



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Luís Daniel da Silva Fernandes

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS
INTEGRADAS PARA A PREVENÇÃO DO
CANCRO-RESINOSO-DO-PINHEIRO
RELEVÂNCIA DO TRATAMENTO DE ÁGUA DE
REGA E DA DESINFEÇÃO DE SEMENTES**

VOLUME 1

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica orientada pelo Professor
Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal e apresentada ao
Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra**

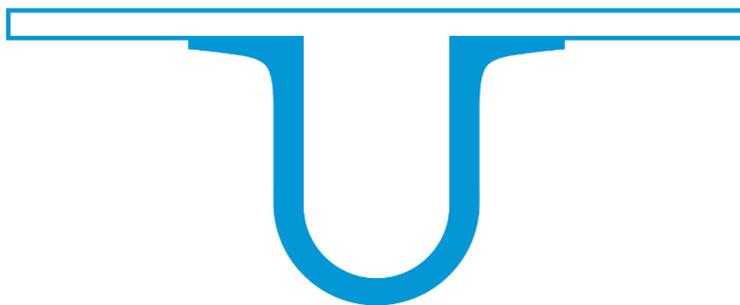
Junho de 2019

DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS INTEGRADAS PARA A PREVENÇÃO
DO CANCRO-RESINOSO-DO-PINHEIRO: RELEVÂNCIA DO TRATAMENTO DE
ÁGUA DE REGA E DESINFEÇÃO DE SEMENTES

Luís Daniel da Silva Fernandes

Junho de 2019

FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Esta dissertação insere-se no GO +PrevCRP (PDR2020-101-031058, parceria nº112, iniciativa nº237), Ação 1.1 Grupos Operacionais, sendo este GO co-financiado pelo Programa PDR2020, Portugal2020 e FEDER.



This thesis is a part of the GO+PrevCRP (PDR2020-101-031058, parceria nº112, iniciativa nº237), Ação 1.1 Grupos Operacionais, with this GO being co-funded by the PDR2020, Portugal2020 and FEDER.



“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don’t just give up.”

Professor Stephen Hawking



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que contribuíram para que esta dissertação se realizasse, quer direta quer indiretamente.

Ao Professor Doutor António Portugal pela oportunidade e confiança que depositou em mim, pela orientação, empenho e disponibilidade que demonstrou durante este projeto desde o início.

À Diana Paiva, que tão bem me acolheu no laboratório, me mostrou os cantos à casa e com quem aprendi muito ao longo dos 3 anos em que trabalhei com ela. Sem o seu apoio, a sua dedicação e o seu trabalho, esta dissertação não seria realidade.

À Ana Faustino, pela ajuda que providenciou ao projeto durante a sua passagem pelo FITOLAB e acima de tudo pelo seu espírito crítico que tanto contribuiu para o funcionamento do projeto.

Ao FITOLAB por me ter acolhido e ao Grupo Operacional +PrevCRP por ter confiado em mim para levar a cabo uma parte tão importante deste projeto.

Ao programa PDR2020 pelo apoio financeiro ao GO+PrevCRP (PDR2020-101-031058, parceria n° 112, iniciativa n° 237).

À minha família, pelo carinho e suporte que sempre me deram. Aos meus pais, pelo esforço monumental que fizeram para que eu chegar aqui e por me ensinarem que só o esforço, dedicação e trabalho árduo nos levam aos nossos objetivos. À minha irmã, pelo apoio que sempre me deu ao longo de todo meu percurso académico e que mesmo longe não deixa de estar perto.

À Inês, minha namorada, por ser o meu pilar, a minha companheira e a minha inspiração. Por me ajudar a levantar sempre que estive em baixo e pela paciência, apoio e ajuda que me deu durante a redação desta dissertação.

Ao João Rocha, ao João Vieira e ao Mário Coutinho pela amizade, camaradagem e companhia nas horas de almoço.

Por último, a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que, de uma ou outra forma, me moldaram naquilo que sou.

*A todos,
O meu sincero muito obrigado*

SUMÁRIO

Numa tentativa de combater a disseminação do agente causador do cancro resinoso do pinheiro (*Fusarium circinatum*) ao nível de viveiros, isto é, disseminação dentro do viveiro e do viveiro para populações florestais, foram conduzidos ensaios de modo a desenvolver estratégias capazes de atuar ao nível de duas grandes fontes de contaminação: a água utilizada na rega de plantas hospedeiras e as sementes infetadas das mesmas.

No que respeita ao tratamento da água de rega, produziu-se uma suspensão de esporos de *Fusarium circinatum* com uma concentração de $1,5 \times 10^6$ esporos/mL, tendo esta sido sujeita a diversos tratamentos, dos quais são de destacar NaClO a concentrações iguais ou superiores a 1%, Desogerme 1% e Hydrocare 4%, todos capazes de eliminar a 100% os esporos do patógeno, mesmo a concentrações elevadas como a utilizada neste ensaio. Os tratamentos que se mostraram eficazes na eliminação de *Fusarium circinatum* foram testados ao nível do impacto destes na germinação de sementes de plantas hospedeiras (*Pinus pinaster*, *Pinus radiata* e *Pinus pinea*), não se tendo verificado um impacto negativo para nenhum dos tratamentos avaliados.

Para os testes em sementes utilizadas pelos viveiristas, sementes de *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* e *Pinus pinea* inoculadas com *Fusarium circinatum* foram sujeitas a diversos tratamentos. Nenhum tratamento foi eficaz na totalidade das espécies testadas, sugerindo a necessidade de tratamentos adaptados a cada espécie, devido às diferenças de tamanho e morfologia das sementes. O composto que foi testado pela primeira vez em sementes neste ensaio, Menoflorades, mostrou bastante eficácia à concentração de 4%, mas aparentou ter um impacto negativo na germinação das sementes de *Pinus radiata* e necessitou de um maior tempo de atuação do tratamento para alcançar o mesmo nível de eficácia em *Pinus pinea*. De igual forma, o tratamento térmico húmido a 60°C e o tratamento com etanol a 60% foram capazes de eliminar totalmente o patógeno em duas das três espécies avaliadas (*Pinus pinaster* e *Pinus radiata*; e *Pinus radiata* e *Pinus pinea*, respetivamente).

Palavras-chave: cancro resinoso; *Pinus*; sementes; água de rega; *Fusarium circinatum*

ABSTRACT

In an attempt to fight the spread of *Fusarium circinatum*, the agent of the Pine pitch canker within nurseries and between nurseries and forest populations, the assays described in this thesis were carried out in order to develop new strategies capable of acting on two of the key sources of contamination: the water used for irrigation host plants and infected seeds of the aforementioned plant hosts.

In what concerns to irrigation water treatment, a suspension of *Fusarium circinatum* spores at a concentration of $1,5 \times 10^6$ spores/mL was produced and subsequently subjected to various treatments, where NaClO at concentrations equal or higher than 1%, Desogerme 1% and Hydrocare 4% showed to be of great relevance, with all of them being able to eliminate 100% of the spores in suspension, even at a concentration as high as the one used in this assay. The treatments that proved effective on *Fusarium circinatum* elimination were tested to see whether they affected seed germination of host plants, with results showing that neither of these treatments had a negative impact on it.

For the assays on seeds used by the nurseries, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* and *Pinus pinea* seeds inoculated with *Fusarium circinatum* were subjected to various treatments. None of these were shown to be efficient in across all three species tested, suggesting the need for individualized treatment for each species, possibly due to the differences in seed size and morphology. The compound that was tested in seeds for the first time on this project, Menoflorades, showed high efficiency at a concentration of 4%, but appeared to have an impact on *Pinus radiata* seed germination and a higher incubation time was needed to reach the same level of efficiency in *Pinus pinea*. In a similar fashion, hot water treatment at 60°C and treatment with ethanol at 60% concentration were able to totally eliminate the pathogen in two of the three species of *Pinus* assayed (*Pinus pinaster* and *Pinus radiata*; and *Pinus radiata* and *Pinus pinea*, respectively).

Keywords: pitch canker disease; *Pinus*; seeds; irrigation water; *Fusarium circinatum*

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	<i>Fusarium circinatum</i>	13
1.1.1.	Taxonomia.....	13
1.1.2.	Morfologia.....	13
1.1.3.	Identificação molecular	14
1.2.	O cancro resinoso do pinheiro.....	14
1.2.1.	Mecanismos de dispersão e infeção	14
1.2.2.	Sintomas.....	15
1.3.	O panorama nacional: impacto económico e ecológico	16
1.4.	Distribuição	16
1.4.1.	Primeira deteção e evolução	16
1.4.2.	Atualidade	17
1.5.	Organismo de quarentena	17
1.5.1.	Medidas fitossanitárias em prática	17
1.5.2.	Consequências económicas/ecológicas	18
1.6.	Estratégias atuais de prevenção.....	18
1.7.	Princípios ativos e suas formas de ação	18
1.7.1.	Água de rega	19
1.7.1.1.	Desogerme	19
1.7.1.2.	Hipoclorito de Sódio.....	19
1.7.1.3.	Hydrocare	20
1.7.2.	Sementes de <i>Pinus</i>	20
1.7.2.1.	Menoflorades	21
1.7.2.2.	Captana	21
1.7.2.3.	Etanol	21
1.7.2.4.	Tratamento Térmico Húmido	21
1.8.	Objetivos.....	22

2.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1.	Meios de cultura	23
2.1.1.	PDA	23
2.1.2.	SNA	23
2.1.3.	DCPA	24
2.2.	Deteção de <i>Fusarium circinatum</i>	24
2.3.	Eliminação de propágulos de <i>Fusarium circinatum</i> de água de rega em viveiros	24
2.3.1.	Preparação da solução de esporos de <i>F. circinatum</i>	24
2.3.2.	Preparação das soluções para tratamento da água de rega	25
2.3.3.	Tratamento da solução de esporos	25
2.3.4.	Impacto dos tratamentos utilizados na germinação de espécies hospedeiras de <i>Fusarium circinatum</i>	25
2.4.	Tratamento de sementes de <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus pinaster</i> e <i>Pinus pinea</i> inoculadas com <i>F. circinatum</i>	26
2.4.1.	Preparação das soluções para tratamento das sementes.....	26
2.4.2.	Tratamento das sementes.....	26
2.4.3.	Incubação e acompanhamento do crescimento fúngico	26
2.4.4.	Análise e confirmação molecular de resultados	27
2.5.	Análise estatística	28
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1.	Água de rega	29
3.1.1.	Eficácia na eliminação dos esporos de <i>F. circinatum</i>	29
3.1.2.	Impacto na germinação.....	31
3.2.	Desinfecção de sementes de <i>Pinus</i>	33
3.2.1.	<i>Pinus pinaster</i>	35
3.2.2.	<i>Pinus radiata</i>	37
3.2.3.	<i>Pinus pinea</i>	39
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	42

5.	BIBLIOGRAFIA	44
5.1.	Referências bibliográficas	44
5.2.	Referências <i>online</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag - Prata

atm - atmosferas

ATP – Adenosina Trifosfato

C - Controlo Negativo

C⁺ - Controlo Negativo

CENASEF – Centro Nacional de Sementes Florestais

DCPA - Dichloran-Chloramphenicol Peptone Agar

dH₂O – Água destilada

DNA – Desoxiribonucleic Acid

EPPO – European Plant Protection Organization

Fig. – Figura

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

ha – hectare

HCIO – ácido hipocloroso

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

IGS – Intergenic Spacer

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ISA – Instituto Superior de Agronomia

ITS – Internal Transcribed Spacer

L - litro

M.O. – Microscópio Ótico

MFR – Materiais florestais de reprodução

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetros

NaClO – Hipoclorito de Sódio

OH[•] - Radical Hidroxilo

pb – pares de bases

PCR – Polimerase Chain Reaction

PCR-RFLP – Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism

PDA – Potato Dextrose Agar

SNA - Spezieller-Nährstoffarmer Agar

UFCs – Unidades Formadoras de Colónias

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Fusarium circinatum*

1.1.1. Taxonomia

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell é um fungo patogénico responsável pelo cancro-resinoso-do-pinheiro, tendo como hospedeiras inúmeras espécies do género *Pinus* e *Pseudotsuga menziesii*. Pertencente ao filo Ascomycota, onde se incluem diversos géneros de grande importância, esta é apenas uma das muitas espécies fitopatogénicas deste género, sendo que se estima que 80% das plantas cultivadas são suscetíveis a pelo menos uma doença causada por espécies de *Fusarium* (Leslie & Summerell, 2006).

