



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

---

## **Detecção de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell em coníferas da região central de Portugal**

**Detection of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in coniferous of the central region of Portugal**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal (Universidade de Coimbra).

**Autor:** Diana Sofia Coutinho Silva de Paiva

---

Julho de 2011

*“Existence is a strange bargain. Life owes us little, we owe it everything. The only true happiness comes from squandering ourselves for a purpose.”*

**William Cowper (1731-1800)**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta dissertação.

Ao Prof. Doutor António Portugal, por toda a dedicação, empenho, disponibilidade, confiança e orientação que me concedeu ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Jorge Canhoto, Coordenador do Mestrado, pelo apoio e dinâmica que mostrou durante estes dois anos.

À Autoridade Florestal Nacional, na pessoa da Engenheira Dina Ribeiro, pela oportunidade criada na participação deste projecto.

À Dona Eulália, funcionária do departamento, pela ajuda na preparação dos meios de cultura.

À Sandra Videira, com quem aprendi muito e, apesar da distância, nunca deixou de me ajudar e incentivar.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, João Trovão e Ludgero Avelar, pela cooperação, amizade e boa disposição.

Ao Bruno Rosa, o meu namorado, pela paciência e ajuda com o meu inglês.

Aos meus pais e avó, pelo esforço para poder estar aqui hoje e pelo apoio incondicional que sempre me deram.

*A todos,  
O meu sincero muito obrigado.*

## RESUMO

Numa altura em que a Floresta de Pinho em Portugal se encontra extremamente fragilizada pelo alastramento do nemátodo da Madeira do Pinheiro a todo o território continental, surge uma nova ameaça, o que tende a agravar o estado fitossanitário do Pinhal. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell), agente responsável pelo cancro resinoso do pinheiro, foi oficialmente assinalado em Portugal em Abril de 2008, num viveiro localizado na cidade de Anadia. O cancro resinoso afecta várias espécies de *Pinus*, tendo sido também observado em *Pseudotsuga menziesii*. Esta doença representa uma grande ameaça, pois provoca uma acentuada redução no crescimento e na qualidade da madeira e causa uma elevada taxa de mortalidade. *F. circinatum* foi considerado um organismo de quarentena em inúmeros países do mundo o que promoveu o desenvolvimento de ferramentas específicas para a detecção deste patogene. O trabalho aqui desenvolvido visava a detecção da presença de *Fusarium circinatum* em diferentes espécies de *Pinus* e *Pseudotsuga menziesii* provenientes da região centro de Portugal. Até Maio do presente ano foram recebidas um total de 85 amostras de *Pinus* sp. (com uma quantia variável de plantas). De cada amostra seleccionou-se um número representativo de plantas, dando especial atenção aos indivíduos que apresentavam sintomas. No caso de plantas aparentemente saudáveis a selecção foi feita ao acaso. Destas, foram recolhidos pequenos fragmentos (1cm de comprimento, 4 fragmentos por planta) nas áreas com lesões ou, no caso de plantas assintomáticas, do sistema radicular. Efectuou-se uma esterilização superficial destes pedaços com hipoclorito de sódio a 2% e posteriormente inocularam-se em PDA (potato dextrose agar) suplementado com 0,5 mg/ml de estreptomicina. Ao fim de 5 dias, todas as colónias visualmente identificadas como *Fusarium* foram isoladas em PDA e SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar) e incubadas a 25°C durante 10 dias. A identificação da espécie *Fusarium circinatum* foi feita primariamente com base no aspecto da cultura e em características morfológicas. Esta identificação foi confirmada por meio de PCR, onde foram utilizados *primers* específicos para esta espécie, CIRC1A/CIRC4A, resultando num fragmento de 360 pb da região IGS (Intergenic Spacer Region) do ADN ribossomal. Das 85 amostras, apenas 3 se mostraram positivas. O primeiro resultado positivo proveio de uma amostra colhida num viveiro onde o fungo já havia sido detectado e supostamente erradicado. O segundo foi isolado, pela primeira vez, de material vindo de um viveiro diferente. O

último teve origem numa plantação na qual foram utilizadas plantas doentes provenientes de um viveiro contaminado. Casos como estes acarretam graves consequências, quer em termos financeiros bem como a ameaça de uma espécie de grande valor, o que reforça a importância de uma atempada detecção e controlo da doença.

**Palavras-chave:** Cancro resinoso; diagnóstico; *Pinus* spp.; *Pseudotsuga menziesii*.

## ABSTRACT

At a time when the Portuguese Pine forest is extremely fragile due to the spread of the pine wood nematode through the entire continental territory, a new threat emerges which tends to worsen the phytosanitary condition of the forest. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorph *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell), the casual agent of pitch canker disease, was officially reported in Portugal on April 2008 in a nursery located in Anadia. Pitch canker affects several species of the genus *Pinus* and is also reported to affect *Pseudotsuga menziesii*. This disease is a serious threat to pine forests wherever it occurs, by reducing growth and timber quality and causing extensive tree mortality. *F. circinatum* has been listed as a quarantine organism in numerous countries throughout the world, which prompted the development of specific tools for the detection of this pathogen. The purpose of this research is to detect the presence of *Fusarium circinatum* in *Pinus* spp. and *Pseudotsuga menziesii* from the central region of Portugal. Until May of the current year a total of 85 samples of *Pinus* sp. (each with a variable number of plants) were received. From each sample, a certain number of plants was selected to represent it, giving special attention to individuals displaying the symptoms. If no symptoms were observed the selection was made randomly. From the selected plants, small fragments were collected (1cm long, 4 pieces per plant) in the areas displaying lesions or in the case when no symptoms were observed, the fragments were removed from the root system. A superficial sterilization was performed using 2% sodium hypochlorite, and isolations were done on PDA (potato dextrose agar) supplemented with 0.5 mg/ml of streptomycin sulfate. After 5 days, the visually identified *Fusarium* species were isolated to obtain pure cultures on PDA and SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar) and incubated at 25°C for 10 days. The species was identified as *Fusarium circinatum* on the basis of morphological and culture medium characteristics. The identification was confirmed by PCR with specific primers CIRC1A/CIRC4A, resulting in a 360 bp DNA fragment of the IGS (Intergenic Spacer) region of the rDNA. Out of the 85 samples, only 3 displayed signs of contamination. The first positive result belonged to a sample obtained in a nursery where the fungus had already been detected and supposedly eradicated. The second was isolated from the first time on a different nursery. The last one originated in a plantation where plants from a contaminated nursery were used. This situation carries severe consequences such

as great financial losses as well as a threat to a species of great value, which strengthens the importance of a timely detection and control of the disease.

**Keywords:** diagnosis; *Pinus* spp.; pitch canker disease; *Pseudotsuga menziesii*.

## ÍNDICE

1 - Introdução.....	16
1.1 - O género <i>Fusarium</i> .....	16
1.2 - O cancro resinoso do pinheiro - <i>Fusarium circinatum</i> .....	17
1.2.1 - Taxonomia .....	17
1.2.2 - Distribuição geográfica.....	18
1.2.3 - Hospedeiros e a sua susceptibilidade.....	20
1.2.4 - Sintomas.....	22
1.2.5 - Biologia e epidemiologia .....	24
1.2.6 - Controlo .....	26
1.2.7 - Importância e impacto económico .....	27
1.3 - Detecção de <i>F. circinatum</i> .....	29
1.3.1 - Identificação morfológica .....	29
1.3.1.1 - Meios de cultura .....	29
1.3.1.2 - Caracteres macroscópicos .....	29
1.3.1.3 - Caracteres microscópicos .....	30
1.3.1.4 - Micotoxinas .....	31
1.3.2 - Identificação molecular.....	31
1.4 - Objectivos.....	32
2 - Materiais e Métodos .....	34
2.1 - Material vegetal .....	34
2.1.1 - Recolha e transporte.....	34
2.1.2 - Amostras .....	34
2.2 - Metodologia.....	34
2.2.1 - Selecção do material .....	35
2.2.2 - Lavagens .....	35
2.2.3 - Recolha de fragmentos vegetais.....	35
2.2.4 - Esterilização.....	36
2.2.5 - Inoculação .....	36
2.2.6 - Isolamento.....	36
2.2.7 - Preparação dos meios de cultura.....	37
2.2.7.1 - Potato Dextrose Agar .....	37
2.2.7.2 - Spezieller Nährstoffarmer Agar .....	38

2.2.8 - Identificação morfológica .....	38
2.2.9 - Identificação molecular.....	38
2.2.9.1 - Extracção de ADN.....	39
2.2.9.2 - Análise da região IGS.....	39
2.3 - Eliminação de desperdícios .....	40
2.4 - Comunicação dos resultados .....	40
3 - Resultados e Discussão .....	42
3.1 - Identificação morfológica.....	44
3.2 - Identificação molecular .....	46
3.3 - Outra informação.....	48
4 - Conclusão e Perspectivas .....	50
5 - Referências Bibliográficas .....	52
5.1 - Livros e artigos .....	52
5.2 - Referências <i>online</i> .....	63
5.3 - Referências <i>online</i> de imagens .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esporos de diferentes espécies fúngicas com formato semelhante, (A) <i>Fusarium solani</i> , (B) <i>Geoglossum umbratile</i> , (C) <i>Oedohysterium sinense</i> , (D) <i>Tubeufia cylindrothecia</i> , (E) <i>Ascocoryne cylichnium</i> .....	17
<b>Figura 2</b> - Distribuição mundial de <i>F. circinatum</i> até 2006. ....	19
<b>Figura 3</b> - Pontos de ocorrência de <i>F. circinatum</i> na União Europeia (viveiros, plantações ou florestas nativas) até 2009. ....	20
<b>Figura 4</b> - Distribuição geográfica das espécies hospedeiras de <i>F. circinatum</i> na Europa.....	21
<b>Figura 5</b> - Sintomas do cancro resinoso em plantas jovens, (A) agulhas secas, (B) ápices murchos, (C) esporodóquios, (D) exsudações de resina, e em plantas adultas, (E e F) cancros resinosos e tecidos impregnados de resina, (G) agulhas secas. ....	23
<b>Figura 6</b> - Características morfológicas de <i>F. circinatum</i> , (A) aspecto da cultura em PDA, (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças, observados directamente em SNA, (C) macroconídios, (D) microconídios, (E) hifas estéreis enroladas, visualizadas em SNA. ....	30
<b>Figura 7</b> - Posição da região IGS relativamente à região ITS no ADN ribossomal [23]. .....	31
<b>Figura 8</b> - Fotografia das amostras vegetais número 22 (plantas jovens) e 59 (ramos de planta adulta). ....	34
<b>Figura 9</b> - Esquema da recolha dos fragmentos do sistema radicular em plantas jovens. .....	35
<b>Figura 10</b> - Esquema dos processos efectuados desde a recolha de fragmentos vegetais, inoculação até ao isolamento das colónias. ....	37
<b>Figura 11</b> - Meios de cultura a secar dentro da câmara de fluxo laminar. ....	37
<b>Figura 12</b> - Parâmetros utilizados na reacção de PCR para amplificação da região IGS. .....	39

**Figura 13** - (A) Eppendorfs com os produtos obtidos por PCR de vários isolados de diferentes amostras, (B) carregamento do gel para eletroforese com esses produtos. ... 40

**Figura 14** - Colónia de *F. circinatum*, (A) aspecto morfológico da cultura com 15 dias em PDA, (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças observados directamente em SNA (MO 100x), (C) hifas enroladas presentes em SNA (MO 40x). ..... 45

**Figura 15** - Isolados identificados como *F. circinatum*, (A) aspecto morfológico da cultura com 15 dias em PDA, (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças observados directamente em SNA (MO 100x), (C) hifas enroladas presentes em SNA (MO 100x). ..... 45

Figura 16 - Géis de agarose obtidos por eletroforese com os *amplicons* de 360pb resultantes do PCR utilizando os *primers* CIRC1A/CIRC4A específicos para *F. circinatum*. (C<sup>+</sup> - controlo positivo, C<sup>-</sup> - controlo negativo, M - marcador molecular (HyperLadder), I<sup>1+</sup> - primeiro isolado positivo, I<sup>2+</sup> - segundo isolado positivo, I<sup>3+</sup> - terceiro isolado positivo). ..... 47

**Figura 17** - Outros organismos encontrados ao longo do tratamento das amostras vegetais, (A) estruturas reprodutoras fúngicas na superfície das agulhas, (B) nemátodo, (C) larva. .... 48

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA. ....	37
<b>Tabela 2</b> - Composição do meio de cultura SNA. ....	38
<b>Tabela 3</b> - Sequência dos primers específicos para amplificação da região IGS do ADN ribossomal de <i>F.circinatum</i> . (*primer reverso).....	39
<b>Tabela 4</b> - Resultados obtidos para a detecção da presença de <i>F. circinatum</i> em <i>Pinus</i> spp. e <i>Pseudotsuga menziesii</i> . (CS - com sintomas, SS - sem sintomas, SI - sem informação, P - positivo, N - negativo). ....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Ampère

AFN - Autoridade Florestal Nacional

ANEFA - Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CFE - Centre for Functional Ecology (Centro de Ecologia Funcional UC)

CGF - Complexo *Gibberella fujikuroi*

EFSA - European Food Safety Authority

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization

FCTUC - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Fig. - Figura

g - gramas

IGS - Intergenic Spacer

INRB - Instituto Nacional de Recursos Biológicos

ITS - Internal Transcribed Spacer

KCL - Cloreto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Dihidrogenofosfato de potássio

$\text{KNO}_3$  - Nitrato de potássio

KOH - hidróxido de potássio

$\text{m}^3$  - metro cúbico

$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Sulfato de magnésio

ml - mililitro

mM - miliMolar

MO - Microscópio Óptico

pb - pares de base

PCR - Polimerase Chain Reaction

PDA - Potato Dextrose Agar

PIB - Produto Interno Bruto

rADN - ADN ribossomal

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

SNA - Spezieller-Nährstoffarmer Agar

TBE - Tris-Borato-EDTA

TE - Tris-EDTA

UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

UV - Ultra Violeta

V - Volt

% - percentagem

°C - graus Celcius

μl - microlitro

[#] - Referência bibliográfica online

## Capítulo I – Introdução

## 1 - INTRODUÇÃO

---

### 1.1 - O género *Fusarium*

O género *Fusarium* representa um dos principais grupos de fungos Ascomicetos. Os seus membros encontram-se amplamente distribuídos por todo o mundo e são frequentemente responsáveis por grandes perdas económicas, ao reduzirem o rendimento de diversas colheitas e a qualidade dos alimentos nestas produzido (Nelson *et al.* 1983; Leslie & Summerell 2006; Kvas *et al.* 2009). Pelo menos 80% das plantas cultivadas estão associadas a, no mínimo, uma doença causada por espécies deste género (Fig.1) (Leslie & Summerell 2006).

