de controle durante 8 meses (165 determinações= 55 amostras x 3 réplicas).

5.2. Amostragem da campanha de 2020

Na campanha de 2020 é objetivo do INIAV repetir as modalidades de 2019 na Quinta da Cholda, nas mesmas parcelas (geográficas) e em parcelas individualizadas.

Pretende-se também testar o aumento de fertilização noutros tipos de solo do mesmo produtor, de modo a elucidar sobre os seus efeitos na presença de *Fusarium* spp. e micotoxinas, mas seguindo um delineamento experimental melhorado e mais adequado, que permita uma análise mais precisa e confiável.

5.3. Desenvolvimento e implementação de métodos rastreio de *Fusarium*

Em 2019, o número de placas necessário ao isolamento de todas as espécies de *Fusarium* presentes nos grãos de milho, sementes e feijoeiros ascendeu a 2.365 e o número de isolados foi de 621, dos quais 181 caracterizados por biologia molecular. Isto representa um elevado custo de reagentes e consumíveis, mas também de recursos humanos. Assim, em 2020, é objetivo do Laboratório de OGM do INIAV o desenvolvimento e otimização de um método de deteção das espécies do género *Fusarium* com maior interesse para o estudo, ou seja, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, por PCR em tempo-real específico para a deteção direta a partir dos grãos de milho. Para além disso, pretende-se ainda detetar as

estirpes produtoras de fumonisinas utilizando a mesma técnica, porém com *primers* específicos para os genes responsáveis pela sua produção. Este tipo de procedimentos permitirá saber mais prontamente se as amostras em questão estão contaminadas com estas espécies e com as estirpes relevantes, permitindo o seu rastreio mais precocemente.

6. Desenvolvimento de um sistema de monitorização

Em relação à tarefa 3.5 “Desenvolvimento de um sistema de monitorização (Hr e T - armazenamento), cabe referir que a 1ª fase foram instalados pelo ISQ sensores de temperatura, humidade, com comunicação wireless para registo de parâmetros monitorizados no milho armazenado nos silos e no armazém da Agromais.

Numa 2ª fase foram também instalados sensores em 6 barricas contendo amostras de milho, provenientes dos campos demonstradores, envolvidos no projeto, que correspondem a diversos métodos de fertilização.

Numa 3ª fase foram também controladas novamente 6 barricas contendo amostras de milho, provenientes dos campos demonstradores, desta vez relativas à campanha seguinte.

Estes dados são obtidos remotamente em tempo real e consultados em forma gráfica o que permite uma tomada de decisão assertiva e rápida.

Em todas as fases, embora não previsto no plano de trabalhos e de investimentos, foram instaladas, no milho proveniente dos ensaios em campo, sondas de CO₂, uma vez que este indicador pode ser uma ferramenta válida para detecção precoce das actividades dos fungos.

De seguida estão apresentados, a título demonstrativo o tipo de gráficos que é atualmente gerado pelo sistema (temperatura, humidade e concentração de CO₂).

