



QUALIMILHO

NOVAS ESTRATÉGIAS
DE INTEGRAÇÃO SUSTENTÁVEIS
QUE GARANTAM A QUALIDADE
E SEGURANÇA NA FILEIRA
DO MILHO NACIONAL



anpromis
associação nacional dos produtores de milho e sorgo



agromais
Entrepósito Comercial Agrícola, C.R.L.



iniav

Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.



ISQ

Índice

01.

Identificação do projeto / 07

02.

Entidades que participam no projeto / 09

03.

Caracterização sumária do projeto/ objetivos do projeto / 11

04.

Descrição das atividades desenvolvidas / 13

04.1. Otimização das práticas agrícolas / 13

04.2. Caracterização do milho à colheita e pós-colheita / 14

04.2.1. Identificação e quantificação das micotoxinas / 14

04.2.2. Caracterização micológica / 15

04.3. Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão / 15

04.4. Processos de demonstração, divulgação e disseminação / 15

05.

Principais resultados obtidos / 17

05.1. Definição dos parâmetros técnicos / 17

05.2. Caracterização dos solos / 17

05.2.1. Análises físico-químicas / 18

05.2.2. Bioensaio com feijão / 19

05.3. Caracterização das colheitas / 22

05.3.1. Amostragem no campo para detecção de fungos no grão / 22

05.3.2. Detecção dos fungos no grão / 24

05.3.3. Monitorização das micotoxinas / 33

05.4. Ensaio de armazenagem / 35

05.5. Resultados de outros parâmetros de qualidade do grão / 38

05.6. Desenvolvimento de um sistema de monitorização / 40

05.7. Desenvolvimento e implementação de métodos rastreio de *Fusarium* / 44

06.

Objetivos atingidos / 46

07.

Indicadores de realização física / 48

08.

Trabalhos publicados / 50



Índice de figuras

Figura 1. Representação gráfica do delineamento de amostragem de solo realizada em 2020 para análise química e bioensaios. / **17**

Figura 2. Bioensaio com feijão que evidencia a sanidade radicular das amostras de solos recolhidas em 2019 de 5 parcelas. / **19**

Figura 3. Bioensaio com feijão que evidencia a sanidade radicular das amostras de solos recolhidas em 2020 da Estação Experimental António Teixeira e Quinta da Cholda. / **20**

Figura 4. Resultados da análise micológica para *Fusarium spp.* das plantas de feijoeiro provenientes do bioensaio de 2019 com solo das diferentes parcelas. / **21**

Figura 5. Resultados da análise micológica para *Fusarium spp.* às plantas de feijoeiro provenientes do ensaio de 2020, por parcela da Quinta da Cholda e tipo de solo, num total de 12 pedaços de raiz analisados. / **22**

Figura 6. Sonda de amostragem de grão com 3 câmaras. / **23**

Figura 7. Delineamento experimental adotado na campanha de 2020. As três modalidades de maior comprimento foram efetuadas de acordo com o realizado em 2019; as modalidades transversais representam os blocos casualizados. / **23**

Figura 8. Número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies por modalidade e exploração agrícola, relativos à amostragem de 2018. / **26**

Figura 9. Número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies por modalidade e exploração agrícola, relativos às amostras retiradas após 4 meses de armazenamento e aquando do pico de CO₂, em 2018. / **27**

Figura 10. 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 S.A. São João de Brito; B – Resultados da fertilização com potássio, magnésio e enxofre (Patentkali), na S.A. Quinda da Labruja. / **27**

Figura 11. Resultados da campanha de 2018 sobre o efeito da aplicação de F-BAC na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* / **28**

Figura 12. Comparação da diversidade de espécies de *Fusarium* das amostras colhidas aquando da colheita do milho e após 4 meses de armazenamento. / **29**

Figura 13. Resultados da campanha de 2019 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, na Quinta da Cholda. / **30**

Figura 14. Resultados da campanha de 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda. / **31**

Figura 15. Resultados da campanha de 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda. / **32**

Figura 16. Comparação dos resultados da campanha de 2019 e 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na porcentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.*, na Quinta da Cholda. / **33**

Figura 17. Total de fumonisinas (FB1+FB2) no milho recolhido em 8 ensaios conduzidos em explorações da região do Vale do Tejo (A, B, C) recolhidas na maturidade fisiológica (1ª data), após 10 dias (2ª data) a após 20 dias (3ª data). / **34**

Figura 18. Total de fumonisinas no milho proveniente de 3 ensaios e de 2 explorações do Vale do Tejo determinadas na altura da colheita, após 4 e 6 meses de armazenamento em barricas. JC3-fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e tratamento antifúngico com F-BAC; JC4-sem tratamento; L2-fertilização com macronutrientes (K, Mg, S) usando Patentkali. / **35**

Figura 19. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio de fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e F-BAC tratado com mostarda e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **36**

Figura 20. Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) no milho proveniente do ensaio de fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e F-BAC tratado com mostarda e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **36**

Figura 21. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio de campo testemunha fertilização tratado com óleo de sêmea de arroz e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **37**

Figura 22. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio com aplicação de Nefusoil e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **37**

Figura 23. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio da exploração agrícola Arminda Luz com aplicação de NOVIMOLD® CP98 e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **38**

Figura 24. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio da Estação António Teixeira da variedade V1 e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas. / **38**

Figura 25. Sondas (TEKON's DUOS hygrotemp e CO₂) utilizadas para monitorização do CO₂ no milho armazenado em barricas na Agromais. / **40**

Figura 26. Representação gráfica da monitorização remota e em tempo real da temperatura (°C), humidade (%) e concentração de CO₂ (ppm) através de sondas instaladas nas barricas de armazenamento de milho colocadas na Agromais. / **41**

Figura 27. Home page da plataforma "MICOTOX ALERT". / **41**

Figura 28. Distribuição das temperaturas (°C) e humidades (%) durante o ciclo produção do milho registadas na estação meteorológica de Lavra-Riachos. / **42**

Figura 29. Sistemas de alertas gerados na plataforma "MICOTOX ALERT" através da recolha de dado das temperaturas (°C) e humidades (%) registadas na estação meteorológica de Lavra-Riachos. / **42**

Figura 30. Representação gráfica da humidade relativa, temperatura e dados de CO₂ registados pelas sondas colocadas em barricas de durante o armazenamento do milho por seis meses. (a) Milho da parcela JC3; (b) Milho da parcela JC4. A cor representa o nível de CO₂, de vermelho (5000 ppm) a azul (0 ppm). / **43**

Figura 31. Sistemas de alertas gerados na plataforma "MICOTOX ALERT" através da recolha remota dos dados emitidos pelos sensores colocados durante o armazenamento do milho. / **43**

Figura 32. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de annealing de 60°C específico para *Fusarium subglutinans*. A. Resultados de amplificação. B. Resultados do Melt. / **44**

Figura 33. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de annealing de 62°C específico para *Fusarium verticillioides*. A. Resultados de amplificação. B. Resultados do Melt. / **45**

Figura 34. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de annealing de 62°C específico para *Fusarium proliferatum*. A. Resultados de amplificação. B. Resultados do Melt. / **45**

Índice de tabelas

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas de amostras de solo recolhidas de 5 parcelas de 4 explorações agrícolas: Estação António Teixeira; Quinta da Cholda (Testemunha), Quinta da Cholda (F-BAC), Arminda da Luz e S.A. Quinta da Labruja. / **18**

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas das 10 amostras de solo recolhidas nas parcelas em estudo na Quinta da Cholda (Onias 1-9) e do caminho da Estação António Teixeira (EEAT). Onias 01 - Testemunha franco; Onias 02 - Nefusoil franco; Onias 03 - Nefusoil argiloso; Onias 04 - F-Bac franco; Onias 05 - F-Bac argiloso; Onias 06 - Blocos casualizados franco; Onias 07 - Blocos casualizados argiloso; Onias 08 - Testemunha arenoso; Onias 09 - Blocos casualizados arenoso. / **19**

Tabela 3. Condições de PCR para amplificação de um fragmento do gene TEF em *Fusarium spp.* / **25**

Tabela 4. Valores médios (n=9) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxinivalenol (DON) em µg/kg no milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda. / **34**

Tabela 5. Valores médios (n=9) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxinivalenol (DON) em µg/kg no milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda. / **34**

Tabela 6. Valores médios (n=6) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxinivalenol (DON) em µg/kg no milho recolhido em 2020 de 5 variedades semeadas em Coruche e na Golegã com 3 repetições de campo. / **35**

Tabela 7. Médias dos resultados (n=6) da composição química básica (%) e carotenóides expressos em luteína (ppm) do grão de milho de 5 variedades recolhido em 2020 e proveniente dos ensaios realizados em Coruche e na Golegã. / **39**

Tabela 8. Médias dos resultados (n=6) do perfil de viscosidades (cP) das farinhas de 5 variedades recolhidas em 2020 e proveniente dos ensaios realizados em Coruche e na Golegã. / **39**

Tabela 9. Valores médios (n=6) da composição química básica (%) do grão de milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda. / **39**

Tabela 10. Valores médios (n=6) da composição química básica (%) do grão de milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda. / **39**

Tabela 11. Composição química básica (% média ± desvio padrão de 2 réplicas) do grão de milho no final do ensaio de armazenamento. / **40**

Tabela 12. Indicadores de realização do Grupo Operacional QualiMilho. / **49**

01.

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Designação do plano de ação:

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

Data de início do plano de ação:

01/ 03/ 2017

Data de conclusão do plano de ação:

31/12/2021

Nº do grupo operacional:

PDR2020 - 101-031291 (Líder)

Parceria n.º 34 / Iniciativa n.º 52

02.

ENTIDADES
QUE PARTICIPAM
NO PROJETO



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

03.

OBJETIVOS DO PROJETO



O Grupo Operacional QualiMilho analisou a problemática das micotoxinas na fileira do milho e os riscos de contaminação antes e após a colheita, através de uma abordagem sistémica (práticas agrícolas, quantificação e caracterização dos fungos presentes, micotoxinas no armazenamento, entre outros) e visando a implementação de uma estratégia de apoio à decisão.

O plano de ação do Qualimilho

contemplou os seguintes objetivos:

Principais:

1. Identificar fungos potencialmente produtores de micotoxinas que ocorrem nos campos de milho e nos grãos armazenados para comercialização em Portugal.
2. Detetar e identificar as micotoxinas associadas aos fungos previamente identificados.
3. Determinar a frequência das micotoxinas mais relevantes.
4. Desenvolver, testar e demonstrar novos sistemas agrícolas que limitem a presença dos fungos produtores de micotoxinas.

Específicos:

5. Implementar um sistema de monitorização de temperatura e teor de humidade durante a conservação do milho.
6. Implementar e validar métodos rápidos de rastreio de micotoxinas em algumas fases da produção ou armazenamento de milho.
7. Adaptar e implementar métodos de deteção e identificação das principais espécies de *Fusarium*.
8. Desenvolver modelos de previsão e um novo processo de apoio à decisão, o MICOTOX ALERT, que integra as etapas antes e após a colheita para orientar precocemente a valorização dos lotes de milho, em função da qualidade do grão e dos níveis de contaminação, garantindo que a sua introdução na cadeia alimentar humana e animal é segura.

04.

DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O plano de ação do QualiMilho

foi implementado durante 3 campanhas de milho (2018, 2019, 2020 e 2021) e contemplou 4 atividades:

01.

Otimização das práticas agrícolas;

02.

Caracterização dos fungos e micotoxinas presentes no grão à colheita e durante a conservação (pós-colheita);

03.

Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão;

04.

Atividades de demonstração, divulgação e disseminação.

04.1. Otimização das práticas agrícolas

A otimização das práticas agrícolas foi articulada com os diversos parceiros, nomeadamente no que se refere à escolha das variedades de milho a semear, o tipo de adubo e fitofármacos a implementar.

No âmbito desta atividade realizaram-se as seguintes tarefas:

- i) Avaliação e caracterização do local de instalação dos ensaios: delineamento de ensaio em blocos casualizados na Quinta da Cholda, georreferenciação, recolha e análises (químicas e bioensaios) de solos.
- ii) Definição dos parâmetros técnicos (aplicações de inseticida, fungicidas, adubação de K e N).
- iii) Definição dos parâmetros qualitativos (espécies de fungos e micotoxinas) a avaliar.
- v) Monitorização da cultura no campo.
- vi) Monitorização da temperatura e humidade durante a maturação grão.

04.2. Caracterização do milho à colheita e pós-colheita

A caracterização do milho focou-se na deteção e identificação de fungos do género *Fusarium* e na identificação e quantificação das micotoxinas por estes sintetizadas.

Para a caracterização à colheita, o QualiMilho beneficiou das amostras colhidas nas explorações agrícolas dos 5 parceiros do projeto e, ainda das obtidas nos ensaios realizados no Centro de Competências InovMilho localizado na Estação Experimental António Teixeira, em Coruche. A caracterização nos diferentes momentos pós-colheita foi feita nas amostras do estudo do processo de armazenagem nos silos da Agromais.

04.2.1. Identificação e quantificação das micotoxinas

No âmbito da caracterização da contaminação com micotoxinas realizaram-se as seguintes tarefas:

- i) Seleção das micotoxinas a avaliar entre as que se encontram listadas 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.
- ii) Definição do plano e método de amostragem. No âmbito do QualiMilho, adotámos o Método 64-70.02 da AACC para a recolha de tomas tendo em vista a constituição de uma amostra final de 5 kg que deverá ser moída na íntegra antes de ser analisada, processo esse que é o recomendado pelo método AACC 45-01.01.
- iii) Definição dos pontos de recolha das amostras e da periodicidade da amostragem durante o armazenamento do grão.
- iv) Desenvolvimento, implementação e validação de uma metodologia multicomposto para a determinação quantitativa simultânea das várias micotoxinas, por recurso à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS).
- v) Implementação e validação de métodos rápidos de rastreio de micotoxinas (imunoensaio por quimiluminescência) com limites de deteção inferiores aos limites máximos estabelecidos na legislação e com capacidade de obtenção de resultados qualitativos e quantitativos.
- vi) Determinação da humidade por intermédio de vários métodos de referência e expeditos. Participação no circuito inter-laboratorial organizado pelo BIPEA para a revisão da ISO 6540 'Maize - Determination of moisture content (on milled grains and on whole grains)'.
- vii) Determinação de outros parâmetros da qualidade grão (composição química básica, carotenoides, perfis de viscosidade).

04.2.2. Caracterização micológica

No âmbito da caracterização da contaminação micológica dos grãos de milho realizaram-se as seguintes tarefas:

- i) seleção do género a prospectar face à composição da contaminação em micotoxinas (*Fusarium*).
- ii) Delineamento experimental dos ensaios a realizar em campo.
- iii) Delineamento e implementação do protocolo para isolamento de espécies do género *Fusarium* e sua identificação.
- iv) Depósito de isolados caracterizados na Coleção do INIAV (MEAN).
- v) Seleção, adaptação e implementação de métodos de rt-PCR com SybrGreen para deteção rápida e precoce de espécies de *Fusarium*.

04.3. Desenvolvimento de um sistema de apoio à decisão

No âmbito da atividade relacionada com o apoio à tomada de decisão realizaram-se as seguintes tarefas:

- i) Colocação de sensores de temperatura e humidade com comunicação wireless para monitorização do milho armazenado. Os dados foram obtidos remotamente em tempo real e operacionalizou-se a sua consulta em forma gráfica.
- ii) Desenvolvimento da 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).