Neste grupo, entre muitas outras, encontramos espécies que causam doenças em cereais (White 1980; Parry *et al.* 1995; Nyvall *et al.* 1999; Goswami & Kistler 2004), outras responsáveis por murchidões ou apodrecimento do sistema radicular em plantas ornamentais (Kraft *et al.* 1981; Linderman 1981; Nelson *et al.* 1981) e ainda alguns causadores de cancrios em Folhosas e/ou Resinosas (Bloomberg 1981; Dwinell *et al.* 1981, 2001; Wingfield *et al.* 2008). Mais recentemente, certos *Fusarium* foram também reconhecidos como sendo patógenos humanos associados a inúmeras infecções, sobretudo em pacientes com o sistema imunitário fragilizado (Nelson *et al.* 1994; Nucci & Anaissie 2002; Summerbell 2003; Dignani & Anaissie 2004). Este género é também muito conhecido pela produção de diversas micotoxinas contaminantes de alimentos (Marasas *et al.* 1984; Joffe 1986; Chelkowski 1989; Desjardins 2006), em que o seu consumo pode provocar sérias consequências em animais e mesmo no Homem (D'Mello *et al.* 1999; Placinta *et al.* 1999; Morgavi & Riley 2007).

Desde que foi estabelecido por Link, em 1809, o género *Fusarium* tem recebido muita atenção em literatura científica. Uma parte significativa destes estudos está relacionada com a sua controversa taxonomia (Leslie & Summerell 2006; Kvas *et al.* 2009), que na sua maioria foi dominada pela utilização de caracteres morfológicos para a diferenciação das diferentes espécies. Nos anos 90, com o aumento da utilização de métodos baseados no estudo do ADN, tornou-se claro que as classificações baseadas unicamente na morfologia subestimam a enorme diversidade existente dentro deste género. A utilização da informação contida no ADN revolucionou a sua classificação e permitiu a separação de muitas espécies distintas que anteriormente eram consideradas como uma só (O'Donnell 2000; O'Donnell *et al.* 2000a; O'Donnell *et al.* 2004).

Actualmente, algumas das espécies melhores estudadas pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi* (CGF). Aqui encontram-se pelo menos 36 formas anamorfas de *Fusarium* spp. e do qual *Fusarium circinatum*, alvo do estudo aqui apresentado, também faz parte (Pérez-Sierra *et al.* 2007).

## 1.2 - O cancro resinoso do pinheiro - *Fusarium circinatum*

### 1.2.1 - Taxonomia

O conceito genérico para o diagnóstico de *Fusarium* em espécies vegetais utilizado por Link, baseava-se na presença de esporos com formato característico de canoa ou banana. Hoje sabemos que este não pode, no entanto, ser o único carácter a ter em conta nesta identificação (Fig.1) pois fungos distintos podiam ser equivocadamente identificados como pertencentes a este género (Leslie & Summerell 2006).



**Figura 1** - Esporos de diferentes espécies fúngicas com formato semelhante, (A) *Fusarium solani* [9], (B) *Geoglossum umbratile* [10], (C) *Oedohysterium sinense* [11], (D) *Tubeufia cylindrothecia* [12], (E) *Ascocoryne cylichnium* [13].

Ao longo dos anos, *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, agente responsável pela doença vulgarmente denominada de cancro resinoso do pinheiro, já sofreu várias alterações de designação (Leslie & Summerell 2006). Em 1946, quando descrito pela primeira vez, foi referido como uma espécie de *Fusarium* não identificada pertencente à secção *Liseola* (não produtores de clamidósporos) (Heptig & Roth 1946). Três anos mais tarde, foi designado como *Fusarium lateritium* Nees f.sp. *pini* Heptig, secção *Lateritium* (Snyder *et al.* 1949). Nos anos 70 foi reclassificado como *Fusarium moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenweber & Reinking, baseado na estrutura dos seus conidióforos e na produção abundante de microconídios, sendo reinserido na secção *Liseola* (Dwinell & Phelps 1977; Kuhlman *et al.* 1978). Em 1983 esta variedade foi considerada uma espécie independente, *Fusarium subglutinans* (Nelson *et al.* 1983). Correll *et al.* (1992), por observação de padrões RFLP do ADN mitocondrial e da

especificidade de hospedeiro, designou-o como uma *forma specialis* de *F. subglutinans*, denominando-o de *F. subglutinans* f.sp. *pini*.

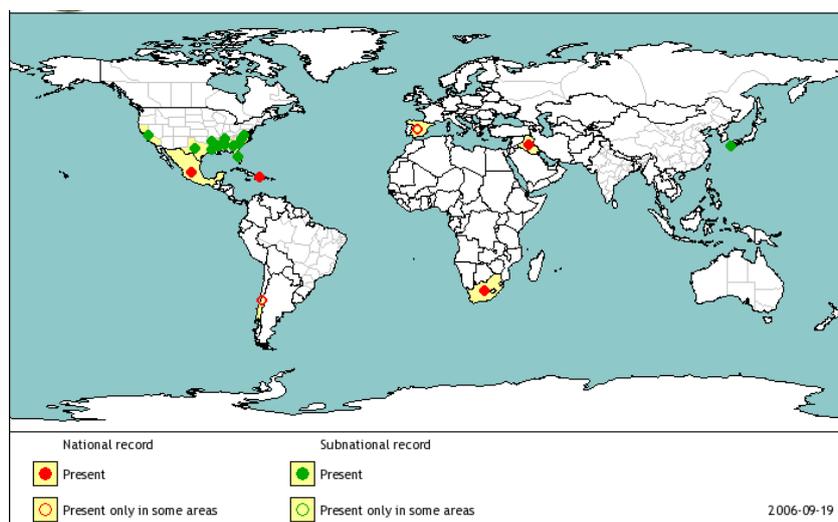
Em 1998, Nirenberg e O'Donnell classificaram este fungo como uma espécie distinta, pelo que lhe foi atribuído o nome de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. Esta diferenciação, relativamente a *F. subglutinans*, foi feita tendo em conta a estrutura das suas polifiálides e a presença de hifas estéreis circinadas. A forma teleomórfica foi designada de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell. A sua separação como um *taxon* distinto foi sustentada por linhagens filogenéticas baseadas na análise das sequências dos genes codificantes da  $\beta$ -tubulina e de factores envolvidos no alongamento durante a transcrição (O'Donnell *et al.* 1998; O'Donnell *et al.* 2000b). Subsequentemente foram levantadas algumas dúvidas relativas a esta classificação, pois apenas um pequeno número de isolados foi utilizado para a descrição morfológica e um único cruzamento na caracterização da fase sexuada. Britz *et al.* (2002) concluíram que as características morfológicas de entre um grande número de isolados de *F. circinatum* e *G. circinata* eram consistentes com a descrição feita originalmente, apenas com algumas pequenas diferenças. A diferenciação deste *taxon* foi, mais uma vez, confirmada pelas análises do gene da histona H3 (Steenkamp *et al.* 1999), do gene responsável pela reprodução sexuada (Steenkamp *et al.* 2000) e da região IGS do ADN ribossomal (Schweigkofler *et al.* 2004).

É esta a identificação que se mantém até aos dias de hoje. As nomenclaturas anteriormente utilizadas são consideradas como sinónimos desta espécie e prevalecem na literatura mais antiga. Incluído na Ordem Hypocreales e na Família Nectriaceae, *Fusarium circinatum* tem sido alvo de grande atenção nos últimos anos devido aos surtos de infecções severas que tem causado, o que conduziu à sua inclusão na lista A1, nº 306, da EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) como organismo de quarentena.

### **1.2.2 - Distribuição geográfica**

O cancro resinoso é autóctone do sudeste dos Estados Unidos da América, onde foi registado pela primeira vez em 1946 (Hepting & Roth 1946). Esta doença ocorre naturalmente na região abrangida pela Flórida, no sul, Virgínia, a norte, até ao Texas, mais a sudoeste (Dwinell *et al.* 1985), onde ocasionalmente, sob condições de stress abiótico, podem ocorrer surtos bastante severos (Blakeslee *et al.* 1979; Barrows-Broadus & Dwinell 1985). Aí, normalmente causa danos económicos apenas em

plantações ou viveiros, sendo raro torna-se um problema em florestas nativas de *Pinus* spp. (Blakeslee *et al.* 1979). Em 1986, foi observado pela primeira vez na Califórnia, na costa oposta do País (McCain *et al.* 1987). A sua incidência mais severa ocorreu no distrito de Santa Cruz em populações de *Pinus radiata*, *Pinus muricata* e *Pinus halepensis*, sendo apontado como o responsável pela debilidade geral e amarelecimento dos pinheiros. Inicialmente encontrava-se confinado a plantações, mas em 1992 foi observado em populações naturais de *P. radiata* em Monterey. Poucos anos mais tarde havia evidências de que a doença se alastrara por toda a costa do estado da Califórnia (Gordon *et al.* 1996).



**Figura 2** - Distribuição mundial de *F. circinatum* até 2006 [14].

Até aos anos 80, o único registo da doença fora dos Estados Unidos foi feita por Heptig e Roth (1953), onde denotavam a sua abundância, no Haiti, em *Pinus occidentalis*. Desde então, já se há disseminado por outros Continentes (Fig.2). No fim dos anos 80, foi detectada em indivíduos de *Pinus luchuensis* que exibiam cancrs resinosos ao longo do tronco, nas ilhas de Amamiooshima e Okinawa, no Japão (Muramoto & Dwinell 1990).

*F. circinatum* surgiu na África do Sul, em 1990, num viveiro florestal causando um apodrecimento geral das plântulas de *Pinus patula* (Viljoen *et al.* 1994). Provavelmente, terá sido introduzido de forma acidental via sementes infectadas provenientes do México (Britz *et al.* 2001). Após o surto inicial a infecção estendeu-se a outros viveiros, onde causou sérios problemas em várias espécies de *Pinus* (Britz *et al.* 2001 e 2005). Na África do sul, o sintoma típico desta doença, presença de cancrs resinosos, não era observado em árvores adultas (Viljoen *et al.* 1994; Wingfield *et al.* 2002). No ano de 1995 foi confirmada a sua presença no México, predominantemente em plantações de *P.*

*radiata* e *P. halepensis* e em povoamentos naturais de *P. douglasiana*, *P. leicophylla*, *P. durangensis* entre outras espécies de *Pinus* (Dwinell *et al.* 2001). Sete anos mais tarde, comprovou-se a sua introdução no Chile, onde a situação da doença era semelhante à encontrada na África do Sul (Wingfield *et al.* 2002).

Este fungo foi referenciado pela primeira vez na União Europeia (Fig.3) em 2005, no norte de Espanha, em viveiros de *P. radiata*, onde provocou uma extensa mortalidade das plantas jovens, e *P. pinaster* e em povoamentos de *P. radiata* (Landeras *et al.* 2005; Pérez-Sierra *et al.* 2007). Itália foi o segundo país a reportar a doença, tendo os primeiros sintomas sido observados no norte do país em árvores adultas de *P. halepensis* e *P. pinea*, no Inverno de 2003-2004 (Carlucci *et al.* 2007). Em 2006, o boletim da EPPO registava a sua ocorrência em França, em *Pseudotsuga menziesii* (EPPO 2006). Em Portugal, foi oficialmente assinalado no mês de Abril de 2008, em grupos de *P. radiata* e *P. pinaster*, num viveiro situado na cidade de Anadia, na região central de Portugal (Bragança *et al.* 2009).



**Figura 3** - Pontos de ocorrência de *F. circinatum* na União Europeia (viveiros, plantações ou florestas nativas) até 2009 [15].

A possibilidade de dispersão de *Fusarium circinatum* é uma grande preocupação para países como a Austrália e Nova Zelândia, onde existem extensas plantações de espécies susceptíveis a este fungo (Dick 1998).

A sua ocorrência global prevalece em áreas costeiras (EFSA 2010).

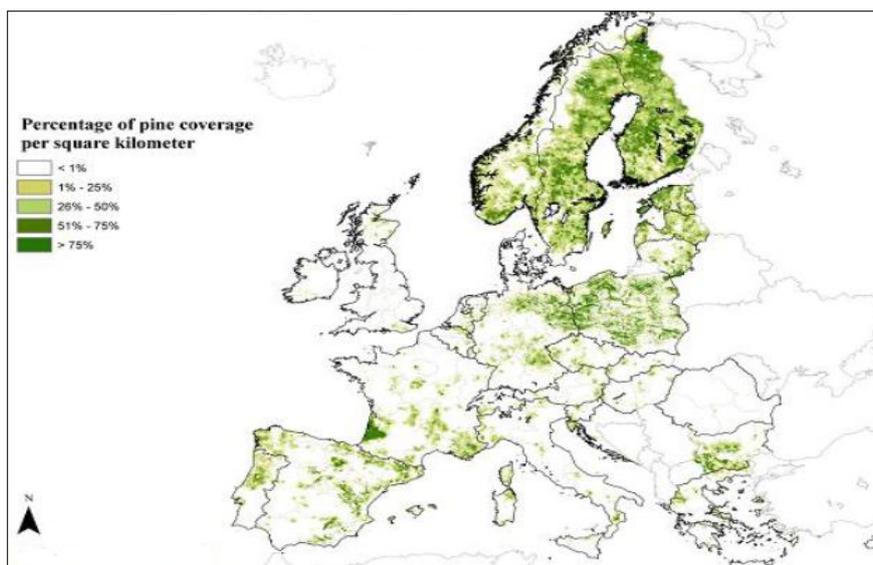
### 1.2.3 - Hospedeiros e a sua susceptibilidade

São consideradas mais de 47 espécies de *Pinus* susceptíveis a este fungo (Dick 1998), incluindo espécies tipicamente mediterrânicas, como *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. sylvestris*, e outras originárias da América do Norte, tais como *P. contorta*

e *P. strobus*, e da Ásia, *P. densiflora* e *P. thunbergii*, mas comumente plantadas na Europa (Fig.4) (EPPO 2005).