A sua taxonomia e designação sofreram bastantes alterações desde a sua primeira descrição em 1946 (Hepting & Roth, 1946) até 1998, quando Nirenberg e O'Donnell o classificaram como uma espécie distinta com base na estrutura das suas polifíalides e na presença de hifas estéries circinadas, tendo-lhe sido atribuído o nome de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, sendo a sua forma teleomórfica designada *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell. Esta separação como um *taxon* distinto foi sustentada por linhagens filogenéticas resultantes da análise das sequências dos genes codificantes da β -tubulina e de factores de alongamento (O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2000).

1.1.2. Morfologia

Quando inoculado em meio PDA (Potato Dextrose Agar, um meio nutricionalmente rico que de uso generalista para fungos e leveduras que promove o crescimento viçoso destes), *Fusarium circinatum* cresce a uma taxa média de 4,7 mm/dia quando incubado a 25°C no escuro. Neste meio os caracteres macroscópicos de destaque são o micélio branco de aspeto felpudo com uma margem inteira e uma coloração violeta-acinzentada no centro, coloração esta que se verifica também no reverso do agar, embora aqui possa variar do acinzentado, violeta-acinzentado até um violeta escuro (O'Donnell *et al.*, 1998). Já em meio SNA (Spezieller-Nährstoffarmer Agar, um meio de cultura pobre em nutrientes que para além de limitar a degeneração da cultura, promove a esporulação uniforme e um bom desenvolvimento das células conidiogénicas) o micélio do fungo é praticamente invisível a olho nu, apresentando um aspeto ralo (Paiva, 2011). No entanto, este meio é muito importante no diagnóstico e identificação de *Fusarium circinatum* uma vez que permite, com recurso ao microscópio

ótico (M.O.), observar com segurança as hifas estéreis circinadas características desta espécie e às quais deve o seu epíteto "*circinatum*". Outros caracteres microscópicos de relevância do patógeno são os seus conidióforos fortemente ramificados e de aspeto arbuscular e os dois tipos de mitósporos, macro e microconídios que este produz em cultura (Paiva, 2011).

1.1.3. Identificação molecular

A identificação molecular deste fungo está dependente de qual o material utilizado, podendo este ser micélio fúngico isolado em meio de cultura ou material vegetal. Alguns métodos, como PCR-RFLP, são viáveis apenas para identificação de DNA do patógeno em cultura pura, pois qualquer contaminante, incluindo DNA do hospedeiro, poderá interferir com a identificação. Outros são passíveis de ser utilizados tanto para DNA extraído de cultura pura como de material vegetal, como sementes. Aqui destacam-se os *primers* específicos (CIRC1A e CIRC4A) desenhados por Schweigkofler *et al.* (2004) que têm como alvo a região IGS do DNA ribossomal e produzem um fragmento de 360pb (Schweigkofler *et al.*, 2004), podendo ser aplicados em PCR convencional ou *SyBr green* Real-Time PCR. Apesar de ser comum recorrer-se à região ITS para identificação de outras espécies de fungos, a análise desta região mostra-se ineficaz na identificação de espécies de *Fusarium* uma vez que a maioria destas apresenta duas cópias divergentes e não-ortólogas da região ITS2 (O'Donnell *et al.*, 1998).

1.2. O cancro resinoso do pinheiro

1.2.1. Mecanismos de dispersão e infeção

Embora a dispersão dos esporos de *F. circinatum* ocorra principalmente desde o início da Primavera até ao início do Outono, o fungo pode subsistir durante os meses de inverno em restos vegetais (Iturrutxa & Barredo, 2006), estando, portanto, o seu inóculo disponível durante todo o ano. Em povoamentos esta dispersão é feita por fenómenos abióticos (chuva, vento e outros) e bióticos, como insetos ou outros vetores animais e pela atividade humana. Dentro de viveiros, a atividade humana é o principal fator de disseminação sendo aqui de destaque o movimento de material vegetal infetado, que representa não só uma fonte de dispersão a curta distância, mas principalmente a longa distância, com o comércio de sementes a representar o fator de maior risco (Paiva, 2011).

Apesar da infecção de plantas hospedeiras estar geralmente associada a lesões na planta (por fenómenos meteorológicos, insetos ou ação humana) que facilitam a entrada do patógeno, estudos recentes mostraram que esta não é necessária para a ocorrência de infecção (Swett *et al.*, 2018), sendo que aberturas naturais da planta, como os estomas das agulhas, podem servir igualmente como pontos de acesso (Mansilla *et al.*, 2005). Os insetos apresentam então um papel duplo na infecção de um hospedeiro com o patógeno, podendo ser simultaneamente vetores de transporte e facilitador do estabelecimento da doença (Brockerhoff *et al.*, 2016).

Os mecanismos moleculares pelos quais o patógeno induz o estado de doença são, até agora, desconhecidos, mas alguns estudos já estão a ser conduzidos no sentido de os perceber, mesmo que apenas parcialmente. Algumas publicações já reportaram a desregulação de alguns genes do hospedeiro na presença de *Fusarium circinatum*, incluindo, por exemplo, a indução da expressão de alguns genes relacionados com respostas de defesa (Morse *et al.*, 2004).

1.2.2. Sintomas

Embora se considere o cancro resinoso como uma doença dinâmica, com cada foco da infecção a apresentar sintomas que são resultado da interação única entre o fungo, o hospedeiro e as condições bióticas e abióticas prevalentes no local, existem sintomas característicos associados a esta doença.

Os sintomas característicos em plantas adultas incluem a presença de cancros, associados frequentemente a exsudações abundantes de resina. Estas podem causar estrangulamento da copa da árvore e, conseqüentemente, a morte da mesma. Na parte aérea verifica-se clorose (défice de clorofila), vermelhidão e queda das agulhas dos ramos infetados, juntamente com a seca destes últimos. O stress hídrico e a morte progressiva dos ramos que resultam da infecção pelo patógeno promovem uma decadência no volume e qualidade da madeira (Landeras *et al.*, 2005).

Já em plantas jovens os sintomas caracterizam-se não só pelas exsudações de resina, lesões no caule e descoloração das agulhas, que secam da base para o topo da planta, como também pela murchidão e encurvamento dos ápices, devido à capacidade do fungo *Fusarium circinatum* obstruir os feixes vasculares responsáveis pelo transporte de água, podendo este sintoma ser igualmente observado em ramos jovens de árvores adultas (Solel & Bruck, 1990).

As sementes são assintomáticas, podendo, contudo, conter o fungo à superfície ou inclusive no seu interior, verificando-se a existência de três tipos de infeção diferentes: superficial, não-superficial latente e não-superficial ativo (Agustí-Brisach *et al.*, 2012). É então claro o seu papel importante na disseminação da doença e a importância de medidas preventivas que atuem a este nível (Wingfield *et al.*, 2008).

1.3. O panorama nacional: impacto económico e ecológico

Em Portugal a área de floresta ocupa um total de 3 154 800 ha, correspondendo a 35,4% do território nacional. Desta, 29% é ocupada pelas duas principais espécies de *Pinus* naturalmente ocorrentes em Portugal, o Pinheiro-bravo e o Pinheiro-manso, ocupando a primeira 714 445 ha e a segunda 175 742 ha (ICNF, 2013), o que nos leva a concluir que sensivelmente 30% da floresta nacional é, então, suscetível a esta ameaça.

Com diversas indústrias dependentes da fileira do pinho, desde a produção de móveis, caixas de transporte e paletes com recurso à sua madeira, passando pela produção de óleos e outros produtos que usam a resina destas plantas como matéria-prima e não esquecendo a inclusão das sementes de determinadas espécies na alimentação, as plantas do género *Pinus* apresentam um enorme valor comercial, tendo a fileira do pinho em Portugal gerado um volume de negócios de 3.281 milhões de euros em 2016, representando 36% das exportações nacionais no setor das indústrias florestais e 3,4% do total de exportações nacionais de bens nesse mesmo ano (i).

Numa altura em que a floresta nacional se encontra fragilizada após os incêndios de 2017, onde mais de 260 mil ha de área de povoamentos se perdeu para as chamas (ii), em que o nemátode da madeira de pinheiro continua a ser uma ameaça e em que se tem verificado um decréscimo drástico da taxa de arborização resultante da preferência dos produtores florestais pela plantação de eucalipto em favor de espécies de pinho, o pinhal nacional encontra-se sobre grande pressão, constituindo portanto o patógeno *Fusarium circinatum* um risco acrescido quer ao nível ecológico quer ao nível económico para a floresta de pinho nacional e, conseqüentemente, para o nosso país.

1.4. Distribuição

1.4.1. Primeira deteção e evolução

Tendo sido detetado pela primeira vez em 1946 no estado da Carolina do Norte, na região sudeste dos Estados Unidos da América (Hepting & Roth, 1946), de onde é nativo, foi, entretanto, reportado noutros países. No continente europeu, a primeira deteção do

fungo data de 2005 em Espanha, com relatórios da sua presença em viveiros de *Pinus radiata* e *Pinus pinaster* e em povoamentos de *Pinus radiata* (Landeras *et al.*, 2005), (Pérez-Sierra *et al.*, 2007). Outros países europeus onde se observou a sua presença incluem França e Itália (Carlucci *et al.*, 2007). Em abril de 2008 foi registada a primeira ocorrência em Portugal, num viveiro em Anadia (Bragança *et al.*, 2009).

1.4.2. Atualidade

Hoje em dia, a sua distribuição na Europa está limitada a Portugal e Espanha, estando ainda presente em alguns estados dos Estados Unidos, no México, em alguns países da América do Sul, na África do Sul, no Japão e na República da Coreia (Fig. 1) (iii).

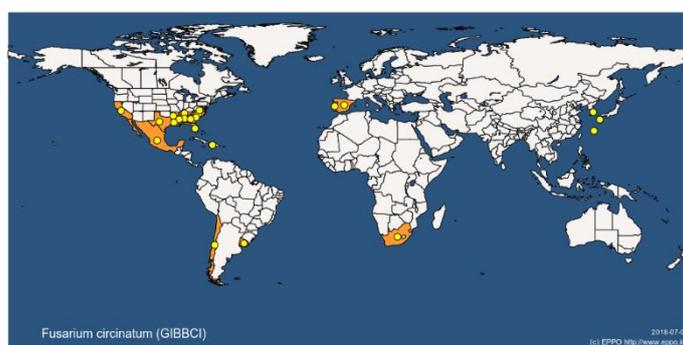


Figura 1 - Distribuição mundial do fungo *Fusarium circinatum* na atualidade. Fonte: EPPO

1.5. Organismo de quarentena

Sendo capaz de dispersão pelo ar, água e insetos, a sua principal via de disseminação é a circulação de sementes e plantas (incluindo contentores e substratos). Como tal, e na sequência do seu aparecimento na Europa, a Comissão Europeia tomou medidas regulamentares fitossanitárias de emergência (Decisão Europeia nº 2007/433/CE de 18 de junho) no sentido de evitar a sua introdução e dispersão em novas áreas, constando atualmente o fungo como organismo de quarentena na lista A2 da Organização Europeia e Mediterrânica para Proteção das Plantas (EPPO, 2013) (iv).

1.5.1. Medidas fitossanitárias em prática

Estas medidas fitossanitárias implicam a destruição de todas as plantas ou sementes dos lotes infetados e a manutenção dos restantes lotes de plantas hospedeiras que partilhem o mesmo local de produção/atividade num período de quarentena de 2 anos. Desde a sua primeira deteção no território nacional em 2008 e até junho de 2016, o fungo *Fusarium circinatum* já foi detetado em 15 fornecedores de materiais florestais de reprodução – MFR (plantas, sementes e partes de plantas), tendo sido destruídas cerca de

1,5 milhões de plantas hospedeiras e tendo ficado de quarentena, nos anos de 2014 e 2015, 815 mil plantas. No CENASEF, único fornecedor nacional de sementes de *Pinus pinaster*, foram destruídos 55,8 kg de semente de *Pinus radiata*, ficando de quarentena 2500 kg de semente de diversas espécies hospedeiras (Ribeiro, comunicação pessoal).