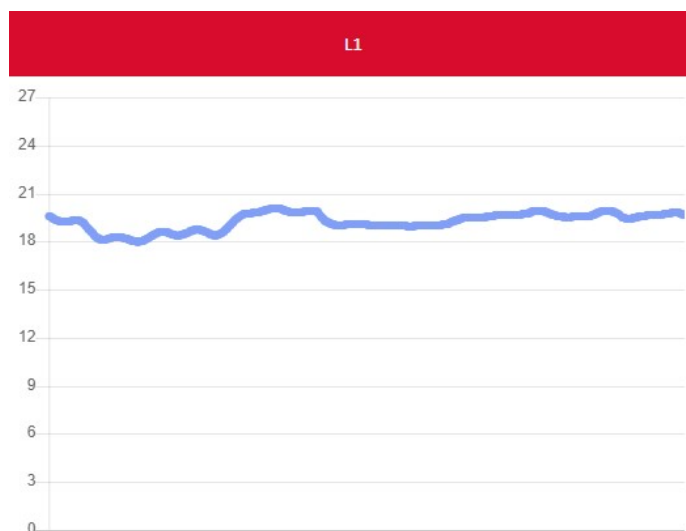


Figura 1 - Gráfico de temperatura da barrica L1

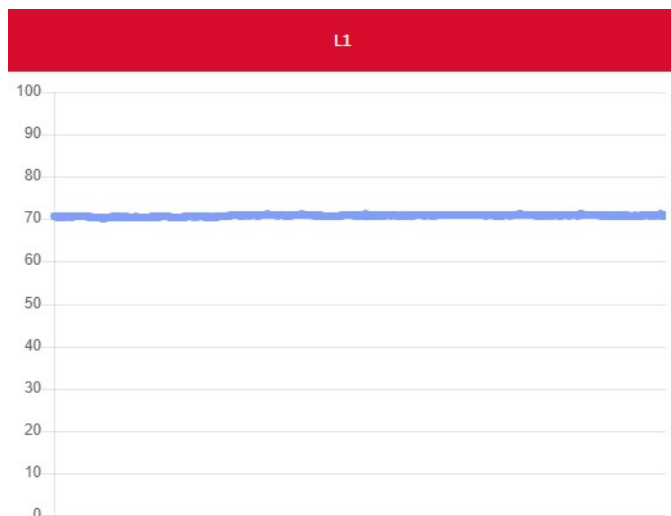


Figura 2 - Gráfico de humidade da barrica L1

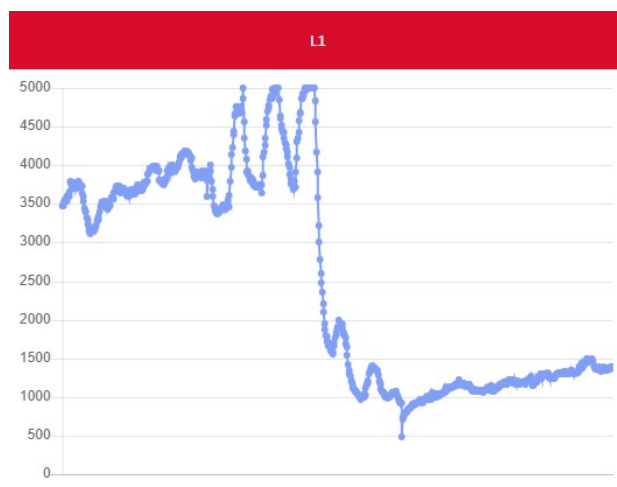


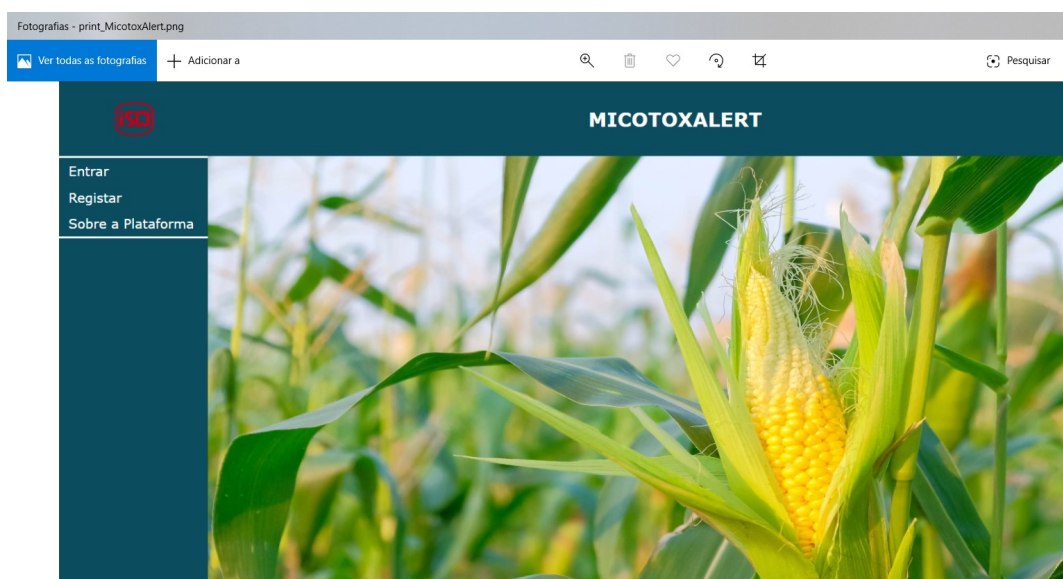
Figura 3 - Gráfico de concentração de dióxido de carbono da barrica L1

Estes gráficos são construídos a partir de um ficheiro de big data que é usado na plataforma MICOTOX ALERT que se encontra em pleno desenvolvimento aguardando a coleta do maior número de dados possível.