*Pseudotsuga menziesii* é a única espécie, fora do género *Pinus*, afectada pelo patógeno (Storer *et al.* 1994). Alóctone da Europa, encontra-se especialmente em jardins e plantações, tendo por isso uma distribuição bastante esparsa (EFSA 2010).

Apesar de o Pinheiro ser o hospedeiro usual para *F. circinatum*, algumas espécies parecem ser resistentes à sua infecção existindo ainda diferenças quantitativas de entre aquelas que lhe são susceptíveis (Rockwood *et al.* 1988; Viljoen *et al.* 1995a). Existem indicações de que *P. radiata* será uma das mais susceptíveis (Correl *et al.* 1991; Dick 1998; Hodge & Devorak 2000). *Pinus brutia* e *P. thunbergiana* são exemplos de espécies resistentes. A resistência relativa entre as diferentes espécies é controlada não só por factores genéticos, mas também por factores ambientais (McCain *et al.* 1987; Gordon *et al.* 1998).



**Figura 4** - Distribuição geográfica das espécies hospedeiras de *F. circinatum* na Europa [15].

Barrows-Broadus e Dwinell (1980) sugeriram que o fungo responsável pelo cancro resinoso fosse também patogénico para *Gladiolus* spp., sendo esta hipótese mais tarde refutada por Viljoen *et al.* (1995b), que mostrou que o fungo responsável pelo apodrecimento dos bolbos de *Gladiolus* era a espécie *Fusarium proliferatum*.

Até à data e até prova em contrário, *F. circinatum* é patogénico exclusivamente em coníferas.

#### 1.2.4 - Sintomas

O cancro resinoso é uma doença dinâmica. Cada surto é um caso singular, resultante da interacção única entre o patógeno, o seu hospedeiro e as condições bióticas e abióticas características do local (Dwinell *et al.* 1985).

*Fusarium circinatum* pode afectar as partes vegetativas e reprodutivas dos hospedeiros susceptíveis, em qualquer fase do seu desenvolvimento. Raízes, troncos, ramos, rebentos, agulhas, pinhas e sementes podem ser infectados (Dwinell *et al.* 1985; AFN 2010). Em adição, os sintomas desta doença variam entre as diferentes espécies hospedeiras (Dwinell *et al.* 1985). Em *Pseudotsuga menziesii* é caracterizada pelo perecimento dos galhos, com inchaços resinosos no ponto de infecção, não acarretando danos maiores (Storer *et al.* 1994). Por sua vez, tem sido demonstrada a capacidade de causar danos fisiológicos bastante severos em *Pinus* spp., conduzindo, muitas vezes, à morte do indivíduo em questão.

Em geral, os sintomas característicos nas plantas adultas (Fig.5, E, F e G) incluem a presença de cancos, frequentemente associados a exsudações abundantes de resina. Estes podem rodear por completo o tronco e os ramos, havendo a possibilidade de estrangulamento da parte apical e conseqüente morte da copa da árvore (Landeras *et al.* 2005). A remoção da casca da árvore expõe as lesões subcorticais, deixando visível os tecidos descolorados e impregnados em resina (EPPO 2009). Na parte aérea ocorre clorose, vermelhidão e queda das agulhas nos ramos infectados, em simultâneo com a seca dos mesmos (Correll *et al.* 1991; EPPO 2009), resultado da invasão das hifas de *F. circinatum* do córtex adjacente para dentro dos vasos xilémicos (Barrows-Broadus & Dwinell 1984). As pinhas nestes ramos podem também ser afectadas, correndo o risco de abortar antes de se desenvolverem completamente (Correll *et al.* 1991; EPPO 2009; AFN 2010). A infecção das raízes é normalmente observada em plantas jovens, mas pode ocorrer em raízes expostas de árvores adultas. Os sintomas nas raízes incluem a disrupção do córtex e descoloração dos tecidos (EPPO 2009).

A infecção por *F. circinatum* promove um declínio muito acentuado no volume de crescimento e na qualidade da madeira, atribuído ao stress hídrico e à morte progressiva dos ramos (Dwinell & Phelps 1977; Arvanitis *et al.* 1984).

Nas plantas jovens (Fig.5, A, B, C e D) são igualmente observadas lesões no caule e exsudações de resina. As agulhas adquirem uma coloração castanha avermelhada, acabando por secar da base para o topo da planta. Murchidão e encurvamento dos ápices

(EPPO 2009; AFN 2010), consequência da capacidade do fungo obstruir a circulação da água pelos feixes vasculares. Este sintoma pode também ser observado em ramos novos de árvores adultas (Solel & Bruck 1990). A mortalidade, pré e pós emergência, das plântulas é muito elevada (Viljoen *et al.* 1994). É frequente o apodrecimento radicular em mudas originadas a partir de sementes contaminadas (EFSA 2010).

Plantas jovens infectadas nem sempre são evidentes, encontrando-se o patógeno somente na parte inferior da planta (sistema radicular), coberta pelo solo (EPPO 2009). Estas infecções são detectadas apenas quando o fungo atinge o colo (linha do solo) da planta e começam a ser manifestados alguns sintomas na parte aérea (EPPO 2009).

Ocasionalmente, podem ser observados esporodóquios (massa de esporos) de cor salmão na superfície dos ramos e do solo, em exemplares jovens ou adultos (AFN 2010).



**Figura 5** - Sintomas do cancro resinoso em plantas jovens, (A) agulhas secas [19], (B) ápices murchos [19], (C) esporodóquios [17], (D) exsudações de resina, e em plantas adultas [18], (E e F) cancros resinosos e tecidos impregnados de resina [16], (G) agulhas secas [17].

Em ambos, indivíduos sintomáticos ou assintomáticos, o fungo pode estar presente permanecendo como endófito, não havendo nenhum sinal da sua presença (Storer *et al.* 1998; Dwinell *et al.* 2001).

As sementes não apresentam qualquer sintoma, no entanto o patógeno pode estar presente na superfície e/ou no seu interior, tornando-as um ótimo vector de disseminação da doença (AFN 2010). A termo de curiosidade, segundo a EUROSTAT, em 2008, 11,220 toneladas de pinhões, frescos ou secos, com e sem casca, foram importados dentro dos 27 membros da União Europeia, dos quais 445 toneladas destinavam-se a sementeira (EFSA 2010).

Os sintomas não são exclusivos desta doença, sendo facilmente confundidos com aqueles causados por infecções de outros organismos, como por exemplo *Sphaeropsis sapinea*, requerendo análises laboratoriais para a confirmação da sua presença (EPPO 2009; AFN 2010).

### 1.2.5 - Biologia e epidemiologia

O inóculo de *F. circinatum* está disponível durante todas as estações do ano. A dispersão dos esporos ocorre, principalmente, durante os meses de Primavera, Verão e início do Outono, porém o fungo pode subsistir durante os meses de inverno em restos vegetais (Iturrutxa & Barredo 2006).

Na Natureza é conhecido por propagar-se assexuadamente através da produção de dois tipos de esporos, macro e microconídios. Até à data, o teleomorfo, *Gibberella circinata*, foi observado exclusivamente em culturas laboratoriais. Tal pode dever-se ao facto deste tipo de reprodução ser favorecida por condições ambientais diferentes, nomeadamente temperatura (Inman *et al.* 2008), àquelas que são óptimas para o surto da doença (Covert *et al.* 1999). Em adição as duas estirpes sexuais têm de estar presentes no mesmo local (Wikler *et al.* 2000). Contudo, a maior diversidade genética observada nas populações do sudeste dos EUA, México e do sul de África levam a crer que esta possa ocorrer em ambiente natural (Wikler & Gordon 2000).

A dispersão dos esporos ocorre através do vento, chuvas ou outros eventos relacionados com o clima (por exemplo, granizo) (Blakeslee *et al.* 1979; Kuhlman *et al.* 1982; Dwinell *et al.* 1985; Fraedrich & Dwinell 1997), insectos ou outros animais vectores (Hepting e Roth 1953; EFSA 2010) e pelo movimento de material vegetal infectado ou outras actividades levadas a cabo pelo Homem, como por exemplo práticas de silvicultura (Wikler & Gordon 2000; EFSA 2010). A longa distância, a disseminação da doença está sobretudo associada ao comércio de material vegetal, sendo a circulação de sementes infectadas o factor de maior risco, uma vez que nestas o fungo não é detectado visualmente (AFN 2010; EFSA 2010).

Qualquer ferida recente nos tecidos da planta, independentemente da causa ou da localização, serve como ponto de entrada para o patógeno (Dwinell *et al.* 2001). Aberturas naturais da planta, como lenticelas de rebentos e os estomas das agulhas, podem servir igualmente como pontos de acesso (Mansilla *et al.* 2005; AFN 2010).

Em árvores adultas, os ferimentos são normalmente provocados por insectos ou acções humanas, nomeadamente a utilização de ferramentas de poda ou qualquer outro

processo que lesione a planta (AFN 2010). Os insectos podem apresentar um papel duplo na infecção por *F. circinatum*. Além de transportarem o inóculo do fungo, criam feridas de alimentação permitindo a entrada de esporos por si transportados ou esporos já presentes na casca da árvore. No primeiro caso o insecto funciona como um verdadeiro vector de dispersão, no segundo apenas favorece o estabelecimento da doença (McCain *et al.* 1987; EFSA 2010). Estes insectos são essencialmente Coleópteros (Hoover *et al.* 1996; Dallara 1997; Storer *et al.* 2004). *Pinus radiata* é reconhecida como sendo a espécie associada ao maior número de insectos vectores da doença, comparativamente a qualquer outra espécie de *Pinus* (Dwinell *et al.* 2001).

Ganley (2006) sugeriu que outros animais, como por exemplo aves Passeriformes, possam também servir como potenciais agentes dispersores ou causadores de ferimentos.

Nas plantas jovens a infecção sucede, em geral, a partir de sementes infectadas ou de inóculo presente no substrato (EPPO 2005). O mecanismo através do qual este fungo contamina as sementes, encontra-se ainda pouco estudado. Storer *et al.* (1998) sugeriram que a infecção superficial ocorria pela entrada de propágulos nas pinhas abertas, enquanto a infecção sistémica dar-se-ia pelo crescimento das hifas do fungo através do pedúnculo de ligação, até o interior da semente. Uma planta contaminada, por contacto, facilmente transmite a doença para as plantas envolventes (Mansilla *et al.* 2005).

A utilização de material contaminado para reflorestação permite a disseminação da doença a novas áreas (Mansilla *et al.* 2005).

O meio ambiente afecta não só o fungo, mas também o hospedeiro e a sua susceptibilidade à doença. Determinados factores de stress como secas ou alagamentos do solo (Dwinell *et al.* 1985), fertilização excessiva (Fisher *et al.* 1981) e poluição (Carey & Kelly 1994) favorecem a maior incidência da doença. Clima ameno e humidade relativa elevada favorecem a infecção por este organismo, o que explica a distribuição geográfica da doença sobretudo em áreas costeiras (Gordon *et al.* 2001). Segundo a avaliação de risco de *F. circinatum* para a União Europeia feita pela European Food Safety Authority (EFSA), pela análise de padrões de clima e distribuição geográfica do fungo, vastas áreas no centro e norte de Portugal encontram-se sob a ameaça do estabelecimento da doença (EFSA 2010).

A sua sobrevivência como saprófita ainda não é bem compreendida. Estudos antigos indicavam que *F. circinatum* poderia comportar-se como um típico fungo habitante do

solo, semelhante às podridões (Dwinell & Barrows-Broadus, 1978; Dwinell *et al.* 1985). Todavia, Gordon *et al.* (2004) indicaram que este patógeno não sobrevive bem no solo, mas persiste tempo suficiente para que este substrato seja considerado um veículo de dispersão. A razão para tal é a elevada sensibilidade que *F. circinatum* apresenta a *Anthrobacter* spp., uma bactéria comum que vive em grandes quantidades no solo (Barrows-Broadus & Kerr 1981). Especialmente em viveiros, o solo é considerado uma das fontes primárias de inóculo (Dwinell & Barrows-Broadus, 1978). A ausência de *Fusarium* spp. no solo das florestas de coníferas pode dever-se, em parte, ao pH ácido que estes geralmente apresentam (Barrows-Broadus & Kerr 1981).

### 1.2.6 - Controlo

Até ao momento, não existem meios de promover um controlo absoluto do cancro resinoso do pinheiro em viveiro e plantações florestais (Wilson *et al.* 1995). Uma possível abordagem para a redução do impacto desta doença trata-se da aplicação de meios de gestão adequados, como por exemplo, medidas de quarentena (Dick 1998), técnicas de silvicultura apropriadas (Dwinell *et al.* 1985) e a selecção de espécies resistentes para cultivo (Gordon *et al.* 2001; Wingfield *et al.* 2002).

A implementação de medidas de quarentena é de grande importância de forma a evitar a dispersão e estabelecimento do fungo para novas áreas (Dick 1998). Estas medidas devem incluir restrição da importação e exportação de material florestal, assim como o seu movimento dentro do próprio país (Dick 1998; EFSA 2010).