1.5.2. Consequências económicas/ecológicas

Para além do enorme impacto económico para os fornecedores devido ao período de quarentena inviabilizar a comercialização das espécies hospedeiras (uma vez que os requisitos legais estabelecidos no Decreto-lei n.º 205/2003 limitam a idade máxima de comercialização de plantas até 2 anos), poderá também verificar-se uma diminuição na disponibilidade de plantas de espécies hospedeiras, podendo resultar numa redução da área a arborizar nos próximos anos, particularmente com pinheiro-bravo.

1.6. Estratégias atuais de prevenção

Atualmente são, como referido anteriormente, aplicadas várias medidas de prevenção e quarentena de modo a promover um maior controlo de dispersão da doença e aos fornecedores de MFR são indicadas as técnicas de gestão e manutenção das suas culturas de modo a prevenir o seu aparecimento nas mesmas. De grande importância para a prevenção da dispersão do patógeno são as análises obrigatórias da presença de *Fusarium circinatum* nos viveiros antes de qualquer plantação ou comercialização de espécies hospedeiras, realizadas por laboratórios certificados e protocolados com o ICNF, I.P. como o IPN-Fitolab.

1.7. Princípios ativos e suas formas de ação

Fungicidas sistémicos como o tiabendazol, pertencente ao grupo dos benzimidazóis, foram testados em diferentes concentrações, sem se verificar qualquer tipo de eficácia. Adicionalmente, resistência a derivados deste composto já foi comprovada entre diferentes espécies de *Fusarium* (Yan & Dickman, 1993). A utilização de peróxido de hidrogénio a 30% ou do fungicida Thiram (dissulfeto de tetrametiluram) em sementes contaminadas foi eficaz na eliminação do patógeno à superfície (Iturrutxa & Barredo, 2006), não se verificando, contudo, eficácia de nenhum método na eliminação do micélio do interior da semente que não afetasse a viabilidade da mesma (Wingfield *et al.*, 2008).

1.7.1. Água de rega

Uma das potenciais formas de disseminação do patógeno em viveiro é através da água utilizada na rega das espécies hospedeiras. Caso existam propágulos do fungo nos contentores onde é armazenada a água destinada à rega ou mesmo na própria água de rega, estes propágulos podem infetar e levar ao desenvolvimento dos sintomas acima descritos e eventualmente levar à morte da cultura, o que, para além do grande prejuízo para o produtor, poderia ter graves consequências a nível ambiental na região na eventualidade do fungo se propagar para fora do viveiro. Assim, encontrar um tratamento capaz de eliminar os propágulos de *Fusarium circinatum* em meio aquoso sem que comprometa a viabilidade das plantas sujeitas a esta água de rega tratada é um importante passo para a adoção de novas medidas preventivas na propagação deste fungo.

1.7.1.1. Desogerme

Um esterilizante de superfícies disponível comercialmente cujo princípio ativo é um composto de amónio quaternário (cloreto de benzalquildimetilamónio) com biguanida cuja eficácia enquanto fungicida já foi demonstrada na eliminação de outras espécies de *Fusarium* (Nel *et al.*, 2007), juntamente com outros compostos de amónio quaternário pode prometer bons resultados no tratamento da água de rega. A sua carga positiva (Fig. 2) reage com os fosfolípidos da membrana citoplasmática, causando distorção desta e alterando assim a permeabilidade da mesma (Vieira *et al.*, 2006).

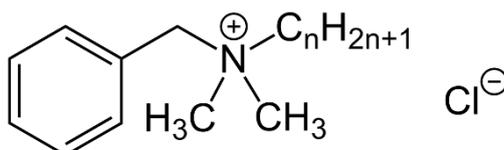


Figura 2 - Estrutura base do Cloreto de Benzalquildimetilamónio. Adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium_chloride#/media/File:Benzalkonium_chloride_Structure_V.1.svg

1.7.1.2. Hipoclorito de Sódio

Em solução aquosa, o NaClO ioniza-se a Na⁺ e ClO⁻ em equilíbrio com ácido hipocloroso (HClO), sendo este último o agente ativo responsável pelas características de desinfeção do hipoclorito de sódio, tendo um efeito de degradação oxidativa em membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos. Tendo o seu efeito fungicida já sido verificado em *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (Nel *et al.*, 2007) e outros fungos fitopatogénicos (Macnish *et al.*, 2010) e associando a isto o facto de

ser um químico não-residual de fácil acesso, isto torna-o um candidato ideal para testes da sua eficácia na eliminação de propágulos de *Fusarium circinatum* na água de rega.

1.7.1.3. Hydrocare

Apesar de o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ser um reagente oxidativo, não é uma espécie radical, apresentando, portanto, uma reatividade limitada. Contudo, na presença de iões metálicos de transição e através da reação de Fenton, é uma fonte de radicais hidroxilo (OH^*). Estes radicais altamente reativos são capazes de atacar quase todas as principais biomoléculas, como DNA, proteínas e lípidos, sendo estes últimos os mais suscetíveis, sofrendo o que se chama de peroxidação lipídica (Bai *et al.*, 2003) que, ocorrendo nos ácidos gordos polinsaturados que compõem a membrana celular, compromete a viabilidade da célula, resultando em *cellular leakage* (Lee *et al.*, 1998). Danos extensivos em proteínas são improváveis a não ser que a exposição aos radicais seja prolongada ou em caso de estes reagirem em determinados locais de algumas proteínas. Caso haja formação de radicais OH^* na sua vizinhança, o DNA é rapidamente atacado por estes, estando tanto os açúcares como as bases azotadas suscetíveis a oxidação, levando a *single strand breakage*, degradação das bases e *cross-linking* com proteínas (Bai *et al.*, 2003). No Hydrocare, um reagente à base de peróxido de hidrogénio, existem nanopartículas de prata que, para além de entrarem na reação de Fenton (enquanto ião metálico de transição) e levarem à formação dos radicais hidroxilo acima mencionada, têm também as suas próprias características biocidas, podendo causar dano direto às membranas celulares ou impedir a produção de ATP e a replicação de DNA caso haja *uptake* de espécies $Ag(I)$ solúveis pelas células (He & Waite, 2012). Como tal, também este agente surge como possível meio de tratamento.

1.7.2. Sementes de *Pinus*

A assintomaticidade das sementes das espécies hospedeiras já acima referida resulta nestas serem um dos principais meios de dispersão a curta e longa distância, tornando-as um dos principais focos nos esforços de combate à propagação do fungo *Fusarium circinatum*, procurando-se um tratamento eficaz na eliminação do patógeno presente nas sementes e que não comprometa a sua viabilidade.

1.7.2.1. Mennoflorades

Um desinfetante de superfícies com eficácia fungicida comprovada, incluindo sobre várias espécies de *Fusarium*. O seu princípio ativo, ácido benzoico, atua ao nível da glicólise, mais concretamente ao nível da fosfofrutocinase, que é inibida pela acidificação do meio intracelular causada pela acumulação extracelular do benzoato. Esta inibição causa um efeito em cadeia de inibição das vias metabólicas e consequente diminuição da concentração e produção de ATP (Krebs *et al.*, 1983), tornando-o num bom candidato a ser testado na desinfeção de sementes, algo nunca antes feito.

1.7.2.2. Captana

Um fungicida clássico, o captana [*N*-(triclorometiltio)-4-ciclohexeno-1,2 dicarbociximida] atua ao nível da mitocôndria, sendo um desacoplador da fosforilação oxidativa. As suas capacidades fungicidas estendem-se ainda à sua afinidade por grupos sulfidrilo comuns nas enzimas mitocondriais, como a NADH-desidrogenase e a β -hidroxibutirato desidrogenase, que leva à inibição das mesmas e à sua capacidade de inibição de outros processos fulcrais na respiração (Nelson, 1971). Todos estes fatores contribuem para este fungicida surgir com um bom candidato para o tratamento de sementes de *Pinus*.

1.7.2.3. Etanol

Servindo, tal como outras moléculas alcoólicas, como base para muitos fungicidas, o etanol sozinho já apresenta atividade antifúngica, o que o torna por si só um bom candidato. O seu principal alvo como agente de stress é a membrana celular dos fungos, com a qual interage ao nível da interface polar-apolar, enfraquecendo a barreira hidrofóbica e permitindo a troca livre de moléculas polares, perturbando assim a estrutura e função membranar. Para além disso apresenta outros efeitos como a desnaturação de proteínas e a inibição do *uptake* de vários nutrientes (Dao & Dantigny, 2011).

1.7.2.4. Tratamento Térmico Húmido

Uma técnica já usada no combate a vários fungos fitopatogénicos (28) e que já demonstrou alguma eficácia na eliminação de *Fusarium circinatum* em sementes

de *Pinus radiata* (Agustí-Brisach *et al.*, 2012) é o tratamento térmico húmido, com temperaturas letais para conidiósporos e micélio de 52°C e 55°C respetivamente, segundo o reportado por Liao *et al.* (2008). Como tal, decidiu-se testar a sua eficácia na desinfeção das sementes de *Pinus* utilizadas nesta dissertação.

1.8. Objetivos

Esta tese insere-se no projeto do Grupo Operacional +PrevCRP enquadrado no PDR2020, que envolve um total de 14 parceiros nacionais, contando com a presença de vários institutos, associações de produtores florestais, viveiros e fornecedores de fitofármacos.

Pretende-se com este projeto desenvolver estratégias de prevenção do cancro resinoso do pinheiro em viveiro, nomeadamente ao nível da desinfeção de sementes, substratos, da água utilizada na rega e dos contentores, sem comprometer a viabilidade das plantas. De igual forma, pretende aferir o desempenho de novos substratos alternativos à casca de pinheiro.

No final deste projeto, pretende-se desenhar novas estratégias sustentáveis que minimizem ou erradiquem o risco de dispersão de *Fusarium circinatum* que sejam implementadas em larga escala pelos fornecedores nacionais de MFR.

A presente tese incide no desenvolvimento de tratamentos para a desinfeção das sementes do género *Pinus* e para a eliminação de propágulos do fungo na água de rega. O desenvolvimento de um ou vários tratamentos capazes de tal será um passo importante na minimização da dispersão de um patógeno com grande impacto ecológico e económico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Meios de cultura

No decorrer dos procedimentos experimentais foram utilizados 3 meios de cultura: PDA (Potato Dextrose Agar), SNA (Spezieller-Nährstoffarmer Agar) e DCPA (Dichloran-Chloramphenicol Peptone Agar), segundo a norma da EPPO para meios apropriados para crescimento e identificação morfológica de *Fusarium circinatum* (PDA e SNA) e para isolamento do mesmo em tecido vegetal, como sementes (DCPA) (PM 7/91 (1), EPPO, 2009). Estes foram preparados de acordo com as tabelas abaixo (tabelas 1-3), sendo as quantidades aí indicadas as necessárias para a preparação de 1L de solução. Após a sua correta preparação, os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos à pressão de 1 atm. Finda a esterilização, os meios foram deixados em banho-maria a 60°C para estabilizarem a temperatura. De seguida foi adicionado estreptomina a 0,5 mg/mL aos meios de modo a prevenir o crescimento de bactérias Gram-negativas, já no interior da câmara de fluxo, onde foram também espalhados para caixas de Petri de 5 e 9 cm de diâmetro conforme a sua finalidade. Após solidificar, as caixas foram seladas e guardadas numa caixa fechada em local fresco até posterior utilização.

2.1.1. PDA

Este meio foi preparado segundo o indicado pelo fabricante VWR Chemicals (tabela 1).

Tabela 1 - Composição do meio de cultura PDA.

PDA	39g
dH ₂ O	1L

2.1.2. SNA

O meio SNA foi preparado segundo o indicado na tabela 2, tendo-se acertado o pH para um valor de 5,7.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura SNA.

KH ₂ PO ₄	1g
KNO ₃	1g
MgSO ₄ •(H ₂ O) ₇	0,5g
KCl	0,5g
Glucose	0,2g
Sacarose	0,2g
Agar Técnico	20g
dH ₂ O	1L

2.1.3. DCPA

O meio DCPA foi preparado segundo o indicado na tabela 3.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura DCPA.

