



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Avaliação do estado fitossanitário e correlação com caraterísticas fenológicas de *Quercus* spp. em ambiente urbano e periurbano

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários 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) e da Professora Doutora Paula Cristina de Oliveira Castro (Universidade de Coimbra).

**Autor:** Bruno Miguel Andrade da Rosa

Julho de 2014

---

## **Agradecimentos**

Gostava de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e que de alguma forma contribuíram para esta dissertação.

Aos meus orientadores, Professor Doutor António Portugal e Professora Doutora Paula Castro, pelo seu empenho, dedicação, orientação e completa disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Á minha namorada e amiga, Diana Paiva, pelo seu apoio, inspiração e ajuda, dentro e fora do laboratório.

Ao colega e amigo, Hugo Paiva de Carvalho, pela sua disponibilidade, ajuda e orientação prática no laboratório.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, Coordenador do Mestrado, pelo apoio e simpatia constante.

A todos os senhores e senhoras que dão apoio diário aos laboratórios e sem os quais nenhum trabalho seria possível.

Finalmente á minha família, aos meus pais e irmão pelo seu apoio constante incondicional e confiança inabalável em mim e no meu trabalho.

A todos, o meu sincero muito obrigado.

## RESUMO

Cada vez mais se torna evidente a importância das várias espécies do género *Quercus* existentes em Portugal, seja pelo seu papel ecológico enquanto espécies-chave nos ecossistemas como os montados, onde são essenciais para a preservação de espécies ameaçadas que dependem desses mesmos ecossistemas, seja pela sua importância cultural e económica enquanto fonte de matéria prima e produtos de exportação. As várias espécies de carvalho existentes em Portugal são atacadas por vários patógenos e pragas, desde insetos a microfungos que causam prejuízos importantes.

O trabalho aqui desenvolvido visou identificar as espécies de carvalho amostradas e avaliar alguns dos seus atributos funcionais, bem como caracterizar a variabilidade de microfungos presente na porção aérea das mesmas, identificando possíveis patógenos do género *Quercus* na zona urbana e periurbana da cidade de Coimbra. Nesta área, foram seleccionadas 8 zonas representativas (4 urbanas e 4 periurbanas) onde foram feitas as amostragens para o estudo. Em cada zona foram seleccionados aleatoriamente 5 espécimes cuja posição foi georeferenciada e de cada um foi feita uma colheita de material vegetal da porção aérea, incluindo folhas, ramos e casca. Do material recolhido, foram seleccionadas aleatoriamente 50 folhas por espécime para análise de cada atributo funcional, nomeadamente área foliar (*Leaf Area - LA*), área foliar específica (*Specific Leaf Area - SLA*) e conteúdo foliar de massa seca (*Leaf Dry-Matter Content - LDMC*). A análise do LDMC foi feita realizando pesagens de cada uma das 50 folhas, logo após a colheita e após secagem ao ar. A análise de LA foi feita utilizando um *scanner* digital e o *software open source* ImageJ, sendo depois o valor utilizado para calcular SLA. Os dados recolhidos foram depois tratados estatisticamente por espécime e por zona. A identificação das espécies amostradas foi feita utilizando uma chave dicotómica. Para avaliar a variabilidade de microfungos, foram recolhidos, do material vegetal amostrado, pequenos fragmentos de folhas, ramos e casca. Estes foram submetidos a uma esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 2% tendo sido posteriormente inoculados em PDA (Potato Dextrose Agar) e incubados a 25°C durante 5 dias. As culturas resultantes foram repicadas para PDA e incubadas a 25°C até estarem completamente desenvolvidas. Para se proceder à identificação das espécies de microfungos, foi extraído o DNA de cada colónia pura tendo este sido depois amplificado por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando *primers*

específicos para fungos para a região ITS. A verificação do sucesso de cada amplificação foi feita através de uma eletroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR foram depois sequenciados. Com as sequências obtidas foram realizados BLASTs em bases de dados *online*.

Foram isoladas, e sequenciadas 109 amostras da região ITS que resultaram em 52 espécies de microfungos no total, 42 presentes na zona urbana e 37 presentes na zona periurbana de Coimbra. Destas 52 espécies, foram identificados 3 patógenos conhecidos do género *Quercus*, os microfungos *Amphiportha leiphaemia*, responsável pela doença conhecida como antracnose dos carvalhos, *Biscogniauxia mediterranea*, responsável pela doença conhecida como carvão do entrecasco e *Tubakia dryina*, responsável pela doença conhecida como *oak-leaf spot*. Foram também encontrados outros patógenos vegetais que não afetam diretamente o género.

Toda a informação recolhida neste trabalho vai ser utilizada para criar uma base de informação no *software open source* Quantum GIS completa com georeferenciação das zonas e indivíduos amostrados.

**Palavras-chave:** atributos funcionais; BLAST; extracção de DNA; LA; LDMC; PCR; *Quercus*; SLA; variabilidade.

## ABSTRACT

Each day, the importance of the several species of the genus *Quercus* that exist in Portugal becomes clearer, either by its ecological role as a keystone species in ecosystems such as the montado where they are essential for the preservation of endangered species that depend on these same ecosystems, or by their cultural and economical significance as a source of raw materials and exportation products. The several species of oak that exist in Portugal are attacked by many pathogens and pests, from insects to microfungi which can cause significant losses.

The purpose of this research was to identify the oak species from which samples were gathered and to evaluate several of its functional attributes as well as characterize the microfungial variability in the aerial portion of those same trees, thus identifying possible pathogens of the genus in the urban and peri-urban areas in the Coimbra region. In this region, 8 representative areas were selected (4 urban and 4 peri-urban) for sampling. In each area, 5 specimens were randomly selected and their position was georeferenced. From each of those 5 specimens, a sampling was collected of the aerial portion of the tree including leaves, branches and bark. Of the sampled material, 50 leaves of each specimen were randomly selected to analyse each of the functional attributes, namely leaf area (LA), Specific Leaf Area (SLA) and Leaf Dry-Mass Content (LDMC). The analysis of LDMC in leaves was performed by weighing each of the 50 leaves right after the sampling process and after air drying. The analysis of LA was performed using a digital scanner and the open source software ImageJ, the value was then used to calculate SLA. All the data was then converted in tables and statistical analysis was performed by specimen and by area. The identification of the sampled oak species was done using an identification key. To assess the microfungial variability, small fragments of leaves, branches and bark were selected from the plant material gathered. These were then surface sterilized using sodium hypochlorite (2%), inoculated in PDA medium and incubated for 5 days at 25°C. The resulting cultures were moved to PDA and incubated at 25°C until fully grown. To identify the various species of microfungi, DNA of each of the pure colonies was extracted and then amplified by PCR using fungal specific primers for the ITS region. To verify the success of each amplification, an electrophoresis in agarose gel was performed. PCR

products were then sequenced. With the results of the sequencing, BLASTs were performed in online databases.

A total of 109 ITS amplicons were isolated and sequenced. After the BLASTs, those resulted in 52 different microfungi species, 42 present in the urban areas and 37 present in the peri-urban areas of Coimbra. Of those 52 species, 3 known pathogens of the genus *Quercus* were identified, the microfungi *Amphiportha leiphaemia*, responsible for causing the oak anthracnose disease, *Biscogniauxia mediterranea*, responsible for causing the oak charcoal disease and *Tubakia dryina*, responsible for causing the disease known as oak-leaf spot. Known pathogens of other plant species were also found but these do not affect the oak species directly. All the information gathered in this study will be used to create a database using the open source software Quantum GIS, completed with georeferencing of the various sampling areas and specimens.

**Keywords:** BLAST; DNA extraction; functional attributes; LA; LDMC; PCR; *Quercus*; SLA; variability.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1 - Introdução .....   | 12 |
| 1.1 – O género <i>Quercus</i> .....  | 12 |
| 1.1.1 – Taxonomia e variabilidade .....                                      | 12 |
| 1.1.1.1 – Sobreiro ( <i>Quercus suber</i> , Linnaeus) .....                  | 12 |
| 1.1.1.2 – Azinheira ( <i>Quercus rotundifolia</i> , Lamarck) .....           | 14 |
| 1.1.1.3 – Carvalho-alvarinho ( <i>Quercus robur</i> , Linnaeus).....         | 15 |
| 1.1.2 – Importância.....   | 16 |
| 1.1.3 – Microfungos em <i>Quercus</i> , principais patógenos e doenças ..... | 17 |
| 1.1.3.1 – <i>Amphiporthe leiphaemia</i> (antracnose dos carvalhos).....      | 18 |
| 1.1.3.2 – <i>Biscogniauxia mediterranea</i> (carvão do entrecasco) .....     | 20 |
| 1.1.3.3 - <i>Ceratocystis fagacearum</i> (murchidão dos carvalhos).....      | 21 |
| 1.1.3.4 – <i>Tubakia dryina</i> (oak leaf-spot).....                         | 22 |
| 1.2 – A região de Coimbra .....  | 23 |
| 1.3 – Atributos funcionais .....   | 25 |
| 1.4 – Análise Molecular - a região ITS.....                                  | 25 |
| 1.5 – Índices de Diversidade e Equitatividade de Shannon-Wiener.....         | 26 |
| 1.6 - Objectivos .....   | 27 |
| 2 – Materiais e Métodos .....  | 30 |
| 2.1 – Locais e amostragem.....   | 30 |
| 2.1.1 – Zonas de recolha.....  | 30 |
| 2.1.2 - Amostragem.....  | 32 |
| 2.2 – Metodologia.....   | 33 |
| 2.2.1 – Atributos funcionais.....  | 33 |
| 2.2.1.1 – <i>Leaf Dry-Matter Content</i> (LDMC) .....                        | 33 |
| 2.2.1.2 – <i>Leaf Area</i> (LA) e <i>Specific Leaf Area</i> (SLA) .....      | 33 |
| 2.2.2 – Inoculação e isolamento de colónias puras .....                      | 34 |
| 2.2.2.1 – Seleção, recolha e esterilização de fragmentos vegetais .....      | 34 |
| 2.2.2.2 – Preparação do meio de cultura.....                                 | 35 |
| 2.2.2.3 – Inoculação.....  | 35 |
| 2.2.2.4 – Isolamento e selecção de culturas .....                            | 35 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.3 – Identificação molecular.....  | 36 |
| 2.2.3.1 – Extração de DNA .....   | 36 |
| 2.2.3.2 – Análise da região ITS (PCR) .....                                   | 37 |
| 2.2.3.3 – Sequenciação e BLAST .....  | 38 |
| 2.3 – Tratamento de dados .....   | 38 |
| 3 – Resultados .....  | 41 |
| 3.1 – Identificação de espécies de <i>Quercus</i> amostradas .....            | 41 |
| 3.2 – Atributos funcionais .....  | 42 |
| 3.2.1 – <i>Leaf Dry-Matter Content</i> (LDMC).....                            | 42 |
| 3.2.2 – <i>Leaf Area</i> (LA) e <i>Specific Leaf Area</i> (SLA) .....         | 44 |
| 3.3 – Diversidade de microfungos.....   | 46 |
| 3.3.1 – Patógenos do género <i>Quercus</i> .....                              | 51 |
| 3.3.2 – Outros patógenos de plantas.....                                      | 52 |
| 4 – Discussão .....   | 55 |
| 4.1 – Atributos funcionais .....  | 55 |
| 4.2 – Diversidade de microfungos.....   | 56 |
| 5 – Conclusões e perspectivas.....  | 60 |
| 6 – Referências Bibliográficas .....  | 63 |
| 6.1 – Livros e Artigos .....  | 63 |
| 6.2 – Referências <i>Online</i> .....   | 69 |
| 6.3 – Referências <i>Online</i> de imagens.....                               | 70 |
| Anexo A – Zonas amostradas e indivíduos .....                                 | 73 |
| Anexo B – Chave dicotómica dos carvalhos de Portugal (Rui Pedro Lérias) ..... | 74 |
| Anexo C – Protocolo de extração de DNA.....                                   | 75 |



## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - <i>Quercus suber</i> , A - sobreiro; B - cortiça; C - amentilhos; D - folhas e bolotas [20].....  | 13 |
| <b>Figura 2</b> - <i>Quercus rotundifolia</i> , A - azinheira; B - amentilhos; C - folhas; D – bolotas [21] .....   | 15 |
| <b>Figura 3</b> - <i>Quercus robur</i> , A – amentilhos; B – folhas; C – bolota [22].....   | 16 |
| <b>Figura 4</b> – <i>Amphiportha leiphaemia</i> , A – manchas sintomáticas na folha; B – colónia em PDA (10 dias); C - conídios [23] .....                            | 19 |
| <b>Figura 5</b> – <i>Biscogniauxia mediterranea</i> , A – estroma carbonáceo no tronco; B – estroma, conídios respectivamente [24] .....                              | 21 |
| <b>Figura 6</b> – <i>Ceratocystis fagacearum</i> , A – carvalho com sintomas; B – folha com sintomas; C – colónia em PDA; D – conídios [25].....                      | 22 |
| <b>Figura 7</b> – <i>Tubakia dryina</i> , A,B – folhas com sintomas; C – Pycnothyrium; D – Conídios [26] .....  | 23 |
| <b>Figura 8</b> - Concelho de Coimbra [27] .....  | 24 |
| <b>Figura 9</b> - Região ITS em rDNA [28] .....   | 26 |
| <b>Figura 10</b> - Zonas urbanas e periurbanas amostradas .....   | 30 |
| <b>Figura 11</b> – Zonas urbanas amostradas; A – Bairro Norton de Matos, B – Instituto Pedro Nunes, C - Parque Verde do Mondego, D – Quinta de São Jerónimo .....     | 31 |
| <b>Figura 12</b> – Zonas periurbanas amostradas; A – Planalto de Santa Clara, B – Pólo II da Universidade, C – Santo António dos Olivais, D – Torres do Mondego ..... | 32 |
| <b>Figura 13</b> - A – amostra recolhida; B – fragmentos para inoculação; C – caixas de meio; D – caixa de meio com fragmentos inoculados.....                        | 36 |
| <b>Figura 14</b> - Esquema representativo da reacção de PCR.....  | 37 |
| <b>Figura 15</b> - Espécies presentes nas zonas urbanas e periurbanas com respectiva sobreposição.....  | 50 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Zonas urbanas e periurbanas amostradas com respectivos códigos .....  | 30 |
| <b>Tabela 2</b> – Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA.....  | 35 |
| <b>Tabela 3</b> - Identificação das espécies amostradas nas várias zonas urbanas e periurbanas  | 41 |
| <b>Tabela 4</b> – Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (s) relativos ao peso fresco e seco das folhas amostradas (g) e <i>Leaf Dry-Matter Content</i> (LDMC) em zonas urbanas.....   | 42 |
| <b>Tabela 5</b> - Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (s) relativos ao peso fresco e seco das folhas amostradas (g) e <i>Leaf Dry-Matter Content</i> (LDMC) em zonas periurbanas.....   | 43 |
| <b>Tabela 6</b> – <i>Leaf Area</i> (LA), média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s), máximos (Máx.), mínimos (Min.) e <i>Specific Leaf Area</i> (SLA) em zonas urbanas.....   | 44 |
| <b>Tabela 7</b> – <i>Leaf Area</i> (LA), média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s), máximos (Máx.), mínimos (Min.) e <i>Specific Leaf Area</i> (SLA) em zonas periurbanas.....   | 45 |
| <b>Tabela 8</b> - Diversidade de espécies de microfungos presentes nas zonas urbanas (NM – Norton Matos; IPN – Instituto Pedro Nunes; PV – Parque Verde do Mondego; QSJ – Quinta de São Jerónimo; I - indivíduo) .....                | 47 |
| <b>Tabela 9</b> - Diversidade de espécies de microfungos presentes nas zonas periurbanas (PSC – Planalto de Santa Clara; POLO – Pólo II da Universidade; SÃO – Santo António dos Olivais; TM – Torres do Mondego; I - indivíduo)..... | 48 |
| <b>Tabela 10</b> - Número de espécies, índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') e índice de Equitatividade (E) para zonas urbanas e periurbanas .....   | 50 |
| <b>Tabela 11</b> - Ocorrência de fungos patógenos em espécies do género <i>Quercus</i> em zonas urbanas (número de isolados) .....  | 52 |
| <b>Tabela 12</b> - Ocorrência de fungos patógenos em espécies do género <i>Quercus</i> em zonas periurbanas (número de isolados) .....  | 52 |
| <b>Tabela 13</b> - Outros patógenos de plantas identificados neste estudo .....   | 53 |

## Lista de abreviaturas

**%** - percentagem

**µl** – microlitro

**A** – Ampère

**atm** – Atmosfera

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool

**bp** – base pairs

**cm** -centímetro

**DNA** – Deoxyribonucleic acid

**EUA** – Estados Unidos da América

**FCTUC** – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

**g** – gramas

**GPS** – Global Positioning System

**INE** – Instituto Nacional de Estatística

**ITS** – Internal Transcribed Spacer

**Jpeg** – Joint Photographic Experts Group

**LDMC** – Leaf Dry-Matter Content

**mg** – miligrama

**ml** – mililitro

**mm** – milímetro

**mM** - milimolar

**NaClO** – Hipoclorito de Sódio

**°C** – graus Celsius

**PCR** – Polimerase Chain Reaction

**PDA** – Potato Dextrose Agar

**Ppi** – pixels per inch or pixel density

**RPM** – Rotações Por Minuto

**SLA** – Specific Leaf Area

**TBE** – Tris-Borato-EDTA

**UV** – Ultra Violeta

**V** – Volt

# **Capítulo I - Introdução**

# 1 - Introdução

## 1.1 – O género *Quercus*

### 1.1.1 – Taxonomia e variabilidade

Taxonomicamente, o género *Quercus* pertence ao Domínio *Eukarya*, Reino *Plantae*, Sub-reino *Tracheobionta*, Divisão *Spermatophyta*, Sub-divisão *Magnoliophytina*, Classe *Magnoliopsida*, Sub-classe *Hamamelidiales* Ordem *Fagales* e está incluído na Família *Fagaceae* [1].

Existem em todo o Mundo cerca de 600 espécies de carvalho (Mabberley, 1987). Em Portugal existem atualmente 9 espécies principais, o sobreiro (*Quercus suber*), a azinheira (*Quercus rotundifolia*), o carvalho-alvarinho (*Quercus robur*), o carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*), o carvalho-cerquinho (*Quercus faginea broteroi*), o carvalho-americano (*Quercus rubra*), o carvalho-anão (*Quercus lusitanica*) o carrasco (*Quercus coccifera*) e o carvalho-de-Monchique (*Quercus canariensis*) [2]. Existem ainda algumas espécies menos conhecidas devido ao seu número reduzido de indivíduos ou à sua distribuição limitada.

Nas zonas amostradas as espécies mais comuns são o sobreiro (*Quercus suber*), a azinheira (*Quercus rotundifolia*) e o carvalho-alvarinho (*Quercus robur*) [2].