Em plantações, a melhor forma para evitar estes surtos é a correcta e apropriada utilização das técnicas silvícolas. O stress ambiental aumenta a incidência da doença (Dwinell *et al.* 1985), por isso os locais de plantação de vem ser apropriados, a densidade de árvores não deve ser muito elevada e o local deve ter uma drenagem adequada. Elevados níveis de fertilização devem ser evitados (Fisher *et al.* 1981; Blakeslee *et al.* 1999). Não devem ser utilizadas técnicas que causem lesões nos hospedeiros, minimizando os pontos de infecção da doença (Dwinell *et al.* 1985). Os ramos doentes devem ser removidos. Embora este processo não reduza o progresso da doença ou aumente o tempo de vida da planta, diminui as quantidades de inóculo disponível (Gordon *et al.* 2001). Árvores severamente infectadas devem ser abatidas (Storer *et al.* 1994; Gordon *et al.* 2001).

Nos viveiros, um dos mais importantes meios de prevenção contra o cancro resinoso é a utilização de sementes livres do patógeno (Dwinell *et al.* 1985; Wingfield *et al.*

2008). No caso deste já se encontrar presente e a doença estar já declarada, deve ser estabelecido um período de quarentena, a fim de aplicar medidas de saneamento adequado (Burgess & Wingfield 2002). A utilização de água não contaminada para irrigação, solo e contentores estéreis, assim como a promoção do controlo de possíveis agentes dispersores, devem ser considerados de forma a diminuir a incidência do fungo e a prevenir surtos graves da doença (Wingfield *et al.* 2008). Todo o material contaminado deve ser arrancado e incinerado ou enterrado com cal viva, se possível, no próprio local (Gadgil *et al.* 2003; AFN 2010).

Equipamentos de poda, maquinarias e veículos utilizados em áreas infestadas devem ser igualmente limpos e desinfectados após a sua utilização minimizando o risco de espalhar o inóculo fúngico a outras áreas (Gadgil *et al.* 2003)

Químicos como tiabendazol (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S), pertencente ao grupo dos benzimidazóis, os fungicidas sistémicos mais utilizados comercialmente, foram testados em diferentes concentrações e mostraram-se ineficientes na redução na doença. Em adição, foram comprovados níveis relativamente altos de resistência a derivados deste composto, entre diferentes espécies de *Fusarium* (Yan & Dickman 1993).

A aplicação de peróxido de hidrogénio a 30% ou Thiram, em sementes contaminadas, mostrou-se eficaz na eliminação do patógeno presente na sua superfície (Mansilla *et al.* 2005). Contudo, nenhum método provou ser totalmente eficiente na eliminação do micélio do interior da semente, sem que esta fosse afectada (Storer *et al.* 1998; Wingfield *et al.* 2008).

A longo termo, a plantação de espécies resistentes deve ser considerada como uma alternativa na gestão da doença em plantações afectadas (Wingfield *et al.* 2002).

### **1.2.7 - Importância e impacto económico**

Existem cerca de 115 espécies de *Pinus* e todas são plantas lenhosas. Nativas do hemisfério norte, estas árvores são de grande importância em termos económicos e ecológicos [1].

Os pinheiros estão entre as espécies de maior valor comercial, sendo a sua madeira um dos principais produtos de interesse [1]. Largamente comercializada na Europa, é utilizada para inúmeros fins, como por exemplo em construção, produção de caixas de transporte ou fabrico de móveis. Só em 2005, entre os 27 países pertencentes à União Europeia foram produzidos 317 milhões de m<sup>3</sup> de madeira proveniente de coníferas,

Nota:

[#] - Optou-se por esta designação para as referências bibliográficas *online* devido à extensão do endereço electrónico correspondente.

num total de 426 milhões de m<sup>3</sup> (EUROSTAT 2007) [2]. A produção de polpa e papel é outra das suas utilidades. Portugal é o 11º maior produtor europeu de papel e cartão, com 1,8% da produção total, e o 4º maior produtor de pasta, com 7,1% do total. Esta indústria representa cerca de 7% da produção industrial portuguesa e 1,5% do PIB, empregando mais de 18000 pessoas (Celpa 2009) [3].

Dos pinheiros é também extraída resina, principalmente utilizada na produção de aguarrás, pês e óleos ou outras essências [4], e as suas sementes são muito apreciadas na alimentação [1]. Muitas vezes, são empregados na reflorestação de áreas degradadas, como antigas áreas mineiras. Apresentam ainda valor estético, sendo usados como árvores ornamentais em muitos parques ou jardins, não esquecendo o seu papel na época natalícia [1].

Aproximadamente 31% da floresta Portuguesa é ocupada por pinhal, do qual muitas espécies susceptíveis ao cancro resinoso do pinheiro fazem parte (Inventários Florestais Nacionais 2010) [5].

Segundo o divulgado pela Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente (ANEFA) a sustentabilidade da floresta de pinho em Portugal encontra-se numa situação crítica. Depois do nemátodo da madeira de pinheiro e da redução drástica da taxa de arborização que se tem verificado, o cancro resinoso do pinheiro é mais um entrave que coloca em risco não só as empresas do sector florestal, mas também toda a indústria que delas dependem para obterem a sua matéria-prima (ANEFA 2009) [6].

Desde 2009, os viveiros encontram-se sequestrados e impedidos de comercializar todas as espécies de *Pinus*, até ser confirmada a presença ou ausência do patógeno no local. Fornecedores de material vegetal de reprodução que apresentem amostras positivas para *F. circinatum* deverão ser proibidos de comercializar plantas coníferas durante os dois anos seguintes e ainda assistir à destruição de todos os lotes contaminados. No entanto, até essa data, apenas dois centros de análise (UTAD e INRB) estavam protocolados com a AFN, o que tem condicionado capacidade e celeridade de resposta. Esta situação tem deixado os viveiros em sobressalto, pois a falta de informação, pode comprometer as próximas campanhas, uma vez que não poderão correr o risco de realizar a sementeira e depois não poderem comercializar as plantas (ANEFA 2009) [6].

Em 2010, a FCTUC, em particular o CFE (Centro de Ecologia Funcional), foi também integrada no projecto, tendo recebido as primeiras amostras vegetais apenas no final desse ano (ANEFA 2009) [6].

Os prejuízos económicos derivados desta situação são, sem dúvida, difíceis de estimar (ANEFA 2009) [6].

### **1.3 - Detecção de *F. circinatum***

Não só em Portugal, mas em inúmeros outros países do mundo, *F. circinatum* foi considerado um organismo de quarentena o que levou ao desenvolvimento de técnicas específicas para a sua detecção.

A identificação de *F. circinatum* em *Pinus* spp. e *Pseudotsuga menziesii*, segundo o protocolo estabelecido pela European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), é realizada através da utilização de diferentes procedimentos, normalmente envolvendo a conjugação da análise de caracteres morfológicos com métodos moleculares.

#### **1.3.1 - Identificação Morfológica**

##### **1.3.1.1 - Meios de Cultura**

Potato Dextrose Agar (PDA) é um meio não selectivo, rico em hidratos de carbono e por isso utilizado para crescer um grande número de espécies de fungos. As estruturas reprodutoras aqui formadas são muito variáveis entre si, em forma e tamanho, sendo por isso pouco confiável para a análise das mesmas. Contudo, a morfologia da colónia, pigmentação e taxas de crescimento são consistentes, podendo ser usado no estudo destas características (Leslie & Summerell 2006).

Spezieller-Nährstoffarmer Agar (SNA), por ser um meio de cultura pobre em nutrientes, é normalmente utilizado para a identificação de microcaracteres e na manutenção de isolados de *Fusarium*. Além de limitar a degeneração da cultura, promove uma esporulação uniforme e um bom desenvolvimento das células conidiogénicas (Nirenberg 1976). Em adição, é transparente e as culturas podem ser observadas directamente ao microscópio (Leslie & Summerell 2006).

##### **1.3.1.2 - Caracteres Macroscópicos**

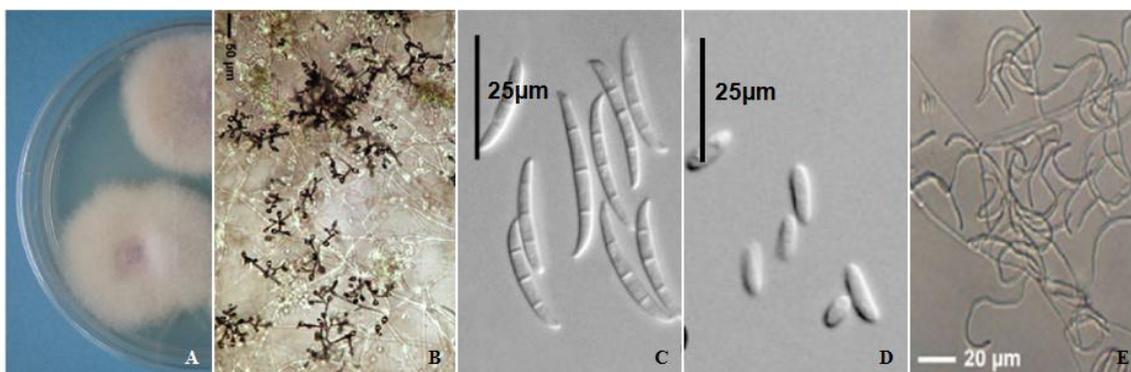
Em PDA, *F. circinatum* cresce relativamente rápido, em média 4,7 mm/dia a 20 °C. A colónia possui uma margem inteira, micélio branco de aspecto felpudo, lembrando algodão, com uma coloração violeta-acinzentada no centro (Fig.6, A). No reverso, o agar geralmente apresenta uma pigmentação que pode ir desde o acinzentado, violeta-acinzentado até um violeta escuro (Nirenberg & O'Donnell 1998; Leslie & Summerell 2006). A germinação dos conídios verifica-se numa ampla faixa de temperaturas,

lentamente a 5 °C e progressivamente mais rápido até um ideal entre 20 a 25 °C. O crescimento micelial é favorecido por temperaturas superiores a 10 °C, com um ótimo a 25 °C (Inman *et al.* 2008), e inibido a 55 °C (Liao *et al.* 2008).

Em SNA, o micélio possui um aspecto ralo, praticamente invisível a olho nú.

### 1.3.1.3 - Caracteres Microscópicos

Em cultura, *F. circinatum* produz dois tipos de mitósporos, macro e microconídios. Os conidióforos são erectos, de aspecto arbuscular (Fig.6, B), fortemente ramificados com terminação em mono ou polifiálides. Os microconídios encontram-se agregados em falsas cabeças, usualmente unicelulares (ocasionalmente com 1 septo), ovais ou obovóides, 7-12 x 2,5-3,9 µm, abundantes no micélio aéreo em SNA (Fig.6, D). Macroconídios tipicamente com 3 septos, delgados, com a célula apical ligeiramente curvada e a basal pouco desenvolvida, 32-48 x 3,3-3,8 µm, assemelhando-se àqueles de inúmeras outras formas anamorfias de *Fusarium* (Fig.6, C). São raramente observados. Esporodóquios igualmente pouco frequentes. Clamidósporos ausentes. A presença de hifas estéreis enroladas (circinadas) é uma das características distintivas desta espécie e da qual advém o seu epíteto “*circinatum*” (Fig.6, E). São observadas com segurança em SNA e ajudam no diagnóstico desta espécie (Nirenberg & O’Donnell 1998; Leslie & Summerell 2006).



**Figura 6** - Características morfológicas de *F. circinatum*, (A) aspecto da cultura em PDA [20], (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças, observados directamente em SNA [21], (C) macroconídios [22], (D) microconídios [22], (E) hifas estéreis enroladas, visualizadas em SNA [21].

Embora não utilizada para o propósito do presente trabalho, é possível obter a fase sexuada através do cruzamento de estirpes compatíveis, ocorrendo a formação de peritécios ovóides, roxo escuro que adquirem uma cor vermelha quando em contacto com ácido lácteo a 100% (Nirenberg & O’Donnell 1998; Britz *et al.* 2002). Os ascos são cilíndricos e albergam 8 ascósporos elipsoidais. Estas características são semelhantes às de outras espécies diferentes de *Fusarium* (Britz *et al.* 2002).

A enorme semelhança entre diferentes espécies de *Fusarium* torna, muitas vezes, difícil a sua rápida e exacta distinção, sendo necessários outros métodos para confirmação desta identificação.

#### 1.3.1.4 - Micotoxinas

Alguns isolados de *F. circinatum* produzem beauvericina (BEA) (Fotso *et al.* 2002), um ionóforo conhecido pelas suas propriedades insecticidas e capaz de induzir a ocorrência de morte celular programada, ou apoptose, em diferentes linhas celulares de mamíferos, incluindo humanos (Logrieco *et al.* 1998).

#### 1.3.2 - Identificação Molecular

Diferenças nas sequências de genes conservados são a forma mais fidedigna para identificação desta espécie (Steenkamp *et al.* 1999; Schweigkofler *et al.* 2004).

A identificação molecular pode ser conseguida por diferentes métodos, com diferentes especificidades, dependendo se é utilizado material vegetal ou micélio fúngico isolado em meio de cultura. Entre estes pode referir-se a técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), tal como apresentou Steenkamp *et al.* (1999), para a identificação de *F. circinatum* apenas em cultura pura, pois a presença de ADN proveniente do hospedeiro ou de algum contaminante pode afectar a qualidade e quantidade dos *amplicons*. *SyBr green real-time* PCR ou o PCR convencional, usando *primers* específicos para esta espécie desenhados por Schweigkofler *et al.* (2004), úteis para a detecção do fungo a partir de culturas puras e de sementes. Embora possam ser aplicados a ADN extraído directamente *in planta*, neste caso é necessária a verificação da natureza do *amplicon* por sequenciação. Real-time PCR combinando *primers* específicos com sondas, desenvolvidas por Ioos *et al.* (2009), aplicável a ADN quer de cultura pura, quer extraído directamente a partir de material vegetal, incluindo sementes.

Neste trabalho, optou-se pela utilização de PCR convencional que tem como alvo a região IGS (Intergenic Spacer) do ADN ribossomal (Fig.7).