04.4. Processos de demonstração, divulgação e disseminação

No âmbito da atividade relacionada com a demonstração, divulgação e disseminação realizaram-se as seguintes tarefas:

- i) Instalação de campos de demonstração (InovMilho, Quinta da Cholda).
- ii) Realização de dias abertos no InovMilho.
- iii) Realização de reuniões de grupo focais com os parceiros do consórcio.
- iv) Publicações técnicas (Vida Rural, Agriterra) e científicas.
- v) Apresentação de poster's em encontros científicos.
- vi) Organização do Colóquio do Milho.
- vii) Elaboração de panfleto de divulgação.
- viii) Divulgação do projeto e dos conteúdos gerados na página Web do INIAV <https://www.iniaiv.pt/projetos/qualimilho> e na plataforma da Rede Rural.

05.

PRINCIPAIS
RESULTADOS
OBTIDOS



05.1. Definição dos parâmetros técnicos

Com base na informação disponibilizada pelos agricultores e da pesquisa de soluções comerciais foram selecionados os seguintes tratamentos:

- // Fertilização com macro e micronutrientes (N, P e Zn)
- // Fertilização com macronutrientes (K, Mg e S) usando Patentkali, (K + S Minerals and Agriculture GmbH, Alemanha).
- // Aplicação do bioestimulante F-BAC (EIBOL Ibérica, S. L. Valencia, Espanha) à base de N, P e Zn (com efeito semelhante a antifúngico).
- // Aplicação do bioestimulante Nefusoil (EIBOL Ibérica, S. L. Valencia, Espanha) à base de N, P e K no solo.
- // Variedades de milho: V1, V2, V3, V4, V5, V6.

05.2. Caracterização dos solos

Em 2019 tomaram-se 5 amostras representativas de parcelas de 3 explorações agrícolas: Estação António Teixeira; Quinta da Cholda (Testemunha); Quinta da Cholda (F-BAC); Arminda da Luz e S.A. Quinta da Labruja. Com base na informação disponível sobre as características pedológicas dos solos, identificou-se uma parcela, objeto de estudo na Quinta da Cholda, para a instalação de ensaios em 2019 e 2020.

Em 2020 tomaram-se 9 amostras de solos representativas da diversidade pedológica e dos tratamentos realizados na parcela da Quinta da Cholda (*Figura 1*). Os resultados obtidos foram comparados com uma amostra de solo de um caminho da Estação Experimental António Teixeira. A qualidade química e sanitária dos solos foi avaliada através de análises físico-químicas e de um bioensaio com feijão, respetivamente.

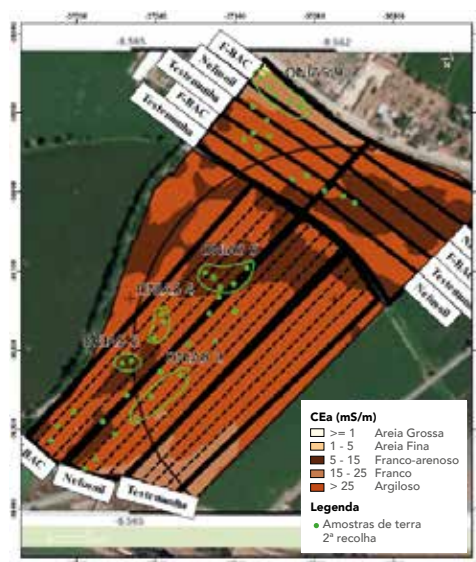


Figura 1.

Representação gráfica do delineamento de amostragem de solo realizada em 2020 para análise química e bioensaios.

05.2.1. Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas dos solos amostrados em 2019 são apresentados na *Tabela 1*.

Os resultados das análises dos solos amostrados na parcela da Quinta da Cholda revelam maiores teores de matéria orgânica e níveis de macro e nutrientes superiores aos amostrados nas parcelas das restantes explorações.

Os resultados das análises físico-químicas dos solos amostrados em 2020 são apresentados na *Tabela 2*.

As amostras de solos da Quinta Cholda (Onias 1-9) revelam níveis de macro e nutrientes muito superiores (excetuando o zinco) aos da amostra do caminho da Estação António Teixeira. Sobretudo no solo arenoso da Quinta da Cholda, os níveis de fósforo extraível detetados foram muito elevados. 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 nestes tipos de solo.

TABELA 1

Amostra	Textura	pH	Mat. Org. (%)	Fósforo ext. (P_2O_5 , mg/ kg)	Potássio ext. (K_2O , mg/ kg)	Mg ext. (mg/ kg)	Fe ext. (mg/ kg)	Mn ext. (mg/ kg)	Zn ext. (mg/ kg)	Cu ext. (mg/ kg)	Boro ext. (mg/ kg)
Estação António Teixeira	Grosseira	5,7	1,55	250	130	92	12	76	14	1,8	<0,20
Quinta da Cholda (Test)	Fina	8,1	1,60	492	283	>220	278	192	4,5	13	0,71
Quinta da Cholda (FB)	Fina	7,6	1,73	1098	283	209	344	194	8,3	19	0,70
Arminda Luz	Fina	6,2	1,60	204	259	129	294	210	4,9	2,6	0,51
S.A. Quinta da Labruja	Média	6,0	1,03	277	151	83	109	64	2,5	0,8	<0,20

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas de amostras de solo recolhidas de 5 parcelas de 4 explorações agrícolas: Estação António Teixeira; Quinta da Cholda (Testemunha), Quinta da Cholda (F-BAC), Arminda da Luz e S.A. Quinta da Labruja.

TABELA 2

Amostra	Textura	pH	Mat. Org. (%)	Fósforo ext. (P_2O_5 , mg/ kg)	Potássio ext. (K_2O , mg/ kg)	Mg ext. (mg/ kg)	Fe ext. (mg/ kg)	Mn ext. (mg/ kg)	Zn ext. (mg/ kg)	Cu ext. (mg/ kg)	Boro ext. (mg/ kg)
Onias 01	Fina	8,0	1,15	565	204	195	219	>110	6,9	19,5	0,66
Onias 02	Fina	8,2	1,10	440	199	202	181	>110	4,2	18,2	0,62
Onias 03	Fina	8,1	1,10	399	283	178	188	>110	4,3	14,5	0,63
Onias 04	Fina	8,3	1,65	599	283	280	210	>110	2,0	11,1	0,71
Onias 05	Fina	8,1	1,40	518	331	285	175	>110	3,8	11,6	0,71
Onias 06	Fina	7,9	1,40	411	331	277	332	>110	2,8	14,3	0,77
Onias 07	Fina	8,1	1,65	620	427	273	259	>110	4,5	13,3	0,79
Onias 08	Fina	8,0	1,40	881	283	191	231	>110	5,7	17,0	0,59
Onias 09	Fina	7,6	1,50	457	427	180	389	91	3,3	14,0	0,73
EEAT	Grosseira	5,7	1,55	250	130	92	12	76	14	1,8	<0,20

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas das 10 amostras de solo recolhidas nas parcelas em estudo na Quinta da Cholda (Onias 1-9) e do caminho da Estação António Teixeira (EEAT). Onias 01 - Testemunha franco; Onias 02 - Nefusoil franco; Onias 03 - Nefusoil argiloso; Onias 04 - F-Bac franco; Onias 05 - F-Bac argiloso; Onias 06 - Blocos casualizados franco; Onias 07 - Blocos casualizados argiloso; Onias 08 - Testemunha arenoso; Onias 09 - Blocos casualizados arenoso.

05.2.2. 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 microbioma do solo.



Figura 2. Bioensaio com feijão que evidencia a sanidade radicular das amostras de solos recolhidas em 2019 de 5 parcelas.

O bioensaio com o feijão foi adotado para avaliar a qualidade do solo. O protocolo adotado foi o do Soil Health Laboratory, University of Cornell, USA (adaptado de Abawi, et al, 2004¹) em que aproximadamente 200 mL de solo fresco de cada uma das 5 amostras (2019) e 10 amostras (2020) provenientes das parcelas foram colocados em vasos. Cada amostra de solo foi ensaiada em 5 vasos e em cada vaso foi plantada uma semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*, variedade Wyatt de Harris-Moran, USA). As 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 em 2019 mostraram que as raízes das plantas de feijão cultivadas nos solos amostrados da Estação 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 S.A. Quinta da Labruja e Arminda da Luz apresentam lesões e sintomas de presença de organismos patogénicos (Figura 2).

Os resultados obtidos em 2020 mostraram que as raízes das plantas cultivadas nos solos das parcelas da Estação Experimental António Teixeira e Quinta da Cholda- Onias 02, 05, 01, 06 e 04 apresentam textura branca grossa e aspeto saudável. Em contrapartida, as raízes das plantas cultivadas nos solos das parcelas Onias 09, 07, 08, 03 apresentam lesões e sintomas de presença de organismos patogénicos (Figura 3).

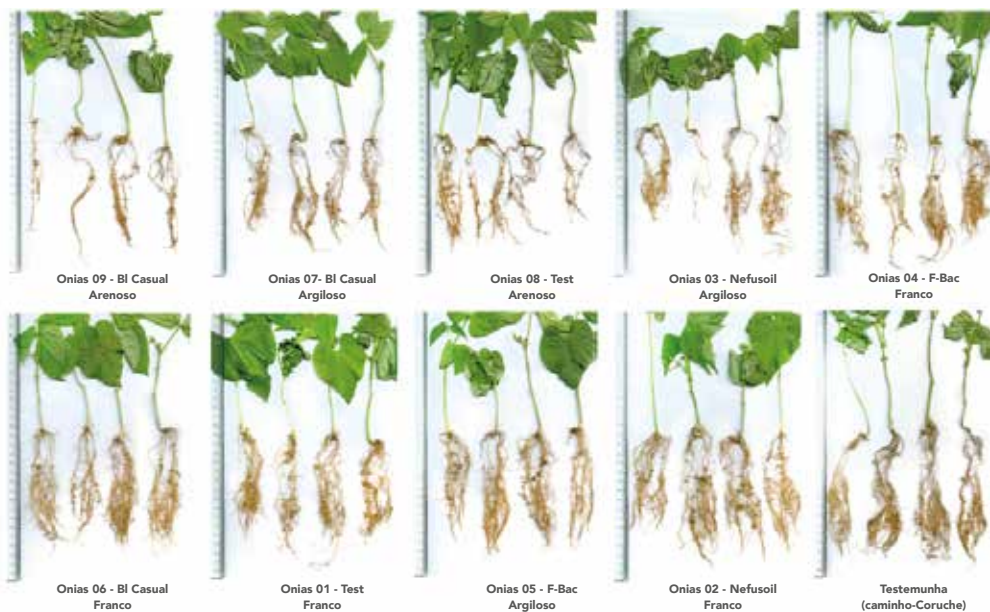


Figura 3. Bioensaio com feijão que evidencia a sanidade radicular das amostras de solos recolhidas em 2020 da Estação Experimental António Teixeira e Quinta da Cholda.

¹ 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

05.2.2.1. Detecção de *Fusarium* spp.

Para além da análise das raízes dos feijoeiros, foi feita a deteção de *Fusarium* spp. e respetiva identificação.

Em 2019, cortou-se e plaqueou-se 10 fragmentos das raízes e 5 dos caules de cada amostra de feijoeiros, seguindo-se o mesmo procedimento definido para a análise dos grãos de milho (*ver ponto 05.3.2.*). Nestas amostras apenas foi feita identificação morfológica, tendo sido identificadas as espécies *F. verticillioides* e *F. oxysporum* (*Figura 4*).

As plantas das quais foi possível obter mais isolados de *Fusarium* foram as provenientes do solo da Quinta da Cholda. Por outro lado, as plantas provenientes de S.A. São João de Brito foram as que resultaram num menor número de isolados de *Fusarium* spp. (*Figura 4*). 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 parcelas e não foram feitos nem controlos nem réplicas que nos permitam compreender o significado e veracidade dos resultados obtidos. Desta forma, em 2020 fez-se o melhoramento do método e repetiu-se o bioensaio, com novas amostras de diferentes tipos de solo provenientes da Quinta da Cholda.

Em 2020, a deteção de *Fusarium* spp. foi realizada apenas nas raízes dos feijoeiros. Cortou-se e plaqueou-se 3 fragmentos das raízes de cada planta de feijoeiro. Para cada tipo de solo amostrado, realizou-se o ensaio com 4 plantas, totalizando 12 pedaços de raízes analisados por cada tipo de solo de cada parcela. Na análise das raízes seguiu-se o mesmo procedimento definido para a análise dos grãos de milho (*ver ponto 05.3.2.*). Nestas amostras apenas foi feita identificação morfológica, tendo sido identificadas *F. solani* e *F. oxysporum*. Estas espécies em condições normais não têm implicações relevantes para a produção de milho sendo que são fungos saprófitas e estão naturalmente presentes no solo. Na parcela tratada com Nefusoil, os feijoeiros em que mais isolados de *Fusarium* foram detetados foram os que cresceram em solo franco, enquanto nos blocos casualizados foram os que cresceram em solo arenoso (*Figura 5*).

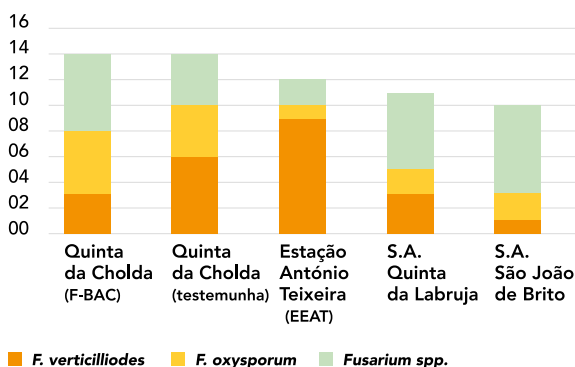
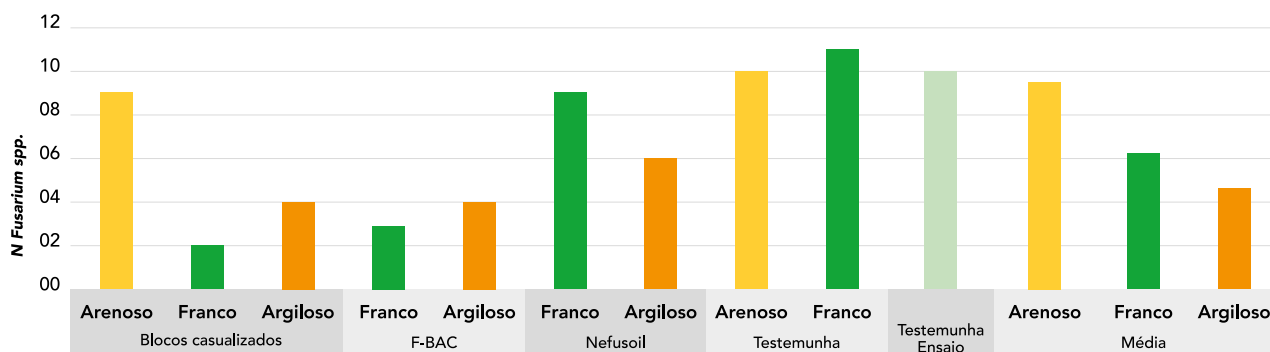


Figura 4.

Resultados da análise micológica para *Fusarium* spp. das plantas de feijoeiro provenientes do bioensaio de 2019 com solo das diferentes parcelas.



Na parcela da testemunha, os feijoeiros apresentaram elevados números de isolados em ambos os tipos de solo (franco e arenoso). O solo argiloso foi o que, em média, menos isolados de *Fusarium* apresentou. Contudo, tendo em conta que diferentes culturas tendem a ter maior propensão para diferentes tipos de fungos, o facto de não se ter usado milho para fazer a análise micológica pode não permitir o isolamento das espécies de *Fusarium* presentes no solo que tendem a infetar o milho e contaminá-lo com fumonisinas. Desta forma, a diversidade e distribuição das espécies de *Fusarium* encontradas nestes feijoeiros podem não ser extrapoláveis para o milho. Aliás, atendendo à elevada contaminação dos grãos de milho com *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, e sabendo que a entrada dos fungos patogénicos no milho se dá essencialmente pela raiz, seria de esperar que fossem essas as espécies mais comumente isoladas nos feijoeiros. Uma vez que tal não se verificou, podemos concluir que o bioensaio com feijoeiros é útil para avaliar a qualidade das características do solo, porém pode não ser adequado à pesquisa de fungos potencialmente patogénicos de outras culturas como o milho.