#### 1.1.1.1 – Sobreiro (*Quercus suber*, Linnaeus)

O sobreiro (*Quercus suber*) também conhecido como chaparro ou sobre é uma árvore autóctone de Portugal. É uma espécie monóica, anemófila, de porte médio que pode atingir os 20 metros de altura e que tem uma longevidade média de cerca de 200 anos (Pereira, 2008). É uma espécie dominante em sobreirais e montados de sobre e uma espécie acompanhante noutros tipos de bosque ou mata [5]. Possui uma copa ampla, pouco densa e um tronco turtuoso com ramificações grossas revestidas por uma casca espessa que, após ser extraída, a árvore consegue recompor completamente. Esta espécie pode ser encontrada até cerca de 1000 metros de altitude sendo, no entanto mais frequente até aos 200 metros e entre 6 a 180 km de distância do oceano [5]. Em Portugal ocorre em todo o país sendo, no entanto mais comum no sul [9].

Uma vez que é polinizada pelo vento e não por insetos, as flores são simples com perianto reduzido uma vez que não existe a necessidade de atrair polinizadores. As flores são unisexuais, ou seja, as estruturas masculinas e femininas estão separadas em diferentes flores. As flores femininas são solitárias ou juntam-se em pares nas axilas das folhas dos ramos jovens, as inflorescências masculinas são amentilhos onde as flores se encontram penduradas para facilitar a dispersão do pólen pelo vento [8] (Figura 1). A floração ocorre normalmente entre Abril e Junho (Silva, 2007) podendo por vezes ocorrer tão cedo como fevereiro [5].

O sobreiro é uma árvore perenifólia, ou seja, as suas folhas são persistentes. Estas apresentam margens dentadas, mas por vezes é possível encontrar-se folhas no mesmo indivíduo com margens inteiras. Esta plasticidade está associada à adaptação a diferentes condições ambientais [8]. As folhas possuem uma textura rija com uma página superior glabra (sem pêlos) de cor verde escura e a página inferior é mais clara com pêlos [8]; o seu tamanho varia entre 2,5 a 10 cm de comprimento e 1,2 a 6,5 cm de largura [9] (Figura 1). O fruto do sobreiro é a bolota, que é composta pelo fruto propriamente dito, um aquénio e uma cúpula escamosa [8] (Figura 1); a sua frutificação e maturação iniciam-se normalmente no outono (Silva, 2007).

O sobreiro tem sido cultivado desde tempos remotos para se proceder à extração de cortiça. Esta só pode ser colhida pela primeira vez em árvores com 25 anos e as colheitas seguintes só são efetuadas a cada 9 anos para não prejudicar o desenvolvimento da mesma (Silva, 2007; Pereira, 2008) assim a cortiça da mesma árvore pode ser colhida várias vezes ao longo da sua vida.



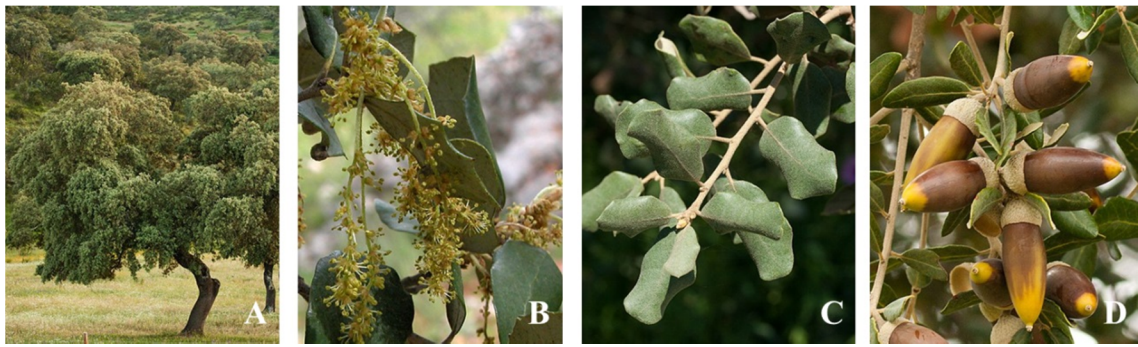
**Figura 1** - *Quercus suber*, A - sobreiro; B - cortiça; C - amentilhos; D - folhas e bolotas [20]

### 1.1.1.2 – Azinheira (*Quercus rotundifolia*, Lamarck)

A azinheira (*Quercus rotundifolia*), também conhecida como azinho é uma árvore autóctone de Portugal. É uma espécie monóica, anemófila de porte médio que pode atingir os 25 metros sendo a altura mais comum 10 metros [10]. Esta espécie pode atingir os 300 anos existindo alguns exemplos que se pensa terem 1000 anos [10]. É uma espécie dominante em azinhais surgindo também em bosques e matagais perenifólios [11]. Possui uma copa ampla, densa e arredondada e um tronco curto e turtuoso com casca cinzenta e fendida em pequenas placas [10]. Esta espécie pode ser encontrada até cerca de 1300 metros de altitude sendo, no entanto mais frequente até 300 metros [11] e podendo ser encontrada até 200 km de distância do oceano [11], em Portugal pode ser encontrada em grande parte do território, excepto nos climas temperados do norte e centro litorais [10].

Como no caso do sobreiro, as flores são simples e unisexuais, as flores masculinas formam amentilhos de 5 a 13 cm e surgem em grandes quantidades nos extremos dos ramos, as flores femininas surgem em menor quantidade e têm uma cor verde-acinzentada. A floração nesta espécie ocorre na primavera (entre março e maio) podendo iniciar-se por vezes em fevereiro [11],

A azinheira é uma árvore perenifólia e as suas folhas são simples, alternas com uma forma oblonga ou elíptica [10], as margens são normalmente inteiras podendo, por vezes ser ligeiramente sentado-epinescentes (com espinhos) [10]. Apresentam uma cor verde-acinzentada na página superior e cinzento-esbranquiçada na página inferior, sendo esta também coberta por pêlos [10] e o seu tamanho varia entre 1,5 e 5 cm de comprimento e 1 e 3 cm de largura [10] (Figura 2). O fruto da azinheira, como no caso do sobreiro, é uma bolota composta pelo aquénio e uma cúpula escamosa, no caso da azinheira a bolota tem 2 a 3 cm e apresenta um pedúnculo lenhoso e rijo [10] (Figura 2), a frutificação e maturação ocorre no outono [10]. A bolota da azinheira é utilizada para alimentação do porco preto de raça alentejana podendo também ser utilizada para consumo humano.



**Figura 2** - *Quercus rotundifolia*, A - azinheira; B - amentilhos; C - folhas; D – bolotas [21]

### 1.1.1.3 – Carvalho-alvarinho (*Quercus robur*, Linnaeus)

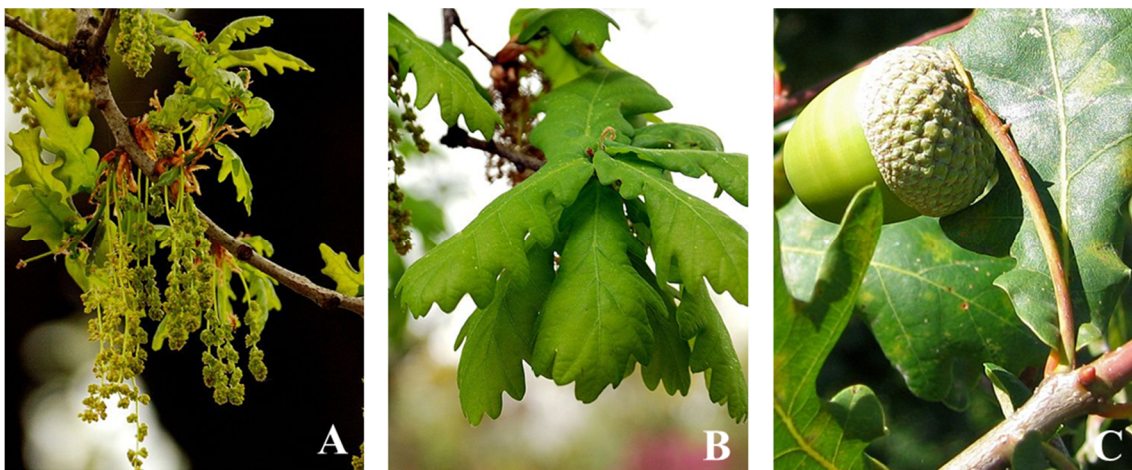
O carvalho-alvarinho (*Quercus robur*) também conhecido como carvalho-roble é uma árvore autóctone de Portugal, é uma espécie monóica, anemófila de um porte considerável que pode atingir os 45 metros de altura [13]; os indivíduos desta espécie podem atingir os 800 anos e excepcionalmente os 1500 anos [13]. É uma espécie dominante em carvalhais ou acompanhante em bosques de caducifólias, pinhais abertos e matas [12]. Possui uma copa ampla e regular e um tronco direito e alto com casca cinzento-acastanhada fendida em placas ou com sulcos longitudinais profundos [13]. Esta espécie pode ser encontrada até cerca de 1000 metros de altitude sendo, no entanto mais comum a baixas altitudes, normalmente até aos 150 metros [12] e entre os 0,5 e os 150 km de distância do oceano [12]. Em Portugal ocorre principalmente no noroeste [13].

As flores desta espécie são simples e unisexuais surgindo sob a forma de amentilhos [14], os amentilho masculinos são compostos por flores com 4 a 7 lóbulos e 6 a 12 estames [14], os amentilhos femininos são compostos por grupos de 2 ou 3 flores sobre um pedúnculo largo [14] (Figura 3), a floração ocorre entre março a maio [12].

O carvalho-alvarinho é uma árvore caducifólia e as suas folhas são simples e alternas de cor verde-claro quando mais jovens e verde-escuras quando maduras [13]; ao contrário das outras espécies aqui descritas esta espécie possui folhas ovais, lobada, com cerca de 4 a 8 pares de lobos e variando entre os 5 e os 19 cm de comprimento não possuindo pêlos em nenhuma das faces [13] (Figura 3). O seu pecíolo é muito curto (0,5 cm) e envolvido pelas aurículas foliares [13]. O fruto é, como nos restantes carvalhos, a bolota, esta é composta pelo aquénio e por uma cúpula formada por escamas aplicadas de



forma subaplanada [13]. As bolotas desta espécie possuem um pedúnculo comprido cujo comprimento varia entre 5 e 11 cm [13] (Figura 3). A frutificação e maturação ocorrem entre setembro e outubro [12].



**Figura 3** - *Quercus robur*, A – amentilhos; B – folhas; C – bolota [22]

### 1.1.2 – Importância

Atualmente, a floresta em Portugal continental ocupa cerca de 3,3 milhões de hectares, destes, os sobreiros ocupam cerca de 714 mil hectares sendo a segunda espécie com maior área a seguir ao eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (ICNF 2013). Os carvalhos são espécies-chave em muitos ecossistemas, desde as florestas áridas mediterrâneas a florestas subtropicais, ou seja, têm uma importância desproporcional relativamente à sua abundância, afetando toda a estrutura ecológica e espécies de um habitat (Oldfield, 2007). Em Portugal existe uma grande biodiversidade associada aos montados de sobreiro e azinheiro, montados esses que são extremamente importantes para algumas espécies em risco como o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia-imperial-ibérica (*Aquila adalberti*) (Pereira, 2008). Devido à sua importância, sobreiro e a azinheira estão protegidos por lei desde 2001 (Decreto-Lei n.º 169/2001, de 25 de maio. D.R. n.º 121, Série I-A). Além da sua importância ecológica, os carvalhos têm uma grande importância económica sendo utilizados principalmente pela sua madeira e casca (cortiça). A madeira de carvalho, dependendo da espécie, pode ser usada no fabrico de mobília ou de barris para a produção de vinho; a sua casca é muito rica em taninos pelo que é usada em processos tradicionais

de curtume e os seus frutos, dependendo da espécie, podem ser usados para alimentação humana ou de animais.

Os carvalhos sempre fizeram parte da vida do povo português, antes da introdução de cereais como o trigo e a cevada, o pão era muitas vezes feito com farinha de bolota. Na época dos Descobrimentos, com a crescente necessidade de material para a construção de navios e para a expansão que se seguiu, as florestas de carvalhos foram em grande parte devastadas devido à exploração excessiva dos seus recursos. Inicialmente foram utilizadas as espécies sobreiro (*Quercus suber*) e azinheira (*Quercus rotundifolia*), mas a sua sobre-exploração levou à procura de outras espécies de carvalho para obtenção de madeira, espécies tais como o carvalho-alvarinho (*Quercus robur*), o carvalho de maior porte existente em Portugal. Mais tarde o carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*) foi utilizado como fonte de matéria prima para a construção das travessas dos caminhos-de-ferro (Paiva, 2012). Atualmente as espécies de carvalho ainda são muito importantes em Portugal, não só como parte da nossa biodiversidade e história, mas também a nível económico, especialmente no caso do sobreiro de onde é extraído um dos principais produtos de produção e exportação nacional, a cortiça. Em 22 de Dezembro de 2011, no Projeto de Resolução da Assembleia da República nº123/XII, o sobreiro foi escolhido como Árvore Nacional.

### **1.1.3 – Microfungos em Quercus, principais patógenos e doenças**

A parte aérea de árvores perenes é um habitat extremamente complexo onde coexiste uma grande variedade de organismos. Os microfungos são uma parte importante desse habitat, interagindo com a planta hospedeira, entre si e com outros organismos. Podem colonizar as superfícies de folhas e ramos (epífitos), os tecidos foliares internos (endófitos foliares), a casca e a madeira (endófitos e decompositores). Esses microfungos desempenham um papel ecológico importante, principalmente no ciclo de nutrientes e simbioses com o hospedeiro ou outros organismos (Stone *et al.* 1996).

Existem estudos que se focam na diversidade de microfungos presentes na manta morta em zonas de carvalhal e nas suas relações de dominância baseadas na taxa de crescimento das hifas (Ogawa *et al.* 1996). Estes estudos contribuem para o conhecimento das espécies e interações relacionadas com a decomposição de matéria vegetal morta.

No entanto, existem estudos que sugerem que, os microfungos responsáveis pela decomposição estão presentes, de forma latente, em árvores saudáveis e que o seu desenvolvimento se inicia enquanto os tecidos ainda se encontram no indivíduo hospedeiro (Parfitt *et al.* 2010). Assim é possível existir uma relação importante entre as comunidades de microfungos da parte aérea e da manta morta em zonas arborizadas.

O género *Quercus* é alvo de vários organismos fitopatogénicos, principalmente insetos e fungos. Insetos desfolhadores como o pulgão-dos-carvalhos (*Altica quercetorum*, Foudras 1860) [6] ou a lagarta-dos-sobreiros (*Lymantria dispar*, Linnaeus 1758) (Collins, J. 1996) [7] podem causar grandes danos enfraquecendo ou mesmo levando à morte extensas áreas de carvalhal. No caso da lagarta alguns dos comportamentos na sua fase larvar podem potencialmente aumentar o risco de infecções fúngicas (Hajek, 2000).

O fungo *Phytophthora ramorum*, Werres, De Cock & Man (Werres *et al.* 2001), é responsável pela doença conhecida como morte súbita dos carvalhos, este fungo ataca o sistema radicular dos hospedeiros, sendo responsável pela destruição de extensas áreas de carvalhal no estado da Califórnia nos EUA (Rizzo *et al.* 2002), desde 2002 faz parte Lista de Alerta EPPO estando sujeito a medidas regulamentares de emergência. Foi detectado em Portugal pela primeira vez em Novembro de 2006 (Gomes *et al.* 2008).

Este estudo focou-se apenas na diversidade de microfungos presentes na porção aérea das árvores, mais concretamente em espécies patogénicas do género *Quercus*, procurando detectar a presença de espécies como o fungo *Amphiporthe leipahemia*, responsável pela doença conhecida como antracnose dos carvalhos, o fungo *Biscogniauxia mediterranea*, responsável pela doença conhecida como carvão do entrecasco, o fungo *Ceratocystis fagacearum*, responsável pela doença conhecida como murchidão dos carvalhos e o fungo *Dicarpella dryina*, responsável pela doença conhecida como *oak leaf spot*.

#### **1.1.3.1 – *Amphiporthe leiphaemia* (antracnose dos carvalhos)**

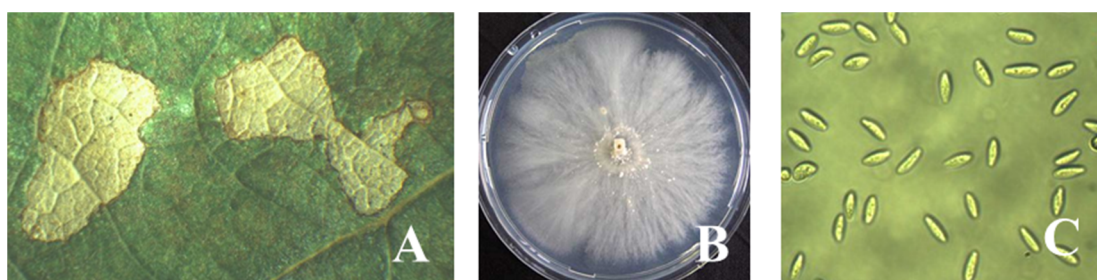
O microfungo *Amphiporthe leiphaemia*, Butin 1980, previamente *Discula quercina*, é um conhecido endófito em espécies de carvalho e está incluído no Filo Ascomycota, Sub-Filo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Sub-Classe Sordariomycetidae, Ordem Diaporthales, Família Valsaceae [16], sendo o seu telomorfo *Gloeosporium quercinum*;

juntos formam o holomorfo da espécie, o fungo *Apiognomonina errabunda* (Roberge ex Desm.), Höhn, 1918. Este microfungo e o seu telomorfo são responsáveis pela doença conhecida como antracnose dos carvalhos, atacando todas as espécies de carvalho em Portugal. O termo antracnose é geralmente utilizado genericamente para várias doenças provocadas por fungos semelhantes que atacam várias espécies de árvores (Moricca *et al.* 2008), no entanto, devido á variação morfológica, comportamental e ecológica entre estes organismos torna-se difícil uni-los num único grupo taxonómico.

Este microfungo em particular ocorre frequentemente nos ramos e folhas de carvalhos em declínio e possui duas fases, uma assintomática e uma sintomática (Moricca *et al.* 2008). Na fase assintomática este microfungo comporta-se como outros fungos endófitos permanecendo dormente nos tecidos saudáveis até que as condições sejam favoráveis ou que outros factores enfraqueçam o hospedeiro.

Na sua fase sintomática, os sintomas incluem, manchas irregulares de cor castanho-esverdeadas nas folhas (Figura 4), pequenos cancos alongados que se desenvolvem em sequência e que se caracterizam pelo fendimento da casca devido à formação de calos pelo hospedeiro (Moricca *et al.* 2008) e isto pode levar ao enfraquecimento e mesmo à morte do hospedeiro. Tanto nas folhas como nos ramos, este patógeno diferencia os seus conidióforos em minúsculos picnídios de cor negra, o seu telomorfo permanece nas folhas da manta morta produzindo peritécios de tamanho considerável na primavera seguinte (Moricca *et al.* 2008). A dispersão ocorre por acção do vento e possivelmente através de vectores como insectos (Moricca *et al.* 2008).

Nos últimos anos tem sido verificado que a área e frequência de ocorrência deste fungo têm aumentado. Pensa-se que este fenómeno está relacionado com a sua capacidade de viver como um organismo endófito, de infectar novas folhas no início da estação de crescimento do hospedeiro, da sua capacidade de dispersão pelo vento tudo relacionado com a alteração favorável das condições climáticas (Ragazzi *et al.* 1999).