Peptona bacteriológica	15g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ •(H ₂ O) ₇	0,5g
Chloramphenicol	0,2g
Dichloran (0,2% W/V in etanol, 1.0mL)	2mg
Cristal Violeta (0,05% W/V in water, 1.0mL)	0,0005g
Agar Técnico	20g
dH ₂ O	1L

2.2. Detecção de *Fusarium circinatum*

A classificação do *Fusarium circinatum* como organismo de quarentena levou ao desenvolvimento de técnicas específicas para a sua deteção, estabelecidas na norma da EPPO (PM 7/91 (1), EPPO, 2009). Estas têm em conta os caracteres macro e microscópicos referidos no ponto 1.1.2. e a identificação molecular referida no ponto 1.1.3. e foram seguidas sempre que a deteção do patógeno era necessária para a determinação de resultados, sendo que apenas a corroboração das duas identificações (morfológica e molecular) nos permite uma correta identificação do fungo.

2.3. Eliminação de propágulos de *Fusarium circinatum* de água de rega em viveiros

2.3.1. Preparação da solução de esporos de *F. circinatum*

Foi repicado *Fusarium circinatum* em SNA e incubado a 25°C durante 30 dias de modo a desenvolver estruturas reprodutoras. Após confirmação ao M.O. de que as culturas tinham esporos bem desenvolvidos, foi preparada a solução de esporos por lavagem das caixas de C⁺ (controlo positivo) com água miliQ estéril, tendo-se recolhido o produto dessas lavagens para um tubo de Falcon de 50mL. A concentração de esporos/mL da solução obtida foi determinada com recurso a uma câmara de Neubauer. A concentração de esporos/mL foi, quando necessário, acertada para uma concentração final de 1,5x10⁶ esporos/mL. Para facilitar a contagem das UFCs (unidades formadoras de colónias) no C⁺ foram realizadas diluições seriadas com diluições entre 1:1000 e 1:10 000 000, sendo a contagem depois ajustada tendo em conta esta diluição.

2.3.2. Preparação das soluções para tratamento da água de rega

Foram preparadas as soluções a testar na sua eficácia na eliminação dos esporos: NaClO 1%, 2% e 2,5% a partir de uma solução stock de 10%; Desogerme 1% a partir de uma solução stock de 100% e Hydrocare 50ppm (0,005%), 1%, 2%, 3%, 4% e 5% a partir de uma solução stock de 100%. Todas as soluções foram preparadas com água da rede, de modo a mimetizar ao máximo as condições reais de aplicação deste estudo.

2.3.3. Tratamento da solução de esporos

A solução de esporos de *Fusarium circinatum* foi então incubada com cada um dos tratamentos durante 15 minutos e subsequentemente plaqueada em PDA. Foi também plaqueada a solução de esporos não tratada em PDA como C⁺ e água da rede também em PDA como C⁻ (controlo negativo). Todas as caixas foram incubadas a 25°C durante 30 dias, sendo o crescimento de *Fusarium circinatum* monitorizado e a contagem de UFCs realizada/atualizada sempre que necessário.

2.3.4. Impacto dos tratamentos utilizados na germinação de espécies hospedeiras de *Fusarium circinatum*

Os melhores tratamentos da tarefa anterior foram selecionados para testar o seu impacto na germinação de espécies hospedeiras de *Fusarium circinatum*. Novamente, todas as soluções foram preparadas com água da rede, sendo esta também utilizada como C⁻.

Sementes de *Pinus radiata*, *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* foram inoculadas em tubos de ensaio com agar não contendo antibiótico, com 1 semente por tubo, 10 tubos por tratamento (Fig. 3), num total de 40 tubos por espécie (3 tratamentos e o C⁻).

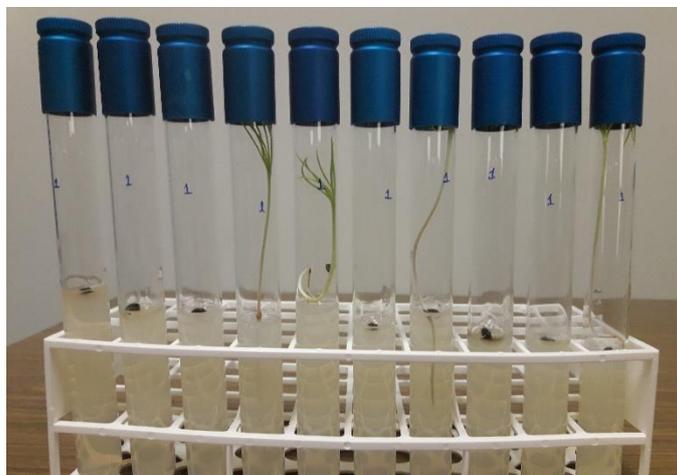


Figura 3 - Sementes de *Pinus radiata* regadas com C⁻.

As sementes foram regadas durante 50 dias a intervalos regulares e a sua germinação foi acompanhada ao longo deste período.

2.4. Tratamento de sementes de *Pinus radiata*, *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* inoculadas com *F. circinatum*

2.4.1. Preparação das soluções para tratamento das sementes

Foram preparadas as seguintes soluções: etanol 50%, 60% e 70% a partir de uma solução stock de 96%, Captana 1,9g/L, e Menoflorades 4% a partir de uma solução stock de 100%. Para a preparação destas soluções foi utilizada dH₂O estéril, tendo esta sido também utilizada para os tratamentos térmicos húmidos.

2.4.2. Tratamento das sementes

Os tratamentos foram aplicados nas sementes sob agitação durante o tempo de aplicação correspondente ao mesmo, como indicado na tabela 4. Nos tratamentos dependentes de temperatura, esta foi acertada e mantida com recurso a placas de aquecimento com agitação magnética.

Após o tempo total de tratamento, as sementes foram recolhidas, secas e inoculadas em meio DCPA.

Tabela 4 - Tratamentos aplicados nas sementes de *Pinus* e seus tempos de aplicação.

Tratamento	Tempo de aplicação (minutos)
Etanol 50%	5
Etanol 60%	5
Etanol 70%	5
Captana 1,9g/L	5
Menoflorades 4%	60
Térmico Húmido 52°C	30
Térmico Húmido 55°C	30
Térmico Húmido 60°C	15

2.4.3. Incubação e acompanhamento do crescimento fúngico

Para todos os tratamentos, as sementes inoculadas foram incubadas a 25°C no escuro durante 31 dias, sendo feito o registo de nº de isolados de *Fusarium circinatum*, nº de isolados de outros fungos e nº de sementes germinadas aos 5, 10, 15 e 20 dias, com confirmação de alterações aos 30 dias. Registo fotográfico foi feito aos 7 e 30 dias.

Todas as colónias fúngicas que cresceram foram repicadas para PDA e SNA e incubados a 25°C no escuro durante um período mínimo de 10 dias. Após este período de

tempo, foram feitas observações destes isolados ao M.O. para despiste da presença de *F. circinatum*.

2.4.4. Análise e confirmação molecular de resultados

Foi feita extração de DNA para a confirmação dos isolados de *Fusarium circinatum* identificados como tal por observação da morfologia ao M.O. e para identificação de outros isolados.

Para fungos não identificados morfologicamente como *Fusarium circinatum* procedeu-se ao processo de extração de DNA com recurso ao kit REDextract-N.Amp PCR ReadyMix (*Sigma*, EUA), segundo o protocolo indicado pelo fabricante. No final do procedimento os DNAs foram guardados a -20°C.

Foi realizada uma reação de PCR para amplificação da região ITS dos DNAs extraídos com recurso aos *primers* ITS1F e ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993), confirmando-se a correta amplificação desta região com uma eletroforese em gel de agarose a 1,2% onde se verifica uma banda na região das 580-750 pb. Os produtos de PCR das regiões ITS foram então purificados com recurso ao kit Exo/SAP Go PCR Purification da Grisp e enviados para sequenciação por método de Sanger para a StabVida.

Os resultados da sequenciação foram então processados com recurso a bases de dados de modo a determinar quais as espécies de fungos que cresceram (BLAST, Altschul *et al.*, 1997).

Para a confirmação da presença de *Fusarium circinatum* observado ao M.O. foi realizada uma extração de DNA convencional por choque térmico a partir dos isolados. Para tal, suspendeu-se micélio destes em 100 µL de Tris-EDTA 1x (*Sigma*, EUA) e colocou-se a -80°C durante 3 minutos. Findo este tempo, descongelou-se a 75°C durante 3 minutos e levou-se ao vortex por 2 minutos. Este processo de congelamento, descongelamento e vortex repetiu-se 3 vezes, sendo que na última o passo de descongelamento foi alargado para 15 minutos. Por fim realizou-se uma centrifugação a 15700g durante 5 minutos, tendo-se retirado o sobrenadante para tubos de PCR limpos (Paiva, 2011). O produto resultante foi purificado recorrendo ao anteriormente referido Exo/SAP Go PCR Purification Kit.

Outra reação de PCR foi realizada com os DNAs purificados, utilizando os *primers* específicos para *F. circinatum* CIRC1A e CIRC4 (Schweigkofler *et al.*, 2004) sendo também realizada uma outra eletroforese de controlo em gel de agarose a 1,2% para se verificar se existia ou não a banda específica de 360 pb.

2.5. Análise estatística

Os resultados obtidos do nº de UFCs que se observaram nos tratamentos de água de rega e da percentagem de desinfeção das sementes de *Pinus* foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com análise post-hoc de Dunn com $P < 0,01$, tendo-se recorrido ao software Past (versão 3.25, Hammer *et al.*, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Água de rega

3.1.1. Eficácia na eliminação dos esporos de *F. circinatum*

O nº de UFCs de *Fusarium circinatum* que cresceu nas placas de PDA inoculadas com cada suspensão tratada foi determinada por contagem, tal como no C⁺, e registada na tabela 5, estando estes dados estatisticamente tratados e representados na figura 4.

Tabela 5 - Média de UFCs/mL de *F. circinatum* por tratamento.

Tratamento	Média (n=5)	Erro Padrão	% de desinfeção
C+	860000	18973,666	0
C-	0	0	N.A.
NaClO 1%	0	0	100
NaClO 2%	0	0	100
NaClO 2,5%	0	0	100
Desogerme 1%	0	0	100
Hydrocare 1%	3280	3,16227766	99,6186
Hydrocare 2%	401	5,05964426	99,5337
Hydrocare 3%	5,4	3,81575681	99,9937
Hydrocare 4%	0	0	100
Hydrocare 5%	20	10,9590146	99,9767

Como é possível verificar pelos dados apresentados na tabela 5, vários tratamentos foram capazes de alcançar 100% de eficácia na eliminação dos esporos de *Fusarium circinatum* em suspensão, nomeadamente NaClO nas três concentrações testadas, Desogerme a 1% e Hydrocare a 4%. A capacidade de degradação oxidativa do ácido

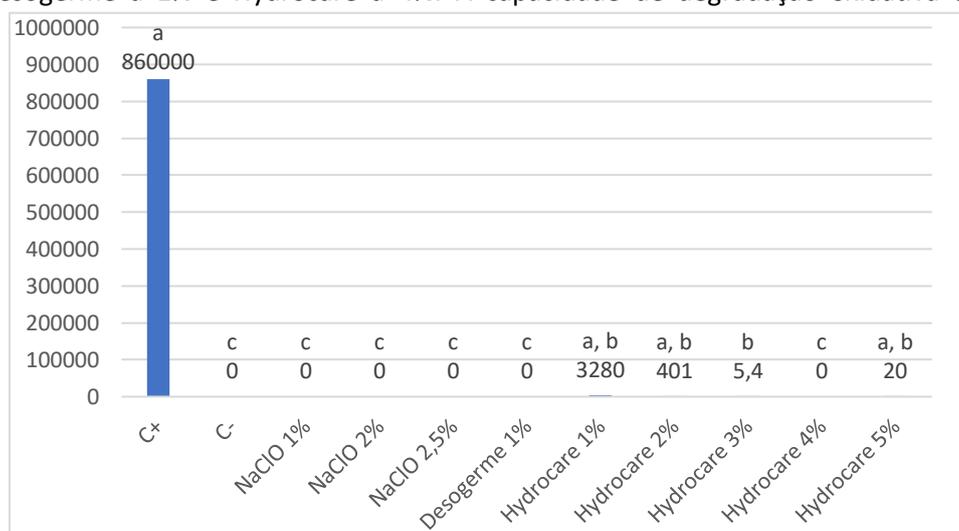


Figura 4 - Média de UFCs de *Fusarium circinatum* por tratamento. Dados (n=5) associados a letras diferentes são significativamente diferentes, segundo o teste de Dunn (P < 0,001).