Figura 5.
Resultados da análise micológica para *Fusarium* spp. às plantas de feijoeiro provenientes do ensaio de 2020, por parcela da Quinta da Cholda e tipo de solo, num total de 12 pedaços de raiz analisados.

05.3. Caracterização das colheitas

O plano de amostragem do grão para caracterização das colheitas de 2018, 2019 e 2020 incidiu em diferentes modalidades dos ensaios conduzidos em Coruche, na Estação Experimental António Teixeira (EEAT), na Golegã e na Quinta da Cholda.

05.3.1. Amostragem no campo para deteção de fungos no grão

Em 2018, a amostragem de milho foi feita na S.A. São João de Brito, na S.A. Quinta da Labruja e na Quinta da Cholda. Em todas as explorações agrícolas foi amostrada a parcela com o tratamento e a respetiva testemunha sendo que na S.A. São João de Brito foram usados Nefusoil e F-BAC, na S.A. Quinta da Labruja foi usado somente Patentkali e na Quinta da Cholda foi aplicado o F-BAC. De cada modalidade foi retirada uma amostra de 10 Kg, aquando da colheita do campo, por um método 3-D. Dos grãos colhidos foram também analisadas subamostras após 4 e 6 meses de armazenamento em barricas, simulando as condições do silo. Cada subamostra consistiu em 5 Kg de grãos e foi colhida por um método 3-D

após a mistura do grão contido na barrica. Depois de 4 meses de armazenamento, foram retiradas para análise micológica as amostras correspondentes às analisadas aquando da colheita de milho, enquanto que após os 6 meses (quando foi detetado um pico de CO₂) apenas foram retiradas para análise micológica as amostras: F-BAC e testemunha da Quinta da Cholda e Patentkali da S.A. Quinta da Labruja. Uma vez que esta metodologia mostrou ter falhas ao nível da representatividade dos campos, em 2019 fez-se um aprimoramento ao método.

Nos anos 2019 e 2020, a amostragem de grãos de milho para análise micológica foi feita apenas na Quinta da Cholda, aquando da colheita. As modalidades na Quinta da Cholda incluíram o tratamento com F-BAC, com Nefusoil e a respetiva testemunha. O grão foi amostrado diretamente da tremonha ou reboque do trator, com recurso a uma sonda de amostragem vertical segmentada (com 7 câmaras), como a representada na **Figura 6**.



Figura 6
Sonda de amostragem de grão com 3 câmaras.

Este tipo de sonda permitiu a recolha aos vários níveis de profundidade, permitindo uma amostragem mais representativa da heterogeneidade do campo.

Cada modalidade do ensaio de 2019 e da sua repetição de 2020, composta por 48 linhas, foi dividida em quatro porções de 12 linhas. No fim da colheita de 12 linhas de milho foi feita uma amostragem, o que corresponde a 4 réplicas por cada modalidade. Cada amostra compôs-se de 10 incrementos, permitindo em cada um retirar 7 tomas representativas da profundidade do atrelado, totalizando 70 tomas por réplica (5 Kg), ou seja, 280 tomas por modalidade (20 Kg). 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.

Em 2020, foi feito também um novo ensaio, noutra parcela da mesma exploração agrícola (Quinta da Cholda), em blocos casualizados (**Figura 7**).

Cada modalidade foi feita aleatoriamente em 3 blocos, de 12 linhas cada, contemplando diferentes tipos de solo. Este ensaio visou validar os resultados obtidos nas parcelas comuns a 2019 e 2020 (**Figura 7**). A amostragem do grão foi feita da mesma forma, totalizando 70 tomas (5 Kg) por cada bloco casualizado, ou seja, 210 tomas (15 Kg) por cada modalidade.

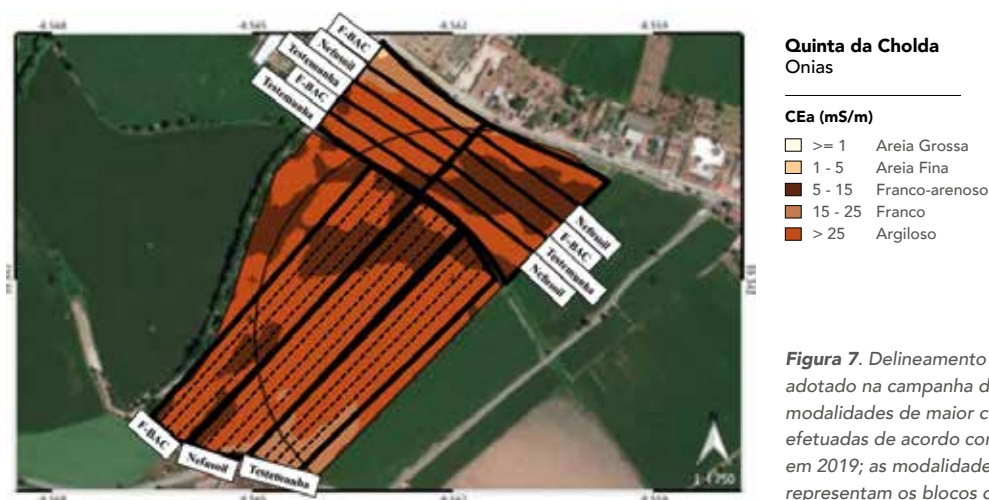


Figura 7. Delineamento experimental adotado na campanha de 2020. As três modalidades de maior comprimento foram efetuadas de acordo com o realizado em 2019; as modalidades transversais representam os blocos casualizados.

05.3.2. Detecção dos fungos no grão

Uma vez que as micotoxinas que apresentaram valores mais elevados foram as Fumonisinias B1 e B2, produzidas essencialmente por espécies do género *Fusarium*, a pesquisa de fungos no grão foi direccionada às espécies que pertencem a este género. Assim, 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 desinfecção superficial foi feita com NaOCl (hipoclorito de sódio) a 1,5%, durante 5 minutos, seguida de três lavagens com água destilada esterilizada e secagem ao ar, dentro da câmara de fluxo em papel de filtro estéril. O plaqueamento dos grãos foi feito segundo o esquema de um grão no centro e um grão por quadrante, totalizando 5 grãos por placa de MGA e 10 placas por amostra. As placas foram incubadas a 27°C durante 7 dias, com 12h de luz e 12h de escuridão. Após os 7 dias de incubação, as placas foram observadas e as colónias de *Fusarium spp.* foram quantificadas e repicadas pela técnica de “esporo único” para placas de PDA (*Potato Dextrose Agar*). Estas placas foram também incubadas durante 7 dias, sob as mesmas condições, acima referidas e, após os 7 dias, as culturas foram observadas, agrupadas em morfotipos e novamente repicadas.

A identificação das culturas foi feita por observação das características macro e microscópicas desenvolvidas após repicagem para CLA (*Carnation Leaf-piece Agar*) e SNA (*Spezieller Nährstoffarmer Agar*) e incubação durante 10 dias, sob as condições acima referidas. Após esses 10 dias, os isolados foram analisados e identificados até à espécie. Sempre que necessário, essa identificação foi 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 sua confirmação por biologia molecular.

Para realizar as técnicas de Biologia Molecular acima referidas, foi necessário otimizar um método rápido de extração de DNA fúngico, usando 200 a 400 µL de Chelex a 5% e esferas de vidro. Este método consiste no rebentamento das membranas celulares dos fungos por fricção com esferas de vidro quando agitadas a elevada frequência (30 Hz durante 30 segundos). A incubação a elevada temperatura (95°C durante 20 minutos) resulta na exposição do DNA. Este é depois purificado por gradiente de densidade. Após a separação de fases (15000 rpm durante 1 minuto) recolhe-se o sobrenadante que contém o DNA. A PCR convencional decorreu no volume final de 25 µL de *mix* dos quais 3 µL eram de DNA. A *mix* consistiu em 5 µL de tampão da enzima (5x), 1,5 µL dos *primers* EF1-728F e EF1-986R (10 µM), 1,5 µL de dNTPs (10 mM), 2,5µL de MgCl₂ (25 mM), 0,3 µL da enzima GoTaq G2Flexi (5 U/µL) e 9,7 µL de água ultrapura com qualidade molecular. O ciclo térmico a que se fez a PCR encontra-se descritas na **Tabela 3**.

Após a PCR, foi necessário confirmar a amplificação do fragmento alvo, purificá-lo e sequenciá-lo. A confirmação foi feita por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) e a purificação foi feita usando 2 µL de EXOSTAR por cada 5 µL de produto PCR e incubando a 37°C e 80°C durante 15 minutos cada. A sequenciação foi feita usando o método de Sanger e os mesmos *primers* que na PCR.

**TABELA 3**

Desnaturação inicial	94°C	5 min.	1x
Desnaturação	94°C	45 seg.	
Hibridação	52°C	30 seg.	39x
Extensão	72°C	90 seg.	
Extensão final	72°C	7 min.	1x

A análise das sequências obtidas foi feita utilizando o software Chromas 2.6.6, seguindo-se a comparação destas com a base de dados do NCBI e posterior obtenção do resultado da identificação de cada isolado à espécie.

Em 2019, fez-se também a pesquisa de *Fusarium spp.* em sementes de milho do lote utilizado na Quinta da Cholda. Uma vez que as sementes têm um revestimento constituído, em parte, por fungicidas e antibióticos, antes de proceder ao normal protocolo, foi necessário fazer duas lavagens em água destilada esterilizada, em agitação durante 28 horas. Após a pré-lavagem, as sementes foram deixadas a secar ao ar, dentro da câmara de fluxo laminar, durante a noite. Após a secagem, procedeu-se ao mesmo protocolo acima descrito para a pesquisa de *Fusarium spp.* em grãos.

As análises estatísticas relativas aos dados obtidos com as análises micológicas foram realizadas com recurso ao software Past 4.03). Primeiramente, foram realizados os testes de homogeneidade (teste de Levene), homocedasticidade (Teste F) e normalidade (Teste Shapiro-Wilk). Quando os três testes resultaram, simultaneamente, em *p-values* superiores a 0,05, foi aplicado o teste ANOVA, enquanto o teste Kruskal-Wallis foi aplicado quando pelo menos um dos *p-values* foi inferior a 0,05. Para *p-values* superiores a 0,05 nos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, considerou-se que as amostras analisadas não eram estatisticamente diferentes.

05.3.2.1. Resultados das amostras da campanha de 2018

Nas amostras colhidas 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 (Figura 8).

A aplicação de F-BAC foi o tratamento que apresentou menor aumento de grãos contaminados, com uma diferença de apenas 4 grãos na Quinta da Cholda e 5 na S.A. São João de Brito, relativamente às respetivas testemunhas. A aplicação de Nefusoil e Patentkali resultou em valores de contaminação com *Fusarium spp.* muito semelhantes, com 98 e 92% dos grãos contaminados, respetivamente. A distribuição das espécies encontradas, do género *Fusarium*, foi semelhante entre as amostras com uma predominância evidente de *F. verticillioides*, seguindo-se *F. subglutinans*. Apenas a amostra tratada com Nefusoil (S.A. SJB) apresentou uma espécie predominante diferente, com 57% dos grãos contaminados por *F. subglutinans* e 43% por *F. verticillioides*. Relativamente à diversidade de espécies, detetou-se *F. verticillioides* (em todas as amostras), *F. subglutinans* (em F-BAC na Q.Cholda, Nefusoil em S.A. SJB e Patentkali e testemunha da S.A. Quinta da Labruja), *F. graminearum* (na testemunha da Q.Cholda) e *F. proliferatum* (na testemunha de S.A. SJB).

Nas amostras retiradas após 4 meses de armazenamento, verificou-se novamente um aumento do número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* nos tratados relativamente às respetivas testemunhas (Figura 9).

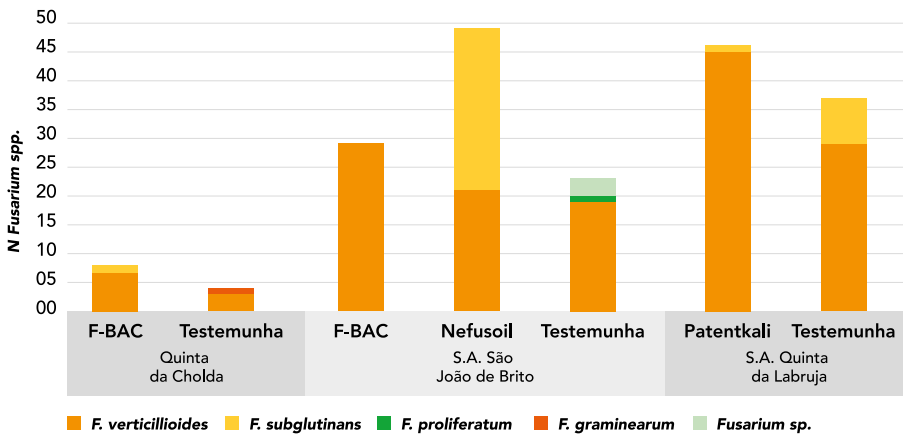


Figura 8
Número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies por modalidade e exploração agrícola, relativos à amostragem de 2018.

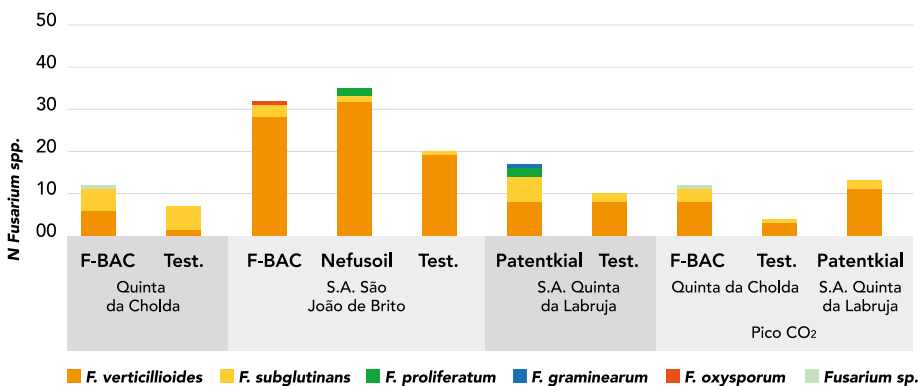


Figura 9
Número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies por modalidade e exploração agrícola, relativos às amostras retiradas após 4 meses de armazenamento e aquando do pico de CO₂, em 2018.

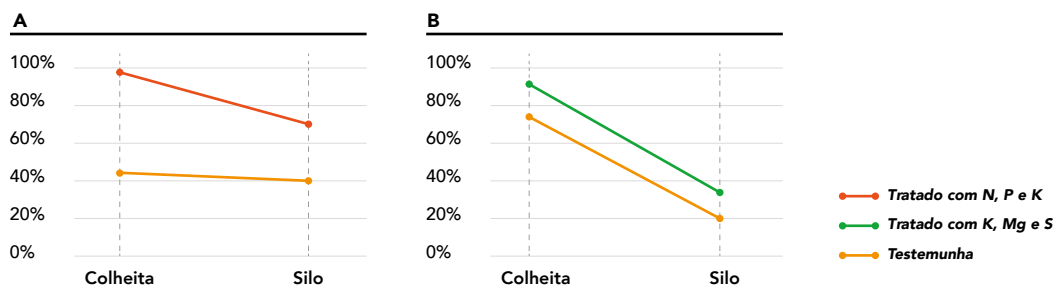


Figura 10. Resultados da campanha de 2018 sobre o efeito da fertilização na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* **A.** Resultados da fertilização com azoto, fósforo e potássio (Nefusoil), na S.A. São João de Brito; **B.** Resultados da fertilização com potássio, magnésio e enxofre (Patentkali), na S.A. Quinta da Labruja.