**Figura 4** – *Amphiportha leiphaemia*, A – manchas sintomáticas na folha; B – colónia em PDA (10 dias); C - conídios [23]

### 1.1.3.2 – *Biscogniauxia mediterranea* (carvão do entrecasco)

O microgungo *Biscogniauxia mediterranea*, (de Not.) Kuntze 1891, previamente conhecido como *Hypoxilon mediterraneum*, está incluído no Filo *Ascomycota*, Sub-Filo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Sub-Classe *Xylariomycetidae*, Ordem *Xylariales*, Família *Xylariaceae* [15] sendo o seu basónimo (nome original do *taxon* mesmo que já não em uso) *Sphaeria mediterranea*. Este fungo é responsável pela doença conhecida como carvão do entrecasco e atualmente encontra-se disperso por toda a região mediterrânea, incidindo principalmente em indivíduos em fases adiantadas de declínio (Santos, 2003).

Este patógeno manifesta-se principalmente através de dois tipos fundamentais de sintomas, o mais frequente caracterizando-se pela intensificação progressiva de um conjunto de sintomas reveladores do enfraquecimento, durante um período de tempo variável (normalmente longo) que termina com a morte das árvores. Estes incluem, a descoloração e rarefação progressiva da copa, o fendilhamento do tronco e ramos e o aparecimento nestes de manchas negras associadas à exudação de um líquido viscoso (Santos, 2003) (Figura 5). O segundo tipo envolve o surgimento de estruturas fúngicas na árvore, nomeadamente, um estroma carbonáceo constituído pelas peritecas (corpos frutíferos) do fungo, estroma que pode estar presente durante todo o ano nas árvores sendo uma das principais fontes de inóculo (Barbosa, 1958) (Figura 5), quando maduras estas peritecas libertam milhares de esporos que podem contaminar diretamente hospedeiros próximos, ou, hospedeiros mais distantes com a ajuda de vectores de dispersão como insectos ou o vento.

Foi detectado pela primeira vez em Portugal em 1930 (Câmara, 1930) e apesar de incidir sobre várias espécies florestais tem um maior impacto em espécies do género *Quercus* sendo considerado um dos principais factores na degradação do ecossistema dos montados (Azevedo, 1958; Azevedo *et al.* 1963). Em 2005 foi desenvolvido um protocolo para detecção de *Biscogniauxia mediterranea* em tecidos assintomáticos de carvalho utilizando a técnica *Real-Time* PCR (Luchi *et al.* 2005). Utilizando este método é possível controlar até certo ponto a dispersão através da importação e exportação de madeiras e subprodutos através de análises regulares.



**Figura 5** – *Biscogniauxia mediterranea*, A – estroma carbonáceo no tronco; B – estroma, conídios respectivamente [24]

### 1.1.3.3 - *Ceratocystis fagacearum* (murchidão dos carvalhos)

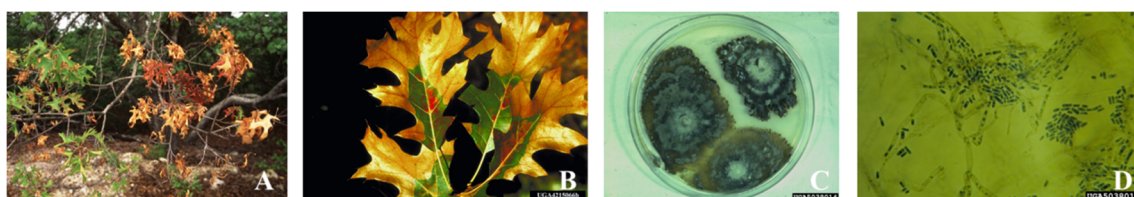
O microfungo *Ceratocystis fagacearum*, Bretz 1950 (basónimo, *Endoconidiophora fagacearum*), está incluído no Filo *Ascomycota*, Sub-Filo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Sub-Classe *Hypocreomycetidae*, Ordem *Microascales*, Família *Ceratocystidaceae* [17]. Este fungo é responsável pela doença conhecida como murchidão dos carvalhos. Atualmente encontra-se apenas na América do Norte não se conhecendo nenhuma espécie do género imune. Faz parte, portanto, da Lista EPPO A1 (espécies recomendadas para regulação enquanto organismos de quarentena) na qual ocupa a posição 6.

O microfungo *C. fagacearum* pode ser encontrado nos feixes vasculares periféricos de xilema do indivíduo infectado até que a árvore atinja um estado moribundo, altura em que pode ser transportado pelo sistema de transpiração para todas as partes de árvore onde, ocorrendo a morte da árvore, pode desenvolver na casca interior tapetes de esporulação onde são produzidos inicialmente endoconidióferos e posteriormente peritecas [19]. O fato de existirem estes tapetes em madeira morta é uma das principais formas de dispersão internacional. A dispersão natural entre hospedeiros ocorre quando os esporos libertados ao nível do sistema radicular são transportados entre indivíduos por cursos de água subterrâneos [19] ou, mais raramente, por vectores como escaravelhos (*Coleopturus truncatus* e *Carpophilus sayi*) que se alimentam da seiva dos hospedeiros e transportam os esporos dos tapetes em árvores mortas ou moribundas para novos hospedeiros (Ambourn *et al.* 2005).

Uma vez que a doença tem impactos diferentes nas várias espécies de carvalho norte-americanas, para determinar a susceptibilidade das espécies europeias foram

realizados estudos nos EUA utilizando indivíduos de várias espécies e de várias proveniências que revelaram elevadas taxas de infecção e mortalidade para todos os indivíduos (Pinon *et al.* 1997).

O principal sintoma associado a esta doença é o fenómeno de murchidão que dá o nome á doença, no início do verão, indivíduos infetados mostram sinais de murchidão nos ramos e copa e a sua folhagem morre em toda a árvore adquirindo uma cor castanha (Figura 6), estas folhas podem manter-se na árvore por longos períodos [19].



**Figura 6** – *Ceratocystis fagacearum*, A – carvalho com sintomas; B – folha com sintomas; C – colónia em PDA; D – conídios [25]

#### 1.1.3.4 – *Tubakia dryina* (oak leaf-spot)

O microfungo *Tubakia dryina*, Belisario & M.E.Barr 1991 (sinónimo, *Actinopelte dryina*, Hoehn), está incluído no Filo Ascomycota, Sub-Filo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Sub-Classe *Sordariomycetidae*, Ordem *Diaporthales*, Família *Melanconidaceae* [18], está presente na América do Norte, Europa e Ásia (Kowalski, 2006); o seu telomorfo é o microfungo *Dicarpella dryina* [18] e foi descrito, na Europa, em alguns países, incluindo Itália (Kowalski, 2006) e Reino Unido.

Este microfungo é responsável pela doença conhecida como *oak-leaf spot* e o seu hospedeiro principal é o carvalho-alvarinho (*Quercus robur*) podendo, no entanto afectar outras espécies de carvalho, bem como, raramente, espécies dos géneros *Acer*, *Castanea*, *Liquidambar*, *Photonia*, *Sasafras* e *Ulmus* (Proffer, 1990). Este patógeno consegue existir nos tecidos das plantas hospedeiras como endófito, sem causar sintomas visíveis nas folhas ou rebentos (Butin, 1992).

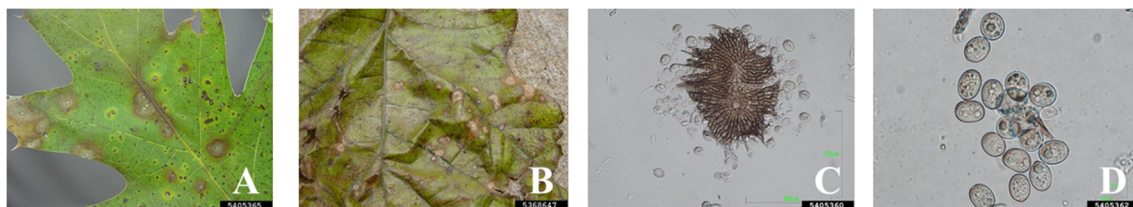
Nas folhas das espécies do género *Quercus* afetadas, o principal sintoma desta doença é o aparecimento de manchas circulares de cor bege a castanho-avermelhadas com cerca de 1 a 15 mm de diâmetro (Figura 7). Várias destas manchas podem coalescer em manchas irregulares de maior tamanho (Proffer, 1990), outro sintoma observado

repetidamente é a necrose e deformação dos pecíolos das folhas afetadas causando a queda prematura das folhas na primavera (Kowalski, 2006).

Quando inoculado em MAE, as colónias de *Tubakia dryina* apresentam primeiro uma aparência semelhante a tufos de cor branca atingindo ao fim de 21 dias um diâmetro de cerca de 86 mm e uma cor esverdeada. Em PDA, o crescimento é mais lento, adquirindo as colónias um diâmetro médio de 72 mm ao fim de 21 dias, a sua estrutura é mais compacta formando anéis concêntricos com pequenos cortes na circunferência (Kowalski, 2006).

Estudos de patogencidade realizados por T. Kowalski mostraram que, quando inoculadas artificialmente com o patógeno, cerca de 65% das folhas e rebentos mostraram sinais de sintomas após 4 a 8 semanas, entre os quais, necrose e escurecimento dos pecíolos das folhas e necrose da própria folha, primeiro ao longo das nervuras e finalmente o resto desta. A necrose ocorre tão rapidamente que as folhas não se desenvolvem até ao tamanho normal (Kowalski, 2006).

Este microfungo, na altura deste estudo, ainda não tinha sido detectado em Portugal apesar de se encontrar estabelecido noutros países europeus.



**Figura 7** – *Tubakia dryina*, A,B – folhas com sintomas; C – Pycnothyrium; D – Conídios [26]

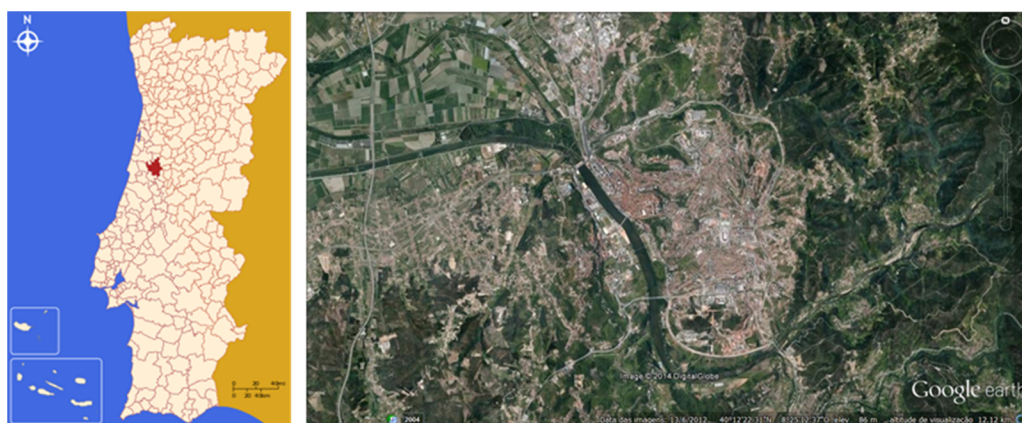
## 1.2 – A região de Coimbra

A cidade de Coimbra, capital do distrito de Coimbra fica localizado na região Centro de Portugal, sub-região do Baixo-Mondego (Figura 8). A cidade, banhada pelo rio Mondego, é a sede de um concelho com 319,4 Km<sup>2</sup>, subdividido em 18 freguesias [3] e com uma população de 143.396 habitantes (INE 2011). A amostragem deste trabalho foi realizada apenas nas freguesias de Coimbra, Santa Clara e Castelo Viegas, Santo António dos Olivais e Torres do Mondego.

O concelho de Coimbra apresenta um clima mediterrânico segundo o sistema de classificação climática de Köppen-Geiger (Peel *et al.* 2007), assim é um clima temperado



com invernos instáveis e húmidos, as temperaturas podem variar entre os 15 °C diurnos e os 5 °C noturnos podendo no entanto atingir mesmo -1 °C em vagas frias, e verões quentes e secos com temperaturas que podem variar entre os 29 °C diurnos e os 16 °C noturnos podendo atingir os 40 °C em vagas de calor extremo [4]. Os níveis de precipitação são tipicamente mediterrânicos diminuindo os níveis mensais e número de ocorrências de precipitação no verão, mas, mesmo assim com um elevado número médio de dias em que esta se regista (140) assim como os níveis médios acumulados anualmente (1018 mm) (Ganho, 2009).



**Figura 8** - Concelho de Coimbra [27]

As zonas verdes são extremamente importantes para as cidades. Para os habitantes estas funcionam como zonas ornamentais ou paisagísticas e zonas de lazer, no entanto, as zonas verdes têm várias outras funções que favorecem o bem-estar das populações citadinas (Werner, 1982). Algumas dos serviços prestados às cidades e áreas circundantes incluem, mas não estão limitados a, captura ou retenção de carbono, proteção dos solos contra erosão, manutenção de recursos hídricos e conservação de biodiversidade animal e vegetal.

Estudos realizados mostraram uma relação clara entre a existência de espaços verdes, o conforto e a qualidade de vida nas cidades de influência mediterrânea (Gomez, 2001).

O rápido desenvolvimento urbano que ocorreu no último século, não teve em conta essa importância, isso levou ao surgimento de problemas como: a poluição do ar, a poluição da água e o efeito ilha de calor urbana (ICU). A Europa, nos últimos anos, tem dado ênfase à importância da preparação das cidades para reagir em situações relacionadas

com alterações climáticas ou desastres naturais, através da iniciativa *Resilient Cities*. As zonas verdes fazem parte desta iniciativa, uma vez que, uma das formas de controlar estes problemas é a manutenção e criação de zonas verdes no ambiente urbano (Jiang, 2012).

### **1.3 – Atributos funcionais**

Os atributos funcionais das várias espécies de plantas são responsáveis pela forma como essas espécies interagem com o seu *habitat* e com outros organismos. Esses atributos permitem às plantas utilizar recursos, modificar a estrutura química e física do seu *habitat* e interagir com outros organismos, incluindo a facilitação da sua dispersão. Alguns desses atributos incluem: arquitetura e tamanho das copas, arquitetura e tamanho radicular, *Specific Leaf Area* (SLA), conteúdo de azoto (N) foliar e *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC) (De Bello *et al.* 2010). Estes estão também ligados aos serviços prestados pela planta ao seu ecossistema, incluindo regulação climática, regulação da água no solo, estabilização de solos, fertilidade dos solos e valor estético (De Bello *et al.* 2010).

As alterações climáticas e a modificação dos ecossistemas devido à agricultura intensiva e pecuária estão a alterar a estrutura e composição das zonas verdes do planeta. Ao caracterizar os organismos como conjuntos de atributos funcionais, estes podem ser usados como indicadores para avaliar certas alterações ambientais ou a forma como esses organismos reagem face a essas alterações (Wellstein *et al.* 2011).

A criação de bases de dados relativas a atributos funcionais de populações permite seguir, ao longo do tempo, a evolução dessas populações e espécies quando sujeitas a uma dada alteração ambiental (Cornelissen *et al.* 2003).

### **1.4 – Análise Molecular - a região ITS**

Os fungos, particularmente os microfungos, são um grupo extremamente diverso e ubíquo que desempenham um papel ecológico muito importante no ciclo de nutrientes terrestre (Nilsson *et al.* 2011). A identificação morfológica das espécies e muitas vezes do género exige experiência e na maioria das vezes, principalmente quando abrangendo várias divisões, classes, ordens e famílias pode tornar-se um processo complexo, impreciso e subjetivo. A identificação de muitos microfungos depende da análise das suas estruturas

sexuais que, quando em meio agarizado, nem sempre são formadas. Assim utilizar técnicas moleculares tornou-se norma como forma principal ou de verificação na identificação de microfungos.

O desenvolvimento de técnicas como a reacção PCR (Polimerase Chain Reaction) (Mullis *et al.* 1986) que permite amplificar determinadas zonas do DNA de uma amostra (White *et al.* 1990) utilizando *primers* específicos para certas regiões do genoma tornou possível a identificação mais rápida e precisa até à espécie.

Nos seres eucariotas existem genes no DNA ribossómico dos quais ocorrem cópias ao longo de todo o genoma. Entre estes genes (5.8S, 18S e 28S) encontra-se a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Figura 9). Nesta região existem zonas com grande potencial para serem utilizadas na identificação até à espécie uma vez que possuem regiões bem definidas não estando sujeita a transferência horizontal, muitas destas regiões ITS estão já disponíveis em bases de dados de acesso público sendo atualmente a mais sequenciada para o estudo molecular de ecologia de fungus (Peay *et al.* 2008).

A região ITS no caso do microfungos é amplificada pela utilização dos *primers* específicos ITS1F (Gardes *et al.* 1993) e ITS4 (White *et al.* 1990) produzindo um fragmento de 600pb (Manter *et al.* 2007), estes *primers* mostraram ter especificidade para fungos pertencentes aos Filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (Gardes *et al.* 1993; Dickie *et al.* 2002; Klamer *et al.* 2002; Anderson *et al.* 2003a,b; Izzo *et al.* 2005).

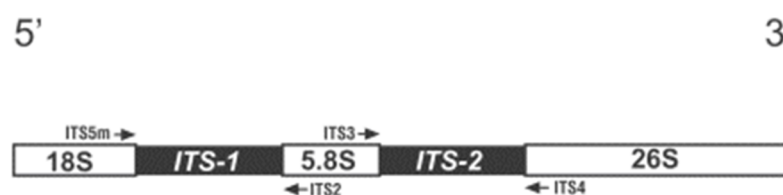


Figura 9 - Região ITS em rDNA [28]

### 1.5 – Índices de Diversidade e Equitatividade de Shannon-Wiener

A diversidade de espécies numa determinada comunidade é definida pela combinação do número de espécies nessa comunidade, ou seja, a sua riqueza e a sua abundância relativa, isto é, a sua equitatividade (Molles, 2004). A influência da riqueza de

espécies na diversidade é óbvia. Mais espécies significa uma maior diversidade, enquanto que a equitatividade representa a proporção em que essas espécies estão representadas nessa comunidade (Molles, 2004).

O índice de diversidade de Shannon-Wiener ou índice de Shannon é uma das formas quantitativas de avaliar a diversidade de espécies (Magurran, 2004), este índice permite comparar a diversidade de várias comunidades ou zonas ao atribuir um valor numérico ( $H'$ ) a essa diversidade. Esse valor pode ser calculado utilizando a fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Na fórmula,  $H'$  é o valor resultante do índice,  $p_i$  é a proporção da espécie  $i$ ,  $\ln(p_i)$  é o logaritmo natural de  $p_i$  e  $s$  é o número total de espécies da comunidade.

Para calcular a equitatividade de espécies, em cada zona amostrada, podemos utilizar o índice de equitatividade de Shannon ( $E$ ). Este valor pode ser calculado utilizando a fórmula:

$$E = \frac{H'}{H_{\max}} = \frac{- \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i}{\ln s}$$

Na fórmula,  $H'$  é o valor obtido para o índice de diversidade de Shannon, calculado pela respectiva fórmula e  $H_{\max}$  é o valor máximo de  $H'$ , cujo valor é o logaritmo natural de  $s$ , sendo  $s$  o número total de espécies da comunidade. O resultado obtido, calculando o índice de equitatividade é um valor entre 0 e 1, sendo 1 uma total equitatividade.