hipocloroso resultante da dissolução do NaClO em água mostrou-se eficaz a eliminar todos os esporos, mesmo à concentração de 1%, demonstrando o mesmo efeito fungicida reportado em *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Nel et al., 2007) e *Botrytis cinérea* (Macnish et al., 2010) também em *Fusarium circinatum*. O mesmo efeito também se verificou para o Desogerme à mesma concentração, que também tinha sido reportado como eficaz na eliminação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Nel et al., 2007). O Hydrocare só teve 100% de eficácia à concentração de 4%, embora para as concentrações iguais ou superiores a 2% tenha tido uma capacidade de desinfecção sempre superior a 99%. A diminuição de eficácia entre Hydrocare 4% e Hydrocare 5% pode dever-se à saturação desta última solução que levou, conseqüentemente, à formação de um precipitado de nanopartículas de Ag. Assim, os iões metálicos de transição não estariam disponíveis para reagir com o peróxido de hidrogénio e gerar os radicais hidroxilo necessários para a desinfecção. A eficácia do peróxido de hidrogénio em eliminar *Fusarium circinatum* já havia sido anteriormente demonstrada em sementes (Dwinell & Fraedrich, 1999), mostrando agora este tratamento com Hydrocare uma capacidade semelhante na eliminação de propágulos do fungo em solução aquosa, com a inovação das nanopartículas de prata a permitirem a utilização de concentrações inferiores às anteriormente usadas. Assim, vários resultados positivos foram obtidos e que podem indicar que se pode seguir para testes posteriores de impacto na germinação e crescimento das plantas hospedeiras.

A análise estatística mostrou-nos a existência de três grupos significativamente diferentes, a, b e c, em que os dois primeiros representam crescimento de *Fusarium circinatum*, ainda que com grande disparidade em termos do nº de UFCs, e o último os tratamentos que não apresentaram qualquer crescimento de *Fusarium circinatum*.

Embora se tenha também testado o Hydrocare a uma concentração de 50ppm (0,005%), a indicada na bula para desinfecção de águas de rega, este apresentou um crescimento igual ao C⁺ não diluído, tendo-se verificado impossível determinar o nº de UFCs neste tratamento, pelo que se escolheu omitir estes resultados da tabela e da análise estatística, uma vez que não seriam relevantes para o objetivo do trabalho em questão.

A principal diferença verificada entre os diferentes tratamentos que mostraram ser eficazes na eliminação dos propágulos fúngicos prende-se na sua capacidade de eliminar ou não algumas bactérias que surgiram no C⁻ (Fig. 5.A). Aqui, verificou-se que o NaClO foi eficaz na eliminação destas em todas as concentrações testadas (Fig 5.D-F), tal como o

Hydrocare para concentrações iguais ou superiores a 1% (Fig. 5.G-K). O Desogerme a 1%, por sua vez, não foi eficaz na eliminação do crescimento bacteriano (Fig. 5.C).

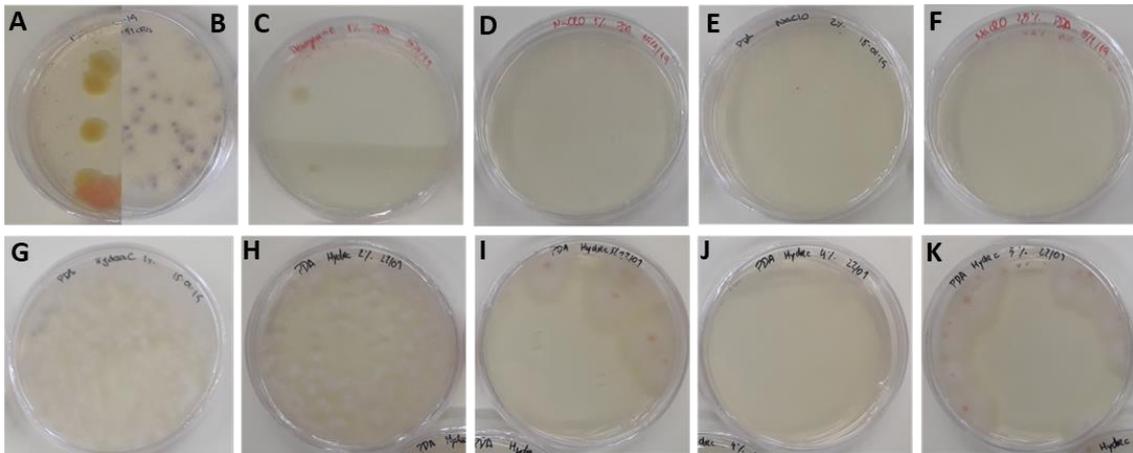


Figura 5 - Caixas inoculadas com os tratamentos de água de rega, 7 dias após inoculação. **A) C**; **B)** C⁺ diluído 1:1000; **C)** Desogerme 1%; **D)** NaClO 1%; **E)** NaClO 2%; **F)** NaClO 2,5%; **G)** Hydrocare 1%; **H)** Hydrocare 2%; **I)** Hydrocare 3%; **J)** Hydrocare 4%; **K)** Hydrocare 5%.

3.1.2. Impacto na germinação

O nº de sementes germinadas foi sendo registado ao longo de 50 dias (Fig. 7). Uma vez que o NaClO foi eficaz em todas as gamas de concentração testadas, para este ensaio escolheu-se a concentração mais baixa, 1%, de modo a minimizar ao máximo qualquer possível impacto que este possa ter na germinação das sementes. De igual forma, pretende-se também minimizar o custo para os fornecedores de MFR numa possível aplicação em contexto real.

Como podemos ver, em nenhum dos tratamentos se verificou um impacto negativo na capacidade de germinação das sementes quando sujeitas a rega com os tratamentos indicados uma vez que o nº total de sementes germinadas para um dado tratamento numa dada espécie no final do ensaio nunca é inferior ao nº de sementes germinadas dessa espécie quando regadas com água sem tratamento, verificando-se, inclusive, um aumento da germinação em alguns dos casos. De igual forma, nenhum dos tratamentos aparenta retardar a germinação de forma significativa, quando analisados os gráficos de germinação ao longo do tempo.

Embora mais testes de impacto na germinação e viabilidade da planta segundo os postulados existentes para tal sejam ainda necessários, estando estes previstos no projeto em que esta tese se insere e sendo levados a cabo pelos nossos parceiros no INIAV e no

ISA, o facto de nenhum dos tratamentos que se verificaram eficazes na eliminação dos esporos de *Fusarium circinatum* aparentar impactuar negativamente a capacidade de germinação de sementes de espécies hospedeiras deste patógeno é um importante passo na prevenção da propagação desta doença.

Dentro de todos os tratamentos, o fácil acesso e custo reduzido de NaClO torna-o um produto favorito para aplicação em contexto real, contudo o facto de este apresentar capacidade biocida em bactérias também poderá ser um potencial problema, devido às relações simbióticas planta-bactéria que existem. De igual forma, o impacto destes tratamentos em fungos que estabelecem relações simbióticas com as plantas não foi avaliado neste ensaio. Assim, os testes adicionais acima referidos que avaliem o impacto dos tratamentos no crescimento e viabilidade da planta são ainda necessários.

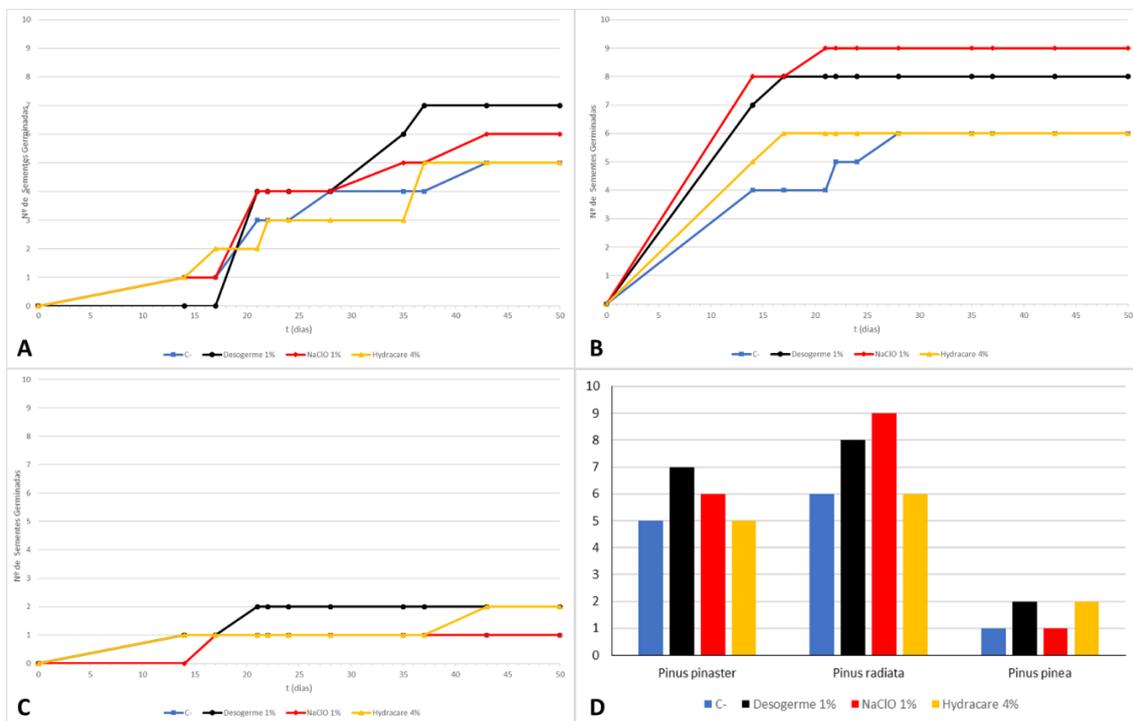


Figura 6 - Germinação das sementes de: A) *Pinus pinaster*; B) *Pinus radiata*; C) *Pinus pinea*, ao longo de 50 dias de rega com os tratamentos. D) N° de sementes germinadas por espécie e tratamento no final de 50 dias de rega.

3.2. Desinfecção de sementes de *Pinus*

O nº de isolados de *Fusarium circinatum* foi determinado por observação macroscópica e microscópica e confirmado por análise molecular, e está resumido na figura 7.

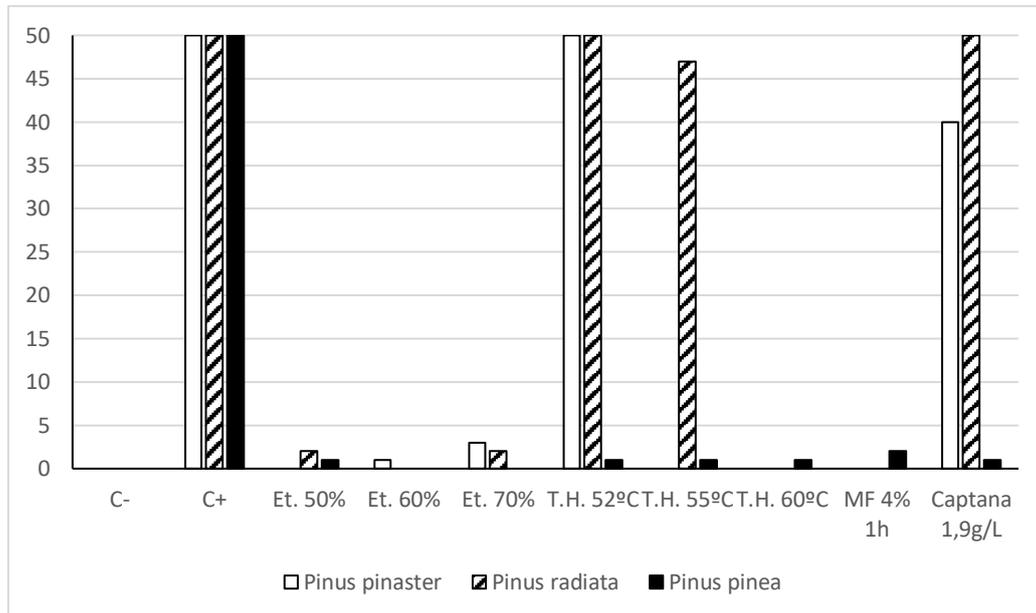


Figura 7 - Nº Isolados de *Fusarium circinatum* em sementes no final de 31 dias por espécie analisada e por tratamento.