Da mesma forma, aquando do pico de CO₂ (após 6 meses de armazenamento), foi possível verificar um aumento do número de grãos contaminados com *Fusarium spp.* na amostra tratada com F-BAC (Quinta da Cholda) relativamente à testemunha. A distribuição das espécies encontradas, permaneceu com a predominância de *F. verticillioides*, seguindo-se *F. subglutinans*. Relativamente à diversidade de espécies, detetou-se *F. verticillioides* e *F. subglutinans* (em todas as amostras), *F. proliferatum* (Nefusoil de S.A. São João de Brito e Patentkali na S.A. Quinta da Labruja), *F. graminearum* (Patentkali da S.A. Quinta da Labruja) e *F. oxysporum* (F-BAC de S.A. SJB). Contudo, aquando do pico de CO₂, apenas foi possível detetar *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, sendo *F. verticillioides* a espécie predominante nas 3 amostras.

No total, da campanha de 2018, cinco dos isolados perderam viabilidade antes de ser possível identificá-los até à espécie, pelo que o resultado foi reportado como *Fusarium spp.*

Comparando os resultados obtidos nas amostras aquando da colheita de milho e após o armazenamento, é possível verificar que 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 dentro da barrica (**Figura 10**). Porém, também a testemunha colhida na propriedade da S.A. Quinta da Labruja apresentou uma diminuição drástica da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium spp.*, de forma muito semelhante ao milho tratado com Patentkali (**Figura 10. B**).

Desta forma, é possível que o uso de Patentkali não acrescente qualquer efeito benéfico nestes terrenos da S.A. Quinta da Labruja, antes pelo contrário, atendendo à elevada percentagem de grãos contaminados com *Fusarium spp.* Na S.A. São João de Brito, por outro lado, parece ser possível observar o efeito da fertilização com Nefusoil na presença de *Fusarium spp.* nos grãos de milho, no entanto contrário ao que seria desejado (**Figura 10. A**). Contudo, dada a falta de réplicas e outros dados, não é possível afirmar que a relação detetada entre o tratamento e a presença de *Fusarium spp.* no milho seja consistente.

A diminuição de grãos contaminados com *Fusarium spp.* após o seu armazenamento não significa, no entanto, necessariamente, uma diminuição dos metabolitos destas espécies, ou seja, 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 as espécies de *Fusarium spp.* e, por outro, da susceptibilidade do grão. Assim, as estirpes de *Fusarium* capazes de produzir fumonisinas podem ser motivadas a produzir mais, levando ao aumento das quantidades de micotoxinas no grão, apesar do decréscimo da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium spp.*

Relativamente à aplicação de F-BAC, verificou-se um ténue aumento da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium spp.*, dentro da barrica, relativamente a aquando da colheita, quer na S.A. São João de Brito (S.A. SJB; mais acentuado) quer na Quinta da Cholda (JC; menos acentuado) (**Figura 11**).

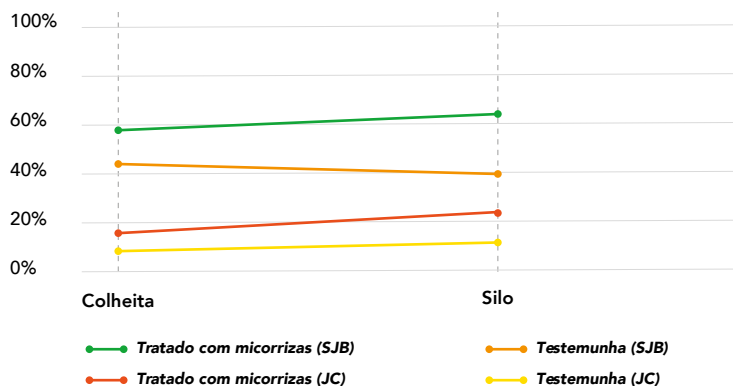


Figura 11
Resultados da campanha de 2018 sobre o efeito da aplicação de F-BAC na porcentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium* spp.

Comparando estes resultados com as respectivas testemunhas, é possível observar que o comportamento das retas das amostras tratadas e da testemunha da Quinta da Cholda são semelhantes, pelo que o tratamento não aparenta estar relacionado com esse aumento. Relativamente às amostras da S.A. São João de Brito, na testemunha verificou-se uma diminuição de 4%, enquanto no F-BAC se verificou um aumento de 6%, o que não constitui uma alteração significativa dos resultados. Desta forma, o F-BAC não aparenta ter efeito no aumento ou diminuição de grãos de milho contaminados com *Fusarium* durante o armazenamento. No que respeita à diversidade de espécies de *Fusarium* encontradas nos grãos de milho, em todas as amostras de milho sujeitas aos tratamentos verificou-se o aumento da diversidade de espécies com o armazenamento (Figura 12), à semelhança do já reportado para *Aspergillus* em amendoim (Xing et al., 2016). Esse aumento de diversidade deve-se ao aumento da prevalência de outras espécies que aquando da colheita do milho existiam em tão pouca quantidade, comparando com as espécies predominantes, que não eram sequer detetadas.

Com o armazenamento, o stresse causado aos fungos existentes é tal que permite que as espécies menos suscetíveis a essas condições proliferem sobre as mais suscetíveis, alterando os perfis de diversidade observados. Porém, estas alterações na diversidade de espécies, associadas ao stresse que existe sobre as espécies, pode levar a um aumento da contaminação do milho com micotoxinas. As espécies/estirpes capazes de produzir micotoxinas irão produzi-las de modo a competir tanto quanto possível com as outras espécies de fungos menos suscetíveis às condições de armazenamento, com o objetivo de as eliminar e assegurar a sua própria sobrevivência. Assim sendo, espera-se observar um aumento da diversidade de espécies e contaminação do milho com micotoxinas após 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 o aumento da diversidade de *Fusarium* spp. (S.A. São João de Brito e testemunha da S.A. Quinta da Labruja). No entanto, no caso do milho tratado (Patentkali) da S.A. Quinta da Labruja foi possível verificar que com o armazenamento ocorreu um aumento significativo de fumonisinas (de 2656 µg/kg para > 4000 µg/kg), acompanhado de um decréscimo da presença de grãos infetados com *Fusarium* spp. e um aumento da diversidade de espécies encontradas (Figuras 10-A e 12). O mesmo acontece com o milho tratado (F-BAC) na Quinta da Cholda, em que, com o armazenamento houve um aumento de fumonisinas (de 1709 µg/kg para 3312 µg/kg), acompanhado de um decréscimo da

presença de *Fusarium spp.* e um aumento da diversidade de espécies encontradas (Figuras 11 e 12). Por outro lado, na Quinta da Cholda, a testemunha manteve os níveis de fumonisinas (2140 µg/kg à colheita e 2118 µg/kg na barrica) e de contaminação por *Fusarium spp.* assim como a sua diversidade. Estes resultados vão de encontro com a hipótese acima descrita, ou seja, será o aumento da diversidade de espécies o que leva a um aumento dos níveis de micotoxinas e não propriamente o número de grãos contaminados. Contudo, quanto maior for a quantidade de grãos contaminados, maior será o inóculo e maior será a escala de aumento das micotoxinas aquando do aumento da diversidade de espécies.

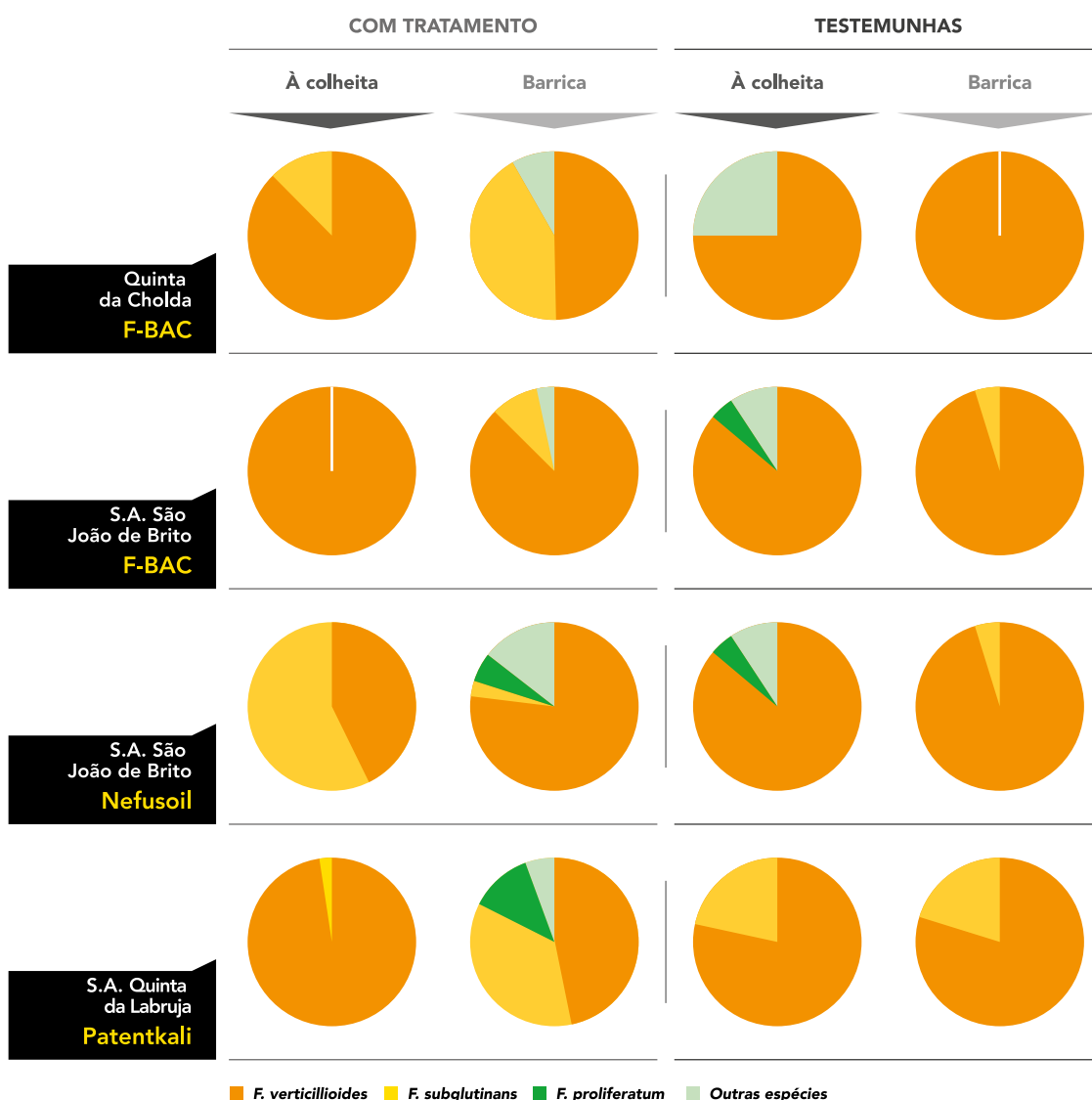


Figura 12

Comparação da diversidade de espécies de *Fusarium* das amostras colhidas aquando da colheita do milho e após 4 meses de armazenamento.

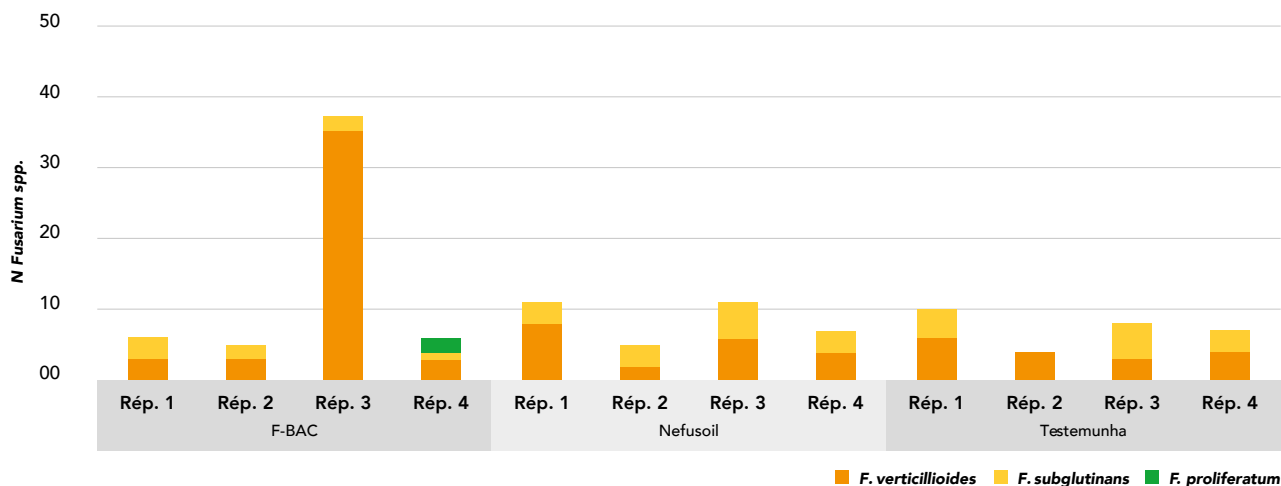


Figura 13.

Resultados da campanha de 2019 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, na Quinta da Cholda.

05.3.2.2. Resultados das amostras da campanha de 2019

Na campanha de 2019, apenas foi realizada a análise micológica aos grãos de milho amostrados na Quinta da Cholda aquando da colheita, totalizando 12 amostras: 4 réplicas de milho tratado com F-BAC; 4 réplicas de milho tratado com Nefusoil; e 4 réplicas de milho sem tratamento extra (testemunha). Nesse ano e contrariamente ao ano anterior, não se verificou um aumento significativo da percentagem de grãos contaminados com *Fusarium spp.* devido à aplicação dos tratamentos (fertilização com Nefusoil e F-BAC) ($p=0,3425$; $\alpha=0,05$), (Figura 13).

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 (de 60 a 62%) (outlier). Este resultado sugere que as condições do campo de milho onde foi experimentada esta modalidade não são homogêneas, realçando a necessidade e importância de fazer réplicas aquando da amostragem. De facto, o produtor afirmou ter detetado indícios de encharcamento numa zona do campo abrangida por essa réplica, o que poderá justificar essa discrepância relativamente às restantes réplicas. Relativamente à diversidade e distribuição das espécies encontradas, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* são as espécies que se destacam como predominantes (Figura 13). *F. proliferatum* apenas foi encontrado numa amostra (réplica 4 do tratamento com F-BAC), em 2 dos 6 grãos que testaram positivo para *Fusarium spp.* (Figura 13). Este resultado, mais uma vez mostra a heterogeneidade do campo.

A diferença dos resultados obtidos em 2018 e 2019 é plausível e pode dever-se a três grandes fatores:

- 1) Em 2018 não se fizeram réplicas, pelo que a amostragem não foi representativa do 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 na S.A. São João de Brito não são iguais aos existentes na Quinta da Cholda, pelo que a sua influência nos efeitos dos tratamentos será naturalmente diferente, gerando resultados díspares (em 2018, o aumento da presença de *Fusarium spp.* na S.A. São João de Brito foi mais intenso do que na Quinta da Cholda);
- 3) Tratando-se de campanhas de anos diferentes, as condições climáticas e os fatores bióticos e abióticos não são, necessariamente, os mesmos, influenciando e gerando resultados provavelmente diferentes, o que justificou a necessidade de mais um ano de observações (2020).