## 1.6 - Objectivos

Dada a relevância ecológica e económica das várias espécies de carvalho existentes em Portugal é importante, entre outros pontos, determinar o seu estado fitossanitário para garantir que não existem zonas com espécimes contaminados com patógenos prejudiciais que representem uma ameaça para esses mesmos indivíduos ou como fonte de potencial inóculo para outras zonas. Uma das formas mais práticas de se conseguir fazer esta

avaliação é através da caracterização da variabilidade de microfungos presente nos indivíduos adultos.

Este estudo visou:

1. Caracterizar a variabilidade fúngica existente na porção aérea de indivíduos do género *Quercus* na zona urbana e periurbana da cidade de Coimbra, utilizando para isso métodos de identificação moleculares e morfológicos.

2. Determinar a presença ou ausência de patógenos conhecidos do género e também utilizar esses dados para calcular os respectivos índices de diversidade dessas mesmas zonas possibilitando assim a sua comparação quantitativa.

3. Caracterizar os principais atributos funcionais foliares, nomeadamente *Leaf Area* (LA) (área foliar), *Specific Leaf Area* (SLA) (área foliar específica) e *Leaf Dry Mass Content* (LDMC) (conteúdo foliar de massa seca), de cada indivíduo amostrado para comparar e tentar relacionar esses atributos entre a área urbana e periurbana bem como a forma como essas características podem afectar a variabilidade fúngica encontrada.

4. Inferir sobre a fitossanidade das zonas amostradas e a sua importância para a manutenção da estrutura ecológica da cidade e das próprias espécies.

## **Capítulo II – Materiais e Métodos**

## 2 – Materiais e Métodos

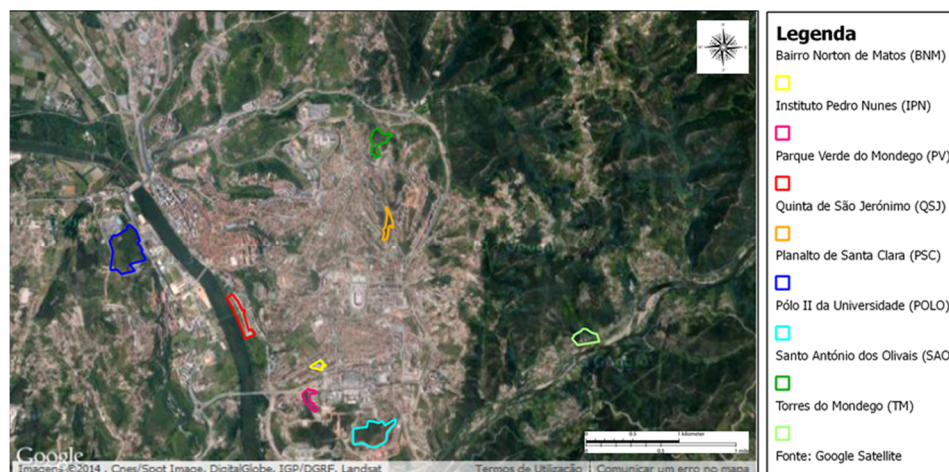
### 2.1 – Locais e amostragem

#### 2.1.1 – Zonas de recolha

O estudo foi realizado no concelho de Coimbra. As amostras foram recolhidas na própria cidade (zona urbana) e nos subúrbios da mesma (zona periurbana). A recolha foi realizada em 8 zonas distintas, 4 zonas localizadas na zona urbana da cidade e 4 localizadas em zonas periurbanas. A cada uma das zonas foi atribuída uma designação para facilitar a identificação e processamento de informação (Tabela 1). A delimitação geográfica das zonas de amostragem e dos indivíduos foram definidas no *software open source* Quantum GIS (<http://www.qgis.org/en/site/>) (Figura 10) (Anexo A).

**Tabela 1** - Zonas urbanas e periurbanas amostradas com respectivos códigos

| Zona                      | Tipo       | Designação |
|---------------------------|------------|------------|
| Bairro Norton de Matos    | URBANA     | NM         |
| Instituto Pedro Nunes     | URBANA     | IPN        |
| Parque Verde do Mondego   | URBANA     | PV         |
| Planalto de Santa Clara   | PERIURBANA | PSC        |
| Pólo II da Universidade   | PERIURBANA | POLO       |
| Quinta de São Jerónimo    | URBANA     | QSJ        |
| Santo António dos Olivais | PERIURBANA | SÃO        |
| Torres do Mondego         | PERIURBANA | TM         |



**Figura 10** - Zonas urbanas e periurbanas amostradas

A zona urbana designada por Bairro Norton de Matos (BNM) está localizada na freguesia de Santo António dos Olivais. O local de amostragem escolhido foi um pequeno terreno baldio que serve de estacionamento e onde se podem encontrar algumas dezenas de carvalhos. O local encontra-se rodeado por vias rodoviárias e urbanizações.

A zona urbana designada por Instituto Pedro Nunes (IPN) está localizada também na freguesia de Santo António dos Olivais, o local de amostragem escolhido foi um terreno localizado ao lado do IPN, a cerca de 350 metros da zona do Bairro Norton Matos. Neste local existe um pequeno arvoredo composto por vegetação de pequeno porte e carvalhos. O local encontra-se perto de um dos principais acessos rodoviários à cidade bem como algumas urbanizações estando, no entanto, próximo a sul de uma área florestada.

A zona urbana designada por Parque Verde do Mondego (PV) está localizada na freguesia de Coimbra. O local de amostragem escolhido foi a margem norte do próprio parque onde existem vários carvalhos espalhados pelo mesmo. O parque tem cerca de 8,2 hectares e cerca de 500 metros de frente ribeirinha. O local encontra-se na margem do rio Mondego perto do centro da Baixa da cidade, existindo alguns acessos rodoviários e zonas verdes perto.

A zona urbana designada por Quinta de São Jerónimo (QSJ) está localizada na freguesia de Santo António dos Olivais. O local de amostragem escolhido foi um pequeno arvoredo dominado por carvalhos e pinheiros. O local encontra-se perto de alguns acessos rodoviários, algumas urbanizações e algumas áreas verdes.



**Figura 11** – Zonas urbanas amostradas; A – Bairro Norton de Matos, B – Instituto Pedro Nunes, C - Parque Verde do Mondego, D – Quinta de São Jerónimo

A zona periurbana designada por Planalto de Santa Clara (PSC) está localizada na freguesia de Santa Clara e Castelo Viegas. O local de amostragem escolhido foi uma zona de arvoredo constituída principalmente por sobreiros dos quais é feita a extração de cortiça. O local encontra-se numa zona verde de dimensão considerável situada nos arredores de Coimbra.



A zona periurbana designada por Pólo II da Universidade de Coimbra (POLO) está localizada na freguesia de Santo António dos Olivais. O local de amostragem escolhido foi uma zona do Pinhal de Marrocos, conhecido como Colina dos Sobreiros, dominada por sobreiros, alguns pinheiros e medronheiros. O local encontra-se no extremo sul da cidade numa área com muitas zonas verdes e alguma urbanização.

A zona periurbana designada por Santo António dos Olivais (SAO) está localizada na freguesia com o mesmo nome. O local de amostragem escolhido é uma zona verde no extremo norte da cidade, dominada por carvalhos. O local encontra-se nos limites da cidade pelo que está rodeado por zonas arborizadas.

Por último, a zona periurbana designada por Torres do Mondego (TM) está localizada na freguesia Torres do Mondego. O local de amostragem escolhido foi uma faixa arborizada ao longo da estrada N110 que segue o rio Mondego na direção norte-este. O local encontra-se completamente fora da zona urbana ou arredores de Coimbra sendo a zona amostrada mais afastada.



**Figura 12** – Zonas periurbanas amostradas; A – Planalto de Santa Clara, B – Pólo II da Universidade, C – Santo António dos Olivais, D – Torres do Mondego

### 2.1.2 - Amostragem

Em cada uma das 8 zonas foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos da espécie *Quercus*. Cada indivíduo foi fotografado e a sua posição foi registada utilizando a aplicação GPS para smartphone *GPS Essentials*<sup>®</sup>. Esta informação foi depois utilizada para se obter a localização geográfica e posteriormente ser tratada num sistema de informação, nomeadamente o *software open source* Quantum GIS.

Cada um dos indivíduos foi identificado com base nas suas características morfológicas utilizando a chave dicotómica de identificação de carvalhos de Rui Pedro Lérias (Anexo B). Os resultados das identificações foram inseridos em tabela (Tabela 3). Foram recolhidas cerca de 75 folhas de cada um dos indivíduos, novamente de forma

aleatória, bem como amostras da casca e ramos. As amostras foram recolhidas entre 06/10/2013 e 29/10/2013.

As amostras recolhidas de cada indivíduo foram guardadas separadamente em sacos *ziplock* e transportadas para o laboratório, onde 25 ficaram armazenadas no frio (3 °C) até ao seu processamento para avaliação da diversidade de microfungos. As restantes folhas foram utilizadas para calcular os valores relativos aos vários atributos funcionais.

## 2.2 – Metodologia

### 2.2.1 – Atributos funcionais

#### 2.2.1.1 – *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC)

Das 75 folhas recolhidas, foram seleccionadas 50 de cada indivíduo. Estas foram colocadas em sacos *ziplock* com papel húmido durante 24 horas, este procedimento serviu para saturar as folhas, elevando o seu conteúdo de água até ao valor máximo. As folhas foram depois individualmente pesadas, utilizando uma balança digital (*KERN ALS 120-4*) e o seu peso registado por indivíduo e zona. Este processo foi repetido para todas as folhas de todas as zonas. As folhas foram depois secas ao ar, tendo para isso sido colocadas entre folhas de jornal numa prensa para retirar a humidade das mesmas, este procedimento demorou entre 7 a 10 dias dependendo da espécie, tendo as folhas de jornal sido substituídas as vezes necessárias.

Uma vez completamente secas, as folhas voltaram a ser pesadas e os valores registados. Utilizando os valores obtidos para o peso fresco e peso seco, foi calculada a massa seca ou *dry mass* (mg), este valor foi depois utilizado no cálculo de *Leaf Dry-Matter Content* ou LDMC ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Tabela 4 e Tabela 5), o qual é calculado através do fórmula:

$$\text{LDMC} = (\text{dry mass})/(\text{water saturated fresh mass})$$

#### 2.2.1.2 – *Leaf Area* (LA) e *Specific Leaf Area* (SLA)

Para determinar o atributo *Leaf Area* (LA) ( $\text{mm}^2$ ) das amostras recolhidas foi utilizado o *software open source* ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) segundo o protocolo

adaptado de Cornelissen *et al.* (2003). As folhas foram digitalizadas usando uma impressora HP (Deskjet F2492) com uma resolução de saída (dpi) de 300 dpi e a imagem digitalizada resultante foi guardada em formato *jpeg* para posterior análise.

As imagens foram depois inseridas no *software* ImageJ e foi calculada a área de cada uma das folhas para cada indivíduo de cada uma das zonas. Os dados resultantes foram registados e posteriormente utilizados para calcular a *Leaf Area* (LA) e respectivo desvio padrão ou *Standart Deviation* (SD) (Tabela 6 e Tabela 7). Utilizando os valores obtidos para a *Leaf Area*, foi calculada a *Specific Leaf Area* (SLA) ( $\text{mm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ ) (Tabela 6 e Tabela 7), a fórmula utilizada foi:

$$\text{SLA} = (\text{leaf area})/(\text{dry mass})$$

## **2.2.2 – Inoculação e isolamento de colónias puras**

### **2.2.2.1 – Seleção, recolha e esterilização de fragmentos vegetais**

Do material vegetal recolhido restante, que incluía folhas, casca e pequenos ramos, foi feita uma escolha mais ou menos aleatória, dando prioridade a zonas com possíveis contaminações por microfungos visíveis à vista desarmada ou que manifestassem lesões ou outros sintomas (Figura 13).

As amostras foram cortadas utilizando um bisturi com lâmina removível e uma tesoura de poda devidamente esterilizados com etanol e à chama entre amostras. Foram selecionados 90 fragmentos (Figura 13) de cada indivíduo da seguinte maneira:

- Amostras de casca foram cortadas em fragmentos com cerca de 1 x 0,5 cm para um total de 19 fragmentos;
- Amostras de ramos foram cortadas em fragmentos com cerca de 1 cm de comprimento para um total de 19 fragmentos;
- Amostras de folhas foram cortadas em fragmentos com cerca de 1 x 0,5 cm para um total de 52 fragmentos;

Os fragmentos vegetais recolhidos foram esterilizados superficialmente utilizando NaClO a 2% (solução de lixívia comercial) diluída com água Mili-Q (*Milipore-Q-Guard*, EUA). Cada amostra foi colocada numa caixa de Petri sendo adicionada a solução de NaClO, após 2 minutos foram realizadas duas lavagens com água Mili-Q previamente

autoclavada de forma a remover quaisquer partículas e resíduos de NaClO. Antes de serem inoculados os fragmentos foram secos em papel absorvente, devidamente esterilizado.

#### 2.2.2.2 – Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para inocular e isolar as culturas fúngicas foi preparado previamente de acordo com a tabela apresentada abaixo (Tabela 2). As quantidades indicadas destinam-se à preparação de 1 litro de solução. A esterilização das soluções foi feita utilizando uma autoclave a 120 °C e 1 atm, durante cerca de 20-30 minutos. Posteriormente adicionaram-se 280 µl de antibiótico, estreptomicina a 0,5 mg/ml (*Sigma*, EUA) de forma a prevenir possíveis contaminações bacterianas. A adição do antibiótico foi feita após um curto período de tempo, de forma a permitir algum arrefecimento e impedir a possível desnaturação do mesmo.

O meio foi espalhado em placas de Petri plásticas de 9 cm de diâmetro e de 5 cm de diâmetro numa câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com luz UV (15 minutos) e etanol (96%). Depois de solidificados, os meios foram embalados e guardados numa caixa fechada até à sua utilização.

**Tabela 2** – Componentes utilizados na preparação do meio de cultura PDA

|            | Stock em pó (Difco™) | Água destilada (Volume) |
|------------|----------------------|-------------------------|
| <b>PDA</b> | 39 g                 | 1000 ml                 |

#### 2.2.2.3 – Inoculação

Os fragmentos foram inoculados no meio de cultura PDA, preparado previamente. A inoculação foi feita dispondo 9 fragmentos na caixa de Petri contendo PDA (Figura 13). As placas inoculadas foram seladas, datadas, identificadas com o respectivo código de zona e incubadas em estufa no escuro durante 5 dias a 25 °C.

#### 2.2.2.4 – Isolamento e selecção de culturas

Após os 5 dias de incubação as caixas foram observadas e as colónias visualmente distintas foram repicadas em duplicado para PDA (caixas pequenas, 5 cm de diâmetro) de

forma a obter colónias puras. A repicagem foi feita em câmara de fluxo laminar esterilizada com luz UV (15 minutos) e etanol (96%) de forma diminuir o risco de contaminação (a esterilização com etanol foi feita entre o processamento de cada amostra).

Os isolamentos realizaram-se removendo uma pequena porção de micélio de uma determinada colónia (explante) e inoculando uma nova caixa. As caixas foram seladas, identificadas e incubadas em estufa no escuro a 25 °C, as réplicas foram mantidas juntas.

Antes de se proceder à extracção de DNA das amostras foi feita uma selecção das colónias isoladas para evitar repetições. A cada uma das colónias foi atribuído um código para extração composto pelo código de zona e um número sequencial tendo sido anotadas as repetições nos vários indivíduos nas várias zonas para referência futura.



**Figura 13** - A – amostra recolhida; B – fragmentos para inoculação; C – caixas de meio; D – caixa de meio com fragmentos inoculados

### 2.2.3 – Identificação molecular

#### 2.2.3.1 – Extração de DNA

A extracção foi realizada utilizando a máquina de extracção *ABIPRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation* (*Applied Biosystems*, EUA), esta permite proceder à extracção de DNA de até 96 amostras em simultâneo por vácuo seguindo o protocolo de extracção fornecido com a mesma (Anexo C).

Após terem sido obtidas as colónias puras isoladas em PDA, estas foram preparadas para a extracção de DNA, para tal cada colónia foi removida do meio por raspagem utilizando um bisturi com lâmina removível, a lâmina foi trocada entre cada raspagem e esterilizada à chama.

O protocolo de extracção consistiu em três etapas, a primeira consistiu na obtenção de uma solução homogeneizada de tecido da amostra, assim, o produto da raspagem foi colocado num tubo *ependorf* (1 ml) ao qual foram adicionados 200 µl de solução

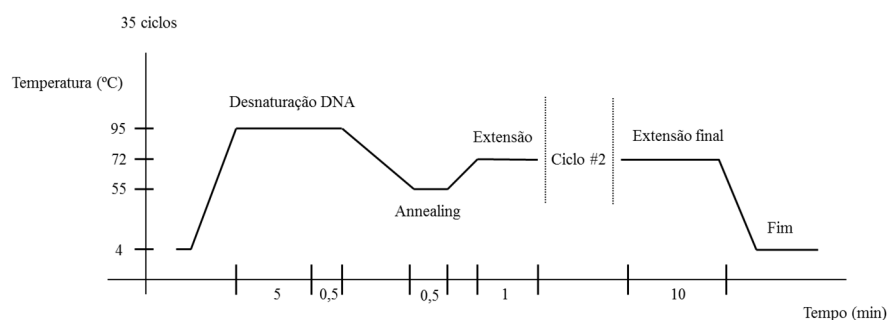
*NucPrep*<sup>TM</sup> DNA Purification Solution (AppliedBiosystems, EUA), sendo seguidamente macerado utilizando um pistão. Após a maceração adicionaram-se mais 600 µl de *NucPrep*<sup>TM</sup> e os tubos foram colocados no frigorífico durante a noite. No dia seguinte, antes de serem introduzidas na máquina de extracção, as amostras foram centrifugadas (5000 RPM durante 3 minutos) de forma a obter duas fases, foi seleccionada a fase superior com menos resíduos de forma a facilitar o processo de extracção. Na segunda etapa, foi realizada uma pré-filtração da amostra carregando os poços com 750 µl da solução obtida anteriormente que foi filtrada por vácuo, na terceira etapa foi realizada a purificação da amostra com uma sequência de lavagens e soluções (protocolo Anexo C).

### 2.2.3.2 – Análise da região ITS (PCR)

Para a amplificação da região ITS utilizaram-se os *primers* ITS1F e ITS4. A mistura para a reacção de PCR de cada um dos isolados continha, para um volume total de 25 µl, 12,5 µl de Jump Start Taq DNA Polimerase (Sigma, EUA), 0,5 µl de cada um dos *primers* (10 mM), 10 µl de água ultrapura (Sigma, EUA) e 1 µl de DNA. Para cada reacção de PCR foi preparado também um controlo negativo (sem DNA).

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (AppliedBiosystems, EUA) usando a sequência (ver Figura 14), desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos seguido por, 35 ciclos de amplificação na seguinte ordem, 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos e um passo final de extensão a 72 °C durante 10 minutos (Manter *et al.* 2007).