De seguida apresenta-se um excerto deste ficheiro que contem milhares de registos (refere-se aos dados de monitorização de uma das amostras- L1):

ID da leitura	ID caso estudo	Nome	Data Hora	Temperatura (°C)	Humidade (%)	CO2 (ppm)
36038	1 L1		23-06-2019 18:32:44	19.64	70.74	1466.00
36032	1 L1		23-06-2019 18:01:45	19.66	70.83	1477.00
36026	1 L1		23-06-2019 17:30:53	19.66	70.83	1497.00
36020	1 L1		23-06-2019 17:00:01	19.66	70.83	1489.00
36014	1 L1		23-06-2019 16:29:04	19.64	70.83	1469.00
36008	1 L1		23-06-2019 15:58:11	19.64	70.94	1415.00
36002	1 L1		23-06-2019 15:27:17	19.63	70.83	1449.00
35996	1 L1		23-06-2019 14:56:26	19.63	70.83	1429.00
35990	1 L1		23-06-2019 14:25:31	19.64	70.83	1410.00
35984	1 L1		23-06-2019 13:54:35	19.63	70.83	1377.00
35978	1 L1		23-06-2019 12:52:39	19.62	70.83	1412.00
35972	1 L1		23-06-2019 12:21:44	19.62	70.83	1433.00
35966	1 L1		23-06-2019 11:50:47	19.62	70.83	1396.00
35960	1 L1		23-06-2019 11:19:48	19.61	70.83	1385.00
35954	1 L1		23-06-2019 10:48:55	19.60	70.93	1333.00
35948	1 L1		23-06-2019 10:18:00	19.60	70.83	1322.00
35942	1 L1		23-06-2019 09:47:07	19.60	70.83	1312.00
35936	1 L1		23-06-2019 08:45:01	19.57	71.01	1316.00
35930	1 L1		23-06-2019 08:13:55	19.57	70.83	1318.00
35924	1 L1		23-06-2019 07:42:56	19.56	71.01	1306.00
35918	1 L1		23-06-2019 07:12:02	19.56	70.73	1310.00
35912	1 L1		23-06-2019 06:41:01	19.55	71.01	1335.00
35906	1 L1		23-06-2019 06:10:01	19.54	71.01	1306.00
35900	1 L1		23-06-2019 05:39:09	19.50	70.72	1348.00
35894	1 L1		23-06-2019 05:08:11	19.50	70.82	1332.00
35888	1 L1		23-06-2019 04:06:18	19.48	70.92	1348.00
35882	1 L1		23-06-2019 03:35:24	19.47	70.72	1321.00
35876	1 L1		23-06-2019 03:04:31	19.47	70.72	1307.00
35870	1 L1		23-06-2019 02:33:29	19.46	70.82	1298.00
35864	1 L1		23-06-2019 02:02:33	19.44	70.91	1320.00
35858	1 L1		23-06-2019 01:31:34	19.44	70.91	1295.00
35852	1 L1		23-06-2019 01:00:41	19.44	70.82	1327.00
35846	1 L1		22-06-2019 23:58:45	19.43	70.82	1315.00
35840	1 L1		22-06-2019 23:27:36	19.43	70.91	1299.00
35834	1 L1		22-06-2019 22:56:37	19.43	70.82	1302.00
35828	1 L1		22-06-2019 22:25:40	19.43	70.82	1324.00
35822	1 L1		22-06-2019 21:54:46	19.44	70.82	1312.00
35816	1 L1		22-06-2019 21:23:46	19.44	70.82	1298.00
35810	1 L1		22-06-2019 20:52:33	19.46	70.91	1310.00
35804	1 L1		22-06-2019 19:50:30	19.48	71.01	1298.00
35798	1 L1		22-06-2019 19:19:31	19.49	70.82	1304.00
35792	1 L1		22-06-2019 18:48:37	19.50	70.82	1316.00
35786	1 L1		22-06-2019 18:17:44	19.53	70.92	1316.00
35780	1 L1		22-06-2019 16:12:18	19.60	70.93	1303.00
35774	1 L1		22-06-2019 15:40:52	19.63	70.83	1301.00
35768	1 L1		22-06-2019 15:09:46	19.68	70.83	1297.00
35762	1 L1		22-06-2019 14:38:52	19.70	71.05	1269.00
35756	1 L1		22-06-2019 14:07:52	19.73	70.83	1266.00
35750	1 L1		22-06-2019 13:36:56	19.75	70.94	1246.00
35744	1 L1		22-06-2019 12:34:52	19.79	70.94	1259.00
35738	1 L1		22-06-2019 12:03:59	19.81	71.06	1234.00
35732	1 L1		22-06-2019 11:32:49	19.83	71.07	1252.00
35726	1 L1		22-06-2019 11:01:55	19.84	70.98	1271.00

Na Fase de Desenvolvimento 4 “Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão”: Foi desenvolvida toda a base de dados e o *front-end* da plataforma “MICOTOX ALERT”, com classificação de diferentes tipologias de usuários, produtores (exploração agrícola) e agrupamento de produtores (armazenamento). Foi também desenvolvida a arquitetura geral dos sistemas de previsão que aguarda a coleta do maior número de dados possível, para afinar estes modelos de previsão.