**Figura 7** - Posição da região IGS relativamente à região ITS no ADN ribossomal [23].

Apesar de amplamente utilizada na identificação de outras espécies de fungos (Bruns *et al.* 1991; Seifert *et al.* 1995), a região ITS (Internal Transcribed Spacer) é ineficaz na identificação de espécies de *Fusarium*, devido à presença de duas cópias divergentes e não ortólogas da região ITS2 na maioria destas espécies (O'Donnell & Ciglenik 1997; O'Donnell *et al.* 1998).

A região IGS de *F. circinatum* é amplificada pela utilização dos *primers* específicos CIRC1A e CIRC4A, produzindo um fragmento de 360pb (Schweigkofler *et al.* 2004).

#### **1.4 - Objectivos**

Desde a sua descoberta em 1946, o cancro resinoso do pinheiro tornou-se gradualmente uma das doenças com maior impacto económico e ecológico.

Na sequência do seu aparecimento na Europa e tendo em conta a Directiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de Maio de 2000 [7], relativa às medidas de protecção contra a introdução na Comunidade Europeia de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação, a Comissão Europeia tomou medidas regulamentares de emergência estabelecidas na Decisão nº 2007/433/CE de 18 de Junho [8].

Em conformidade com estas medidas foi estabelecido pela Autoridade Florestal Nacional (AFN) um plano de prospecção, controlo e erradicação do cancro resinoso do pinheiro (*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell) para Portugal.

O objectivo deste trabalho foi a detecção de *Fusarium circinatum* em coníferas, nomeadamente *Pinus* spp. e *Pseudotsuga menziesii*, provenientes da região centro de Portugal, de forma a responder ao plano desenvolvido pela AFN.

## Capítulo II – Materiais e Métodos

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1 - Material vegetal

#### 2.1.1 - Recolha e transporte

O material vegetal utilizado neste estudo proveio da região central de Portugal. A recolha, condicionamento e transporte do mesmo foi da responsabilidade da AFN. O seu local de origem foi mantido em anónimo do investigador responsável pelo trabalho, tendo sido fornecida apenas alguma informação que o inspector responsável tenha considerado relevante (presença ou não de sintomas, espécie vegetal, entre outra).

#### 2.1.2 - Amostras

Cada amostra veio acondicionada em papel de jornal, dentro de um saco plástico devidamente selado e identificado com uma etiqueta exterior. Obedecendo ao sigilo exigido, no trabalho aqui apresentado o código original de cada etiqueta foi substituído por um número representativo.

As amostras de material vegetal adulto eram constituídas por um número variável de ramos, enquanto as de plantas jovens geralmente continham 60 exemplares completos (Fig.8).

Até ao final de Maio, do presente ano, receberam-se 85 amostras para análise.



**Figura 8** - Fotografia das amostras vegetais número 22 (plantas jovens) e 59 (ramos de planta adulta).

### 2.2 - Metodologia

A metodologia aqui empregada foi adaptada da ficha de diagnóstico para *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell proposta pela EPPO (2009).

Cada amostra foi cuidadosamente aberta e fotografada, de forma a manter-se um registo do material recebido.

Uma amostra foi tratada como um todo, não sendo feita diferenciação entre as várias plantas dentro da mesma. Isto aconteceu, pois a confirmação da presença do patógeno, independentemente do número de plantas contaminadas, compromete a amostra na totalidade.

### 2.2.1 - Selecção do material

Em amostras de plantas adultas, todos os ramos constituintes da amostra eram utilizados.

No caso de amostras de plantas jovens, das 60 plantas foi feita uma escolha mais ou menos aleatória, dando preferência àquelas com sinais de doença (quando presentes), de um número representativo de plantas, geralmente 25 a 30.

### 2.2.2 - Lavagens

Todo o material vegetal seleccionado foi lavado em água corrente, de forma a eliminar os restos de solo ou outros resíduos.

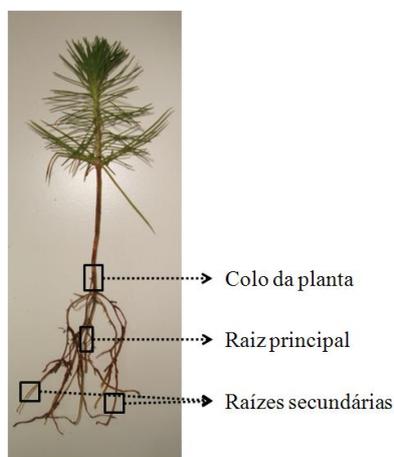
A água resultante da lavagem de cada amostra foi recolhida e, após a adição de lixívia comercial, foi colocada em repouso por um período mínimo de duas horas. Ao fim deste tempo foi coada e despejada.

Entre amostras, todo o material, bancadas e local de lavagem eram cuidadosamente desinfectados, evitando possíveis contaminações cruzadas.

### 2.2.3 - Recolha de fragmentos vegetais

Nas plantas adultas, de cada ramo foram retiradas várias fracções, com aproximadamente 1cm de comprimento, tendo especial atenção aos locais que apresentavam lesões (em média, 50 fragmentos por amostra). Em ramos aparentemente saudáveis a recolha foi feita ao acaso.

Em plantas jovens, daquelas seleccionadas, foram colhidos 4 fragmentos por planta, com 1 cm de comprimento, dando igualmente prioridade aos locais com sintomas (em média, 100 fragmentos por amostra). Em plantas assintomáticas os fragmentos foram removidos do sistema radicular, segundo o esquema abaixo apresentado (Fig.9).



**Figura 9** - Esquema da recolha dos fragmentos do sistema radicular em plantas jovens.

Os bisturis ou tesouras utilizados eram esterilizados à chama entre as diferentes amostras.

Os restos vegetais foram colocados no seu respectivo saco, que foi novamente fechado e guardado em ambiente fresco, para eventual repetição da análise ou destruição posterior.

#### **2.2.4 - Esterilização**

Os fragmentos removidos foram alvo dum esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 2% (lixívia comercial diluída a 50% da concentração original, 4 ou 5%), durante 2 minutos. Seguidamente realizaram-se 2 lavagens com água Milli-Q (*Millipore-Q-Gard*, EUA), previamente autoclavada.

#### **2.2.5 - Inoculação**

A inoculação do material recolhido foi feita em PDA, previamente preparado. Em cada caixa de Petri (9 cm de diâmetro) foram dispostos 7 fragmentos (Fig.11). De seguida, estas placas foram seladas, identificadas com o respectivo número da amostra e incubadas no escuro durante 5 dias a 25 °C (estufa).

#### **2.2.6 - Isolamento**

Ao fim desse tempo, as colónias visualmente identificadas como *Fusarium* sp. foram isoladas para PDA e SNA (caixas de Petri com 5 cm de diâmetro), de forma a obter colónias puras (Fig.10).

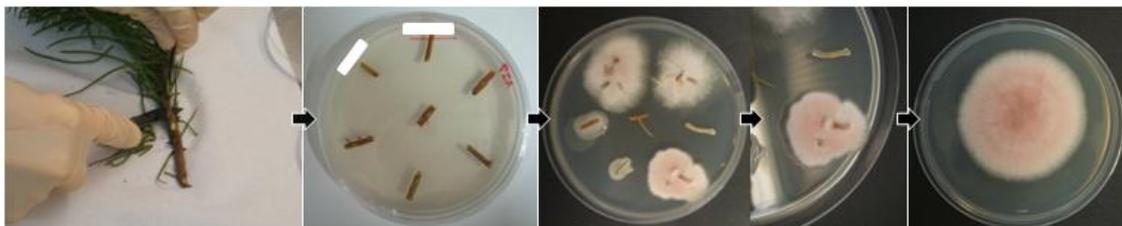
Os isolamentos realizaram-se pela remoção de uma pequena porção de micélio da colónia seleccionada, originada no passo anterior.

Após o isolamento, as placas foram igualmente seladas, identificadas e incubadas no escuro a 25 °C, desta vez por um período de 10 dias. As caixas de PDA e SNA da mesma colónia foram mantidas unidas.

Neste e no passo anterior, o selamento das placas de Petri foi feito com película aderente em substituição do parafilm vulgarmente utilizado. Além de acessível, não quebra com a temperatura e humidade, diminuindo o risco de contaminações. Também, todas as pinças e bisturis utilizados foram esterilizados à chama e em álcool a 96%, entre as diferentes amostras.

Todos os passos efectuados desde a remoção dos fragmentos até ao presente ponto, foram realizadas numa câmara de fluxo laminar, diminuindo o risco de contaminação

por outros microrganismos. Da mesma forma, a câmara foi desinfectada com álcool a 96% ou lixívia a 2% no início e no fim do processamento de cada amostra.



**Figura 10** - Esquema dos processos efectuados desde a recolha de fragmentos vegetais, inoculação até ao isolamento das colónias.

## 2.2.7 - Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados na inoculação e isolamento das culturas fúngicas foram preparados segundo as tabelas abaixo apresentadas (Tabelas 1 e 2). As quantidades indicadas destinam-se à preparação de 1 litro de solução. A esterilização dos mesmos foi feita por autoclavagem a 121 °C, à pressão de 1 atm, durante 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se o antibiótico, estreptomicina a 0,5 mg/ml (*Sigma*, EUA), para prevenir crescimento bacteriano. Na sua maioria, os antibióticos tornam-se instáveis quando aquecidos, sendo, por isso, adicionados apenas após a autoclaveagem e o ligeiro arrefecimento do meio de cultura. Os meios foram espalhados para placas de Petri grandes, com 9 cm de diâmetro, (PDA) e pequenas, 5 cm de diâmetro, (PDA e SNA), numa câmara de fluxo laminar, deixados solidificar (Fig.11), embalados e guardados numa caixa fechada, num local fresco, até ulterior utilização.



**Figura 11** - Meios de cultura a secar dentro da câmara de fluxo laminar.

### 2.2.7.1 - Potato Dextrose Agar (*Difco*<sup>TM</sup>, EUA)

A preparação do meio PDA foi efectuada segundo a receita do fabricante (Tabela 1), *Difco* EUA, como é indicado na tabela abaixo.

**Tabela 1** - Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA.

PDA ( <i>Difco</i> <sup>TM</sup> )	39g
Água destilada	1000 ml

### 2.2.7.2 - Spezieller Nährstoffarmer Agar

O meio SNA não existe comercialmente, tendo-se utilizado a receita indicada na Tabela 2. Este foi preparado no agitador magnético com aquecimento, facilitando assim a mistura dos diferentes componentes da mistura. Procedeu-se ao ajuste no pH para um valor de 5,7 pela adição de KOH 0,01N.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura SNA.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
KNO <sub>3</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,5g
KCL	0,5g
Glucose	0,2g
Sacarose	0,2g
Agar	20g
Água destilada	Perfazer volume

### 2.2.8 - Identificação morfológica

Dez dias após o isolamento efectuou-se uma identificação morfológica das colónias.

Os isolados estabelecidos em PDA utilizaram-se no estudo da morfologia da colónia e pigmentação do meio, enquanto nos isolados em SNA foi analisada a formação de microconídios, estrutura dos conidióforos e a presença de hifas estéreis enroladas, como foi descrito por Nirenberg & O'Donnell (1998) e Britz *et al.* (2002). As placas de SNA foram observadas directamente ao microscópio óptico, a uma ampliação de 40x ou 100x. Descartaram-se as espécies não identificadas como *Fusarium circinatum*. Às restantes procedeu-se à identificação molecular.

Foram sempre utilizadas colónias controlo de *F. circinatum*, com a mesma idade das culturas a ser identificadas, como meio de comparação (colónia controlo original fornecida pelo INRB).

A grande semelhança entre diferentes espécies de *Fusarium* muitas vezes dificulta a sua correcta identificação e por isso, em todos os casos de dúvida, procedeu-se sempre à confirmação molecular.

### 2.2.9 - Identificação molecular

A identificação morfológica da espécie *F. circinatum* foi comprovada com recurso a métodos moleculares.

Um resultado positivo resulta da corroboração da identificação morfológica com a molecular. Os restantes são considerados negativos.

### 2.2.9.1 - Extração de ADN

O micélio fúngico de cada isolado identificado anteriormente foi suspenso em 100µl de água destilada ou TE a 1x (solução stock 100x) (*Sigma*, EUA), congelado em gelo seco ou, em alternativa, no congelador por 3 minutos, descongelado a 75 °C e levado ao vortex por 2 minutos. Os passos anteriores foram repetidos 3 vezes e na última descongelação, o tempo é estendido para 15 minutos. No final, efectuou-se uma centrifugação por 5 minutos a 15700 g e 6,25 µl do sobrenadante foi utilizado no passo seguinte, como *template* na reacção de PCR (Schweigkofler *et al.* 2004).

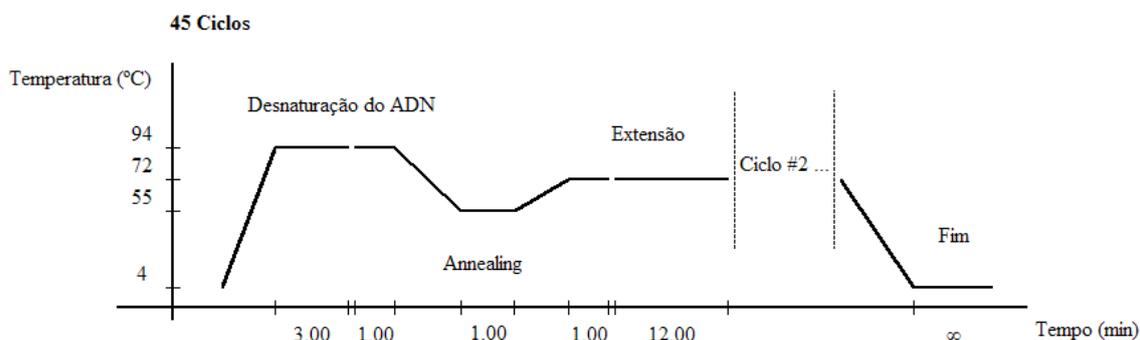
### 2.2.9.2 - Análise da região IGS

Para a amplificação da região IGS, utilizaram-se os *primers* CIRC1A e CIRC4A (Tabela 3), específicos para *F. circinatum*, resultando num fragmento de 360pb (Schweigkofler *et al.* 2004). A mistura para a reacção para cada isolado continha 3,75 µl de água ultrapura (*Sigma*, EUA), 12,5 µl de Jump Start Taq DNA polimerase (*Sigma*, EUA), 1,25 µl de cada *primer* a 10 mM e 6,25 µl de *template* de ADN, perfazendo um total de 25 µl de volume de amplificação. Para cada reacção de PCR foi também preparado um controlo negativo (sem ADN) e positivo (com ADN de *F. circinatum*).