Os produtos de PCR obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (*Ultrapure*<sup>TM</sup> Agarose, Invitrogen<sup>TM</sup>, EUA) a 1,2%. O gel foi preparado utilizando 1,2 g de agarose com 100 ml de TBE (Sigma, EUA) a 1x corado com 0,6 µl de GelRed (Sigma, EUA). O gel foi corrido durante 45 minutos a 100 V tendo sido visualizado sob luz UV no visualizador *Bio-Rad Molecular Imager Doc XR System* (Fisher, EUA) e fotografado.



**Figura 14** - Esquema representativo da reacção de PCR

### 2.2.3.3 – Sequenciação e BLAST

Os produtos de PCR foram sequenciados num único sentido utilizando o *primer* ITS4 (forward). Para cada uma das sequências obtidas foi realizado um BLAST nos websites *Mycobank* (<http://www.mycobank.org/>) e *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para haver um termo de comparação, tendo sido verificado no website IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) o nome actual do género ou espécie resultante. O acesso aos sites foi feito nos dias 31 de Março e 1 de Abril de 2014.

### 2.3 – Tratamento de dados

Todos os dados recolhidos neste estudo, incluindo identificação de espécies amostradas, *Leaf Area*, *Specific Leaf Area*, *Leaf Dry-Matter Content* e variabilidade de microfungos, foram registados em tabelas para análise posterior. No caso do *Leaf Dry-Matter Content*, foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão para os valores apurados das pesagens frescas e após secagem, para cada indivíduo e cada zona. No caso da *Leaf Area*, foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão para cada indivíduo e cada zona, indicando também o mínimo e máximo encontrados. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SPSS® *Statistics* (IBM, EUA). Para comparar as médias obtidas para os atributos funcionais *Leaf Area* e *Leaf Dry-Matter Content*, das espécies de *Quercus* identificadas, nas zonas urbanas e periurbanas, realizaram-se *One-Way* ANOVAs, após confirmar a distribuição normal dos resultados. Foi realizado também um teste de correlação de Pearson para procurar possíveis correlações entre variáveis, nomeadamente, *Leaf Area* (LA), *Specific Leaf Area* (SLA), *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC) e número de espécies de microfungos identificadas. Este teste foi realizado para as zonas urbanas e periurbanas.

Foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Wiener, bem como o índice de equitatividade para as várias zonas amostradas, considerando o número de indivíduos em cada zona onde foi identificada cada espécie de microfungo e calculando a proporção relativa de cada espécie relativamente ao número total de espécies encontradas.

Todos os resultados foram introduzidos no *software open source* Quantum GIS para criar uma base de dados relativa aos indivíduos amostrados com as respectivas características apuradas e localização geográfica de cada zona.



## **Capítulo III – Resultados**

### 3 – Resultados

#### 3.1 – Identificação de espécies de *Quercus* amostradas

Dos 40 indivíduos amostrados neste trabalho, foram identificadas 2 espécies: o sobreiro (*Quercus suber*) e o carvalho-alvarinho (*Quercus robur*). Foram amostrados 34 sobreiros e 6 carvalhos-alvarinhos nas 8 zonas (Tabela 3) o que representa uma proporção percentual de 85% para 15%.

Dos 6 carvalhos-alvarinhos amostrados, 5 formam a totalidade amostrada da zona urbana do Parque Verde do Mondego e 1 pertence à zona periurbana de Santo António dos Olivais. Todos os indivíduos desta espécie são carvalhos adultos.

Todas as restantes zonas amostradas são compostas por sobreiros adultos.

**Tabela 3** - Identificação das espécies amostradas nas várias zonas urbanas e periurbanas

| Zona Urbana                         | Indivíduos | Espécie              | Zona Periurbana                        | Indivíduos | Espécie              |
|-------------------------------------|------------|----------------------|--|------------|----------------------|
| <b>Bairro Norton de Matos (NM)</b>  | 1          | <i>Quercus suber</i> | <b>Planalto de Santa Clara (PSC)</b>   | 1          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 2          | <i>Quercus suber</i> |  | 2          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 3          | <i>Quercus suber</i> |  | 3          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 4          | <i>Quercus suber</i> |  | 4          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 5          | <i>Quercus suber</i> |  | 5          | <i>Quercus suber</i> |
| <b>Instituto Pedro Nunes (IPN)</b>  | 1          | <i>Quercus suber</i> | <b>Pólo 2 da Univesidade (POLO)</b>    | 1          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 2          | <i>Quercus suber</i> |  | 2          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 3          | <i>Quercus suber</i> |  | 3          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 4          | <i>Quercus suber</i> |  | 4          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 5          | <i>Quercus suber</i> |  | 5          | <i>Quercus suber</i> |
| <b>Parque Verde do Mondego (PV)</b> | 1          | <i>Quercus robur</i> | <b>Santo António dos Olivais (SAO)</b> | 1          | <i>Quercus robur</i> |
|                                     | 2          | <i>Quercus robur</i> |  | 2          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 3          | <i>Quercus robur</i> |  | 3          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 4          | <i>Quercus robur</i> |  | 4          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 5          | <i>Quercus robur</i> |  | 5          | <i>Quercus suber</i> |
| <b>Quinta de São Jerónimo (QSJ)</b> | 1          | <i>Quercus suber</i> | <b>Torres do Mondego (TM)</b>          | 1          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 2          | <i>Quercus suber</i> |  | 2          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 3          | <i>Quercus suber</i> |  | 3          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 4          | <i>Quercus suber</i> |  | 4          | <i>Quercus suber</i> |
|                                     | 5          | <i>Quercus suber</i> |  | 5          | <i>Quercus suber</i> |

### 3.2 – Atributos funcionais

#### 3.2.1 – Leaf Dry-Matter Content (LDMC)

Nas zonas urbanas amostradas, o valor calculado para o atributo LDMC, para as zonas compostas exclusivamente por sobreiros, nomeadamente Bairro Norton de Matos, Instituto Pedro Nunes e Quinta de São Jerónimo variou entre 16,218 mg.g<sup>-1</sup> e 182,726 mg.g<sup>-1</sup> (Tabela 4), foi excluído o valor do indivíduo 5 da zona IPN. Na zona composta por carvalho-alvarinho, nomeadamente Parque Verde do Mondego, o conteúdo de água médio variou entre 149,367 mg.g<sup>-1</sup> e 514,257 mg.g<sup>-1</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4** – Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (s) relativos ao peso fresco e seco das folhas amostradas (g) e *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC) em zonas urbanas

| Zona Urbana                         | Indivíduos | Peso fresco ( $\bar{x}$ ) | SD (s) | Peso seco ( $\bar{x}$ ) | SD (s) | LDMC (mg.g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------|------------|---------------------------|--------|-------------------------|--------|----------------------------|
| <b>Bairro Norton de Matos (NM)</b>  | 1          | 0,189                     | 0,062  | 0,098                   | 0,033  | 479,223                    |
|                                     | 2          | 0,271                     | 0,138  | 0,160                   | 0,081  | 410,510                    |
|                                     | 3          | 0,163                     | 0,044  | 0,086                   | 0,025  | 471,805                    |
|                                     | 4          | 0,230                     | 0,082  | 0,127                   | 0,046  | 450,633                    |
|                                     | 5          | 0,209                     | 0,132  | 0,118                   | 0,068  | 435,426                    |
| <b>Média total (Zona)</b>           |            | 0,212                     | 0,092  | 0,118                   | 0,051  | 449,519                    |
| <b>Instituto Pedro Nunes (IPN)</b>  | 1          | 0,176                     | 0,055  | 0,102                   | 0,032  | 418,557                    |
|                                     | 2          | 0,208                     | 0,079  | 0,114                   | 0,044  | 453,644                    |
|                                     | 3          | 0,176                     | 0,086  | 0,102                   | 0,050  | 420,195                    |
|                                     | 4          | 0,142                     | 0,060  | 0,116                   | 0,050  | 182,726                    |
|                                     | 5          | 0,171                     | 0,108  | 0,168                   | 0,087  | 16,218                     |
| <b>Média total (Zona)</b>           |            | 0,175                     | 0,078  | 0,120                   | 0,052  | 368,780                    |
| <b>Parque Verde do Mondego (PV)</b> | 1          | 0,522                     | 0,219  | 0,274                   | 0,122  | 474,932                    |
|                                     | 2          | 0,413                     | 0,208  | 0,228                   | 0,123  | 446,822                    |
|                                     | 3          | 0,276                     | 0,112  | 0,134                   | 0,058  | 514,257                    |
|                                     | 4          | 0,530                     | 0,210  | 0,273                   | 0,109  | 484,504                    |
|                                     | 5          | 0,216                     | 0,139  | 0,183                   | 0,065  | 149,367                    |
| <b>Média total (Zona)</b>           |            | 0,391                     | 0,178  | 0,219                   | 0,095  | 413,977                    |
| <b>Quinta de São Jerónimo (QSJ)</b> | 1          | 0,169                     | 0,079  | 0,096                   | 0,044  | 431,191                    |
|                                     | 2          | 0,257                     | 0,174  | 0,142                   | 0,094  | 448,753                    |
|                                     | 3          | 0,208                     | 0,106  | 0,127                   | 0,063  | 390,940                    |
|                                     | 4          | 0,142                     | 0,060  | 0,086                   | 0,036  | 397,254                    |
|                                     | 5          | 0,168                     | 0,087  | 0,101                   | 0,053  | 400,350                    |
| <b>Média total (Zona)</b>           |            | 0,189                     | 0,101  | 0,110                   | 0,058  | 413,698                    |

Nas zonas periurbanas amostradas, o valor calculado para o atributo LDMC para as zonas compostas exclusivamente por sobreiros e para a zona de Santo António dos Olivais, excluindo o indivíduo 1, variou entre 131,166 mg.g<sup>-1</sup> e 478,168 mg.g<sup>-1</sup>. Para o indivíduo 1 da área de Santo António dos Olivais, identificado como carvalho-alvarinho, o valor para o atributo LDMC calculado foi de 507,211 mg.g<sup>-1</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5** - Média ( $\bar{x}$ ) e desvio-padrão (s) relativos ao peso fresco e seco das folhas amostradas (g) e *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC) em zonas periurbanas

| Zona Periurbana                 | Indivíduos | Peso fresco ( $\bar{x}$ ) | SD (s) | Peso seco ( $\bar{x}$ ) | SD (s) | LDMC (mg.g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------|------------|---------------------------|--------|-------------------------|--------|----------------------------|
| Planalto de Santa Clara (PSC)   | 1          | 0,238                     | 0,110  | 0,124                   | 0,056  | 478,168                    |
|                                 | 2          | 0,206                     | 0,083  | 0,179                   | 0,098  | 131,166                    |
|                                 | 3          | 0,225                     | 0,104  | 0,122                   | 0,057  | 455,544                    |
|                                 | 4          | 0,240                     | 0,086  | 0,132                   | 0,049  | 450,514                    |
|                                 | 5          | 0,325                     | 0,180  | 0,179                   | 0,098  | 450,620                    |
| <b>Média total (Zona)</b>       |            | 0,247                     | 0,113  | 0,147                   | 0,072  | 393,202                    |
| Pólo 2 da Univesidade (POLO)    | 1          | 0,139                     | 0,055  | 0,078                   | 0,031  | 437,308                    |
|                                 | 2          | 0,176                     | 0,079  | 0,105                   | 0,047  | 405,737                    |
|                                 | 3          | 0,172                     | 0,059  | 0,102                   | 0,036  | 404,735                    |
|                                 | 4          | 0,132                     | 0,071  | 0,074                   | 0,026  | 442,869                    |
|                                 | 5          | 0,181                     | 0,069  | 0,115                   | 0,040  | 366,444                    |
| <b>Média total (Zona)</b>       |            | 0,160                     | 0,066  | 0,095                   | 0,036  | 411,418                    |
| Santo António dos Olivais (SAO) | 1          | 0,403                     | 0,233  | 0,199                   | 0,112  | 507,211                    |
|                                 | 2          | 0,209                     | 0,107  | 0,135                   | 0,124  | 354,304                    |
|                                 | 3          | 0,222                     | 0,088  | 0,125                   | 0,049  | 438,126                    |
|                                 | 4          | 0,226                     | 0,084  | 0,130                   | 0,048  | 422,761                    |
|                                 | 5          | 0,214                     | 0,077  | 0,127                   | 0,043  | 407,013                    |
| <b>Média total (Zona)</b>       |            | 0,255                     | 0,118  | 0,143                   | 0,075  | 425,883                    |
| Torres do Mondego (TM)          | 1          | 0,216                     | 0,071  | 0,124                   | 0,043  | 424,174                    |
|                                 | 2          | 0,179                     | 0,038  | 0,102                   | 0,022  | 428,967                    |
|                                 | 3          | 0,187                     | 0,072  | 0,111                   | 0,043  | 408,624                    |
|                                 | 4          | 0,198                     | 0,067  | 0,113                   | 0,037  | 430,329                    |
|                                 | 5          | 0,267                     | 0,078  | 0,148                   | 0,043  | 445,565                    |
| <b>Média total (Zona)</b>       |            | 0,210                     | 0,065  | 0,120                   | 0,038  | 427,532                    |

O valor médio calculado para o atributo LDMC nas folhas de sobreiro foi superior para as zonas urbanas relativamente às zona periurbanas, no entanto, esta diferença é de apenas 4,028 mg.g<sup>-1</sup> (413,658 mg.g<sup>-1</sup> para as zonas urbanas e 409,630 mg.g<sup>-1</sup> para as

zonas periurbanas). No caso do carvalho-alvarinho, o valor calculado foi inferior na zona urbana do Parque Verde do Mondego do que na zona periurbana de Santo António dos Olivais. No entanto, a amostra desta espécie para a zona periurbana é composta por um único indivíduo. De forma global, para todas as zonas, foi calculado um valor médio de LDMC de 411,339 mg.g<sup>-1</sup> para o sobreiro e de 429,516 mg.g<sup>-1</sup> para o cavalo-alvarinho.

O teste estatístico realizado (ANOVA F = (1,32) = 0,434, p = 0,515) para comparar as médias do sobreiro nas zonas urbanas e periurbanas, revelou que não existem diferenças estatisticamente significantes para p < 0,05 nos valores dessas médias.

No caso dos carvalhos-alvarinhos, o teste estatístico realizado (ANOVA F(1,4) = 0,320, p = 0,602) para comparar as médias nos dois tipos de áreas, revelou que não existem diferenças estatisticamente significantes para P < 0,05 nos valores dessas médias.

### 3.2.2 – Leaf Area (LA) e Specific Leaf Area (SLA)

Nas zonas urbanas amostradas, o valor do atributo *Leaf Area* para zonas compostas exclusivamente por sobreiros, nomeadamente Bairro Norton de Matos, Instituto Pedro Nunes e Quinta de São Jerónimo variou entre 780,4 mm<sup>2</sup> e 1173,8 mm<sup>2</sup> sendo o valor médio para as 3 zonas 895,9 mm<sup>2</sup>. Na zona composta por carvalho-alvarinho, nomeadamente Parque Verde do Mondego, o valor do atributo *Leaf Area* variou entre 2284,5 mm<sup>2</sup> e 3425,6 mm<sup>2</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6** – *Leaf Area* (LA), média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s), máximos (Máx.), mínimos (Min.) e *Specific Leaf Area* (SLA) em zonas urbanas

| Zona Urbana                        | Indivíduos | LA ( $\bar{x}$ ) (mm <sup>2</sup> ) | SD (s) | Min.  | Máx.   | SLA (mm <sup>2</sup> .mg <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|------------|-------------------------------------|--------|-------|--------|--|
| <b>Bairro Norton de Matos (NM)</b> | 1          | 918,2                               | 292,6  | 349,9 | 1497,8 | 10,163                                   |
|                                    | 2          | 1173,8                              | 562,6  | 284,8 | 2487,4 | 10,560                                   |
|                                    | 3          | 780,4                               | 195,2  | 500,6 | 1318,0 | 10,161                                   |
|                                    | 4          | 1110,7                              | 417,5  | 429,6 | 2127,2 | 10,697                                   |
|                                    | 5          | 977,6                               | 548,3  | 338,9 | 3325,2 | 10,719                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>          |            | 992,1                               | 403,2  |       |        | 10,460                                   |
| <b>Instituto Pedro Nunes (IPN)</b> | 1          | 741,9                               | 206,4  | 278,1 | 1286,1 | 10,058                                   |
|                                    | 2          | 891,2                               | 299,6  | 423,1 | 1481,4 | 9,433                                    |
|                                    | 3          | 794,5                               | 333,2  | 229,8 | 1882,3 | 10,733                                   |
|                                    | 4          | 976,0                               | 391,4  | 459,9 | 1925,6 | 37,649                                   |
|                                    | 5          | 1070,4                              | 550,0  | 305,4 | 2448,3 | 386,147                                  |
| <b>Média Total (Zona)</b>          |            | 850,9                               | 356,1  |       |        | 90,804                                   |

(Tabela 6, Parte 2)

| Zona Urbana                  | Indivíduos | LA ( $\bar{x}$ ) (mm <sup>2</sup> ) | SD (s) | Min.   | Máx.   | SLA (mm <sup>2</sup> .mg <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------|------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|--|
| Parque Verde do Mondego (PV) | 1          | 3302,1                              | 1158,6 | 1061,9 | 6060,9 | 13,309                                   |
|                              | 2          | 2533,3                              | 1131,5 | 855,9  | 4758,7 | 13,741                                   |
|                              | 3          | 2284,5                              | 858,0  | 500,1  | 4087,6 | 16,103                                   |
|                              | 4          | 3425,6                              | 1233,6 | 1335,6 | 5771,8 | 13,343                                   |
|                              | 5          | 2899,6                              | 1455,3 | 1208,1 | 6605,6 | 90,045                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>    |            | 2889,0                              | 1167,4 |        |        | 29,308                                   |
| Quinta de São Jerónimo (QSJ) | 1          | 783,0                               | 355,9  | 201,1  | 1615,6 | 10,728                                   |
|                              | 2          | 934,7                               | 537,7  | 298,8  | 2295,5 | 8,090                                    |
|                              | 3          | 848,7                               | 390,6  | 163,6  | 1958,9 | 10,433                                   |
|                              | 4          | 586,5                               | 218,7  | 297,1  | 1238,0 | 10,406                                   |
|                              | 5          | 850,4                               | 396,1  | 262,8  | 1908,5 | 12,633                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>    |            | 800,7                               | 379,8  |        |        | 10,458                                   |

Nas zonas periurbanas amostradas, o valor do atributo *Leaf Area* para as zonas compostas exclusivamente por sobreiros e para a zona de Santo António dos Olivais, excluindo o indivíduo 1, variou entre 751,1 mm<sup>2</sup> e 1146,1 mm<sup>2</sup> sendo o valor médio para as 4 zonas 990 mm<sup>2</sup>. No indivíduo 1 da área de Santo Antonio dos Olivais identificado como carvalho-alvarinho, o valor do atributo *Leaf Area* foi 2577,4 mm<sup>2</sup> (Tabela 7).