Acessoriamente, para despiste da origem da contaminação com *Fusarium spp.*, foram analisadas duas réplicas dos grãos utilizados na sementeira da campanha de 2019, tendo ambas sido negativas para a presença de isolados de *Fusarium spp.* viáveis.

05.3.2.3. Resultados das amostras da campanha de 2020

Em 2020, foi realizada a análise micológica aos grãos de milho amostrados na Quinta da Cholda aquando da colheita, totalizando 21 amostras de grãos de milho. Destas, 12 amostras foram colhidas nas mesmas parcelas do ano anterior: 4 amostras de milho tratado com F-BAC; 4 de milho tratado com Nefusoil; e 4 de milho sem tratamento extra (Testemunha). Para além disso, foram colhidas e analisadas mais 9 amostras, provenientes de blocos casualizados: 3 de milho tratado com F-BAC; 3 de milho tratado com Nefusoil; e 3 de milho sem tratamento (Testemunha).

No que respeita às parcelas comuns a 2019, contrariamente ao observado nesse ano, não foram detetados picos da presença de *Fusarium spp.* em nenhuma das réplicas dos diferentes tratamentos. As percentagens de contaminação com *Fusarium* foram muito semelhantes entre as diferentes réplicas e tratamentos, oscilando entre os 12 e 32% (Figura 14)

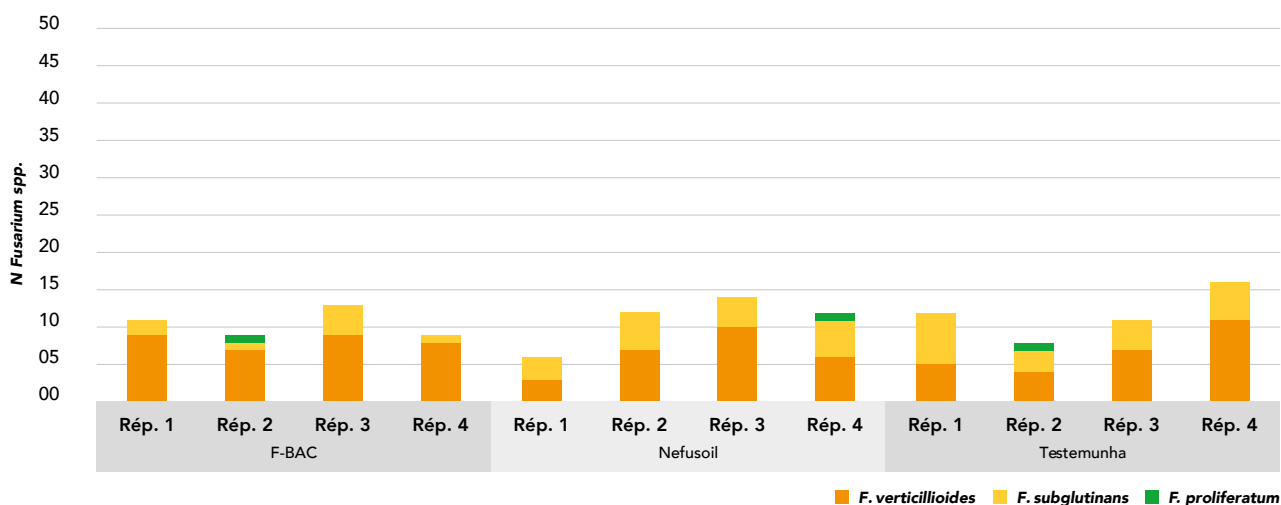


Figura 14

Resultados da campanha de 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda.

Assim, os tratamentos com F-BAC e Nefusoil resultaram numa média de 11 grãos contaminados com *Fusarium spp.*, enquanto a testemunha apresentou uma média de 12 grãos contaminados, não havendo diferenças significativas entre as modalidades ($p=0,8393$; $\alpha=0,05$). Relativamente à distribuição e diversidade de espécies, apenas foram detetadas três espécies (não foi possível identificar até à espécie 1 isolado), nomeadamente: *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*. *F. verticillioides* foi a espécie predominante em todas as amostras, excetuando na réplica 1 da testemunha, em que 58% dos isolados foram identificados como *F. subglutinans*. *F. proliferatum* apenas foi detetado em duas amostras (réplicas 2 de F-BAC e testemunha) enquanto *F. subglutinans* foi detetado em todas as amostras, tendo sido identificado em 11 a 58% dos isolados.

Relativamente à contaminação dos grãos com *Fusarium spp.* nas amostras colhidas nos blocos casualizados, também não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,6611$; $\alpha=0,05$). As réplicas referentes ao tratamento com F-BAC apresentaram valores entre os 4 e 20% (média de 6 grãos contaminados) e as réplicas do tratamento com Nefusoil entre os 14 e 28% (média de 10 grãos contaminados), enquanto as da testemunha variaram entre os 10 e 66% (média de 15 grãos contaminados) (Figura 15).

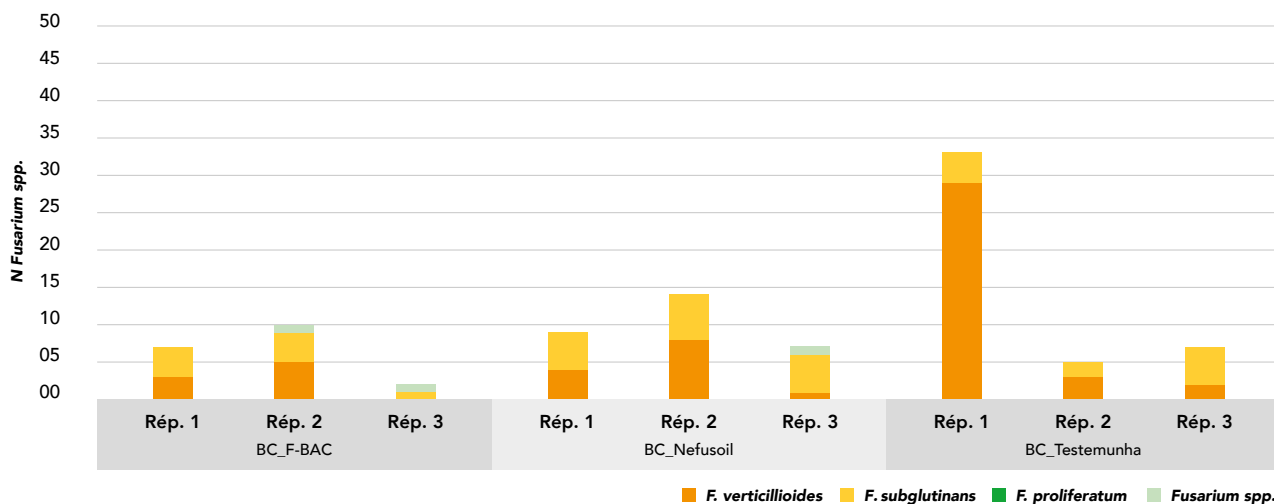


Figura 15.

Resultados da campanha de 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.* e respetiva distribuição de espécies, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda.

No que respeita à diversidade e distribuição de espécies, apenas foram detetadas *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, sendo que não foi possível identificar até à espécie 3 dos isolados. *F. subglutinans* foi a espécie predominante em 5 das amostras (réplicas 1 e 3 de F-BAC e Nefusoil e réplica 3 da testemunha), enquanto *F. verticillioides* foi a espécie predominante nas restantes 4 amostras.

Comparando os resultados obtidos nas parcelas comuns a 2019 e nos blocos casualizados, podemos observar que as diferenças das percentagens de contaminação não são significativas. O tratamento com F-BAC nas parcelas comuns a 2019 resultou numa média de 22% de contaminação e nos blocos casualizados em 12% ($p=0,1242$, $\alpha=0,05$). A adição de Nefusoil nas parcelas comuns a 2019 resultou numa média de 26% de contaminação e nos blocos casualizados em 20% ($p = 0,3687$, $\alpha = 0,05$). Nas testemunhas, verificou-se 12% de contaminação com *Fusarium* nas parcelas comuns a 2019 e 15% nos blocos casualizados ($p = 0,4795$, $\alpha = 0,05$).

Apesar da predominância de *F. subglutinans* na maioria das amostras provenientes dos blocos casualizados e de *F. verticillioides* na maioria das amostras das parcelas comuns a 2019, a diversidade de espécies do género *Fusarium* encontradas não apresentou diferenças significativas.

05.3.2.4. Comparação dos resultados das amostras da campanha de 2019 e 2020

Quando cruzamos os resultados das campanhas de 2019 e 2020, é possível verificar que não houve diferenças significativas entre as parcelas 2019 e 2020 e os blocos casualizados (F-BAC $p = 0,07961$, Nefusoil $p = 0,1376$ e testemunha $p = 0,2405$; $\alpha = 0,05$), relativamente à presença de *Fusarium spp.* no milho (Figura 16).

Este resultado é deveras relevante, pois 2020 permitiu validar os resultados obtidos em 2019, quer com a repetição do estudo nas parcelas comuns aos dois anos, quer com os blocos casualizados, apesar da deteção de algumas variações entre réplicas. Estas variações são provavelmente resultado do conjunto de todas as restantes variáveis envolvidas, sendo, aliás, a maioria verdadeiros outliers (réplica 3 com F-BAC de 2019 e réplica 1 com Nefusoil de 2020). Também relativamente à distribuição e diversidade de espécies encontradas, não houve diferenças significativas, com uma concomitância de *F. verticillioides* e *F. subglutinans*. Dado que nenhum dos tratamentos levou à obtenção de resultados com diferenças estatisticamente significativas entre si e relativamente à testemunha, é possível concluir que nenhum aparenta ter o efeito esperado na redução da contaminação do milho por *Fusarium spp.*

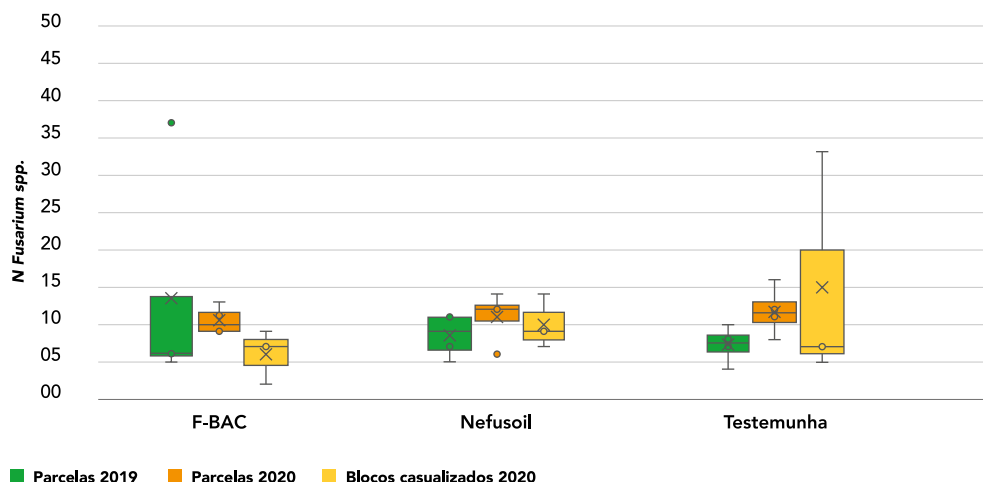


Figura 16.

Comparação dos resultados da campanha de 2019 e 2020 sobre o efeito da aplicação de F-BAC e Nefusoil na percentagem de grãos de milho contaminados com *Fusarium spp.*, na Quinta da Cholda.

05.3.3. Monitorização das micotoxinas

No âmbito do QUALMILHO, o INIAV implementou e validou o método de referência por cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo (UHPLC-ToF-MS) para quantificar em simultâneo as aflatoxinas B1, B2, G1, G2, OTA, T2, ZEA e fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2). Paralelamente, implementou também um outro método rápido, de rastreio por imunoensaio com menor precisão que o UHPLC-ToF-MS mas que foi validado satisfatoriamente para despiste de amostras positivas para as fumonisinas totais (B1+B2), OTA, Aflatoxinas (G1+G2), Desoxinivalenol (DON), T2, Aflatoxina B1 e ZEA. Este método de rastreio quantifica as fumonisinas totais, contudo, não permite a discriminação das FB1 e FB2.

A distribuição das micotoxinas nos grãos de milho é muito heterogénea, as concentrações estipuladas para os limites máximos são muito baixas, expressos em partes por bilião (ppb ou µg/kg). O plano de amostragem adotado pelo QUALMILHO considerou a retirada aleatória de várias porções incrementais de grão que foram misturados, de forma a obter uma amostra agregada ou global de pelo menos 5 kg que foi homogeneizado por trituração. Cada amostra de 5 Kg foi homogeneizada por trituração num moinho de martelos com crivo de 1 mm. A cada moenda, o moinho foi limpo de modo a evitar contaminações cruzadas. As análises das micotoxinas realizaram-se em 3 porções (subamostras) de 50g retiradas aleatoriamente da farinha completamente homogeneizada.

Nas colheitas de 2018, 2019 e 2020 e num conjunto significativo de amostras representativas dos parceiros do QualiMilho e de explorações agrícolas do Vale do Tejo, foram realizadas análises para despistar todas as micotoxinas validadas (resultados em Anexo).

Em todas as amostras analisadas provenientes do campo em 2018 e 2019, apenas foram detetadas fumonisinas em níveis variáveis e maioritariamente abaixo dos limites legais, sendo a FB1 a micotoxina predominante. Contudo, é de realçar ainda que os valores de fumonisinas quantificados em espigas com sintomatologia de *Fusariose* são muito superiores aos limites legais, o que evidencia a necessidade de identificar estratégias de mitigação no campo e também após a colheita, como por exemplo, separando os grãos contaminados antes do armazenamento. Em 2020 também foram detetados níveis baixos de desoxinivalenol (DON).

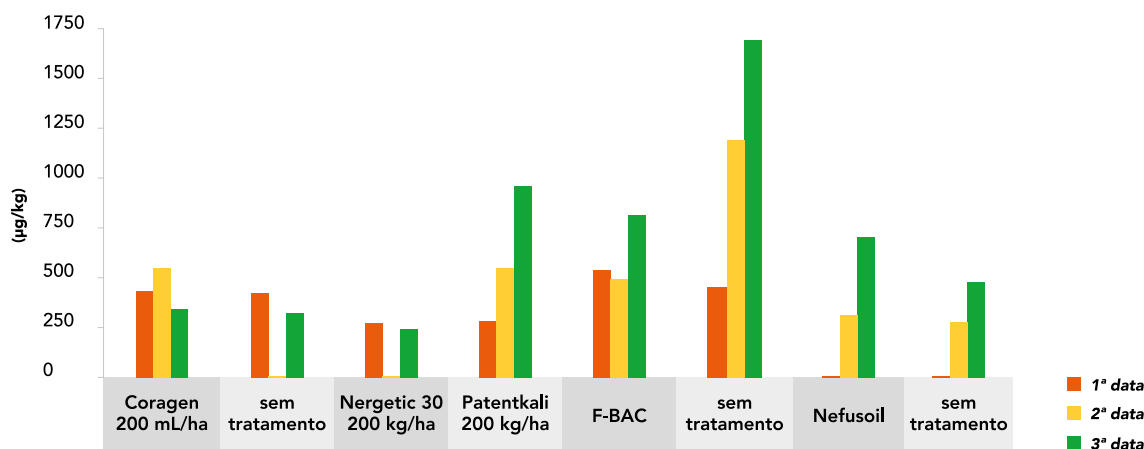


Figura 17.