**Tabela 3** - Sequência dos *primers* específicos para amplificação da região IGS do ADN ribossomal de *F.circinatum*. (\**primer* reverso)

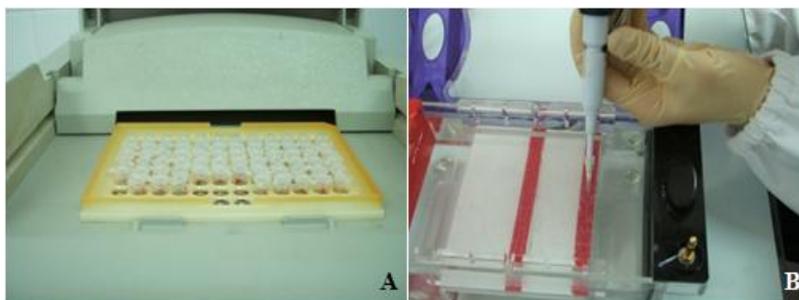
<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Alvo	Referência
CIRC1A	CTT GGC TCG AGA AGG G	360	região IGS rDNA	Schweigkofler <i>et al.</i> (2004)
CIRC4A*	ACC TAC CCT ACA CCT CTC ACT			

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, USA), segundo o esquema abaixo apresentado (Fig.12).



**Figura 12** - Parâmetros utilizados na reacção de PCR para amplificação da região IGS.

Os produtos de PCR obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Fig.13). O gel foi preparado misturando 0,6 g de agarose (*Pharmacia Biotech*, Suécia) com 50 ml de TBE (*Sigma*, EUA), a 1x (solução stock 10x) e corado com 0,3 µl de GelRed (*Sigma*, EUA). Após corrido durante 30 minutos a 100V e 120A, fez-se a observação do gel sob efeito de luz UV no *Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR System* (*Fisher*, EUA).



**Figura 13** - (A) Eppendorfs com os produtos obtidos por PCR de vários isolados de diferentes amostras, (B) carregamento do gel para eletroforese com esses produtos.

### 2.3 - Eliminação de desperdícios

Apenas depois de se obterem os resultados concretos é que os desperdícios das amostras poderiam ser eliminados. Até à data, manteve-se todo material recebido, em sala própria vedada. Amostras contaminadas devem ser incineradas ou enterradas com cal viva, enquanto as restantes podem ser enterradas sem qualquer tratamento.

Em todos os passos ao longo da metodologia são adoptados cuidados rigorosos com a limpeza e desinfecção dos materiais e instalações, pois como se trata de um organismo de quarentena é importante anular a possibilidade de contaminações para o exterior.

### 2.4 - Comunicação dos resultados

Com o término do tratamento de cada amostra, elaborou-se um relatório onde foi comunicado o resultado obtido à entidade responsável, a AFN. Os relatórios deviam ser emitidos num prazo máximo de 30 dias após a recepção da respectiva amostra. Nos casos positivos para a presença de *F. circinatum*, a AFN é, também, a responsável pelas medidas necessárias ao controlo e erradicação da doença *in situ*.

## Capítulo III – Resultados e Discussão

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 85 amostras recebidas entre Setembro de 2010 e Maio de 2011, apenas 3 se mostraram positivas para a presença de *F. circinatum*, tal como é indicado na tabela a seguir apresentada (Tabela 4, Partes I, II e III).

**Tabela 4** - Resultados obtidos para a detecção da presença de *F. circinatum* em *Pinus* spp. e *Pseudotsuga menziesii*. (CS - com sintomas, SS - sem sintomas, SI - sem informação, P - positivo, N - negativo).

Nº. Amostra	Data	Espécie	Agente Patogénico	Sintomas	Resultado
1	15 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
2	15 Set 2010	<i>Pinus radiata</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
3	15 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
4	15 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
5	15 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
6	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
7	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
8	23 Set 2010	<i>Pinus radiata</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
9	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
10	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
11	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
12	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
13	23 Set 2010	<i>Pinus nigra</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
14	23 Set 2010	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
15	23 Set 2010	<i>Pinus nigra</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
16	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
17	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
18	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
19	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
20	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
21	23 Set 2010	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
22	23 Set 2010	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
23	23 Set 2010	<i>Pinus radiata</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
24	23 Set 2010	<i>Pinus radiata</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
25	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
26	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
27	23 Set 2010	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
28	23 Set 2010	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	N
29	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
30	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
31	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
32	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
33	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N

(Tabela 4, Parte I)

Nº. Amostra	Data	Espécie	Agente Patogénico	Sintomas	Resultado
34	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
35	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
36	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
37	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
38	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
39	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
40	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
41	20 Jan 2011	<i>Pinus nigra</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
42	20 Jan 2011	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
43	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
44	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
45	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
46	20 Jan 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
47	21 Jan 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SS	<b>P</b>
48	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
49	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
50	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
51	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
52	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
53	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	<b>P</b>
54	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
55	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
56	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
57	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
58	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	CS	N
59	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
60	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
61	10 Fev 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
62	25 Mar 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
63	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
64	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
65	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
66	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
67	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
68	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
69	15 Abr 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
70	19 Abr 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	CS	<b>P</b>
71	17 Mai 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
72	17 Mai 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
73	17 Mai 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
74	17 Mai 2011	<i>Pinus</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
75	20 Mai 2011	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
76	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N

(Tabela 4, Parte II)

Nº. Amostra	Data	Espécie	Agente Patogénico	Sintomas	Resultado
77	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
78	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
79	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
80	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
81	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
82	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
83	20 Mai 2011	<i>Pinus pinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
84	20 Mai 2011	<i>Pinus radiata</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N
85	25 Mai 2011	<i>Pinus sp.</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	SI	N

(Tabela 4, Parte III)

Dois dos resultados positivos foram obtidos de isolamentos feitos a partir de amostras de *Pinus pinea*. Da amostra positiva 53 não é conhecida a espécie de *Pinus*.

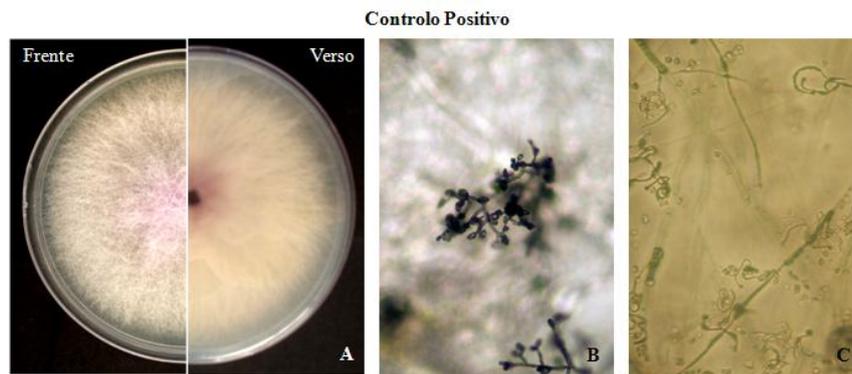
Em 2009, na primeira campanha realizada para prospecção e erradicação do cancro resinoso do pinheiro em Portugal, das 262 amostras recolhidas por todo território continental, 34 encontravam-se contaminadas por *F. circinatum*. Estes 34 casos positivos provieram na sua maioria das regiões centro e sul do país (AFN, dados não publicados, comunicação pessoal).

### 3.1 - Identificação morfológica

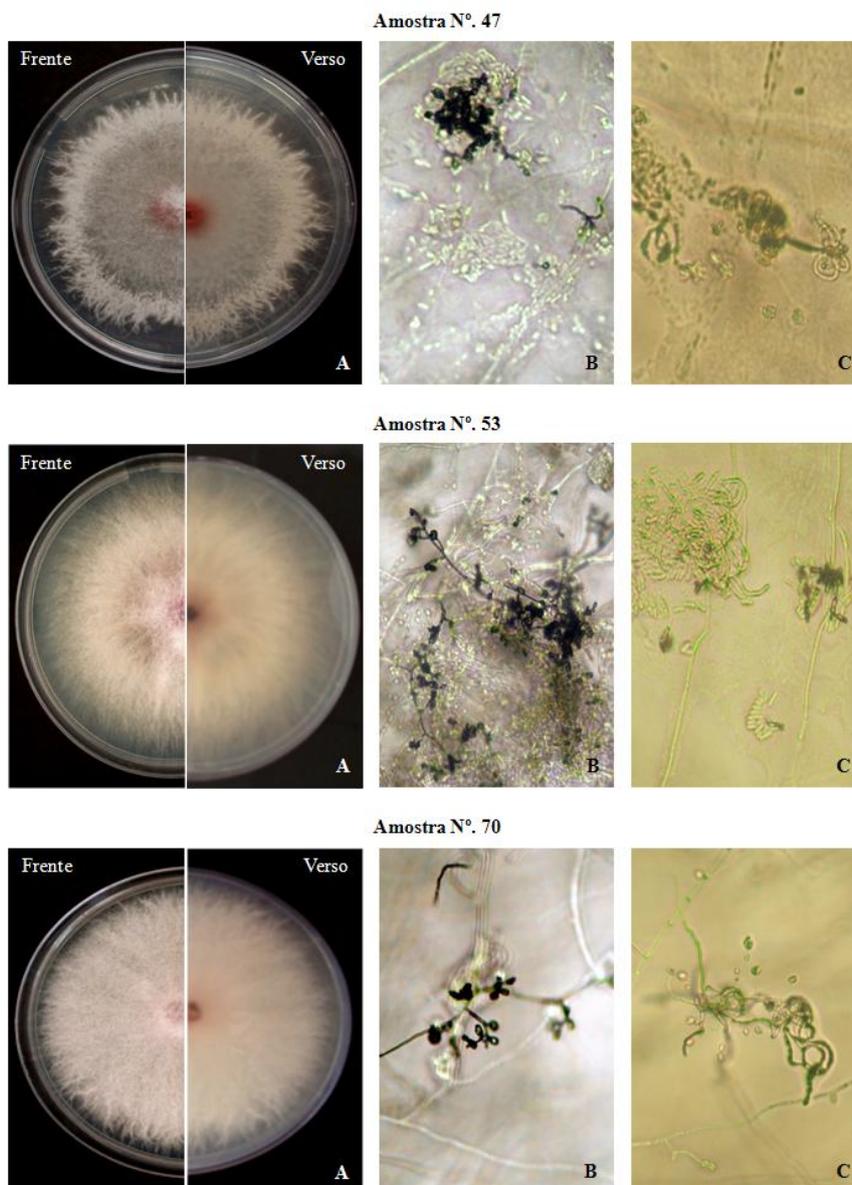
Entre os isolados, das diferentes amostras, identificados como *F. circinatum* observou-se alguma variabilidade no aspecto da cultura em PDA. Diferenças deste cariz já foram referidas por outros autores (Pérez-Sierra *et al.* 2007) e, em adição, o próprio controlo positivo mostrou uma certa degradação no seu aspecto, todas as vezes que se realizou uma nova cultura. No geral, o micélio era branco com pigmento violeta ou arroxeadado no reverso (Fig.15). No primeiro resultado positivo, amostra número 47, onde se verifica a maior variação da cultura em PDA, não se deve excluir a hipótese de ter ocorrido algum tipo de contaminação aquando da remoção de micélio (abertura da placa de PDA com a cultura fúngica) para a análise molecular.

Caracteres morfológicos típicos desta espécie foram sempre observados nas culturas crescidas em SNA. Estas características incluíam conidióforos erectos e de aspecto arbuscular, frequentemente com polifiálides, microconídios abundantes, unicelulares e agregados em falsas cabeças, hifas estéreis enroladas e ausência de clamidósporos. Contudo, comparativamente com o controlo (Fig.14), estas estruturas eram bastante esparsas.

Nas imagens abaixo, é possível verificar algumas das particularidades já referidas.



**Figura 14** - Colónia de *F. circinatum*, (A) aspecto morfológico da cultura com 15 dias em PDA, (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças observados directamente em SNA (MO 100x), (C) hifas enroladas presentes em SNA (MO 40x).