Como podemos ver, nenhum tratamento foi eficaz na total desinfecção das sementes de todas as espécies. Contudo, houve sempre pelo menos um tratamento capaz de alcançar 100% de desinfecção das sementes de uma dada espécie. De grande destaque são os tratamentos Térmico Húmido 60°C durante 15 minutos e Menoflorades 4% durante 1h, que apresentam a maior taxa de eficácia entre todos os tratamentos, sendo 100% eficazes na total desinfecção de sementes de *Pinus pinaster* e *Pinus radiata*. Estes dois apresentam, no entanto, dificuldades na desinfecção total das sementes de *Pinus pinea*, embora reduzam bastante o nível de infecção. Nesta última espécie, os tratamentos mais bem-sucedidos são Etanol a 60% e 70% durante 5 minutos.

Para as sementes de todas as espécies, a presença de *Fusarium circinatum* foi sempre confirmada por análise molecular de acordo com a norma EPPO, por amplificação dum amplicão da região IGS por *taxon specific primers* (Fig. 8.A) e as restantes colónias fúngicas identificadas recorrendo à análise da sua região ITS (Fig. 8.B). No caso das sementes de *Pinus radiata*, foi registada uma grande variedade de espécies fúngicas diferentes, como

Chromelosporium carneum, *Cladosporium cladosporioides* e *Neurospora crassa*, entre muitos outros, tendo-se ainda detetado vários isolados com putativo interesse científico.

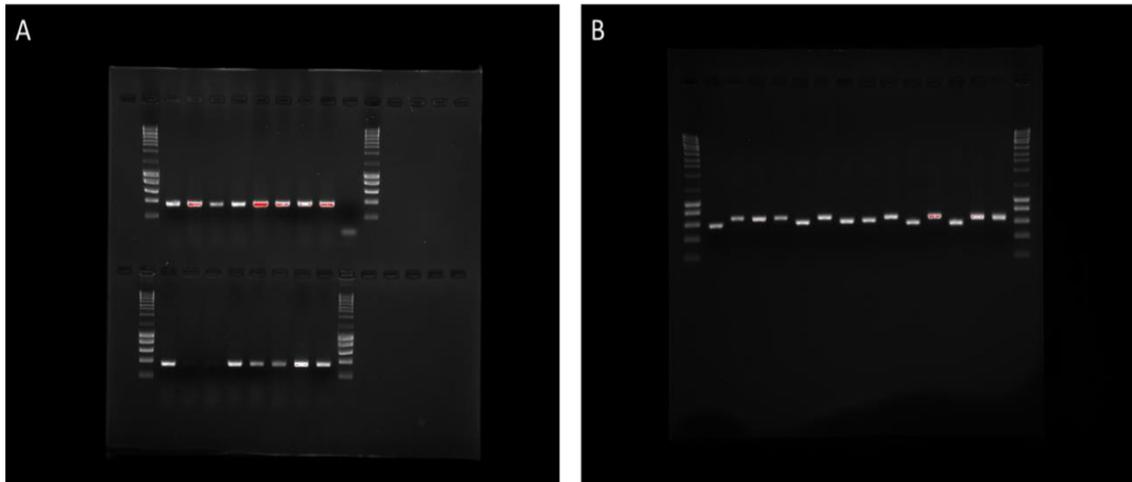


Figura 8 - Eletroforeses realizadas no decorrer dos ensaios. **A)** Despiste da presença de *Fusarium circinatum* em fungos isolados das sementes tratadas de *Pinus radiata* por análise com os *primers* específicos CIRC1A e CIRC4A. **B)** Confirmação da correta amplificação da região ITS de outros fungos isolados de sementes de *Pinus radiata* não identificados como *Fusarium circinatum*.

3.2.1. *Pinus pinaster*

O crescimento de *Fusarium circinatum*, de outros fungos e o nº de sementes germinadas foi registado para as sementes de *Pinus pinaster* tratadas ao longo de 31 dias e encontra-se registado na tabela 6. Tal como referido acima, vários tratamentos se mostraram eficazes na completa desinfeção de *Fusarium circinatum* nas sementes desta espécie, nomeadamente Etanol a 50%, Térmico Húmido a 55°C e 60°C e Menoflorades a 4%.

A análise estatística (Fig. 9) mostrou existirem dois grupos significativamente diferentes. O grupo a, onde a percentagem de desinfeção foi muito reduzida ou nula, que inclui os tratamentos térmico húmido a 52°C e Captana a 1,9g/L, juntamente com o C⁺, e o grupo b, onde se verificou uma grande ou total percentagem de desinfeção e que inclui todos os restantes tratamentos. Apesar deste agrupamento, os tratamentos que alcançaram 100% de desinfeção são os de maior destaque e relevância para o trabalho em questão.

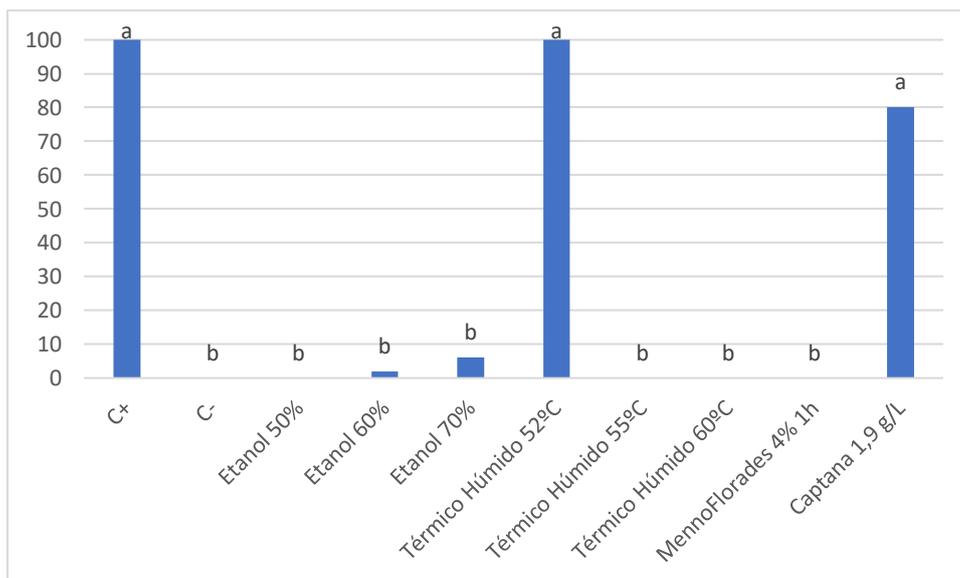


Figura 9 - Percentagem de infecção das sementes de *Pinus pinaster* por tratamento. Dados (n=5) associados a letras diferentes representam resultados significativamente diferentes, segundo o teste de Dunn ($P < 0,001$).

Verificou-se, contudo, uma grande diferença na capacidade de eliminar outros fungos entre os vários tratamentos, sendo de destacar aqui o tratamento com Menoflorades a 4%, que apresentou apenas crescimento de um outro fungo, demonstrando a capacidade antifúngica do seu princípio ativo, benzoato, já anteriormente descrita (Krebs *et al.*, 1983). Com este resultado, este tratamento mostra grande potencial

antifúngico não só ao nível da eliminação de *Fusarium circinatum* como possivelmente ao nível de outros fungos fitopatogénicos.

Relativamente ao efeito dos tratamentos na capacidade de germinação das mesmas, nenhum dos tratamentos testados eficazes na eliminação do patógeno aparentou ter um impacto negativo na mesma, verificando-se sempre um nº de sementes germinadas superior ao registado no C⁻ (tabela 6).

Tabela 6 - Nº de isolados de *Fusarium circinatum*, outros isolados fúngicos e nº de sementes germinadas ao fim de 31 dias em *Pinus pinaster*.

Tratamento	Isolados de <i>F. circinatum</i> (total)	Outros isolados (total)	Sementes Germinadas (total)
C ⁺	50	0	2
C ⁻	0	43	4
Etanol 50%	0	26	7
Etanol 60%	1	26	9
Etanol 70%	3	19	9
Térmico Húmido 52°C	50	0	2
Térmico Húmido 55°C	0	33	7
Térmico Húmido 60°C	0	16	8
MennoFlorades 4% 1h	0	1	7
Captana 1,9 g/L	40	40	6

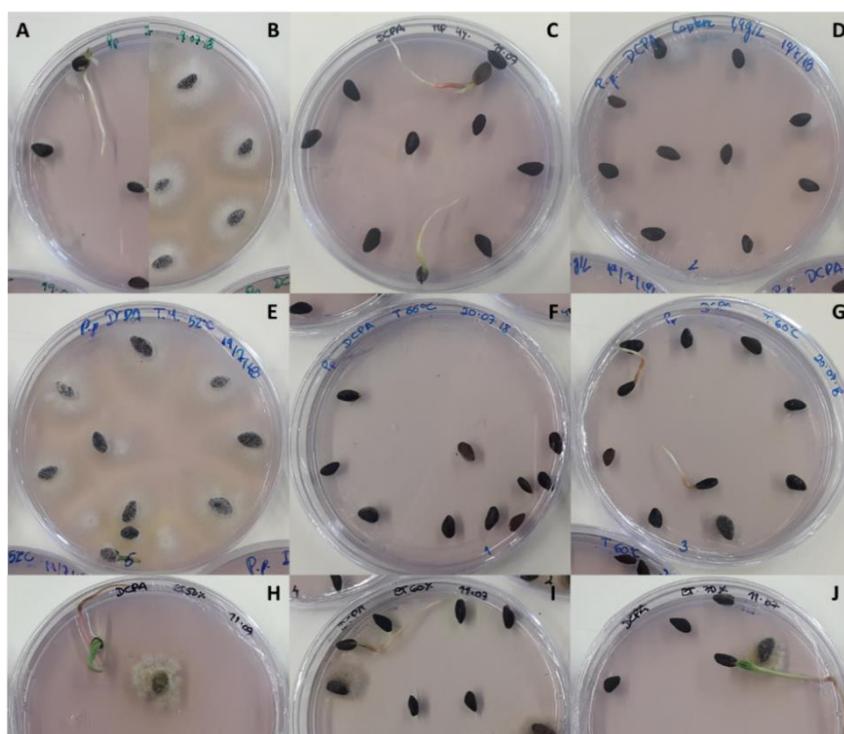


Figura 10 - Sementes de *Pinus pinaster* 15 dias após tratamento: **A)** C⁺; **B)** C⁻; **C)** MennoFlorades 4%; **D)** Captana 1,9g/L; **E)** Térmico Húmido 52°C; **F)** Térmico Húmido 55°C; **G)** Térmico Húmido 60°C; **H)** Etanol 50%; **I)** Etanol 60%; **J)** Etanol 70%.

3.2.2. *Pinus radiata*

Novamente, o registo dos três parâmetros em avaliação (crescimento de *Fusarium circinatum*, crescimento de outros fungos e germinação das sementes) foi feito ao longo dos 31 dias após os tratamentos e os valores finais encontram-se registados na tabela 7. Estes foram posteriormente sujeitos a análise estatística, estando esta representada graficamente na figura 11.

Tabela 7 - Nº de isolados de *Fusarium circinatum*, outros isolados fúngicos e nº de sementes germinadas ao fim de 31 dias em *Pinus radiata*.