Total de fumonisinas (FB1+FB2) no milho recolhido em 8 ensaios conduzidos em explorações da região do Vale do Tejo (A, B, C) recolhidas na maturidade fisiológica (1ª data), após 10 dias (2ª data) a após 20 dias (3ª data).

Na colheita de 2019 e em 8 ensaios com diferentes tratamentos realizados em 3 explorações do Vale do Tejo, as micotoxinas foram monitorizadas numa amostragem de 25 espigas recolhidas diretamente no campo e em 3 períodos que antecederam a colheita. As espigas foram recolhidas na maturidade fisiológica, 10 e 20 dias após a primeira colheita e os valores mais altos de fumonisinas (>1000 µg/kg) foram obtidos nas 2ª e 3ª datas para o ensaio que não foi tratado (Figura 17).

O grão proveniente do ensaio em que foi aplicado azoto foi aquele que revelou os valores mais baixos de fumonisinas. Os maiores níveis de fumonisinas foram obtidos no grão proveniente da 3ª data e esses resultados evidenciam que há um maior risco de contaminação em colheitas tardias.

Na colheita de 2020 determinaram-se as micotoxinas nas mesmas amostras em que se procedeu à caracterização micológica nos ensaios da Quinta da Cholda e também em amostras recolhidas de ensaios comparativos de 5 variedades de milho conduzidos em Coruche (EEAT) e na Golegã com 3 repetições de campo.

Tipo ensaio	Fum B1	Fum B1	Fum B1
F-BAC	646 ^a	193 ^a	298 ^a
Testemunha	177 ^a	n.d.	309 ^a
Nefusoil	956 ^a	343 ^a	251 ^a

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$. n.d. não detetado

Tabela 4.

Valores médios ($n=9$) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxinivalenol (DON) em µg/kg no milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda.

Tipo ensaio	Fum B1	Fum B1	Fum B1
F-BAC	509 ^b	125 ^a	383 ^a
Testemunha	85 ^a	n.d.	335 ^a
Nefusoil	560 ^b	124 ^a	344 ^a

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$. n.d. não detetado

Tabela 5.

Valores médios ($n=9$) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxinivalenol (DON) em µg/kg no milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda.

Variedades	Fum B1	Fum B2	Fum B1
V2	503 ^a	175 ^a	130 ^b
V3	252 ^a	56 ^a	104 ^{ab}
V4	209 ^a	39 ^a	64 ^a
V5	235 ^a	88 ^a	99 ^{ab}
V6	436 ^a	104 ^a	133 ^b

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$.

Tabela 6.

Valores médios ($n=6$) das micotoxinas fumonisinas B1 (Fum B1), B2 (Fum B2) e desoxivalenol (DON) em $\mu\text{g}/\text{kg}$ no milho recolhido em 2020 de 5 variedades semeadas em Coruche e na Golegã com 3 repetições de campo.

A análise de variância dos resultados dos níveis de micotoxinas obtidos nas amostras recolhidas nos ensaios da Quinta da Cholda na parcela comum a 2019 permitiu concluir que não existiram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os diferentes tratamentos (F-BAC, Nefusoil) e a testemunha. Os resultados médios dos níveis de micotoxinas são apresentados nas *Tabelas 4 e 5*.

A testemunha apresentou níveis de fumonisinas inferiores aos tratamentos no caso do ensaio de blocos casualizados (Tabela 5).

Não se encontraram diferenças significativas entre variedades para os níveis de fumonisinas (Tabela 6). Embora a níveis baixos verificou-se diferenças significativas entre variedades para desoxivalenol (DON).

05.4. Ensaio de armazenagem

Outra atividade do projeto QUALIMILHO foi a avaliação da evolução da contaminação do grão armazenado, tanto ao nível das espécies de *Fusarium* como das micotoxinas presentes. O grão da variedade V1 proveniente de 3 parcelas, L2 (exploração agrícola Arminda Luz 2), JC3 (Quinta da Cholda 3), JC4 (Quinta da Cholda 4) e de ensaios conduzidos em 2018, foi recolhido, seco em estufa a 40°C durante 48 h e colocado em barricas de 25 kg.

As avaliações realizaram-se durante 6 meses de armazenamento do grão monitorizadas com sondas de temperatura, humidade relativa e CO₂. O *Fusarium verticillioides* foi a espécie predominante nos 3 períodos de monitorização e as micotoxinas identificadas foram apenas as fumonisinas, com maior incidência da FB1 (4:1). Durante o período de armazenamento, os níveis de fumonisinas aumentaram em cerca de 20 a 40% (*Figura 18*).

A par do aumento de fumonisinas também aumentaram os valores de humidade relativa, temperatura e CO₂ monitorizados (resultados apresentados em 5.6).

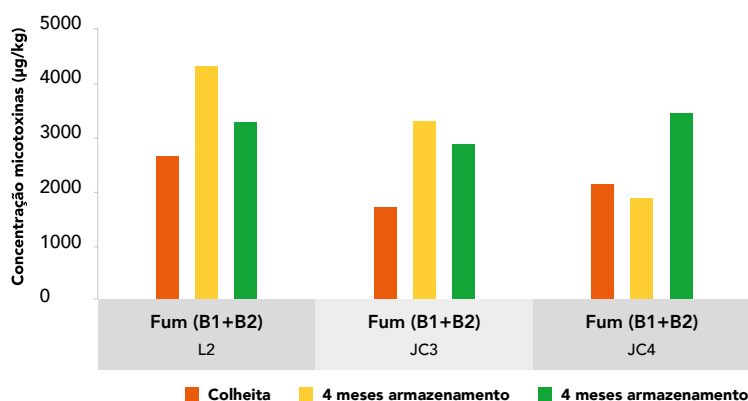


Figura 18.

Total de fumonisinas no milho proveniente de 3 ensaios e de 2 explorações do Vale do Tejo determinadas na altura da colheita, após 4 e 6 meses de armazenamento em barricas. JC3-fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e tratamento antifúngico com F-BAC; JC4-sem tratamento; L2-fertilização com macronutrientes (K, Mg, S) usando Patentkali.

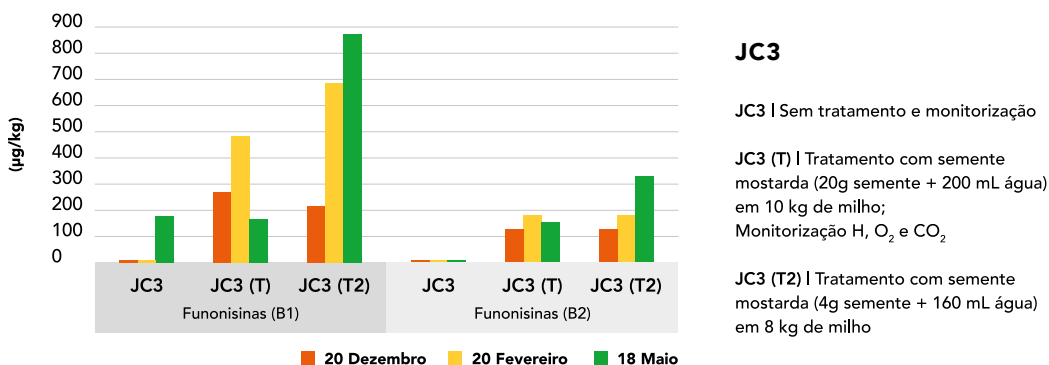


Figura 19. Fumonisin (B1, B2) no milho proveniente do ensaio de fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e F-BAC tratado com mostarda e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.

Um segundo ensaio de armazenamento foi realizado com o grão colhido nos ensaios conduzidos em 2019. O grão foi colocado nas barricas em dezembro de 2019 e foram retiradas amostras para a quantificação das micotoxinas em 4 datas de controlo durante 10 meses. Com as amostras selecionadas realizaram-se 5 ensaios para testar medidas de descontaminação e outros tratamentos ao grão (Novimold® CP98, mostarda, óleo) em barricas de 10 kg nas instalações da AGROMAIS (Riachos). No que respeita à monitorização das condições de armazenamento do grão colhido em 2019, 3 dos ensaios foram monitorizados com sondas de humidade, O₂ e CO₂ e 2 com humidade e O₂.

Os resultados dos níveis de micotoxinas obtidos no grão recolhido no ensaio de fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e tratamento antifúngico com F-BAC (JC3) durante o armazenamento são apresentados nas Figuras 19 e 20.

No início do armazenamento o grão não tratado com mostarda (JC3) não apresentou fumonisin (Figura 19) e após 5 meses foram detetadas a baixas concentrações (173 µg/kg).

O grão não tratado com mostarda (JC3) não apresentou aflatoxinas no início do armazenamento, mas, essas micotoxinas foram detetadas após 5 meses (total-7,6 µg/kg; B1-4,8 µg/kg). O grão tratado com mostarda revelou valores muito altos logo no início do armazenamento (B1>8 µg/kg), valores esses que poderão ser imputados a fatores externos que não foram devidamente avaliados.

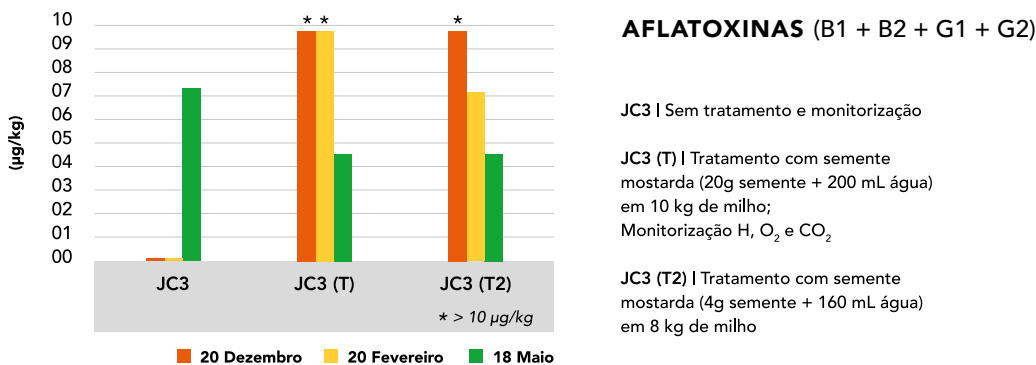
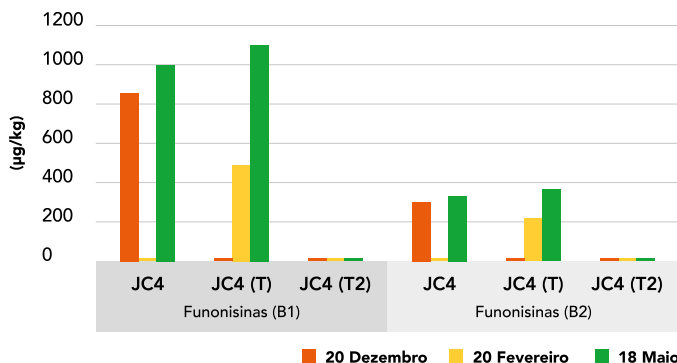


Figura 20. Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) no milho proveniente do ensaio de fertilização com macro e micronutrientes (N, P, Zn) e F-BAC tratado com mostarda e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.



JC4

JC4 | Monitorização de Hum. e O₂

JC4 (T) | Tratamento com óleo de sêma arroz (300 mL óleo) em 10 kg de milho; Monitorização de Hum O₂

JC4 (T2) | Tratamento com óleo de sêma arroz (100 mL óleo) em 10 kg de milho

Figura 21. Fumonisin (B1, B2) no milho proveniente do ensaio de campo testemunha fertilização tratado com óleo de sêma de arroz e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.

Salvaguardando as variáveis e limitações do procedimento adotado é de registrar que o tratamento com mostarda não revelou eficácia para a redução dos níveis de contaminação.

A aplicação de óleo de sêma de arroz foi testada no grão colhido no ensaio não tratado (JC4) e os resultados dos níveis de fumonisin são apresentados na *Figura 21*.

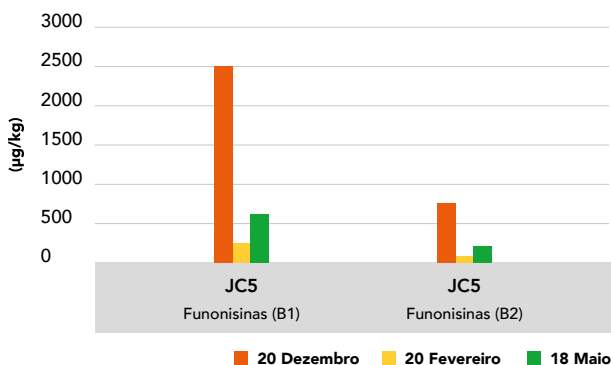
No grão não tratado com óleo foram detetadas fumonisin no início do armazenamento (1181 µg/kg) e após 5 meses foram detetadas valores altos que também são evidentes com o tratamento com óleo (JC4-1364 µg/kg; JC4(T)-1495 µg/kg). Apesar disso, o tratamento com 100 mL de óleo revelou alguma eficácia.

Os resultados dos níveis de fumonisin obtidos no grão recolhido no ensaio com aplicação de Nefusoil (JC5) durante o armazenamento são apresentados na *Figura 22*.

O grão apresentou fumonisin logo no início do armazenamento (B1-2582 µg/kg, B2-837 µg/kg) e após 5 meses as concentrações diminuiram.

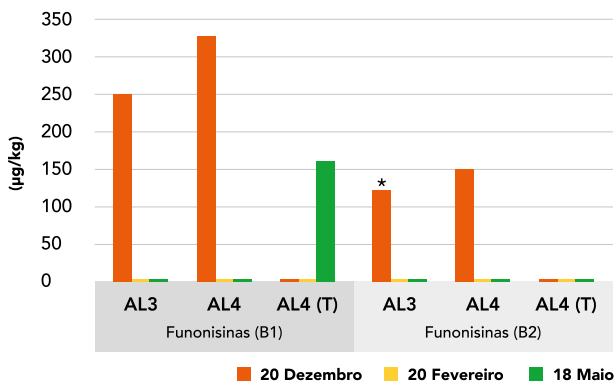
Os resultados dos níveis de fumonisin obtidos no grão recolhido no ensaio de outra exploração agrícola (Arminda Luz) com aplicação de Novimold® CP98 durante o armazenamento são apresentados na *Figura 23*.

No grão não tratado com NOVIMOLD® CP98 apresentou níveis baixos de fumonisin no início do armazenamento e após 5 meses não foram detetadas. O NOVIMOLD® CP98 revelou alguma ação mas, são necessários mais testes para suportar o seu nível de eficácia.



JC5

Figura 22. Fumonisin (B1, B2) no milho proveniente do ensaio com aplicação de Nefusoil e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.



AL

AL3 | Monitorização de Hum. e O₂

AL4 | Sem tratamento e monitorização

AL4 (T) | Tratamento com NOVIMOLD CP 98 (50g) em 10 kg de milho

Figura 23. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio da exploração agrícola Arminda Luz com aplicação de NOVIMOLD® CP98 e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.

Os resultados dos níveis de fumonisinas obtidos no grão recolhido no ensaio da Estação Experimental António Teixeira com a variedade V1 durante o armazenamento são apresentados na **Figura 24**.

O grão não apresentou fumonisinas no início do armazenamento e após 2 meses foram detetados níveis baixos de fumonisinas B1.