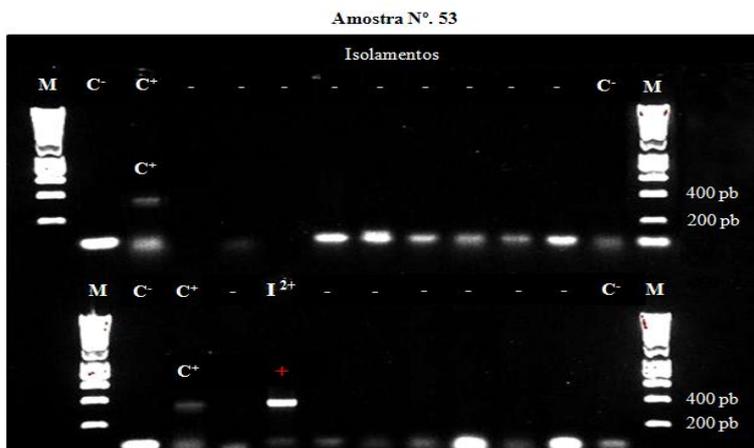
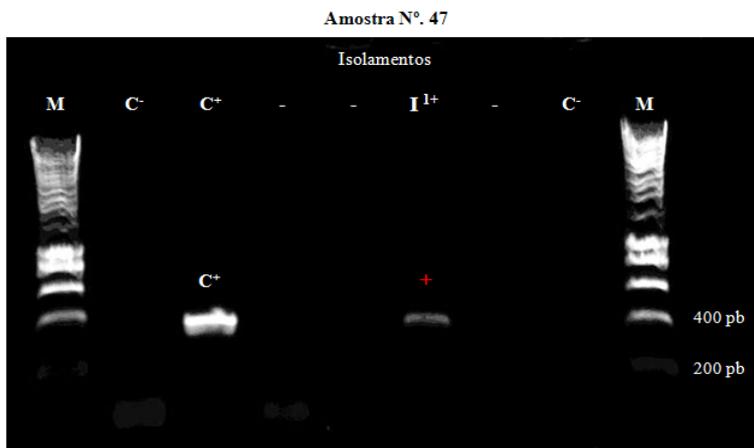
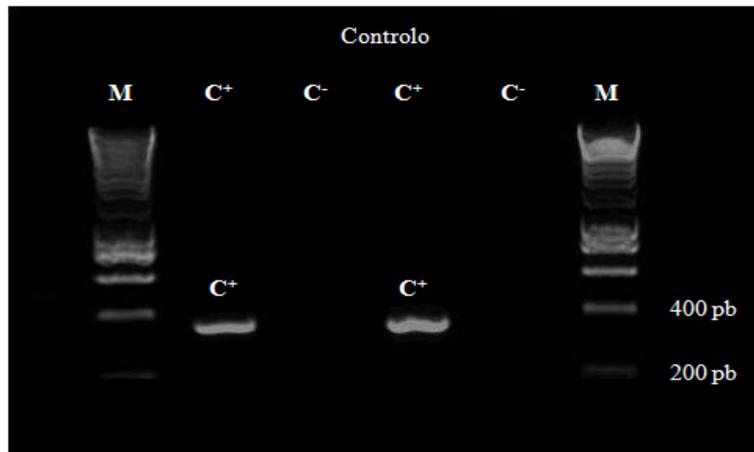


**Figura 15** - Isolados identificados como *F. circinatum*, (A) aspecto morfológico da cultura com 15 dias em PDA, (B) conidióforos erectos com microconídios agregados em falsas cabeças observados directamente em SNA (MO 100x), (C) hifas enroladas presentes em SNA (MO 100x).

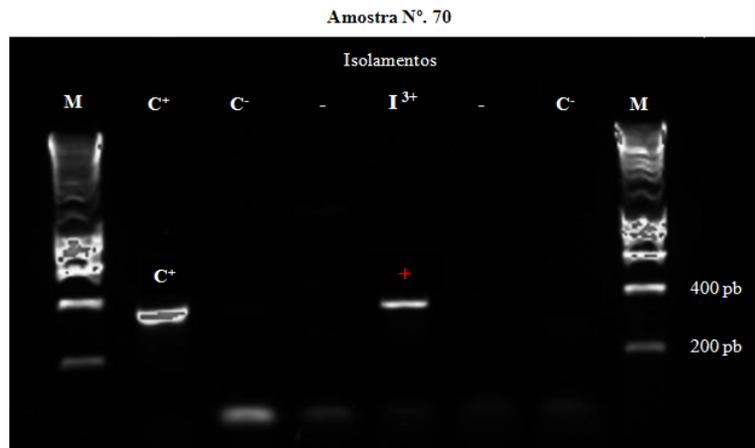
O processo de identificação morfológica é bastante moroso, em especial porque uma grande percentagem dos isolados obtidos do tratamento das amostras eram de *Fusarium* spp.

### 3.2 - Identificação molecular

Os isolados acima referidos (Fig.15) foram confirmados como *F. circinatum* através da análise molecular, havendo 100% de correspondência entre ambas as técnicas de identificação (Fig.16).



(Legenda da figura na página seguinte)



**Figura 16** - Géis de agarose obtidos por eletroforese com os *amplicons* de 360pb resultantes do PCR utilizando os *primers* CIRC1A/CIRC4A específicos para *F. circinatum*. (C<sup>+</sup> - controlo positivo, C<sup>-</sup> - controlo negativo, M - marcador molecular (HyperLeader), I<sup>1+</sup> - primeiro isolado positivo, I<sup>2+</sup> - segundo isolado positivo, I<sup>3+</sup> - terceiro isolado positivo).

A região IGS dos 3 isolados foi amplificada com os *primers* CIRC1A e CIRC4A, obtendo-se um fragmento de 360 pb (Schweigkofler *et al.* 2004), igual ao controlo positivo (Fig.16).

Outros isolados haviam suscitado algumas incertezas e embora não se observassem estruturas características, como os conidióforos muito ramificados e hifas estéreis circinadas, o aspecto da cultura era semelhante ao controlo. Em nenhum destes casos ocorreu amplificação, o que demonstrou não só a especificidade dos *primers* para *F. circinatum*, mas também a segurança com que essas microestruturas podem ser encontradas em SNA.

Nunca se obteve mais do que um isolado positivo por amostra.

Com a corroboração dos resultados, as amostras 47, 53 e 70 foram dadas como positivas para a presença de *F. circinatum*.

A identificação molécula aqui empregada é um processo simples, relativamente rápido e bastante eficaz.

Inicialmente, outros métodos de extracção de ADN foram testados, nomeadamente protocolos utilizando o extrator ABIPRISM 6100 *Nucleic Acid Prepstation* (Applied Biosystems, EUA). No entanto, embora se obtivesse ADN (ocorreu amplificação com os *primers* ITS1F e ITS4), não se verificou amplificação na presença dos *primers* CIRC1A e CIRC4A, levando a crer que a sua região alvo (região IGS) poderá ter sido degradada durante esse procedimento. A extracção utilizada neste estudo é um processo mecânico (de certa forma muito simples), mas que mantém a integridade da região IGS, pelo que continuou a ser adoptada.

### 3.3 - Outra Informação

A amostra número 47, de onde se obteve o primeiro resultado positivo, proveio de um viveiro onde o patógeno já havia sido detectado e supostamente erradicado, o que reforça a ideia do quão problemático poderá ser eliminar por completo o inóculo fúngico.

O segundo resultado positivo, amostra 53, teve origem num viveiro onde o fungo foi descoberto pela primeira vez.

A última amostra positiva, número 70, foi recolhida numa plantação (revegetação de área degradada) onde foram utilizadas plantas provenientes de um viveiro contaminado. Situações como esta devem ser prevenidas ao máximo, pois no exterior a doença é difícil de conter e controlar.

Algumas das restantes amostras, apesar de não contaminadas por *F. circinatum* mostravam sintomas de debilidade e doença, sugerindo que outros agentes fitopatogénicos possam estar a causar esta condição (Fig.17). Em adição, estas plantas já enfraquecidas podem também tornar-se “alvos fáceis” para a doença do cancro resinoso do pinheiro.



**Figura 17** - Outros organismos encontrados ao longo do tratamento das amostras vegetais, (A) estruturas reprodutoras fúngicas na superfície de agulhas, (B) nemátodo, (C) larva.

## Capítulo IV – Conclusão e Perspectivas

#### 4 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

---

Este estudo permitiu confirmar de forma inequívoca a presença de *F. circinatum* em 4% das amostras recebidas. Este número não deve, no entanto, ser encarado com ligeireza, pois uma planta contaminada pode facilmente dispersar a doença a muitas outras. Em adição, a inspecção realizada através de amostragens não pode provar que a doença está realmente ausente. Demonstra apenas que a sua frequência é inferior a determinado nível ou dentro de um intervalo especificado, com um grau de confiança conhecido, de acordo com a publicação *Sampling of consignments for visual phytosanitary inspection* (2006) da EPPO. Porém, seria impossível analisar individualmente as centenas ou mesmo milhares de plantas existente em cada lote de amostragem.

Segundo o primeiro plano de prospecção e erradicação do cancro resinoso do pinheiro em Portugal, realizado em 2009, 13% das amostras recolhidas por todo o país encontravam-se contaminadas. É importante que, de futuro, esta percentagem não aumente e para tal é necessário que as medidas até aqui tomadas se mantenham.

O cancro resinoso do pinheiro, causado por *F. circinatum*, tornou-se a mais recente ameaça à floresta nacional colocando em risco a sua sustentabilidade, quer ao nível dos ecossistemas, quer no seu tecido empresarial.

A continuação deste trabalho é, sem dúvida, essencial numa perspectiva de tentar conter e controlar a doença, não repetindo os mesmos erros cometidos no caso do nemátodo do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, contra o qual ainda travamos uma batalha, mais de 11 anos após a sua introdução em Portugal.

A longo prazo, a utilização de espécies de *Pinus* resistentes a esta praga deverá ser uma hipótese a considerar.

O bom estado fitossanitário dos pinhais e da floresta portuguesa no geral é um factor importante a alcançar e para o qual deve ser dedicado um grande esforço.

Assim como o CFE tem dado a sua contribuição, a prestação de serviços à comunidade e ao estado Português, em particular, é cada vez mais uma função da Comunidade Universitária e cada vez mais premente.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

### 5.1 - Livros e Artigos

- AFN, Autoridade Florestal Nacional (2010). Plano de Prospecção e Erradicação do Cancro Resinoso do Pinheiro para 2010 (*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell).
- Arvanitis, L.G., Goodbee, J.F., Porta, I. (1984). Pitch canker impact on volume growth: A case study in slash pine plantations. *Southern Journal of Applied Forestry* 8: 43-47.
- Barrows-Broadus, J.B. & Dwinell, L.D. (1985). Branch dieback and cone seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Barrows-Broadus, J.B. & Dwinell, L.D. (1980). Decay and colonization of gladiolus corms by the pine pitch canker fungus. *Phytopathology* 70: 847-850.
- Barrows-Broadus, J.B. & Dwinell, L.D. (1984). Variation to the pitch canker fungus among half-sib and full sib families of Virginia pine. *Phytopathology* 74: 438-444.
- Barrows-Broadus, J.B. & Kerr, T.J. (1981). Inhibition of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, the causal agent of pine pitch canker, by the soil bacterium *Arthrobacter* sp. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 20.
- Blakeslee, G.M., Dorset, R.D., Oak, S.W. (1979). Inoculum dispersal of the pine pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*). *Phytopathology* 69: 1022.
- Blakeslee, G.M., Jokela, E.J., Hollis, C.H., Wilson, D.S., Lante, W.D., Allen, J.E. (1999). Pitch Canker in young Loblolly pines: influence of pre-commercial thinning and fertilization on disease incidence and severity. *Southern Journal of Applied Forestry* 23: 139-143.
- Bloomberg, W.J. (1981). Diseases caused by *Fusarium* in forest nurseries. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (eds. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook). The Pennsylvania State University Press, University Park: 178-187.

- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F., Amparo, P. (2009). First report of Pitch canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease* 93: 1079
- Britz H., Coutinho T.A., Wingfield M.J. (2001). Characterization of pitch canker fungus *Fusarium circinatum* from Mexico. *South African Journal of Botany* 67: 609-614.
- Britz, H., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Marasas, W.F.O., Wingfield, M.J. (2005). Diversity and differentiation of two populations of *Gibberella circinata* in South Africa. *Plant Pathology* 54: 46-52.
- Britz, H., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Marasas, W.F.O., Wingfield, M.J. (2002). Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* 54: 9-22.
- Britz, H., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A., Marasas, W.F.O., Leslie, J.F. (1998). Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2094-2095.
- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991). Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Burgess, T. & Wingfield, M.J. (2002). Quarantine is important in restricting the spread of exotic seed-borne tree pathogens in the southern hemisphere. *International Forestry Review* 4: 56-65.
- CABI, Centre for Agricultural Bioscience International (2007). Reports - *Gibberella circinata* (pitch canker) - *Pinus*. *Crop Protection Compendium*.
- Carey, W.A. & Kelly, W.D. (1994) Interaction of ozone exposure and *Fusarium subglutinans* inoculation on growth and disease development on loblolly pines. *Environmental Pollution* 84: 35-43.
- Carlucci, A., Colatruglio, L., Frisullo, S. (2007). First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease* 91: 1683.
- Chelkowski, J. (Ed.) (1989). *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Correl, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H. (1992). Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Phytopathology* 82: 415-420.
- Correl, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S., Wood, D.L., Schultz, M.E. (1991). Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75: 676-682.
- Covert, S.F., Briley, A., Wallace, M.M., McKinney, V.T. (1999). Partial Mat 2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology* 28: 43-54.
- Dallara, P.L. (1997). Studies on the distribution, interspecific relationships, host range, and chemical ecology of *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) and selected insectan associates, and their associations with *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* in central coastal California. Ph.D. Dissertation University of California, Berkeley.
- Desjardins, A.E. (2006). *Fusarium* mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. APS Press, St.Paul, Minnesota.
- Dick, M. (1998). Pine pitch canker - the threat to New Zealand. *New Zealand Forestry* 42: 30-34.
- Dignani, M.C. & Anaissie, E. (2004). Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 67-75.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., MacDonald, A.M.C. (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed and Technology* 80: 183-205.
- Dwinell, L.D. & Barrows-Broadus, J (1978). Recovery of the pine pitch canker fungus from pine plantations and seed orchard soil. *Phytopathology News* 12: 207.
- Dwinell, L.D., Barrows-Broadus, J., Kuhlman, E.G. (1985). Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* 69: 270-276.