Tratamento	Isolados de <i>F. circinatum</i> (total)	Outros isolados (total)	Sementes Germinadas (total)
C+	50	1	29
C-	0	15	41
Etanol 50%	2	8	32
Etanol 60%	0	10	27
Etanol 70%	2	6	30
Térmico Húmido 52°C	50	1	18
Térmico Húmido 55°C	47	1	31
Térmico Húmido 60°C	0	7	37
MennoFlorades 4% 1h	0	2	10
Captana 1,9 g/L	50	0	17

Embora a obtenção de um tratamento único que apresentasse capacidade de desinfeção total nas três espécies fosse ideal, os primeiros resultados obtidos em *Pinus radiata* rapidamente mostraram que essa tarefa poderia ser bastante difícil quando comparados com os resultados obtidos anteriormente em *Pinus pinaster*. Tratamentos que apresentaram uma taxa de desinfeção de 100% para *Pinus pinaster* não foram capazes de apresentar o mesmo nível de ação nesta segunda espécie, como foi o caso do tratamento com Etanol a 50% ou o tratamento Térmico Húmido a 55°C. De igual forma, o tratamento com Etanol a 60%, que na espécie anterior não tinha sido capaz de eliminar o fungo *Fusarium circinatum* totalmente, demonstrou uma taxa de desinfeção de 100% em *Pinus radiata*. Contudo, outros tratamentos continuaram a mostrar-se eficazes,

nomeadamente o tratamento Térmico Húmido nas temperaturas de 55°C e 60°C e Mennoflorades a 4%.

Mais uma vez se destaca a capacidade do Mennoflorades em eliminar não só *Fusarium circinatum* como também a maior parte dos outros fungos quando comparado com os outros tratamentos. Por outro lado, ao contrário do que se verificou em *Pinus pinaster*, em *Pinus radiata* este tratamento aparentou ter um impacto negativo significativo na capacidade de germinação das sementes, verificando-se um grande decréscimo no nº de sementes germinadas entre as tratadas com Mennoflorades a 4% e o C.

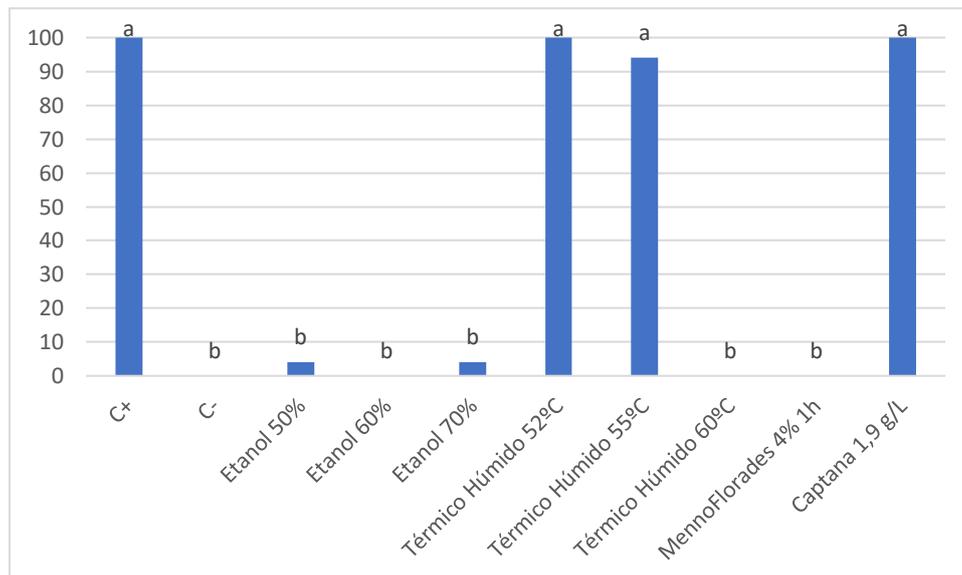


Figura 11 - Percentagem de infeção das sementes de *Pinus radiata* por tratamento. Dados (n=5) associados a letras diferentes representam resultados significativamente diferentes, segundo o teste de Dunn ($P < 0,001$).

Igualmente relevantes são os resultados obtidos no tratamento Térmico Húmido a 52°C uma vez que não se verificou a redução no crescimento de *Fusarium circinatum* reportada por Agustí-Brisach *et al.* (2012), quando as sementes de *Pinus radiata* foram submetidas a esta temperatura durante 30 minutos, podendo esta diferença de resultados se dever às diferenças na metodologia utilizada.

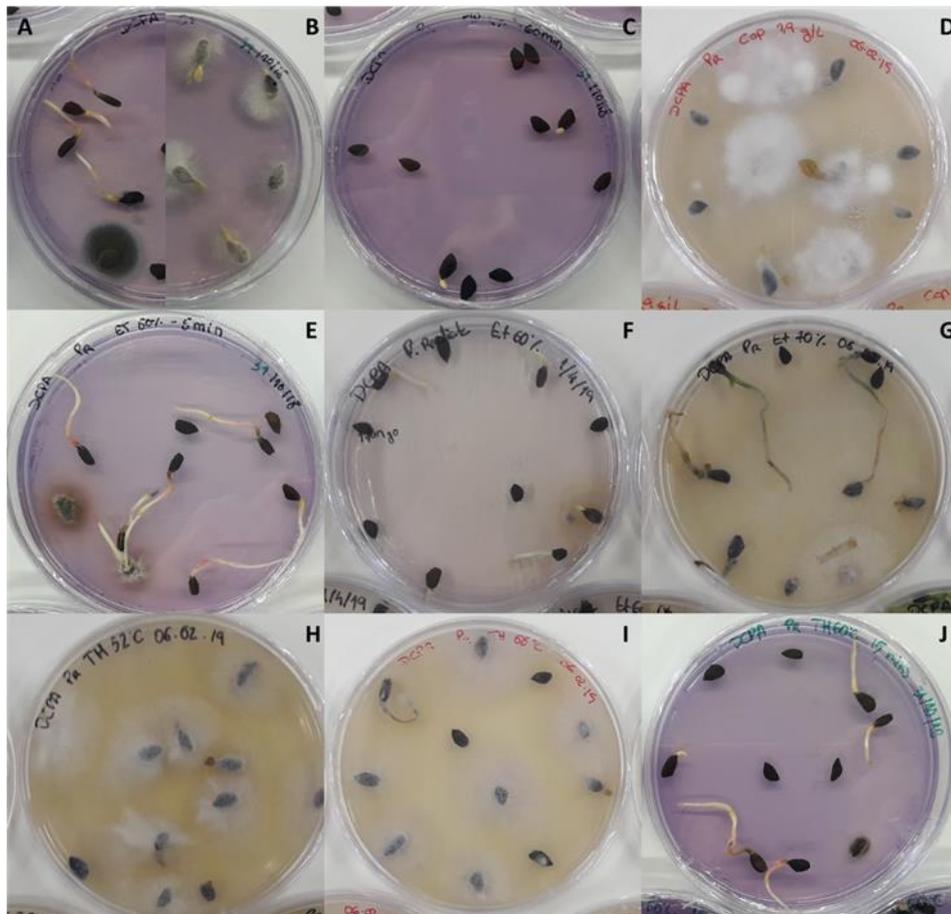


Figura 12 - Sementes de *Pinus radiata* 15 dias após tratamento: **A)** C; **B)** C+; **C)** Mennoflorades 4%; **D)** Captana 1,9g/L; **E)** Térmico Húmido 52°C; **F)** Térmico Húmido 55°C; **G)** Térmico Húmido 60°C; **H)** Etanol 50%; **I)** Etanol 60%; **J)** Etanol 70%.

3.2.3. *Pinus pinea*

Os ensaios em *Pinus pinea* mostraram ser mais desafiantes que as outras duas espécies devido à grande quantidade de outros fungos que cresceram na maior parte dos tratamentos (Tabela 8) e que dificultaram as observações durante o período pós-tratamentos. Esta grande quantidade, ao contrário do que aconteceu em *Pinus radiata*, não se traduziu numa grande variedade de espécies, com a maior parte das colónias a pertencerem a um número reduzido de espécies do género *Trichoderma*. O facto de existirem poucos estudos com sementes desta espécie levou a uma dificuldade acrescida no decorrer destes ensaios. Nesse sentido, o protocolo de desinfecção e posterior inoculação das sementes com *Fusarium circinatum* que é realizado por um parceiro do GO+PrevCRP, nomeadamente o INIAV, continua a ser otimizado numa tentativa de obter

resultados mais fidedignos e alcançar conclusões no que a tratamentos desta espécie diz respeito.

Ainda assim, a capacidade de eliminação de *Fusarium circinatum* dos tratamentos testados nestas sementes foi avaliada e analisada estatisticamente (Fig. 13). Neste aspeto, apenas dois tratamentos se mostraram 100% eficazes, nomeadamente Etanol nas concentrações de 60% e 70%, mostrando que a capacidade inibitória do crescimento fúngico anteriormente descrita (Dao & Dantigny, 2011) se estende também a *Fusarium circinatum*. De igual forma, nenhum deles aparentou ter impacto na germinação das sementes, sendo que no C⁻ não se verificou germinação de todo.

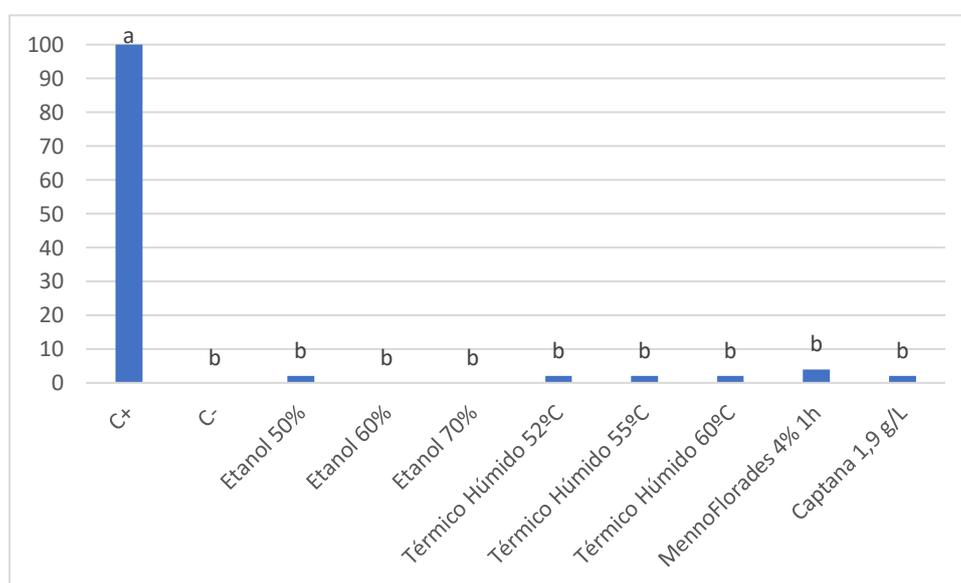


Figura 13 - Percentagem de infeção das sementes de *Pinus pinea* por tratamento. Dados (n=5) associados a letras diferentes representam resultados significativamente diferentes, segundo o teste de Dunn ($P < 0,01$).

Tabela 8 - Nº de isolados de *Fusarium circinatum*, outros isolados e nº de sementes germinadas ao fim de 31 dias em *Pinus pinea*.

Tratamento	Isolados de <i>F. circinatum</i> (total)	Outros isolados (total)	Sementes Germinadas (total)
C ⁺	50	1	0
C ⁻	0	50	0
Etanol 50%	1	46	0
Etanol 60%	0	20	2
Etanol 70%	0	16	1
Térmico Húmido 52°C	1	49	0
Térmico Húmido 55°C	1	44	0
Térmico Húmido 60°C	1	37	0
MennoFlorades 4% 1h	2	9	4
Captana 1,9 g/L	1	28	0

Embora a análise estatística (Fig. 13) tenha agrupado todos os tratamentos como significativamente semelhantes, são novamente de grande destaque aqueles capazes de alcançar uma taxa de desinfecção de 100%.

Testes adicionais foram conduzidos nesta espécie, para confirmação de resultados, uma vez que foi a primeira vez que se verificou que o Mennoflorades foi incapaz de eliminar totalmente *Fusarium circinatum*. Um aumento do tempo de incubação para 120 minutos mantendo a concentração de 4% revelou-se então eficaz na total eliminação do patógeno.