**Tabela 7** – *Leaf Area* (LA), média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (s), máximos (Máx.), mínimos (Min.) e *Specific Leaf Area* (SLA) em zonas periurbanas

| Zona Periurbana               | Indivíduos | LA ( $\bar{x}$ ) (mm <sup>2</sup> ) | SD (s) | Min.  | Máx.   | SLA (mm <sup>2</sup> .mg <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|------------|-------------------------------------|--------|-------|--------|--|
| Planalto de Santa Clara (PSC) | 1          | 1182,6                              | 479,3  | 490,3 | 2518,8 | 10,378                                   |
|                               | 2          | 981,6                               | 368,0  | 107,3 | 1625,8 | 36,331                                   |
|                               | 3          | 996,9                               | 425,7  | 304,5 | 1985,3 | 9,733                                    |
|                               | 4          | 927,5                               | 281,7  | 392,5 | 1506,2 | 8,577                                    |
|                               | 5          | 1642,0                              | 856,3  | 343,8 | 3861,6 | 11,204                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>     |            | 1146,1                              | 482,2  |       |        | 15,245                                   |
| Pólo 2 da Univesidade (POLO)  | 1          | 580,1                               | 192,6  | 287,5 | 1161,4 | 9,578                                    |
|                               | 2          | 768,7                               | 299,6  | 214,7 | 1457,9 | 10,774                                   |
|                               | 3          | 890,8                               | 270,2  | 394,9 | 1539,6 | 12,815                                   |
|                               | 4          | 619,6                               | 199,9  | 192,9 | 1042,9 | 10,582                                   |
|                               | 5          | 896,3                               | 290,1  | 244,3 | 1582,5 | 13,496                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>     |            | 751,1                               | 250,5  |       |        | 11,449                                   |

(Tabela 7, Parte 2)

| Zona Periurbana                 | Indivíduos | LA ( $\bar{x}$ ) (mm <sup>2</sup> ) | SD (s) | Min.  | Máx.   | SLA (mm <sup>2</sup> .mg <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------|------------|-------------------------------------|--------|-------|--------|--|
| Santo António dos Olivais (SAO) | 1          | 2577,4                              | 1356,6 | 790,7 | 7015,3 | 12,615                                   |
|                                 | 2          | 869,5                               | 407,3  | 203,5 | 1949,2 | 11,745                                   |
|                                 | 3          | 1005,2                              | 363,5  | 406,7 | 1622,5 | 10,342                                   |
|                                 | 4          | 998,9                               | 354,0  | 296,9 | 2038,0 | 10,478                                   |
|                                 | 5          | 1256,6                              | 391,7  | 565,9 | 2190,6 | 14,408                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>       |            | 1341,5                              | 574,6  |       |        | 11,917                                   |
| Torres do Mondego (TM)          | 1          | 1052,4                              | 255,2  | 684,8 | 1817,6 | 11,477                                   |
|                                 | 2          | 855,2                               | 186,4  | 541,9 | 1465,2 | 11,138                                   |
|                                 | 3          | 871,6                               | 290,2  | 357,8 | 1586,0 | 11,385                                   |
|                                 | 4          | 1094,9                              | 305,5  | 486,4 | 1759,4 | 12,842                                   |
|                                 | 5          | 1276,2                              | 367,9  | 541,5 | 2259,3 | 10,722                                   |
| <b>Média Total (Zona)</b>       |            | 1030,1                              | 281,0  |       |        | 11,513                                   |

O valor médio do atributo *Leaf Area* foi inferior para as áreas urbanas relativamente às áreas periurbanas no caso do sobreiro (8,959 cm<sup>2</sup> para as zonas urbanas e 9,9 cm<sup>2</sup> para as zonas periurbanas) e também no caso do carvalho-alvarinho. No entanto, no caso do carvalho-alvarinho como toda a amostra representativa da espécie nas áreas periurbanas foi de um único indivíduo é impossível fazer uma comparação fiável.

De forma global, para as zonas urbanas e periurbanas, foi calculada um valor de 9,472 cm<sup>2</sup> para o sobreiro e 28,371 cm<sup>2</sup> para o carvalho-alvarinho.

O teste estatístico realizado (ANOVA  $F(1,32) = 1,64$ ,  $p = 0,210$ ) para comparar as médias do sobreiro nas áreas urbanas e periurbanas, revelou que não existem diferenças estatisticamente significantes para  $p < 0,05$  nos valores dessas médias.

No caso dos carvalhos-alvarinhos, o teste estatístico realizado (ANOVA  $F(1,4) = 0,340$ ,  $p = 0,591$ ) para comparar as médias nos dois tipos de áreas, revelou que não existem diferenças estatisticamente significantes para  $P < 0,05$  nos valores dessas médias.

### 3.3 – Diversidade de microfungos

Foram sequenciados um total de 109 produtos de PCR da região ITS, amplificados a partir de 109 amostras extraídas a partir de colónias isoladas. Após a realização dos BLASTs, foram identificadas 52 espécies, das quais 42 nas zonas urbanas (Tabela 8) e 37 nas zonas periurbanas (Tabela 9).

**Tabela 8** - Diversidade de espécies de microfungos presentes nas zonas urbanas (NM – Norton Matos; IPN – Instituto Pedro Nunes; PV – Parque Verde do Mondego; QSJ – Quinta de São Jerónimo; I - indivíduo)

|                                       | NM  |     |     |     |     | IPN |     |     |     |     | PV  |     |     |     |     | QSJ |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
|                                       | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 |  |  |  |  |  |
| <i>Aspergillus tubingensis</i>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Alternaria alstroemeriae</i>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Alternaria alternata</i>           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Alternaria arborescens</i>         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Alternaria sp.</i>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Alternaria tangelonis</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Amphiporthe leiphaemia</i>         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Arthrimum kogelbergense</i>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Biscogniauxia mediterranea</i>     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Cladosporium sp.</i>               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Diaporthe neotheicola</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Epicoccum nigrum</i>               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Epicoccum sp.</i>                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Fusarium cortaderiae</i>           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Fusarium proliferatum</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Hypocrea lixii</i>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Hypocrea sp.</i>                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Khuskia oryzae</i>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Lewia infectoria</i>               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Mucor racemosus</i>                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Nigrospora sp.</i>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Obolarina dryophila</i>            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Paraconiothyrium brasiliense</i>   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Penicillium citrinum</i>           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Penicillium decaturense</i>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Penicillium glabrum</i>            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Penicillium griseofulvum</i>       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Penicillium sp.</i>                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Phoma glomerata</i>                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Phoma herbarum</i>                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Phomosis amygdali</i>              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Pleospora australiensis</i>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Sordaria humana</i>                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |
| <i>Sphaeropsis sapinea</i>            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |



(Tabela 8, parte 2)

|                                    | NM  |     |     |     |     | IPN |     |     |     |     | PV  |     |     |     |     | QSJ |     |     |     |     |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                    | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 |
| <i>Trichoderma atroviride</i>      |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Trichoderma citrinoviride</i>   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Trichoderma inhamatum</i>       |     |     |     |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Trichoderma paraviridescens</i> |     | x   |     |     |     |     |     | x   | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Tubakia dryina</i>              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     | x   | x   |     |

**Tabela 9** - Diversidade de espécies de microfungos presentes nas zonas periurbanas (PSC – Planalto de Santa Clara; POLO – Pólo II da Universidade; SÃO – Santo António dos Olivais; TM – Torres do Mondego; I - indivíduo)

|                                       | PSC |     |     |     |     | POLO |     |     |     |     | SÃO |     |     |     |     | TM  |     |     |     |     |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                       | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1  | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 | I 1 | I 2 | I 3 | I 4 | I 5 |
| <i>Aspergillus tubingensis</i>        |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |
| <i>Alternaria alternata</i>           | x   | x   |     | x   | x   | x    | x   | x   |     | x   |     | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   |
| <i>Alternaria arborescens</i>         |     |     |     | x   |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Alternaria sp.</i>                 | x   |     | x   | x   |     |      | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   | x   |     | x   | x   |     | x   |
| <i>Alternaria tangelonis</i>          |     |     |     |     |     | x    |     |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Amphiporthe leiphaemia</i>         | x   |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | x   |     | x   |     | x   |     |     |     |     |
| <i>Arthrinium kogelbergense</i>       |     |     |     |     |     |      |     |     | x   |     |     |     | x   |     | x   |     | x   |     |     |     |
| <i>Biscogniauxia mediterranea</i>     | x   | x   |     |     |     |      |     |     | x   | x   |     |     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i>        |     |     |     |     |     |      |     | x   | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Cladosporium sp.</i>               |     |     |     |     |     |      | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| <i>Colletotrichum dracaenophilum</i>  |     |     |     |     | x   |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Colletotrichum fiorinae</i>        |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |     | x   |     |     | x   |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Cryphonectria naterciae</i>        |     |     |     | x   |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Daldinia concentrica</i>           |     | x   |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Diaporthe neotheicola</i>          |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Epicoccum nigrum</i>               |     |     |     |     | x   | x    | x   |     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Fusarium cortaderiae</i>           |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Gelasinospora sp.</i>              |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| <i>Gibberella avenacea</i>            |     |     |     | x   |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |
| <i>Hypocrea lixii</i>                 |     |     |     |     |     |      | x   |     | x   |     |     | x   | x   | x   | x   |     | x   |     |     | x   |
| <i>Hypocrea sp.</i>                   |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Khuskia oryzae</i>                 |     |     |     | x   |     |      |     | x   |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     | x   |
| <i>Mucor racemosus</i>                |     |     |     |     |     | x    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Nigrospora sp.</i>                 | x   |     |     | x   | x   |      | x   | x   |     | x   | x   | x   |     | x   |     | x   |     |     |     |     |

(Tabela 9, Parte 2)

|                                    | PSC    |        |        |        |        | POLO   |        |        |        |        | SAO    |        |        |        |        | TM     |        |        |        |        |   |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
|                                    | I<br>1 | I<br>2 | I<br>3 | I<br>4 | I<br>5 | I<br>1 | I<br>2 | I<br>3 | I<br>4 | I<br>5 | I<br>1 | I<br>2 | I<br>3 | I<br>4 | I<br>5 | I<br>1 | I<br>2 | I<br>3 | I<br>4 | I<br>5 |   |
| <i>Nigrospora sphaerica</i>        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x      | x      |        |        |        |   |
| <i>Penicillium citrinum</i>        | x      |        |        |        |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x      |   |
| <i>Penicillium glabrum</i>         |        |        |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        | x      | x      | x      |        |        |        |        |   |
| <i>Penicillium sp.</i>             |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |   |
| <i>Penicillium spinulosum</i>      | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x      |   |
| <i>Pithomyces chartarum</i>        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |   |
| <i>Sordaria fimicola</i>           |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x |
| <i>Sordaria humana</i>             |        |        | x      | x      | x      |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        | x      |        |        | x      | x |
| <i>Sphaeropsis sapinea</i>         |        |        |        |        |        |        |        | x      | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x |
| <i>Trichoderma inhamatum</i>       |        |        | x      |        | x      |        |        |        |        |        | x      | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |   |
| <i>Trichoderma paraviridescens</i> |        |        |        |        |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |   |
| <i>Tubakia dryina</i>              |        |        |        |        |        | x      |        |        |        | x      |        |        |        |        |        |        |        |        |        | x      |   |

As espécies de microfungos presentes nas zonas urbanas e periurbanas, bem como a sua sobreposição nas mesmas, caso esta ocorra, está representada na Figura 15. Os resultados ilustram apenas em quantos indivíduos nas zonas urbanas e periurbanas foi identificada cada espécie.

Foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Wiener para todas as zonas urbanas e periurbanas (Tabela 10).

No caso das zonas urbanas, a zona com maior diversidade foi a Quinta de São Jerónimo com um valor de 3,01, sendo a zona de menor diversidade o Parque Verde do Mondego com um valor de 2,68. A diversidade geral média calculada para as zonas urbanas foi de 2,83.

No caso das zonas periurbanas, a zona de maior diversidade foi a zona Torres do Mondego com um valor de 3,06, sendo a zona de menor diversidade a zona de Santo António dos Olivais com um valor de 2,59. A diversidade geral média calculada para as zonas periurbanas foi de 2,8.

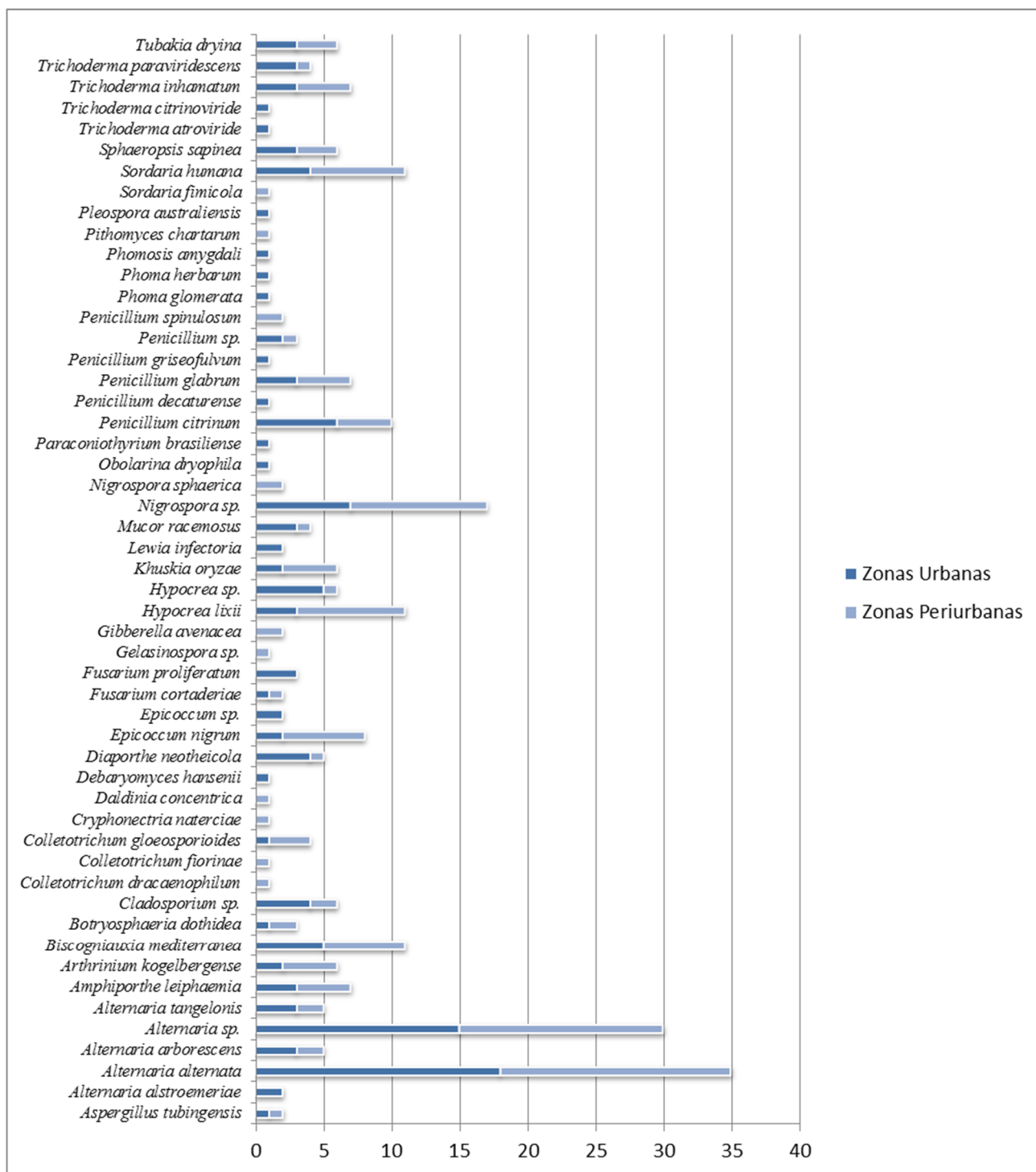


Figura 15 - Espécies presentes nas zonas urbanas e periurbanas com respectiva sobreposição

**Tabela 10** - Número de espécies, índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') e índice de Equitatividade (E) para zonas urbanas e periurbanas

|                   | Zonas | Nº Espécies | Índice de Shannon-Wiener (H') | Equitatividade (E) |
|-------------------|-------|-------------|-------------------------------|--------------------|
| Áreas urbanas     | NM    | 18          | 2,74                          | 0,95               |
|                   | IPN   | 22          | 2,92                          | 0,94               |
|                   | PV    | 17          | 2,68                          | 0,95               |
|                   | QSJ   | 24          | 3,01                          | 0,95               |
| Áreas periurbanas | PSC   | 19          | 2,80                          | 0,95               |
|                   | POLO  | 18          | 2,75                          | 0,95               |
|                   | SAO   | 16          | 2,59                          | 0,93               |
|                   | TM    | 25          | 3,06                          | 0,95               |

Foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar possíveis correlações entre as variáveis LA (*Leaf Area*), SLA (*Specific Leaf Area*), LDMC (*Leaf Dry-Matter Content*) e número de espécies de microfungos nas áreas urbanas e periurbanas. Os resultados obtidos mostram que, existe uma correlação negativa entre as variáveis LA e número de espécies ( $r = -0,496$ ,  $n = 20$ ,  $p = 0,026$ ) e que existe também uma correlação negativa entre as variáveis SLA e LDMC ( $r = -0,812$ ,  $n = 20$ ,  $p = 0,001$ ) nas zonas urbanas. Nas zonas periurbanas, os resultados obtidos mostram que, existe uma correlação negativa entre as variáveis SLA e LDMC ( $r = -0,905$ ,  $n = 20$ ,  $p = 0,001$ ).

### 3.3.1 – Patógenos do género *Quercus*

Das 52 espécies identificadas, 3 são patógenos conhecidos do género *Quercus*, nomeadamente os Ascomycota: *Amphiportha leiphaemia*, *Biscogniauxia mediterranea* e *Tubakia dryina*. Estes fungos foram encontrados tanto nas zonas urbanas como periurbanas. No entanto o número de ocorrências registadas variou com a zona e espécie de carvalho infectado (zonas urbanas, Tabela 11; zonas periurbanas, Tabela 12).

**Tabela 11** - Ocorrência de fungos patógenos em espécies do género *Quercus* em zonas urbanas (número de isolados)

|                                   | <i>Quercus suber</i> | <i>Quercus robur</i> |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Amphiportha leiphaemia</i>     | 3                    | 0                    |
| <i>Biscogniauxia mediterranea</i> | 5                    | 0                    |
| <i>Tubakia dryina</i>             | 2                    | 1                    |

**Tabela 12** - Ocorrência de fungos patógenos em espécies do género *Quercus* em zonas periurbanas (número de isolados)

|                                   | <i>Quercus suber</i> | <i>Quercus robur</i> |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Amphiportha leiphaemia</i>     | 4                    | 0                    |
| <i>Biscogniauxia mediterranea</i> | 6                    | 0                    |
| <i>Tubakia dryina</i>             | 3                    | 0                    |

A ocorrência destes fungos foi superior nas zonas periurbanas para todas as espécies de patógeno, no caso do sobreiro. Relativamente às zonas urbanas, no caso do carvalho-alvarinho, apenas foi encontrado um dos patógenos no indivíduo 2 da zona urbana Parque Verde do Mondego.