- Dwinell, L.D. & Phelps, W.R. (1977). Pitch canker of slash pine in Florida. *Journal of Forestry* 75: 488-489.
- Dwinell, L.D., Fraedrich, S.W., Adams, D. (2001). Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St.Paul, Minnesota: 225-232.
- Dwinell, L.D., Kuhlman, E.G., Blakeslee, G.M. (1981). Pitch cancer of southern pines. *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press, University Park: 188-194.
- Dwinell, L.D. & Nelson, P.E. (1978). Susceptibility of slash and loblolly pines to strains of *Fusarium moniliforme* and its variety *subglutinans*. *Phytopathology News* 12:207.
- EFSA, European Food Safety Authority (2010). Panel on Plant Health (PLH): Risk assessment of *Gibberella circinata* for EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 8: 1620.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2006). First report of *Gibberella circinata* in France. *EPPO Reporting services* 2006/104, n°5.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2005). *Gibberella circinata*. Data sheets on Quarantine pests. *EPPO Bulletin* 35: 383-386.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2009). *Gibberella circinata*. Diagnostics. *EPPO Bulletin* 39: 298-309.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2009). Sampling of consignments for visual phytosanitary inspection. *Phytosanitary procedures*. *EPPO Bulletin* 36: 195-200.
- Fisher, R.F., Garbett, W.S., Underhill, E.M. (1981). Effects of fertilization on healthy and pitch canker infected slash pine *Pinus ellottii* var. *ellottii*. *Southern Journal of Applied Forestry* 52: 77-79.
- Fraedrich, B.R. & Dwinell, L.D. (1997). Mortality of longleaf pine seedlings caused by *Fusarium subglutinans* and an evaluation of potential inoculum sources. *James, R.*

- (ed.) Proc. of the diseases and insects in Forest nurseries IUFRO working party conference, Gainsville: 48-54.
- Fotso, J., Leslie, J.F., Smith, J.S. (2002). Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5195-51-97.
- Gadgil, P.D., Dick, M.A., Simpson, J., Bejakovich, D., Ross, M., Bain, J., Horgan, G., Wylie, R. (2003). Management plan response to an incursion of pine pitch canker in Australia or New Zealand. Commissioned and Published by the Forest Health Committee on behalf of the Forestry and Forest Products Committee, Canberra.
- Ganley, R.J. (2006). Pitch canker: risk of establishment in New Zealand based on a global perspective. *New Zealand Journal of Forestry* 52: 26-30.
- Geiser, D.M., Lewis Ivey, M.L., Hakiza, G., Juba, J.H., Miller, S.A. (2005). *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* complex. *Mycologia* 97: 191-201.
- Gordon, T.R., Storer, A.J., Okamoto, D. (1996). The population structure of pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* in California. *Mycological Research* 100: 850-854.
- Gordon, T.R., Storer, A.J., Okamoto, D., Wood, D.L. (1998). Relative susceptibility of five landscape pine to pitch canker, caused by *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Hortscience* 33: 868-871.
- Gordon, T.R., Storer, A.J., Wood, D.L. (2001). The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128 - 1139.
- Gordon, T.R., Wood, D.L., Storer, A.J. (2004). Research on pitch canker at University of California: 1999-2003. Final report to California Department of Forestry and Fire Protection. August 2004.
- Goswami, R.S. & Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525.

- Hepting, G.H. & Roth, E.R. (1946). Pitch canker a new disease on some southern pines. *Journal of Forestry* 44: 742-744.
- Hepting, G.H. & Roth, E.R. (1953). Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology* 54: 475.
- Hodge, G.R. & Dvorak, W.S. (2000). Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* 19: 241-258.
- Hoover, K., Wood, D.L., Storer, A.J., Fox, J.W., Bros, W.E. (1996). Transmission of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, to Monterey pine, *Pinus radiata*, by cone and twig infesting beetles. *Canadian Entomologist* 128: 981-994.
- Inman, A.R., Kirkpatrick, S.C., Gordon, T.R., Shaw, A.V. (2008). Limiting effects of low temperature on growth and spore germination in *Gibberella circinata*, the cause of pitch canker in pine species. *Plant Disease* 92: 542-545.
- Ioos, R., Fourrier, C., Iancu, G., Gordon, T.R. (2009). Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99: 582-590.
- Iturrutxa, E. & Barredo, A. (2006). *Fusarium circinatum*, el hongo causante de la enfermedad del cancro resinoso. Departamento de Producción y Protección Vegetal. País Vasco. Basoko Teknika.
- Joffe, A.Z. (1986). *Fusarium species: Their biology and toxicology*. John Wiley and Sons, New York City.
- Kraft, J.M., Burke, D.W., Haglund, W.A. (1981). *Fusarium* diseases of beans, peas and lentils. Pennsylvania State University Press, University Park: 142-156.
- Kuhlman, E.G. (1982). Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74: 756-768.
- Kuhlman, E.G., Dwinell, L.D., Nelson, P.E., Booth, C. (1978). Characterization of *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia* 70: 1131-1143.

- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., Méndez-Lodcs, S., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., Berbegal, M., Beltrán, R., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2005). Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Disease* 89: 1015.
- Leslie, J.F. (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73: S282-S295.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- Liao, T., Ye, J., Chen, J., Han, Y., Wu, C., An, Y. (2008). Biological characteristics of *Fusarium circinatum*. *Journal of Nanjing Forestry University, Natural Sciences Edition* 32: 83-86.
- Linderman, R.G. (1981). *Fusarium* diseases of flowering bulb crops. Pennsylvania State University Press, University Park: 129-141.
- Link, J.H.F. (1809). *Observationes in ordines plantarum naturales*. Dissertatio Ime. Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, Magazin 3: 3-42.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A., Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3084 - 3088.
- Mansilla, P., Aguín, O., Pintos, C., González, M. (2005). *F. circinatum*. Estación Fitopatológica do Areeiro. Servicio Agrario.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park.
- McCain, A.H., Koehler, C.S., Tjosvold, S.A. (1987). Pitch canker threatens California Pines. *California Agriculture* 41: 22-23.

- Morgavi, D. & Riley, R.T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137: 201-212.
- Muramoto, M. & Dwinell, L.D. (1990). Pitch canker of *Pinus luchuensis* in Japan. *Plant disease* 74: 530.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479-504
- Nelson, P.E., Horst, R.K., Woltz, S.S. (1981). *Fusarium* diseases of ornamental plants. Pennsylvania State University Press, University Park: 121-128
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Masaras, W.F.O. (1983). *Fusarium* Species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park: 193.
- Nirenberg, H.I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola* (Estudos sobre a diferenciação morfológica e biológica de *Fusarium* - seção *Liseola*). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land-und Forstwirtschaft* 169: 1-117.
- Nirenberg, H.I. & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458.
- Nucci, M. & Anaissie, E. (2002). Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immuno-compromised hosts: Implications for diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases* 35: 909-920.
- Nyvall, R.F., Percich, J.A., Mirocha, C.J. (1999). *Fusarium* head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. *Plant Disease* 83: 159-164.
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 2: 919-938.
- O'Donnell, K. & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a mono-phyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-116.

- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K., Casper, H.H. (2000a). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)* 97: 7905-7910.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E. (2000b). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61-78.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating-type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41: 600-623.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., Leon, M., Berbegal, M., Garcia-Jime'nez, J., Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in Northern Spain. *Mycological Research* 111: 832-839.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- Rockwood, D.L., Blakeslee, G.M., Lowerts, G.A., Underhill, E.M., Oak, S.W. (1998). Genetic strategies for reducing pitch canker incidence in slash pine. *Southern Journal of Applied Forestry* 72: 297-300.
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K., Gabelotto, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker, from two California sites by using a real time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3512-3520.

- Seifert, K.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1995). A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany* 73: 760-767.
- Snyder, W.C., Toole, E.R., Hepting, G.H. (1949). Fusaria associated with mimosa wilt, and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research* 78: 365-382.
- Solel, Z. & Bruck, R.I. (1990) Relation between wilt rate and obstruction of water flow in stems of two families of loblolly pine affected by pitch canker. *European Journal of Forest Pathology* 20: 317-320.
- Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., Leslie, J.F. (1999). Differentiation of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3401-3406.
- Stenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Coutinho, T.A., Zeller, K.A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., Leslie, J.F. (2000). PCR based identification of MAT1 and MAT2 in *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4378-4382.
- Storer, A.J., Gordon, T.R., Clark, S.L. (1998). Association of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant Pathology* 47: 649-656.
- Storer, A.J., Gordon, T.R., Dallara, P.L., Wood, D.L. (1994). Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture* 48: 9-13.
- Storer, A.J., Wood, D.L., Gordon, T.R. (2004). Twig beetles, *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae), as vectors of the pitch canker pathogen in California. *Canadian Entomologist* 136: 685-693.
- Summerbell, R. (2003). An introduction to the taxonomy of zoopathogenic fungi. In: *Pathogenic fungi in humans and animals* (ed. D.H. Howard). Marcel Dekker, Inc., New York: 394-401.

- Viljoen, A., Wingfield, M.J., Gordon, T.R., Marasas, W.F.O. (1997). Genotypic diversity in the South African population of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Plant Pathology* 46: 590-593.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J., Kemp, G.H.J., Marasas, W.F.O. (1995a). Susceptibility of pines in South Africa to the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*. *Plant Pathology* 44: 877-882.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O. (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South African Plant Disease 78: 309-312.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J., Marasas, W.F.O., Coutinho, T.A. (1995b). Characterization of *Fusarium* isolates from gladiolus corms pathogenic to pines. *Plant Disease* 79: 1240-1244.
- White, D.G. (1980). *Compendium of Corn Diseases*. APS, St. Paul, Minnesota.
- Wikler, K. & Gordon, T.R. (2000). An initial assessment of genetic relations among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany* 78: 709-717.
- Wikler, K., Gordon, T.R., Clark, S.L., Wingfield, M.J., Britz, H. (2000). Potential for outcrossing in an apparently asexual population of *Fusarium circinatum*, the casual agent of pitch canker disease. *Mycologia* 92: 1085-1090.
- Wilson, P., Wheeler, D.P., Wilson, R.A. (1995). *Pine pitch canker: a threat to California pines*. CDF pamphlet. California.
- Wingfield, M.J., Coutinho, T.A., Roux, J., Wingfield, B.D. (2002). The future of exotic plantation forestry in the tropics and southern Hemisphere: Lessons from pitch canker. *South African Forestry Journal* 195: 79-82.
- Wingfield, M.J., Hammerbacher, A., Ganley, R.J., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., Wingfield, B.D., Coutinho, T.A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37: 319-334.

Yan, K. & Dickman, M.B. (1993). Sensitivity of field strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) to benomyl and hygromycin B. *Mycologia* 85: 206-213.

## 5.2 - Referências online

- [1] - The Gymnosperm Database, *Pinus*. Disponível em: <http://www.conifers.org/pi/Pinus.php> (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [2] - EUROSTAT Pocketbooks, Forestry statistics 2007. Disponível em: [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY\\_OFFPUB/KS-76-06-322/EN/KS-76-06-322-EN.PDF](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-76-06-322/EN/KS-76-06-322-EN.PDF) (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [3] - Celpa, Associação da Indústria Papeleira. Boletim estatístico 2009. Disponível em: <http://www.celpa.pt/index.php?article=239&visual=22&layout=3> (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [4] - AFN, Sector dos Resinosos em Portugal. Evolução e Análise 2008. Disponível em: <http://www.afn.min-agricultura.pt/portal/outros/mediateca/resource/ficheiros/SectorResina-7MB.pdf> (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [5] - AFN, Inventários Florestais Nacionais 2010 - Relatório final. Disponível em: <http://www.afn.min-agricultura.pt/portal/ifn> (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [6] - ANEFA, Informação à Imprensa 2009. Viveiros Sequestrados. Disponível em: [http://www.anefa.pt/pdf/VIVEIROS\\_FLORESTAIS\\_SEQUESTRADOS.pdf](http://www.anefa.pt/pdf/VIVEIROS_FLORESTAIS_SEQUESTRADOS.pdf) (Acedido em 10 de Julho de 2011).
- [7] - Comissão Europeia, Directiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de Maio de 2000. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:169:0001:0112:PT:PDF> (Acedido em 10 de Julho de 2011)
- [8] - Comissão Europeia, Decisão nº 2007/433/CE de 18 de Junho de 2007. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:161:0066:0069:PT:PDF> (Acedido em 10 de Julho de 2011)
- ## 5.3 - Referências online de imagens
- [9] - <http://tolweb.org/Sordariomycetes/29050> (Acedido em 2 de Julho de 2011)

- [10] - <http://www.ambmuggia.it/forum/topic/6916-geoglossum-umbratile/> (Acedido em 2 de Julho de 2011)
- [11] - <http://www.studiesinmycology.org/cgi/content/full/64/1/49> (Acedido em 2 de Julho de 2011)
- [12] - <http://tolweb.org/Tubeufiaceae/60229> (Acedido em 2 de Julho de 2011)
- [13] - <http://cemachampi.blogs.sudouest.fr/archive/2009/09/18/spores-2-ascomycota-microscopie-des-spores-deuxieme-partie-p.html> (Acedido em 2 de Julho de 2011)
- [14] - [http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Gibberella\\_circinata/GIBBCI\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Gibberella_circinata/GIBBCI_map.htm) (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [15] - <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1620.pdf> (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [16] - [http://www.forestales.net/archivos/forestal/pdfs%2031/fusarium\\_circinatum.html](http://www.forestales.net/archivos/forestal/pdfs%2031/fusarium_circinatum.html) (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [17] - <http://www.plagasyenfermedades.es/imagenes.html> (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [18] - [http://www.vifoga.org/portal/images/stories/pc\\_fusarium\\_2010.pdf](http://www.vifoga.org/portal/images/stories/pc_fusarium_2010.pdf) (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [19] - <http://www.afn.min-agricultura.pt/portal/pragas-doencas/cancro-pinheiro/cancro-resinoso-do-pinheiro> (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [20] - [http://www.draaf.lorraine.agriculture.gouv.fr/article.php3?id\\_article=371&debut\\_image=3](http://www.draaf.lorraine.agriculture.gouv.fr/article.php3?id_article=371&debut_image=3) (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [21] - <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2009.02317.x/pdf> (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [22] - <http://old.padil.gov.au/viewPest.aspx?id=582> (Acedido em 3 de Julho de 2011)
- [23] - [http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/dnagen/identification\\_of\\_microbes.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/dnagen/identification_of_microbes.htm) (Acedido em 3 de Julho de 2011)