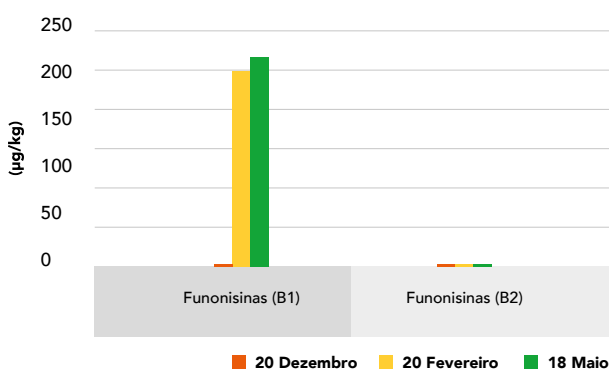


Figura 24. Fumonisinias (B1, B2) no milho proveniente do ensaio da Estação António Teixeira da variedade V1 e determinadas em 3 períodos de armazenamento em barricas.

05.5. Resultados de outros parâmetros de qualidade do grão

A composição química básica do milho referente ao teor de humidade, cinzas e macronutrientes (Amido, Proteína, Gordura, Fibra), os carotenóides expressos em luteína e o perfil de viscosidades foram determinados em todas as amostras recolhidas (resultados em anexo).

Os resultados obtidos em 2020 e nos ensaios comparativos de 5 variedades de milho conduzidos em Coruche (EEAT) e na Golegã com 3 repetições de campo indicam que globalmente há variação na gordura (3.11%-5.41%), proteína (7.1%-10.4%) e amido (62.0%-68.8%) do grão de milho proveniente dos dois ensaios.

As análises da variância dos resultados mostram que há diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as variedades para os teores de amido, proteína, gordura, fibra, cinzas e luteína (**Tabela 7**).

No que respeita ao perfil de viscosidades não se encontraram diferenças entre as variedades para a viscosidade do pico e apenas ligeiras diferenças para a viscosidade mínima (**Tabela 8**).

Variedades	Amido	Proteína	Gordura	Fibra	Cinzas	Luteína
V2	64,2 ^a	8,25 ^{ab}	4,87 ^b	2,08 ^b	0,82 ^{ab}	53,2 ^b
V3	63,6 ^a	7,88 ^a	4,74 ^b	1,96 ^b	0,76 ^{ab}	43,4 ^a
V4	65,3 ^a	8,58 ^{ab}	4,12 ^a	1,65 ^a	0,72 ^a	44,5 ^a
V5	65,0 ^a	8,74 ^b	4,13 ^a	1,82 ^{ab}	0,91 ^a	43,8 ^a
V6	66,4 ^a	8,17 ^{ab}	4,11 ^a	1,63 ^a	0,76 ^{ab}	43,1 ^a

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$.

Variedades	Viscosidade Pico	Viscosidade Mínima	Retrogração
V2	6903 ^a	2798 ^a	4524 ^a
V3	6944 ^a	3040 ^b	4972 ^{ab}
V4	6931 ^a	3015 ^b	5266 ^{abc}
V5	6047 ^a	2859 ^a	5853 ^c
V6	7120 ^a	3028 ^a	5542 ^{bc}

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$.

Tabela 7. Médias dos resultados ($n=6$) da composição química básica (%) e carotenóides expressos em luteína (ppm) do grão de milho de 5 variedades recolhido em 2020 e proveniente dos ensaios realizados em Coruche e na Golegã.

Tabela 8. Médias dos resultados ($n=6$) do perfil de viscosidades (cP) das farinhas de 5 variedades recolhidas em 2020 e proveniente dos ensaios realizados em Coruche e na Golegã.

O ensaio conduzido em Coruche foi suplementado com azoto, apesar da fertilização, a média geral da proteína (7.9%) e amido (64.1%) desse ensaio foi inferior à obtida com as mesmas variedades no ensaio da Golegã (8.8% e 65.7% respetivamente).

A composição básica das amostras recolhidas nos diferentes ensaios realizados na Quinta da Cholda foi muito similar.

As análises da variância dos resultados mostram que não há diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os diferentes tratamentos para os teores de amido, proteína, gordura, fibra e cinzas (Tabelas 9, 10).

Os valores médios globais de proteína e amido para o grão recolhido no ensaio da campanha de 2020 foram respetivamente de 8.1% e 66.3%.

Tipo ensaio	Amido	Proteína	Gordura	Fibra	Cinzas
F-BAC	69,15 ^a	8,50 ^b	4,22 ^a	2,02 ^a	0,79 ^a
Testemunha	68,49 ^a	8,26 ^{ab}	4,33 ^a	1,93 ^a	0,67 ^a
Nefusoil	69,00 ^a	8,19 ^a	4,14 ^a	1,76 ^a	0,66 ^a

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$.

Tabela 9. Valores médios ($n=6$) da composição química básica (%) do grão de milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nas parcelas comuns a 2019, na Quinta da Cholda.

Tipo ensaio	Amido	Proteína	Gordura	Fibra	Cinzas
F-BAC	7,04 ^a	8,10 ^a	4,28 ^a	1,71 ^a	1,71 ^a
Testemunha	65,82 ^a	8,23 ^a	4,35 ^a	1,90 ^a	1,90 ^a
Nefusoil	66,17 ^a	8,11 ^a	4,43 ^a	1,85 ^a	1,85 ^a

valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes para $p \leq 0,05$.

Tabela 10. Valores médios ($n=6$) da composição química básica (%) do grão de milho recolhido em 2020 e correspondente aos ensaios com aplicação de F-BAC, Testemunha e Nefusoil, nos blocos casualizados (BC), na Quinta da Cholda.

TABELA 11

Amostras	Cinzas	Gordura	Fibra	Proteína	Amido
AL3	0,49 ± 0,05	3,79 ± 0,01	1,84 ± 0,18	7,68 ± 0,01	66,55 ± 0,31
AL4	0,62 ± 0,00	3,35 ± 0,24	1,63 ± 0,01	7,52 ± 0,11	67,24 ± 0,05
AL4-T	0,65 ± 0,05	3,87 ± 0,15	1,77 ± 0,16	7,67 ± 0,01	65,41 ± 0,01
JC3	0,67 ± 0,00	3,46 ± 0,02	1,13 ± 0,07	7,80 ± 0,18	68,11 ± 0,17
JC3-T	0,71 ± 0,06	3,58 ± 0,10	1,19 ± 0,03	7,66 ± 0,04	66,71 ± 0,73
JC3-T2	0,71 ± 0,02	3,54 ± 0,12	1,11 ± 0,11	7,62 ± 0,14	66,14 ± 0,98
JC4	0,61 ± 0,07	3,73 ± 0,18	1,24 ± 0,03	7,78 ± 0,08	67,58 ± 0,25
JC4-T	0,89 ± 0,01	5,10 ± 0,37	1,95 ± 0,02	7,69 ± 0,18	63,19 ± 0,96
JC4-T2	0,71 ± 0,02	4,36 ± 0,01	1,52 ± 0,18	7,49 ± 0,34	66,14 ± 0,50
JC5	0,68 ± 0,09	3,81 ± 0,17	1,49 ± 0,14	7,89 ± 0,11	66,63 ± 0,24
V1	0,80 ± 0,02	3,63 ± 0,16	1,50 ± 0,00	7,21 ± 0,08	65,12 ± 0,90

Tabela 11. Composição química básica (% média ± desvio padrão de 2 réplicas) do grão de milho no final do ensaio de armazenamento.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados das amostras no final do ensaio de armazenamento, correspondente ao grão proveniente da colheita de 2019 armazenado 10 meses nas barricas. Os resultados da composição química básica das 11 amostras são muito idênticos, como seria de esperar, as amostras tratadas com óleo apresentaram maiores valores de gordura (JC4-T, JC4-T2).

05.6. Desenvolvimento de um sistema de monitorização

Numa 1ª fase foram instalados pelo ISQ sensores de temperatura e 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 correspondentes aos ensaios de armazenagem realizados em 2019 e numa 3ª fase em 2020 (ver 5.4).

Os dados foram obtidos remotamente e em tempo real e operacionalizou-se a sua consulta em forma gráfica o que permitiu uma tomada de decisão assertiva e rápida.

Em todas as fases, embora não previsto no plano de trabalhos e de investimentos, foram instaladas sondas de CO₂ (Figura 25), uma vez que esta monitorização pode ser uma ferramenta válida para deteção precoce de atividade fúngica.



Figura 25. Sondas (TEKON's DUOS hygrotemp e CO₂) utilizadas para monitorização do CO₂ no milho armazenado em barricas na Agromais.

A título demonstrativo a Figura 26 mostra o tipo de gráficos que é atualmente gerado pelo sistema (temperatura, humidade e concentração de CO₂).

Estes gráficos são construídos a partir dos dados recolhidos remotamente e processados de forma a permitir o manuseamento dos big data resultantes e a sua apresentação na plataforma MICOTOX ALERT.

As tarefas relacionadas com o desenvolvimento da ferramenta "MICOTOX ALERT" incidiram na construção de toda a base de dados e o front-end da plataforma, com classificação de diferentes tipologias de usuários, produtores (exploração agrícola) e agrupamento de produtores (armazenamento). Os modelos de previsão irão correr nesta plataforma e terão por base os dados que estão a ser recolhidos remotamente pelos sensores, bem como todos os dados provenientes dos cadernos de campo das explorações agrícolas onde decorreram os ensaios. As informações meteorológicas das explorações agrícolas em estudo foram obtidas através da rede de estações meteorológicas pertencentes à Agromais.

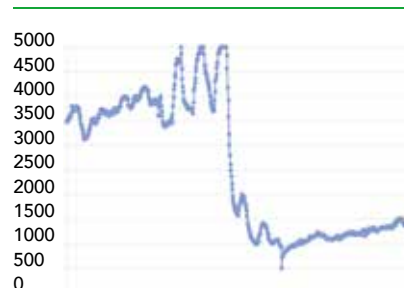
**A | Temperatura (C°)
da Barrica L1****B | Humidade (%)
da Barrica L1****C | Concentração de dióxido
de carbono (ppm) da Barrica L1**

Figura 26. Representação gráfica da monitorização remota e em tempo real da temperatura (C°), humidade (%) e concentração de CO₂ (ppm) através de sondas instaladas nas barricas de armazenamento de milho colocadas na Agromais.

A plataforma “MICOTOX ALERT” (*Figura 27*) é uma ferramenta útil para o apoio à decisão, pois congrega informação recolhida nas várias fases da produção e armazenamento do milho.

As informações meteorológicas das explorações agrícolas (obtidas através da rede de estações meteorológicas pertencentes à Agromais), permitiram definir um sistema de alerta para os agricultores relativamente às condições dos campos. O alerta será emitido apenas no período oportuno para a colheita, em particular com humidade relativa superior a 85% como revelado na *Figura 28*, tendo como base a máxima de que o risco é maior quanto mais tempo demorar a colheita após a maturação da espiga.



Figura 27. Home page da plataforma “MICOTOX ALERT”.

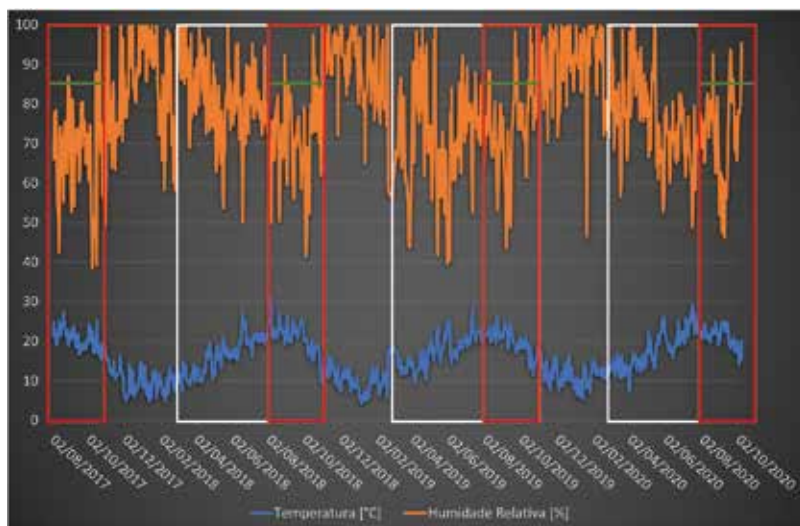


Figura 28. Distribuição das temperaturas (°C) e humidades (%) durante o ciclo produção do milho registadas na estação metereológica de Lavra-Riachos.

Na **figura 28** a branco está identificado o período de sementeira como identificado nos cadernos de campo e a vermelho está o período estimado para a maturidade fisiológica do grão. Na imagem os limites vermelhos indicam o período de maturação da espiga, onde existe maior risco de aparecimento de fungos (aviso amarelo) e se a humidade relativa for superior a 85% ocorrem condições propícias para o desenvolvimento de fungos (aviso vermelho).

No gráfico é visível que a humidade relativa fica muito elevada no final do período de colheita o que também dificulta a correta secagem do grão.

Os alertas podem ser exibidos na plataforma MICOTOX ALERT como revelados na **Figura 29**.

No âmbito da atividade de apoio à decisão foi também desenvolvida a arquitetura geral dos sistemas de alerta. Relativamente aos silos de armazenamento de milho, apresentamos uma proposta com base nos dados adquiridos nos sensores de CO₂.



Figura 29. Sistemas de alertas gerados na plataforma "MICOTOX ALERT" através da recolha de dados das temperaturas (°C) e humidades (%) registadas na estação metereológica de Lavra-Riachos.

Na **Figura 30**, as cores indicam o nível de CO₂, de vermelho (5000 ppm) a azul (0 ppm). O gráfico a) e o gráfico b) são relativos aos dados registados nas barricas JC3 e JC4 respetivamente, e apresentam a relação entre temperatura, humidade relativa e CO₂. Os níveis de CO₂ entre 400 e 1000 ppm foram considerados como as variações ambientais aceitáveis, de 1000 a 2000 ppm consideram-se num nível de alerta intermediário e quando são >2000 ppm requerem ação a fim de se verificar a origem do CO₂. Estes resultados foram publicados na revista Foods. Os três níveis de alerta, referidos anteriormente, correspondem respetivamente às cores verde, amarelo e vermelho na plataforma "MICOTOX ALERT".

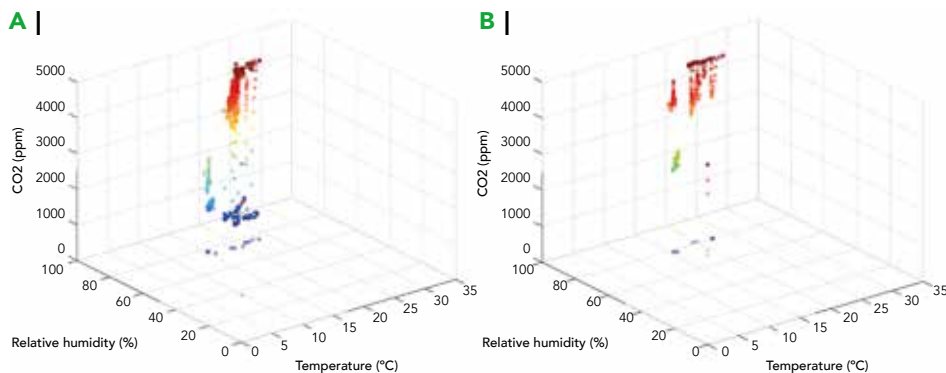


Figura 30. Representação gráfica da humidade relativa, temperatura e dados de CO₂ registados pelas sondas colocadas em barricas de durante o armazenamento do milho por seis meses. (a) Milho da parcela JC3; (b) Milho da parcela JC4. A cor representa o nível de CO₂, de vermelho (5000 ppm) a azul (0 ppm).

Os alertas gerados pelos dados dos sensores e usando algoritmos em modelos de previsão são transferidos para a plataforma como mostra a **Figura 31**.

A implementação de um sistema de monitorização permite uma atuação imediata e assertiva em todas as fases da cadeia de produção do milho. A plataforma "MICOTOX ALERT" é uma ferramenta útil de gestão operacional para os agricultores, com informações em tempo real que permitem uma maior vigilância para o potencial aparecimento de fungos produtores de micotoxinas.