### 3.3.2 – Outros patógenos de plantas

Neste estudo foram encontradas outras espécies de patógenos que não afectam directamente o género *Quercus*, mas que representam um potencial risco para outras espécies de plantas. As espécies de carvalho servem apenas como hospedeiras para estes patógenos representando, sendo, portanto, uma possível fonte de inóculo. Alguns são fungos endofíticos oportunistas comuns em plantas lenhosas que apenas atacam plantas doentes ou sob stress. Outros são, no entanto, patógenos perigosos para determinadas espécies de plantas (Tabela 13) (informação acedida em [www.plantwise.org/](http://www.plantwise.org/)). Como o microfungo *Gibberella avenacea*, Cook 1967, que ataca numerosas espécies de plantas de grande importância económica e que foi identificado em duas zonas periurbanas (Planalto de Santa Clara e Torres do Mondego) (Tabela 9).

**Tabela 13** - Outros patógenos de plantas identificados neste estudo

| <b>Espécie</b>                        | <b>Gêneros/Espécies susceptíveis</b>   | <b>Doença</b>         |
|---------------------------------------|--|-----------------------|
| <i>Alternaria alstroemeriae</i>       | <i>Alstroemeria</i> sp.  | black spot            |
| <i>Alternaria alternata</i>           | cerca de 380 espécies  | alternaria leaf spot  |
| <i>Alternaria arborescens</i>         | <i>Solanum lycopersicum</i> (tomateiro)  | Antracnose            |
| <i>Colletotrichum dracaenophilum</i>  | <i>Dracaena braunii</i> (bambo da sorte)   | Antracnose            |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | (+)1000 espécies tropicais de fruta  | podridão da fruta     |
| <i>Cryphonectria naterciae</i>        | <i>Castanea sativa</i> (castanheiro)   | cancro do castanheiro |
| <i>Fusarium proliferatum</i>          | <i>Allium</i> sp.  | podridão do bolbo     |
| <i>Gibberella avenacea</i>            | <i>Allium sativum</i> (alho); <i>Avena sativa</i> (aveia);<br><i>Brassica</i> sp.; <i>Malus domestica</i> (macieira);<br><i>Nicotina tabacum</i> (tabaco); <i>Prunus</i> sp;<br><i>Triticum aestivum</i> (trigo) - entre muitas outras | Podridão              |
| <i>Khuskia oryzae</i>                 | <i>Zea mays</i> (milho)  | podridão da espiga    |
| <i>Phomosis amygdali</i>              | <i>Prunus persica</i> (pessegueiro); <i>Prunus amygdalus</i> (amendoeira)  | Podridão              |
| <i>Sphaeropsis sapinea</i>            | <i>Pinus</i> sp.   | seca das agulhas      |

## **Capítulo IV – Discussão**

## 4 – Discussão

### 4.1 – Atributos funcionais

Todas as espécies de plantas possuem certas características fisiológicas ou atributos funcionais. Estes são o resultado da sua adaptação às condições particulares do *habitat* onde estão inseridas. Uma mesma espécie pode apresentar valores diferentes para uma mesma característica, quando se encontra sujeita a diferentes condições climáticas e ecológicas. Essas características, caso sofram alterações devido a fatores externos, podem ter efeitos nas populações dessas espécies. As duas espécies do género *Quercus* que foram identificadas no âmbito deste estudo apresentam diferenças no que diz respeito aos atributos funcionais medidos tanto em zonas urbanas como em zonas periurbanas.

Os sobreiros amostrados em zonas urbanas apresentam folhas com uma menor área relativamente aos amostrados em zonas periurbanas. Isto deve-se, provavelmente, ao menor acesso a nutrientes como azoto (N) e fósforo (P) nos solos das zonas urbanas. Estes nutrientes afetam o desenvolvimento dos espécimes nestas áreas, assim como a variação da concentração destes nutrientes nas folhas afeta a sua *Specific Leaf Area* (SLA) (Niinemets *et al.* 2003; Dominguez *et al.* 2012). No entanto, o atributo *Leaf Dry-Matter Content* (LDMC) para os sobreiros nas zonas urbanas é superior ao valor apurado para as zonas periurbanas. Uma menor *Leaf Area* (LA) significa que existe uma menor área onde pode ocorrer perda de água pela planta, logo, existe uma maior percentagem de água em folhas menores. No caso dos carvalhos-alvarinhos, estes possuem folhas com uma maior área nas zonas urbanas do que os indivíduos das zonas periurbanas. O conteúdo de água nesta espécie é superior nas zonas periurbanas. Estes resultados podem ser explicados se tivermos em consideração que os indivíduos amostrados na zona urbana do Parque Verde do Mondego recebem água na forma de rega e adubos, em alturas de stress, o que explica o desenvolvimento de folhas maiores. No entanto, estão sujeitos a um grande período de exposição solar direta diariamente, enquanto que o indivíduo amostrado na zona periurbana de Santo António dos Olivais se encontra num local mais protegido, com exposição solar limitada e onde os níveis de humidade são elevados. Seria interessante, comparar os valores médios obtidos para cada espécie com outros valores recolhidos em



locais diferentes, no entanto não foram encontrados dados na literatura para comparação.

#### **4.2 – Diversidade de microfungos**

De forma geral, existe uma maior diversidade de microfungos nas zonas urbanas relativamente às zonas periurbanas na região amostrada. A maior diversidade presente nas zonas urbanas está possivelmente relacionada com a maior movimentação de pessoas e veículos bem como com a maior interação humana, por exemplo, no caso de serem realizadas podas em espécimes urbanos. Este e outros fatores afetam plantas em ambientes urbanos e colocam as plantas sob stress, o que facilita a contaminação por diferentes espécies de patógenos. Por exemplo, o stress hídrico pode alterar a diversidade e a estrutura de comunidade de fungos endofíticos presentes (Linaldeddu *et al.* 2011). As pessoas bem como os seus veículos podem funcionar também como vectores de dispersão dos microfungos. A zona com maior diversidade foi a zona periurbana Torres do Mondego. Nesta zona, foram identificados 25 espécies de microfungos. Por sua vez, a zona com menor diversidade foi a zona periurbana Santo António dos Olivais onde foram identificados 16 espécies. Apesar de se localizar na zona periurbana da cidade de Coimbra, os indivíduos amostrados na zona Torres do Mondego estão localizados perto de uma via rodoviária, o que pode explicar a maior diversidade, uma vez que existe uma maior movimentação de possíveis vectores de dispersão. O teste de correlação de Pearson efetuado para as variáveis LA, SLA, LDMC e número de espécies, mostrou que existem correlações negativas elevadas  $r$  ou  $r^2 (> -0,70)$  entre as variáveis LA e número de espécies, e entre as variáveis SLA e LDMC nas zonas urbanas, ou seja, com o aumento de uma das variáveis a outra diminui. Estes resultados mostram que, não só alguns dos atributos funcionais das plantas estão relacionados, como alguns desses atributos influenciam a variabilidade de microfungos presentes nas folhas. Da mesma forma, para as zonas periurbanas, o teste de correlação de Pearson mostrou que existe uma correlação negativa elevada entre as variáveis SLA e LDMC, ou seja, com o aumento de uma destas variáveis, ocorre uma diminuição da outra. O estudo dos atributos funcionais de espécies de plantas é importante, uma vez que permite perceber a forma como esses atributos se relacionam com a susceptibilidade das plantas a contaminações e como influenciam os diferentes patógenos.

No que diz respeito às espécies de microfungos, a maioria das identificadas neste estudo são fungos endofíticos. Muitas das espécies e gêneros são semelhantes aos identificados no estudo realizado nas espécies mediterrâneas *Quercus cerris* e *Quercus pubescens* (Moricca *et al.* 2012), *Quercus ilex* em Espanha (Collado *et al.* 1996) e *Quercus robur* (Unterseher *et al.* 2007). Estes microfungos vivem no interior de tecidos vegetais assintomáticos até que algum tipo de stress afete o hospedeiro. Estes fungos são considerados endofíticos, pois, mesmo após a esterilização superficial realizada, ocorreu desenvolvimento de colónias quando a amostras vegetais foram inoculadas em meio agarizado. Das espécies identificadas, o género mais representado foi o género *Alternaria*, nomeadamente com a espécie *Alternaria alternata*. Esta espécie é um patógeno oportunista muito comum em mais de 380 espécies de plantas. Muitas das espécies fúngicas encontradas foram também identificadas em estudos realizados em espécies de plantas diferentes.

Os três patógenos mais importantes para o género *Quercus* encontrados neste estudo foram encontrados quase na sua totalidade em sobreiros. Apenas o patógeno *Tubakia dryina* foi encontrado num espécime de carvalho-alvarinho. Apesar de surgirem tanto nas zonas urbanas como nas zonas periurbanas, o maior número de ocorrências foi registado nas zonas periurbanas. O caso da ocorrência do microfungo *Tubakia dryina*, em particular, é importante sendo esta a primeira vez que é encontrado no território Português. O microfungo *Biscogniauxia mediterranea* existe normalmente como organismo endofítico nas várias espécies de *Quercus*. No entanto quando os seus hospedeiros se encontram em situações de stress, nomeadamente stress hídrico, essa condição influencia o desenvolvimento do microfungo que se transforma num patógeno responsável pela doença conhecido como carvão do entrecasco (Vannini *et al.* 2009), não se sabe até que ponto as alterações climáticas atuais vão afetar este microfungo. Por estas razões, é importante existir uma monitorização de todos estes patógenos e evitar a sua dispersão.

A região de Coimbra, nomeadamente a cidade de Coimbra, é uma zona onde existem muitas áreas verdes e a sua manutenção em condições fitossanitárias boas é muito importante. Apesar da maioria das espécies serem organismos endofíticos comuns que não representam ameaça numa situação normal para as plantas, algumas são importantes patógenos de plantas. Espécies como o patógeno *Gibberella avenacea* têm o potencial de provocar danos consideráveis em muitas espécies economicamente importantes, tais como

o trigo, a aveia, as macieiras e a planta do tabaco. Apesar de ter sido identificado apenas em duas zonas periurbanas, é importante prevenir que este patógeno se disperse. Convém realizar que, apesar de terem sido encontrados patógenos do género *Quercus*, não foram encontrados espécimes com sintomas de nenhuma das doenças provocadas por esses microfungos, ou seja, a existência de plantas assintomáticas é mais uma razão para preocupação quando não existem programas de prospeção. Estes estudos são assim cruciais para antecipar problemas fitossanitários futuros, uma vez que permitem identificar patógenos em espécimes sem sintomatologia.

## **Capítulo V – Conclusões**

## 5 – Conclusões e perspectivas

Este estudo permitiu fazer um levantamento da diversidade de microfungos presente nas várias espécies do género *Quercus* nas zonas urbanas e periurbanas da cidade de Coimbra, identificando espécies patogénicas presentes.

As três espécies de patógenos encontradas, nomeadamente os microfungos *Amphiportha leiphaemia*, *Biscogniauxia mediterranea* e *Tubakia dryina*, têm o potencial de causar danos nas populações do género *Quercus*, principalmente no caso do sobreiro onde foram maioritariamente encontrados. É importante notar que no caso do sobreiro, estes três fungos foram encontrados tanto na zona urbana como periurbana de Coimbra em vários indivíduos. O microfungo *Tubakia dryina*, ainda não tinha sido encontrado no território de Portugal Continental sendo esta a primeira evidência do mesmo. Uma continuação do estudo destes patógenos em Portugal, incluindo a sua dispersão, possíveis vectores e possíveis métodos de controlo são deveras importantes para evitar problemas no futuro. Por outro lado, o estudo da sua possível relação com outras pragas do género já conhecidas, principalmente insetos que podem atuar eles próprios como vetores de dispersão, é também crucial.

Não só é importante conhecer o estado fitossanitário das espécies de carvalho devido à sua importância ecológica e económica, mas também perceber o seu papel enquanto espécies hospedeiras de patógenos de outras espécies vegetais importantes uma vez que, neste caso, os carvalhos podem representar uma possível fonte de inóculo. Estudos como o realizado nesta dissertação devem fazer parte de uma estratégia de monitorização de zonas verdes e de avaliação da sua fitossanidade.

Estudos de diversidade e fitossanidade representam um importante passo no conhecimento da nossa floresta e biodiversidade vegetal, numa altura em que cada vez mais existem problemas relacionados com o surgimento de patógenos associados a espécies importantes, que causam grandes prejuízos económicos e ecológicos. Da mesma forma, a manutenção de zonas verdes saudáveis nas zonas urbanas e periurbanas é muito importante, não só para a sustentabilidade das próprias cidades face a todos os problemas relacionados com alterações climáticas e crescimento urbano, mas também para melhorar a qualidade de vida dos habitantes e preservar toda a biodiversidade que depende e nelas existe.

A base de dados criada no decurso deste estudo serve duas funções principais. Por um lado permitir acesso aos dados obtidos bem como à georeferenciação dos mesmos, e por outro permitir que sejam adicionados novos dados relevantes relativos a outras espécies ou características, criando assim um sistema de gestão de informação para a região de Coimbra.

## **Capítulo VI – Referências bibliográficas**

## 6 – Referências Bibliográficas

### 6.1 – Livros e Artigos

Ambourn, A.K., Juzwik, J., Moon, R.D. (2005). Seasonal dispersal of the oak wilt fungus by *Colopterus truncatus* and *Carpophilus sayi* in Minnesota. *Plant Disease* 89:1067-1076.

Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I. (2003a). Diversity of fungi in organic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology*, 5:1121–1132.

Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I. (2003b). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 5:36–47.

Azevedo, N.F.S. (1958). O carvão do entrecasco do sobreiro. *Publicações dos Serviços Florestais e Aquícolas, Portugal*, 25:159-179.

Azevedo, N.F.S., Macara, A.M. (1963). Quelques observations sur la pathogenicité du «charbon du liège». *FAO/SCM/LG/63. Annexe IV*.

Barbosa, M.A. (1958). O carvão do entrecasco *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.). Contribuição para o seu estudo. *Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*, XXV:93-132.

Butin, H. (1992). Effect of endophytic fungi from oak (*Quercus robur* L.) on mortality of leaf inhabiting gall insects. *European Journal Forest Pathology*. 22:237-246.

Câmara, M.S. (1930). Contributions ad Mycoflorum Lusitaniae Centuriae VIII. IX Anais do Instituto Superior de Agronomia, Portugal, 3:84.



- Collado J., Platas G., Pelaez F. (1996). Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from central Spain. *Nova Hedwigia*, 63:347–360.
- Collins, J. (1996). European Gypsy Moth, ENTFACT-425, University of Kentucky, College of Agriculture, USA.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S. et al (2003). A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51:335-380.
- De Bello, F., Lavergne, S., Meynard, C.N., Leps, J., Thuiller, W. (2010). The partitioning of diversity: showing Theseusa a way out of the labyrinth. *Journal of Vegetable Sciences*, 21:992-1000.
- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T. (2002). Vertical distribution of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol*, 156:527–535.
- Dominguez, M., Aponte, C., Pérez-Ramos, I., Garcia, L., Villar, R., Marañón, T. (2012). Relationships between leaf morphological traits, nutrient concentrations and isotopic signatures for Mediterranean woody plants species and communities. *Plant Soil*, 357:407-424.
- Ganho, N. (2009). Precipitação em Coimbra (Portugal): regimes médios e prováveis como instrumento fundamental de análise de riscos hidrogeomorfológicos e aplicação ao ordenamento urbano. *Cadernos de Geografia* nº28/29:21-32. FLUC, Coimbra.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2:113–118.
- Gomes, M.J., Amaro, P.T. (2008). Ocorrência de *Phytophthora ramorum* em Portugal sobre *Viburnum spp.* *Revista de Ciências Agrárias*, 31:105-111.

- Gómez, F., Tamarit, N., Jabaloyes, J. (2001). Green zones, bioclimatics studies and human comfort in the future development of urban planning. *Landscape and Urban Planning*, 55;151-161.
- Hajek, A.E. (2000). Larval behavior in *Lymantria dispar* increases risk of fungal infection. *Oecologia*, 126:285-291.
- Izzo, A., Agbowo, J., Bruns, T.D. (2005). Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol*, 166:619–630.
- Jiang, B. (2012). Ecological strategy of green urban design in urban renewal, the specific ecological measures for the existing urban ecological problems in China. 48<sup>th</sup> ISOCARP Congress.
- Johnson, O., More, D. (2006). *Collin Tree Guide – The Most Complete Field Guide to the Trees of Britain and Europe*, Collins Press, Ireland. 978-0007207718
- Klamer, M., Roberts, M.S., Levine, L.H., Drake, B.G., Garland, J.L. (2002). Influence of elevated CO<sub>2</sub> on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 68:4370–4376.
- Kowalski, T. (2006). *Tubakia dryina*, symptoms and pathogenicity to *Quercus robur*. *ACTA MYCOLOGICA*, 41:299-304.
- Linaldeddu, B.T., Sirca, C., Spano, D., Franceshini, A. (2011). Variation of endophytic cork oak associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathology*, 41:193—201.

- Luchi, N., Capretti, P., Pinzani, P., Orlando, C., Pazzagli, M. (2005). Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. *Letters in Applied Microbiology*, 41:61-68.
- Mabberley, D. J. (1987). *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants*, Cambridge University Press, UK. 978-0521340601
- Magurran, A.E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 256 pp.
- Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal Microbiol Methods* 71:7-14.
- Molles, M.C.Jr. (2004). *Ecology: Concepts and Applications – Third Edition*. McGraw-Hill, NY, USA. 978-0072439694
- Moricca, S., Ragazzi, A. (2008). Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina*. *Journal of Phytopathology*, 98:380-386.
- Moricca, S., Ginetti, B., Ragazzi, A. (2012). Species and Organ specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopatologia Mediterranea*, 51:587-598.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring harb Quant Biol*, 51:263-273.
- Niinemets, U., Kull, K. (2003). Leaf structure vs. nutrient relationships vary with soil conditions in temperate shrubs and trees. *Acta Oecologica*, 24:209-219.

- Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Larsson, K.H., Koljalg, U. (2011). Molecular Identification of Fungi: Rationale, Philosophical Concerns, and the UNITE Database. *The Open Applied Informatics Journal*, 5(Suppl 1-M9):81-86.
- Ogawa, Y., Tokumaso, S., Tubaki, K. (1996). Factors affecting microfungal diversity. *Mycoscience*, 37:377-380.
- Oldfield, S., Eastwood, A. (2007). *The Red List of Oaks*. Fauna & Flora International, Cambridge, UK. 9781-903703250
- Paiva, J. (2012). *Evolução e relevância da floresta portuguesa*. Material de apoio de Recursos Florestais 2013.
- Parfitt, D., Hunt, J., Dockrell, D., Rogers, H.J., Brody, L. (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. *Fungal Ecology*, 3:338-346.
- Peay K.G., Kennedy P.G., Bruns T.D. (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience*, 58:799–810.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11:1633-1644.
- Pereira, J.S., Bugalho, N.M., Caldeira, M.C. (2008). *From the Cork Oak to Cork, a sustainable system*, Litografia Coimbra, SA. Coimbra, Portugal. 978-9729517174
- Pinon, J., Irwin, H., MacDonald, W., Tainter, H. (1997). The susceptibility of European oaks to oak wilt. *Phytopathology*, 87:S114.
- Proffer, T. J. (1990). *Tubakia leaf spot*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, USA. Plant Pathology Circular No. 337.

- Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I. (1999). Endophytic presence of *Discula quercina* on Declining *Quercus cerris*. *Journal of Phytopathology*, 147:437-440.
- Rizzo, D.M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. & Koike, S. T. (2002). *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus spp.* and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*, 86:205–214.
- Santos, M.N.S. (2003). Contribuição para o conhecimento das relações *Quercus suber* – *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hypoxilon mediterraneum*). *Silva Lusitanica*, Lisboa, Portugal, 11:21-29.
- Silva, J.S. 2007. Árvores e Florestas de Portugal. Os Montados. Muito para além de árvores. Público, Lisboa, Vol.3, 247 pp.
- Stone, J.K., Sherwood, M.A., Carroll, G.C. (1996). Canopy microfungi: Function and Diversity. *Northwest Science*, Vol.70, Special Issue, 37-45.
- Unterseher M., Reiher A., Finstermeier K. (2007). Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycology Progress*, 6:201–212.
- Vannini, A., Lucero, G., Anselmi, N., Vettraino, A.M. (2009). Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. *Forest Pathology*, 39:8-14.
- Wellstein, C., Schroder, B., Reineking, B., Zimmermann, N. (2011). Understanding species and community response to environmental change – A functional trait perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 145:1-4.

Werner, P., Sukopp, H. (1982). Nature in cities: a report and review of studies and experiments concerning ecology, wildlife, and nature conservation in urban and suburban areas. Council of Europe, Strasbourg and Croton, New York, Vol.28, 94 pp.

Werres, S., Marwitz, R., Man in't Veld, W. A., de Cock A. W. A. M., Bonants, P. J. M., de Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E. & Baayen, R. P. (2001a). *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*, 105:1166–1175.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and amplifications*. Academic Press, London, UK, 315-322.

## 6.2 – Referências *Online*

[1] <http://jb.utad.pt/pesquisa> (Acedido em 3 de Abril de 2014)

[2] <http://www.flora-on.pt/#/1quercus> (Acedido em 7 de Abril de 2014)

[3] Diário da República, 1ª série – Nº19 – 28 de Janeiro de 2013, disponível em: <http://dre.pt/pdf1sdip/2013/01/01901/0000200147.pdf> (Acedido em 6 de Abril de 2014)

[4] <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1971-2000/006/> (Acedido em 6 de Abril de 2014)

[5] <http://www.flora-on.pt/#/1quercus+suber> (Acedido em 9 de Abril de 2014)

[6] Nota informativa ICNF – Julho de 2013, disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/prag-doe/resource/ficheiros/pulg-ni-jul> (Acedido em 11 de Abril de 2014)

[7] <http://naturdata.com/Lymantria-dispar-7999.htm> (Acedido em 9 de Abril de 2014)

[8] <http://www.spbotanica.pt/pmes/pmes25.html> (Acedido em 9 de Abril de 2014)

[9] <http://www.florestar.net/sobreiro/sobreiro.html> (Acedido em 9 de Abril de 2014)

[10] <http://www.florestar.net/azinheira/azinheira.html> (Acedido em 10 de Abril de 2014)

[11] <http://www.flora-on.pt/#/1quercus+rotundifolia> (Acedido em 10 de Abril de 2014)

- [12] <http://www.flora-on.pt/#/1quercus+robur> (Acedido em 10 de Abri de 2014)
- [13] <http://www.florestar.net/carvalho-roble/carvalho-roble.html> (Acedido em 10 de Abril de 2014)
- [14] <http://www.biorede.pt/page.asp?id=1775> (Acedido em 10 de Abril de 2014)
- [15] <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=51454&Fields=All> (Acedido em 11 de Abril de 2014)
- [16] <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=1229&Fields=All> (Acedido em 13 de Abril de 2014)
- [17] <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=3865&Fields=All> (Acedido em 13 de Abril de 2014)
- [18] <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=46240&Fields=All> (Acedido em 13 de Abril de 2014)
- [19] EPPO Data Sheets on Quarantine Pests – *Ceratocystis fagacearum* and its vectors, disponível em:  
[http://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Ceratocystis\\_fagacearum/CERAFA\\_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Ceratocystis_fagacearum/CERAFA_ds.pdf)  
 (Acedido em 16 de Abril de 2014)

### 6.3 – Referências *Online* de imagens

- [20] <http://www.flora-on.pt/index.php?q=Quercus+suber> (Acedido em 11 de Abril de 2014)
- [21] <http://www.flora-on.pt/#/1Quercus+rotundifolia> (Acedido em 11 de Abril de 2014)
- [22] <http://www.flora-on.pt/#/1querucs+robur> (Acedido em 11 de Abril de 2014)
- [23] <http://www.plantwise.org/default.aspx?site=234&page=4279&dsID=25541>;  
<http://www.forst.tumuenchen.de/EXT/LST/BOTAN/LEHRE/PATHO/QUERCUS/discula.html> (Acedido em 17 de Abril de 2014)
- [24] <http://www.biodiversidadvirtual.org/hongos/Biscogniauxia-mediterranea-var.-mediterranea-%28De-Not.%29-Kuntze-1891.-img51524.html>;  
<http://www.biodiversidadvirtual.org/hongos/Biscogniauxia-mediterranea-var.-mediterranea-%28De-Not.%29-Kuntze-1891.-img26304.html> (Acedido em 17 de Abril de 2014)

[25]<http://texasforests-service.tamu.edu/uploadedImages/FRD/PestManagement/Diseases/Oak%20Wilt%20Red%20Oak.jpg>;

<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5038013> (Acedido em 17 de Abril de 2014)

[26] <http://www.forestryimages.org/series/viewseries.cfm?ser=195> (Acedido em 17 de Abril de 2014)

[27]<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/97/LocalCoimbra.svg/280px-LocalCoimbra.svg.png> (Acedido em 11 de Abril de 2014)

[28]<http://hermes.bionet.nsc.ru/pg/34/9.htm4.gif> (Acedido em 02 de Abril de 2014)



## **Anexos**

## Anexo A – Zonas amostradas e indivíduos

### Zonas urbanas amostradas



Bairro Norton de Matos (BNM)



Instituto Pedro Nunes (IPN)



Parque Verde do Mondego (PV)



Quinta de São Jerónimo (QSJ)

### Zonas periurbanas amostradas



Planalto de Santa Clara (PSC)



Pólo II da Universidade de Coimbra (PoloII)



Santo António dos Olivais (SAO)



Torres do Mondego (TM)

## Anexo B – Chave dicotómica dos carvalhos de Portugal (Rui Pedro Lérias)

### Pedro Lérias - Chave dicotómica dos carvalhos de Portugal

|   |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| 1 | Folhas persistentes, coriáceas, espinhosas ou não  | 2                     |
|   | Folhas caducas ou marcescentes, coriáceas ou membranáceas mas nunca espinhosas, mesmo se dentadas  | 4                     |
| 2 | Folhas adultas em geral glabras, com a cor dos dois lados da folha muito semelhante; casca cinzenta, lisa; escamas da cúpula das bolotas com pontas livres, visivelmente encurvadas para fora e rígidas                  | Carrasco              |
|   | Folhas adultas em geral pubescentes no verso, com as cores dos dois lados da folha contrastantes; casca não lisa; ponta das escamas da cúpula das bolotas aplicadas ou livres, mas não encurvadas para fora              | 3                     |
| 3 | Casca é cortiça (grossa, enrugada, com fissuras marcadas) ou quando esta foi retirada avermelhada e lisa; folhas remotamente denticuladas, nervuras bem marcadas; escamas da cúpula da bolota alongadas e de ponta livre | Sobreiro              |
|   | Casca gretada, sem cortiça; folhas baixas e em árvores jovens serradas e espinhosas, tornando-se inteiras na parte superior da árvore, nervuras pouco marcadas; escamas da cúpula sem pontas alongadas                   | Azinheira             |
| 4 | Folhas de inteiras a lobadas mas nunca com dentes aristados nos extremos dos lóbulos; bolotas de maturação anual, presentes apenas nos novos ramos do ano, cúpula da bolota em forma de tigela (meia-esfera)             | 5                     |
|   | Folhas fortemente lobadas, lóbulos angulosos triangulares, com 1 a 3 dentes aristados (filamentosos); bolotas de maturação bienal, presentes no inverno, cúpula achatada, discoide                                       | Carvalho-americano    |
| 5 | Folhas marcescentes, sub-coriáceas, raramente lobadas; pedúnculo das bolotas até 25 mm   | 6                     |
|   | Folhas caducas, raramente marcescentes, membranáceas ou sub-membranáceas, lobadas; pedúnculo das bolotas frequentemente acima dos 30 mm  | 8                     |
| 6 | Folhas marcescentes, em geral com 12-15 pares de nervuras; folhas glabras ou com indumento caduco; em Portugal, apenas presente na Serra de Monchique (Algarve)  | Carvalho-de-Monchique |
|   | Folhas marcescentes, em geral com menos de 12 pares de nervuras; verso das folhas tomentoso, pelo menos nas nervuras   | 7                     |
| 7 | Árvore, raramente arbusto erecto; folhas em geral denteadas, por vezes lobuladas, quase até à base; peciolo 5-20 mm; bolota em geral de 15-35 mm comprimento   | Carvalho-cerquinho    |
|   | Arbusto, geralmente prostrado, raramente superando os 3 m; folhas inteiras no primeiro 1/3 inferior; peciolo menor que 5 mm; bolota 10-16 mm   | Carvalhiça            |
| 8 | Folhas glabras; pedúnculo da bolota pendente, comprido, com 25-120 mm, glabro  | Carvalho-alvarinho    |
|   | Folhas fortemente tomentosas, aveludadas no verso; pedúnculo rígido, até 40 mm, tomentoso  | Carvalho-negral       |

# Anexo C – Protocolo de extração de DNA

## NucPrep™ Chemistry Isolation of gDNA Quick Reference Card

Chemistry on the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation *(continued)*

**⚠ WARNING** Biological samples have the potential to transmit infectious disease. For safety and biohazard guidelines, refer to the "Safety" section in the NucPrep™ Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue Protocol, P/N 4333959. Follow specific safety practices when using this instrument. For each chemical in **bold** type below, read the MSDS and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

| STEP     | ACTION  |   |            |                  |                         |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
|----------|---|---|------------|------------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|------------|---------------------|---|---|----|-------------------------|---|---------------|------------|-----|----|-------------------------|-----|---|---|-----|-----|-------------------------|---|---|-----|-------|---|-----|----|---|---|--|-----|-------|---|--------------------------|-----------|-------------------------|---|--|-----|-------|---|-----|----|-------------------------|---|-----------------------------|---|-------|---|-----|-----|-------------------------|---|---------------------|---|-------|---|---|---|-------------------------|---|--------------------------------------|-----|------------|-----|----|-----|-------------------------|---|--------------------------------------|-----|------------|---|----|-----|-------------------------|---|--------------------------|---|------------|---|---|---|-------------------|
| <b>1</b> | Prepare sample  | <p>a. Digest animal tissue.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Add 5 to 50 mg of tissue to a microcentrifuge tube or deep-well plate.</li> <li>2. Add 150 µL <b>NucPrep Digestion Buffer</b> and 50 µL <b>NucPrep Proteinase K Solution</b>.</li> <li>3. Incubate the tissue in a heater/shaker device at ~500 rpm, at 65 °C, for 30 to 60 min.</li> <li>4. Add 600 µL <b>NucPrep DNA Purification Solution</b> to the dissolved tissue.</li> <li>5. Vortex 30 sec to 1 min or use a wide-bore pipette and pump-mix at least three times.</li> </ol> <p>b. Homogenize plant tissue using either a rotor/stator or bead beater type homogenizer.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Add 5 to 50 mg of plant tissue and 800 µL of <b>NucPrep DNA Purification Solution</b> to the homogenizer.</li> <li>2. Homogenize for 30 sec and repeat for an additional 30 sec or until material is well homogenized.</li> </ol>  |            |                  |                         |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| <b>2</b> | Perform pre-filtration with Quick Run or use the Pre-filter preconfigured method            | <p>a. Load disposables and tape over any unused wells.</p> <p>b. Add 750 µL digested tissue lysate/<b>NucPrep DNA Purification Solution</b> into each well of the Tissue Pre-Filter Tray II and perform pre-filtration.</p> <p>c. Pre-filtration using Quick Run is presented in the following table. See the NucPrep Chemistry protocol (P/N 4333959) for the Pre-filter preconfigured method.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Description</th> <th>Position</th> <th>Time (sec)</th> <th>Vacuum (%)</th> <th>Action</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>From the main menu.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Press <b>F1</b> (Quick)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Enter values.</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">500</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>    a. Repeat step 2 until all material has passed through.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>    b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Touch Off at Collection.</td> <td style="text-align: center;">Touch Off</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Perform Touch Off</td> </tr> </tbody> </table> <p>c. Clear the instrument by removing the Tissue Pre-Filter Tray II and the deep-well plate from the instrument.</p> <p>d. Save the deep-well plate for purification. If necessary, store it at 4 °C for up to 12 h or at -20 to -80 °C until needed.</p>   | Step       | Description      | Position                | Time (sec) | Vacuum (%)              | Action     | 1          | From the main menu. | — | —   | —  | Press <b>F1</b> (Quick) | 2 | Enter values. | Collection | 500 | 60 | Press <b>F1</b> (Start) | 3   | Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter. |   |     |     |                         |   | a. Repeat step 2 until all material has passed through. |     |       |   |     |    | b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells. |   |  |     |       | 4 | Touch Off at Collection. | Touch Off | —                       | — | Perform Touch Off                      |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| Step     | Description   | Position  | Time (sec) | Vacuum (%)       | Action                  |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 1        | From the main menu.   | —   | —          | —                | Press <b>F1</b> (Quick) |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 2        | Enter values.   | Collection  | 500        | 60               | Press <b>F1</b> (Start) |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 3        | Observe the Tissue Pre-Filter Tray II to see if all material has passed through the filter. |   |            |                  |                         |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
|          | a. Repeat step 2 until all material has passed through.                                     |   |            |                  |                         |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
|          | b. Stop the vacuum after all liquid has passed through all the wells.                       |   |            |                  |                         |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 4        | Touch Off at Collection.  | Touch Off   | —          | —                | Perform Touch Off       |            |                         |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| <b>3</b> | Run the NucPrep chemistry method to purify the pre-filtered, digested, tissue lysate        | <p>a. Create a new method for the NucPrep chemistry method. Enter the parameter values provided in the table below.</p> <p>b. Save the method as <b>NucPrep</b>.</p> <p>c. Load the disposables, placing a 96-well Optical Reaction Plate with Barcode in the collection compartment, a splash guard in the waste compartment, and the DNA Purification Tray II in the purification tray carriage, then secure the tray.</p> <p>d. Move the carriage to the waste position and lock it.</p> <p>e. Ensure that the highlighter is at step 1 of the NucPrep method.</p> <p>f. Pre-wet the wells of the DNA Purification Tray II, add the pre-filtered tissue lysate, then perform the washes and the elution as indicated below.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Description</th> <th>Vol (µL)</th> <th>Position</th> <th>Incubation (sec)</th> <th>Vacuum (%)</th> <th>Time (Sec)</th> <th>Action</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Pre-wet the wells with <b>NucPrep DNA Purification Solution</b>.</td> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Add sample lysates.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b>.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td>Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b>.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td>Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b>.</td> <td style="text-align: center;">650</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5</td> <td>Perform pre-elution vacuum.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td>Touch Off at Waste.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Waste</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">7</td> <td>Add NucPrep DNA Elution Solution 1.*</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">8</td> <td>Add NucPrep DNA Elution Solution 2.†</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td style="text-align: center;">180</td> <td>Press <b>F1</b> (Start)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td>Touch Off at Collection.</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">Collection</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td style="text-align: center;">—</td> <td>Perform Touch Off</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Failure to perform the 180-second incubation step at this point results in low yields of gDNA.<br/>         †To obtain the correct pH for the final sample, equal volumes of NucPrep DNA Elution Solution 1 and NucPrep DNA Elution Solution 2 MUST be used.</p> <p>g. Clear the instrument.</p> <p>h. Save the 96-well Optical Reaction Plate (archive plate containing gDNA). Store it at -15 to -25 °C until needed.</p> | Step       | Description      | Vol (µL)                | Position   | Incubation (sec)        | Vacuum (%) | Time (Sec) | Action              | — | Pre-wet the wells with <b>NucPrep DNA Purification Solution</b> . | 40 | Waste                   | — | —             | —          | —   | 1  | Add sample lysates.     | 650 | Waste   | 0 | 100 | 180 | Press <b>F1</b> (Start) | 2 | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> .                  | 650 | Waste | 0 | 100 | 90 | Press <b>F1</b> (Start)   | 3 | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> . | 650 | Waste | 0 | 100                      | 90        | Press <b>F1</b> (Start) | 4 | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> . | 650 | Waste | 0 | 100 | 90 | Press <b>F1</b> (Start) | 5 | Perform pre-elution vacuum. | — | Waste | — | 100 | 180 | Press <b>F1</b> (Start) | 6 | Touch Off at Waste. | — | Waste | — | — | — | Press <b>F1</b> (Start) | 7 | Add NucPrep DNA Elution Solution 1.* | 100 | Collection | 180 | 60 | 180 | Press <b>F1</b> (Start) | 8 | Add NucPrep DNA Elution Solution 2.† | 100 | Collection | 0 | 60 | 180 | Press <b>F1</b> (Start) | 9 | Touch Off at Collection. | — | Collection | — | — | — | Perform Touch Off |
| Step     | Description   | Vol (µL)  | Position   | Incubation (sec) | Vacuum (%)              | Time (Sec) | Action                  |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| —        | Pre-wet the wells with <b>NucPrep DNA Purification Solution</b> .                           | 40  | Waste      | —                | —                       | —          | —                       |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 1        | Add sample lysates.   | 650   | Waste      | 0                | 100                     | 180        | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 2        | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> .  | 650   | Waste      | 0                | 100                     | 90         | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 3        | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> .  | 650   | Waste      | 0                | 100                     | 90         | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 4        | Add <b>NucPrep DNA Wash Solution</b> .  | 650   | Waste      | 0                | 100                     | 90         | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 5        | Perform pre-elution vacuum.   | —   | Waste      | —                | 100                     | 180        | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 6        | Touch Off at Waste.   | —   | Waste      | —                | —                       | —          | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 7        | Add NucPrep DNA Elution Solution 1.*  | 100   | Collection | 180              | 60                      | 180        | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 8        | Add NucPrep DNA Elution Solution 2.†  | 100   | Collection | 0                | 60                      | 180        | Press <b>F1</b> (Start) |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |
| 9        | Touch Off at Collection.  | —   | Collection | —                | —                       | —          | Perform Touch Off       |            |            |                     |   |   |    |                         |   |               |            |     |    |                         |     |   |   |     |     |                         |   |   |     |       |   |     |    |   |   |  |     |       |   |                          |           |                         |   |  |     |       |   |     |    |                         |   |                             |   |       |   |     |     |                         |   |                     |   |       |   |   |   |                         |   |                                      |     |            |     |    |     |                         |   |                                      |     |            |   |    |     |                         |   |                          |   |            |   |   |   |                   |

© Copyright 2002, Applied Biosystems. All rights reserved. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Applied Biosystems is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the U.S. and certain other countries. AB (design), Applied and NucPrep are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the U.S. and certain other countries.