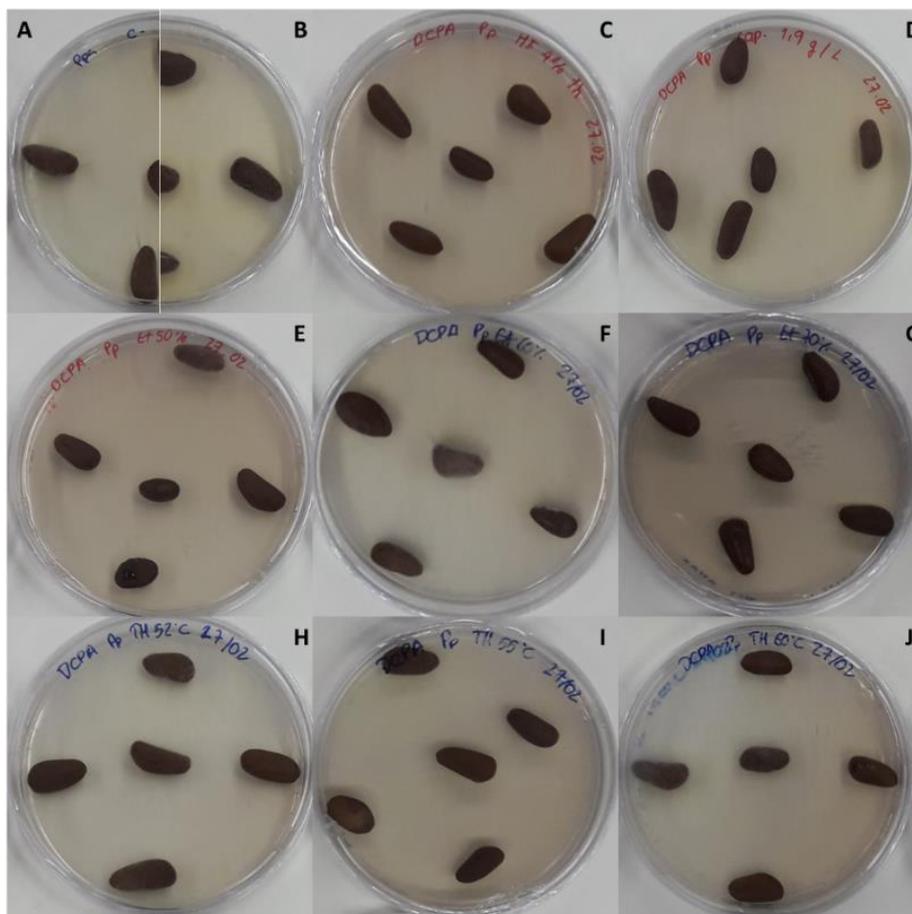


Figura 14 - Sementes de *Pinus pinea* 7 dias após tratamento: **A)** C; **B)** C; **C)** Mennoflorades 4%; **D)** Captana 1,9g/L; **E)** Térmico Húmido 52°C; **F)** Térmico Húmido 55°C; **G)** Térmico Húmido 60°C; **H)** Etanol 50%; **I)** Etanol 60%; **J)** Etanol 70%.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no decorrer deste projeto são um primeiro passo para o desenvolvimento de novas estratégias de desinfecção tanto ao nível da água de rega como das sementes de *Pinus*. Contudo, testes adicionais ao nível do impacto dos tratamentos nas plantas e ensaios em contexto real são ainda necessários, antes destas estratégias poderem ser aplicadas pelos produtores de MFR.

Sendo o primeiro objetivo o de desenhar um tratamento capaz de eliminar esporos de *Fusarium circinatum* presentes em águas de rega, os ensaios desenvolvidos mostraram que vários tratamentos são capazes de tal, nomeadamente tratamento com hipoclorito de sódio a concentrações iguais ou superiores a 1% e também Desogerme a 1%. Embora testes adicionais sejam necessários para determinar o possível impacto destes tratamentos no crescimento das plantas com eles regadas, os resultados obtidos mostram que nenhum destes afetou negativamente a germinação de sementes de espécies de *Pinus*.

Ao nível da desinfecção das sementes de *Pinus*, os resultados obtidos mostram que as diferenças de tamanho e morfologia das sementes levam a diferentes eficácias na eliminação do patógeno para um mesmo tratamento, sugerindo a necessidade de tratamentos específicos para cada espécie. Ainda assim, o tratamento com Menoflorades 4% mostrou ser bastante eficaz tanto para *Pinus pinaster* como para *Pinus radiata*. Um aumento do tempo de atuação do tratamento de 60 para 120 minutos levou a que mostrasse igual eficácia em *Pinus pinea*, demonstrando o grande potencial deste novo fármaco enquanto desinfetante de sementes. Contudo, embora muito eficaz na eliminação de *Fusarium circinatum*, este tratamento aparentou ter um impacto negativo na germinação das sementes de *Pinus radiata*, pelo que não será o tratamento ideal para esta espécie. Outros tratamentos também foram capazes de alcançar 100% de desinfecção em duas espécies diferentes, como o tratamento térmico húmido a 60°C durante 15 minutos em *Pinus pinaster* e *Pinus radiata* ou etanol 60% em *Pinus radiata* e *Pinus pinea*. São então de realçar os seguintes tratamentos para a desinfecção total de *Fusarium circinatum* das sementes das seguintes espécies: para *Pinus pinaster*, incubação com Menoflorades 4% durante 60 minutos; para *Pinus radiata*, tratamento térmico húmido a 60°C durante 15 minutos; e para *Pinus pinea*, incubação com etanol a 60% durante 5 minutos. Todos estes tratamentos foram 100% eficazes na eliminação de *Fusarium circinatum* nas respetivas espécies sem se ter verificado que afetassem a germinação das sementes. Ensaios adicionais em *Pinus pinea* continuam a ser necessários após otimização do protocolo de inoculação das sementes com o patógeno de forma a diminuir o número de colónias fúngicas que crescem após

inoculação das sementes em meio e que dificultaram a detecção de *Fusarium circinatum* no decorrer dos ensaios. Testes adicionais da viabilidade das sementes após serem sujeitas aos tratamentos são ainda necessários e fica ainda por explorar o potencial de sinergia entre alguns tratamentos, como Mennoflorades 4% associado a um aumento de temperatura, algo já sugerido por Agustí-Brisach *et al.* (2012).

Ao longo dos ensaios de desinfecção das sementes, vários fungos foram isolados e a sua região ITS sequenciada. Da análise destes resultados surgiram vários isolados com potencial interesse, abrindo-se também aqui novas vias de investigação.

5. BIBLIOGRAFIA

5.1. Referências bibliográficas

- Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Berbegal, M. (2012). Efficacy of hot water treatment to reduce the incidence of *Fusarium circinatum* on *Pinus radiata* seeds. *Forestry* **85**, 629–635.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Bai, Z., Harvey, L. M. & Mcneil, B. (2003). Oxidative Stress in Submerged Cultures of Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* **23**, 267–302.
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F. & Amparo, P. (2009). First report of Pitch canker on Pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease* **93**: 1079
- Brockerhoff, E. G., Dick, M., Ganley, R., Roques, A., & Storer, A. J. (2016). Role of insect vectors in epidemiology and invasion risk of *Fusarium circinatum*, and risk assessment of biological control of invasive *Pinus contorta*. *Biological Invasions*, **18**(4), 1177–1190. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1059-8>
- Carlucci, A., Colatruglio, L. & Frisullo, S. (2007). First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease* **91**: 1683.
- Crous, P., Swart, L., & Coertze, S. (2001). The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S464-S466.
- Dao, T. & Dantigny, P. (2011). Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control* **22**, 360–368.
- Dwinell, L.D. & Fraedrich, S.W. (1999). Contamination of pine seeds by the pitch canker fungus. In Proceedings of the Forest and Conservation Nursery Associations, USDA, Forest Service, Southern Research Station, General Technical Reports SRS-25.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2009). *Gibberella circinata*. Diagnostics. *EPPO Bulletin* **39**: 298-309.
- Gardes, M. & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113–118.

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**(1): 9pp.
- He, D., Garg, S. & Waite, T. D. (2012). H₂O₂-Mediated Oxidation of Zero-Valent Silver and Resultant Interactions among Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Reactive Oxygen Species. *Langmuir* **28**, 10266–10275.
- Hepting, G. H. & Roth, E. R. (1946) Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry*, **44**, 724–744.
- ICNF. (2013). IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010. *6º Inventário Florestal Nacional*, **34**. Retrieved from <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/ficheiros/ifn/ifn6-resprelimv1-1>
- Iturrutxa, E. & Barredo, A. (2006). *Fusarium circinatum*, el hongo causante de la enfermedad del cancro resinoso. Departamento de Producción y Protección Vegetal. País Vasco. Basoko Teknika.
- Krebs, H. A., Wigginst, D. & Stubbs, M. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal* **07**, 657–663.
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., MéndezLodcs, S., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., Berbegal, M., Beltrán, R., García-Jiménez, J. & Armengol, J. (2005). Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Disease* **89**: 1015
- Lee, H. J., Choi, G. J. & Cho, K. Y. (1998). Correlation of Lipid Peroxidation in *Botrytis cinerea* Caused by Dicarbimide Fungicides with Their Fungicidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **8561**, 737–741.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- Liao, T., Ye, J., Chen, J., Han, Y., Wu, C. & An, Y. 2008 Biological characteristics of *Fusarium circinatum*. *J. Nanjing Forestry Univ.* **32**, 83–86.
- Macnish, A. J. *et al.* Sodium hypochlorite: A promising agent for reducing *Botrytis cinerea* infection on rose flowers. *Postharvest Biology and Technology* **58**, 262–267 (2010).
- Mansilla, P., Agúin, O., Pintos, C. & González, M. (2005). *F. circinatum*. Estación Fitopatológica do Areeiro. Servicio Agrario.

- Morse, A. M., Nelson, C. D., Covert, S. F., Holliday, A. G., Smith, K. E., & Davis, J. M. (2004). Pine genes regulated by the necrotrophic pathogen *Fusarium circinatum*. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**(5), 922–932. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1719-4>
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection* **26**, 697–705.
- Nelson, B. D. (1971). Action of the Fungicides Captan and Folpet on Rat Liver Mitochondria. *Biochemical Pharmacology* **20**, 737–748.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465- 493.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T. & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**: 61 -78.
- Paiva, D. S. C. S. (2011). Detecção de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell em coníferas da região central de Portugal. Retrieved from <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28053/1/Dissertação DPaiva 2011.pdf>
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., Leon, M., Berbegal, M., Garcia-Jiménez, J. & Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in Northern Spain. *Mycological Research* **111**: 832–839
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. & Gabelotto, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the casual agent of pitch canker from two California sites by using a real time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3512-3520.
- Solel, Z. & Bruck, R.I. (1990) Relation between wilt rate and obstruction of water flow in stems of two families of loblolly pine affected by pitch canker. *European Journal of Forest Pathology* **20**: 317-320.
- Swett, C. L., Reynolds, G. J., & Gordon, T. R. (2018). Infection without wounding and symptomless shoot colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, the cause of pitch canker. *Forest Pathology*, (January), 1–7. <https://doi.org/10.1111/efp.12422>

- Vieira, B., Carmona-Ribeiro, A. M., Sa, U. De, Lineu, A. & Butanta, P. (2006). Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 760–767.
- White, T., Burns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylo-genetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (M.A. Innis, Ed.), Academic Press, New York, USA, 315–322.
- Wingfield, M. J., Hammerbacher, A., Ganley, R. J., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., & Coutinho, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - A growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, **37**(4), 319–334. <https://doi.org/10.1071/AP08036>
- Yan, K. & Dickman, M.B. (1993). Sensitivity of field strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) to benomyl and hygromycin B. *Mycologia* **85**: 206-213.

5.2. Referências online

- (i) <https://jornaleconomico.sapo.pt/noticias/industria-de-pinho-em-portugal-e-deficitaria-em-43-209841> (visitado pela última vez a 16/06/19)
- (ii) <https://www.publico.pt/2017/11/10/sociedade/noticia/2017-foi-o-ano-em-que-mais-ardeu-nos-ultimos-dez-anos--quatro-vezes-mais-que-o-habitual-1792180> (visitado pela última vez a 16/06/19)
- (iii) <https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI> (visitado pela última vez a 16/06/19)
- (iv) <http://www2.icnf.pt/portal/florestas/prag-doe/ag-bn/cancro-resinoso-pinheiro> (visitado pela última vez a 16/06/19)