Os modelos de previsão (exploração, transporte e armazenamento), irão correr nesta plataforma e terão por base os dados que estão recolhidos remotamente pelos sensores em cada uma das fases referidas anteriormente, bem como todos os dados provenientes dos cadernos de campo das explorações agrícolas onde decorreram os ensaios, e ainda, as informações meteorológicas das explorações agrícolas (obtidas através da rede de estações meteorológicas pertencentes à Agromais).

B. Execução Financeira:

Em relação à execução financeira deste projecto, esta encontra-se aquém do desejável. Uma das principais razões para esta realidade, prende-se com a grande morosidade que se está a verificar na análise dos Pedidos de Pagamento, que impede a entrega de um novo PP, enquanto o anterior não estiver cabimentado.

Designação das entidades	Investimento Elegível Aprovado (€) ⁽¹⁾	Investimento Elegível Realizado (€) ⁽²⁾	Taxa de Execução (%) ⁽³⁾
ANPROMIS	120.620,56€	28.672,38	24%
AGROMAIS	74.832,49€	13.412,73	18%
Instituto da Soldadura e Qualidade	94.803,90€	24.747,52	26%
INIAV	146 430,34	48 136,31	33%
Sociedade Agrícola da Quinta da Labruja	5.393,66€	640,78	12%
Sociedade Agrícola de S. João de Brito	8.209,39€	623,96	7%
Quinta da Cholda	9.043,78€	1.843,45	20%
Arminda Aurora D. Henriques Sousa Luz	8.715,65€	1.685,40	20%

C. Desvios:

Como referido ao longo deste relatório, o plano inicialmente previsto foi cumprido na sua quase totalidade.

Os resultados das análises laboratoriais que têm sido obtidos ao longo do projecto, têm-nos permitido orientar as tarefas a implementar de acordo com o melhor interesse para atingir os objectivos que nos propomos atingir.

Por outro lado e tendo em conta a necessidade de adaptarmos os métodos de análise às nossas condições de produção e ajustarmos os ensaios de milho instalados no campo aos resultados que fomos obtendo ao longo dos três anos do projecto, foi solicitada autorização ao Secretariado Técnico do PDR2020 autorização para prolongarmos a conclusão deste projecto até 28/02/2021.

Este adiamento permitir-nos-á implementarmos mais um ano de ensaios em 2020, com a recolha de um maior número de dados de campo e laboratoriais que nos possibilitará não só monitorizarmos de uma forma mais pormenorizada a presença de micotoxinas nos grãos de milho recolhidos, como delinear-mos com maior certeza a sua variação ao longo das diversas fases de produção e de armazenamento. Este pedido de alteração (PALT) foi aprovado pelo ST PDR2020, em 13/11/2019.

D. Disseminação e divulgação:

A disseminação dos dados deste projecto tem decorrido de acordo com o previsto, destacando-se a divulgação efectuada pelo INIAV que participou em diversos fóruns onde o projecto foi divulgado, nomeadamente no workshop do projeto Europeu Myco Key Junho 18-19, 2019, Agroscope, Zurique, Suíça (Carla Brites), 41st Mycotoxin Workshop Lisboa de 6 a 8 de maio de 2019 (Ana Sanches Silva), 18th Congress of European Mycologists Varsóvia, Polónia, 16-21 de setembro 2019 (Eugénio Diogo) e no 1º Simpósio INIAV para Segurança Alimentar (Carla Brites, Ana Sanches Silva, Andreia Freitas, Andreia Soares, Bruna Carbas, Jorge Barbosa).

E. Trabalhos publicados:

Brites C, Sanches Silva A, Freitas A, Barbosa J (2019). Micotoxinas no milho e seu controle. *Vida Rural* nº 1848, 34-36.

Freitas A, Barros S, Brites C, Barbosa J, Silva AS (2019). Validation of a Biochip Chemiluminescent Immunoassay for Multi-Mycotoxins Screening in Maize (*Zea mays* L.). *Food Analytical Methods* <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01625-1>

Silva AS, Brites C, Vila Pouca A, Barbosa J, Freitas A (2019). UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation. *Current Research in Food Science* 1:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.07.001>

Silva AS, Freitas A, Soares A, Pinto T, Barbosa J, Brites C (2019). New insights for mycotoxin mitigation in the maize chain. *1º Simpósio INIAV para Segurança Alimentar*, Vila do Conde, 28 Nov 2019.

Simões D, Andrade E, Brites C, Diogo E (2019). Detection of *Fusarium* species producers of fumonisins in maize grains in Portugal. *18th Congress of European Mycologists*, Varsóvia, Polónia, 16-21 de Set 2019.

Lisboa, 28 de Fevereiro de 2020