Figura 31. Sistemas de alertas gerados na plataforma "MICOTOX ALERT" através da recolha remota dos dados emitidos pelos sensores colocados durante o armazenamento do milho.

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

Apenas no ano de 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 foram caracterizados por biologia molecular. Isto representa um elevado custo de reagentes e consumíveis, mas também de recursos humanos. Assim, em 2020, o Laboratório de OGM do INIAV iniciou 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. subglutinans* e *F. proliferatum*, por PCR em tempo-real específico para a deteção direta a partir dos grãos de milho. Este tipo de procedimentos é de elevado interesse pois permitirá saber mais prontamente se as amostras em questão estão contaminadas com estas espécies, permitindo o seu rastreio mais precocemente. Porém, devido aos atrasos causados pela pandemia, apenas foi possível otimizar o método usando DNA fúngicos.

Para a otimização da PCR em tempo-real para detetar cada uma das espécies selecionadas, usou-se SYBR green, pelo que a especificidade da reação para cada espécie depende apenas dos *primers* utilizados e da temperatura de *annealing* selecionada. Utilizou-se sempre dois DNA de cada espécie, em duplicado: QM52-10/01 e QM57-10/01 correspondem a *F. verticillioides*; QM26-02/02 e QM60-04/02 correspondem a *F. proliferatum*; QM57-04/01 e QM58-10/01 ou QM67-01/02 e QM67-02/01 correspondem a *F. subglutinans*. Apenas foram consideradas positivas as amostras que amplificaram até ao Ciclo "threshold" (Ct) 35 e, simultaneamente, apresentaram um pico bem definido para a temperatura de dissociação (melt) e a uma temperatura semelhante às restantes amostras da mesma espécie.

Com uma temperatura de *annealing* de 60°C foi possível amplificar apenas *F. subglutinans*. É possível observar que os Ct para amostras de *F. subglutinans* variaram entre os 27,37 e 28,60 (Figura 32. A), enquanto a temperatura de *melt* variou entre os 82,5 e 82,85°C, com picos bastante evidentes (Figura 32. B), podendo deste modo ser consideradas positivas.

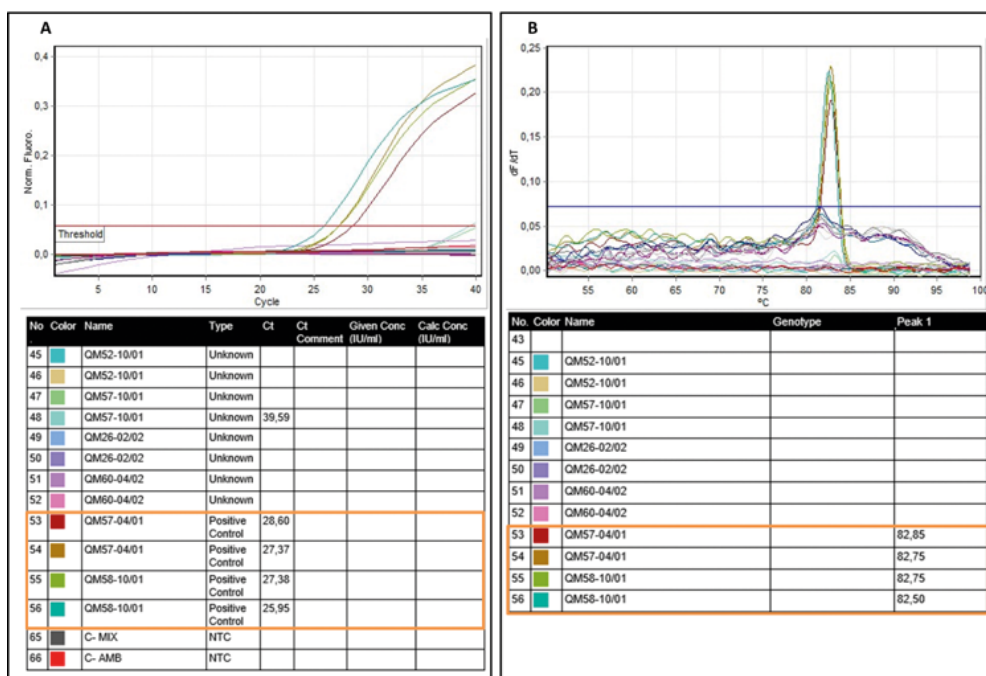


Figura 32. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de *annealing* de 60°C específico para *Fusarium subglutinans*. A – Resultados de amplificação. B – Resultados do Melt.

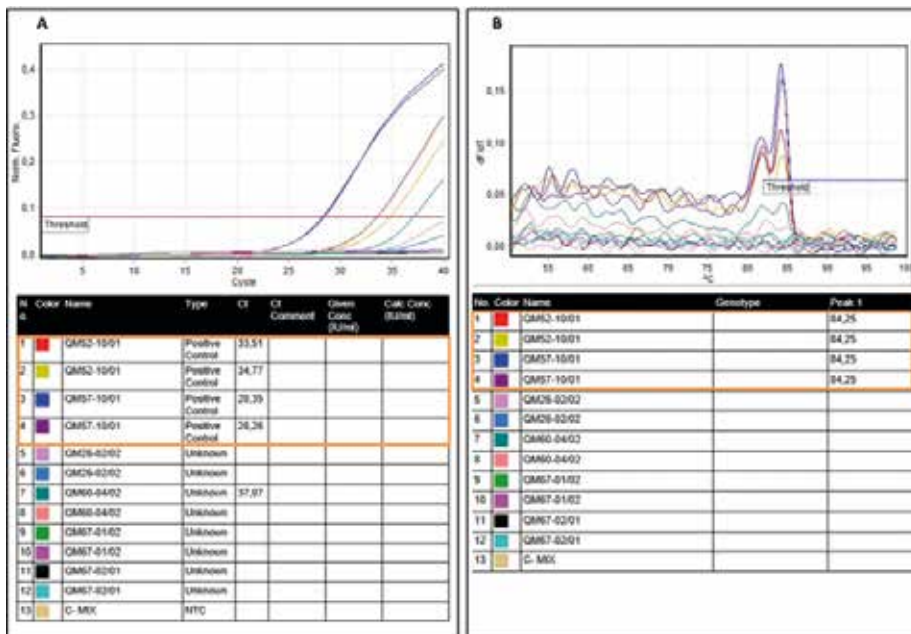


Figura 33. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de annealing de 62°C específico para *Fusarium verticillioides*. A – Resultados de amplificação. B – Resultados do Melt.

Utilizando a temperatura de annealing de 62°C apenas amplificou *F. verticillioides*. As amostras de *F. verticillioides* amplificaram todas entre os 28,26 e 34,37 Ct (Figura 33. A), podendo ser consideradas positivas, pois, simultaneamente, todas apresentaram um pico bem definido à temperatura de melt de 84,25°C. (Figura 33. B).

Aos 64°C de temperatura de annealing, apenas *F. proliferatum* amplificou, com os Ct a variar entre os 22,20 e 23,97 (Figura 34. A), podendo ser consideradas positivas, uma vez que a temperatura de melt variou entre os 83,35 e 83,40°C, com todos os picos bastante evidentes (Figura 34. B).

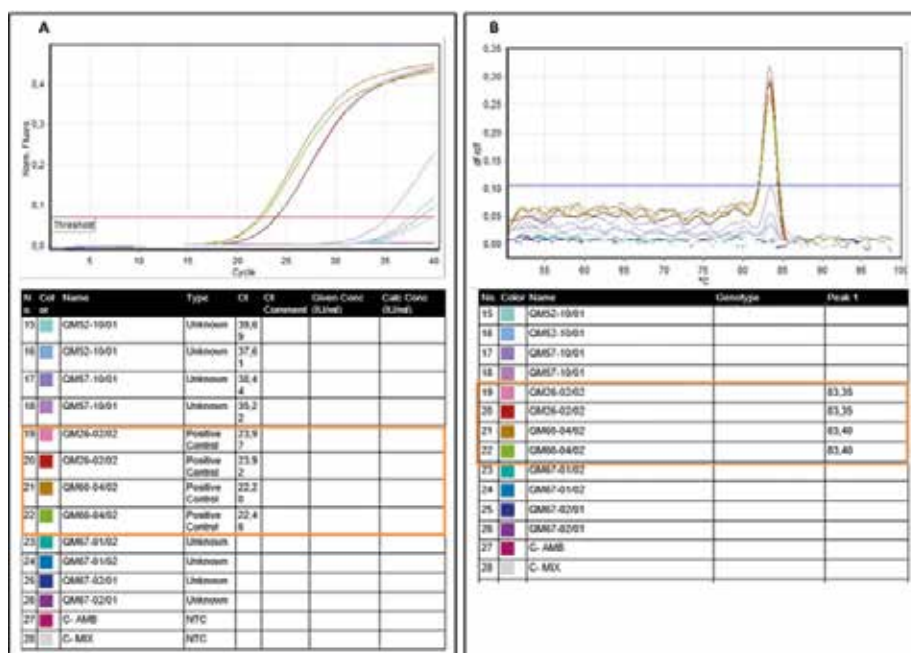


Figura 34. Resultados do PCR em tempo-real, com temperatura de annealing de 62°C específico para *Fusarium proliferatum*. A – Resultados de amplificação. B – Resultados do Melt.

06.

OBJETIVOS
ATINGIDOS

Dos principais resultados gerados pelas atividades do projeto destacam-se os seguintes objetivos atingidos:

01. Identificar as melhores práticas de pré e pós-colheita para reduzir os níveis de contaminação de micotoxinas; ✓
02. Quantificar as micotoxinas cujos limites estão legislados; ✓
03. Identificar os fungos potencialmente produtores das micotoxinas identificadas; ✓
04. Testar soluções que limitem a presença dos fungos produtores de micotoxinas; ✓
05. Desenvolver um sistema informatizado de registo e monitorização de temperatura e teor de humidade das amostras recolhidas nos vários pontos de amostragem; ✓
06. Desenvolver um modelo de previsão do nível de risco de contaminação em função de dados das estações meteorológicas e dos cadernos de campo; ✓
07. Desenvolver um modelo de previsão do nível de risco de contaminação em função dos níveis de CO₂ registados em ensaios de armazenamento; ✓
08. Desenvolver uma plataforma de gestão e emissão de alertas a "MICOTOX ALERT"; ✓
09. Divulgar os resultados do projeto através de publicações, elaboração de folheto e colóquio do milho. ✓

07.

INDICADORES DE REALIZAÇÃO FÍSICA



As actividades realizadas pelo QualiMilho

geraram um conjunto significativo de resultados que suportaram os indicadores de demonstração, divulgação e disseminação

Indicadores	Quant. realizada
Publicações	12
Comunicações	03
Reuniões	04
Relatórios	03
Organização de eventos	03 (1 colóquio, 2 dias de campo)
Folheto de divulgação	01
Metodologias validadas	02

Tabela 12.
Indicadores de realização do Grupo Operacional QualiMilho

O QualiMilho beneficiou da experiência da ANPROMIS na realização de dias e campo no InovMilho e eventos que envolvem um grande número de agricultores e técnicos agrícolas:

// Dias de Campo a 26/09/2017 (320 participantes), 10/07/2018 (340 participantes), 04/09/2019 (340 participantes), 23/09/2020 (550 visualizações remotas) e a 28/09/2021 (280 participantes).

// 10º Colóquio Nacional do Milho 2020 (630 participantes) e 11º Colóquio Nacional do Milho 2021 (cerca de 1.055 participantes que acompanharam esta iniciativa remotamente, devido às limitações impostas pela COVID19).

Foram realizadas várias comunicações do projeto nomeadamente na Cimeira da Inovação “Agrolnovação” que teve lugar no dia 29 de Outubro de 2019 em Oeiras e que contou com participação de cerca de 400 pessoas.

A equipe do projeto participou 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).

As 12 publicações técnico científicas são um meio privilegiado de divulgação na comunidade científica em geral bem como para outros interessados e para o público em geral, assim como, outras iniciativas de disseminação em que os parceiros participaram.

08.

TRABALHOS
PUBLICADOS



Carbas B, Simões D, Soares A, Freitas A, Carvalho A, Sanches Silva A, Pinto T, Varela M, Semedo J, Covao S, Andrade E, Brites C. (2021). Estratégias de mitigação da incidência de micotoxinas durante o armazenamento do milho, *Vida Rural* 1869:57-63.

Brites C. (2021). Novas estratégias de integração sustentáveis que garantam a qualidade e segurança na fileira do milho nacional. *Agriterra* 3, 58-61. <https://www.agriterra.pt/Artigos/350596-NOVAS-ESTRATEGIAS-DE-INTEGRACAO-SUSTENTAVEIS-QUE-GARANTAM-A-QUALIDADE-E-SEGURANCA-NA.html>

Carbas B, Soares A, Freitas A, Silva AS, Pinto T, Andrade E, Brites C. (2021). Mycotoxin Incidence in Pre-Harvest Maize Grains. *Proceedings*, 70(1):24. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07667

Carbas B, Simões D, Soares A, Freitas A, Ferreira B, Carvalho ARF, Silva AS, Pinto T, Diogo E, Andrade E, Brites C. (2021). *Occurrence of Fusarium spp. in Maize Grain Harvested in Portugal and Accumulation of Related Mycotoxins during Storage*. *Foods* 10(2):375. <https://doi.org/10.3390/foods10020375>

Carbas, B., Soares, A., Freitas, A., Silva, A. S., Pinto, T., Andrade, E., & Brites, C. 2022. Evaluation of biobased solutions for mycotoxin mitigation on stored maize. 1st International Online Conference on Agriculture - Advances in Agricultural Science and Technology session From Field to Consumers: Challenges and Approaches to High-Quality Agricultural Products. 10.3390/IOAG2022-12306

Carbas, B., Soares, A., Barros, S., Carqueijo, A., Silva, A.S., Freitas, A. & Brites, C. 2021. Assessment of regulated mycotoxins in maize harvested in Portugal. Dare2Change, an International Conference, Porto, Portugal 18-19 Nov.

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

Freitas A, Barros S, Brites C, Barbosa J, Sanches Silva A (2019). Validation of a biochip chemiluminescent immunoassay for multi-mycotoxins screening in maize. *41st Mycotoxins Workshop*, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, Maio 2019.

Simões, D., Carbas, B., Soares, A., Freitas, A., Silva, A.S., Silva-Pinto, T., Brites, C., Diogo, E., Andrade, E. (2022). Controlling *Fusarium* and Mycotoxins Contaminations of Maize Grains: The Use of Two Different Treatments (em preparação para submissão na revista *Plants*)

Video youtube

11º Colóquio Nacional do Milho | 1º Encontro das Culturas Cerealíferas, 5 Março 2021. <https://www.youtube.com/watch?v=ePHodQQ7EUo>

Grupo Operacional



“Novas estratégias de integração sustentáveis que garantam a qualidade e segurança na fileira do milho nacional”

Parceiros do Projeto:

- | **ANPROMIS** - Ass. Nac. Prod. de Milho e Sorgo
- | **AGROMAIS** - Entrepasto Comercial Agrícola, CRL
- | **INIAV** - Inst. Nac. Inv. Agrária e Veterinária
- | **ISO** - Instituto de Soldadura e Qualidade
- | Arminda Aurora D. H. Sousa Luz
- | Maria Francisca Henriques da Luz Lino Caetano
- | Quinta da Cholda, SA
- | Sociedade Agrícola Quinta da Labruja, SA
- | Sociedade Agrícola São João de Brito, SA

Relatório Final do Projeto

Lisboa, 27 de Dezembro de 2021

