

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**ENVOLVIMENTO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* NO DECLÍNIO
DE *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE
FACTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA PROGRESSÃO DA DOENÇA.
POSSIBILIDADES DE CONTROLO QUÍMICO DO DECLÍNIO**

Tese para a obtenção do grau de doutor no ramo de Ciências Agrárias,
especialidade de Protecção de Plantas

PAULA CRISTINA LUCAS CAETANO

Orientador: Professor Catedrático José Ferreira Pereira Ferraz, Universidade do Algarve
Co-orientador: Professora María Esperanza Sánchez Hernández, Universidad de Córdoba

Constituição do Júri

Presidente: Reitor da Universidade do Algarve

Vogais: Professor Catedrático Antonio Trapero Casas, Universidad de Córdoba

Professor Catedrático Carlos Alberto Gomes de Abreu,
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Professora Catedrática Joana Maria Canelhas Palminha Duclos,
Universidade Técnica de Lisboa

Professor Associado Gustavo Nuno Barbosa Nolasco,
Universidade do Algarve

Professora Associada Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida,
Universidade Técnica de Lisboa

À minha Família

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, não posso deixar de lembrar e agradecer a quem de uma ou outra forma fizeram possível a sua realização.

Em primeiro lugar recordo o Eng.º Herculano Brito de Carvalho, infelizmente já desaparecido de entre nós, que, quando era ainda estudante de licenciatura, me perguntou se queria estudar o problema do sobreiro e fazer o meu estágio nesse tema. Desde então e, com exceção de pequenos períodos, em que devido a circunstâncias da vida tive outros interesses, nunca mais deixei o sobreiro. Recordo-o com saudade ...

Pela mesma altura, conheci o Prof. Doutor José Ferraz que foi meu orientador de estágio e depois de doutoramento. Com ele aprendi muito e, é sempre um prazer desfrutar da sua companhia. Expresso todo o meu apreço pela sugestão do tema de trabalho, entusiasmo e dedicação, bem como pela revisão crítica do mesmo.

Mais tarde, conheci a Doutora Esperanza Sánchez, que viria a ser também minha orientadora de doutoramento na Universidade de Córdoba, a quem agradeço pela possibilidade de ter trabalhado nessa universidade, pelo seu entusiasmo, disponibilidade, paciência, ânimo e ajuda, sem a qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Recordo também o Sr. Manuel Martins, da extinta Administração Florestal do Algarve, com quem aprendi muito sobre o sobreiro, nas muitas deslocações ao campo no Algarve.

Muitas outras pessoas tornaram possível a realização deste trabalho e às quais manifesto o meu reconhecido agradecimento.

Ao Prof. Doutor Alfredo Cravador da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, pelo seu entusiasmo sobre o tema e ânimo que sempre demonstrou.

Ao Prof. Doutor António Trapero da Universidade de Córdoba por ter-me aceitado no Departamento de Agronomia da “Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes” da Universidade de Córdoba e pela amabilidade demonstrada.

Ao Prof. Doutor Afonso Martins da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro pela ajuda e apoio prestado no estudo de campo e análises pedológicas.

Ao Eng.º António Luigi da LLT Agro Lda. pela preparação dos produtos químicos para tratamento de sobreiros.

Aos técnicos da Associação de Produtores Florestais da Serra do Caldeirão (APFSC) pela ajuda no tratamento dos sobreiros no campo e pela sua amizade.

À Doutora Ana Cristina Coelho da Universidade do Algarve pela ajuda prestada no laboratório e momentos passados.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório na Universidade do Algarve, Dina, Marília, Nelson, por compartilhar comigo os bons e maus momentos e pela ajuda e sugestões. Agradeço em especial à Dina pela sua amizade, disponibilidade e ânimo com que sempre me presenteou.

A todos os membros da Unidade de Patologia Vegetal, do Departamento de Agronomia da ETSIAM da Universidade de Córdoba, e a todos os que por lá passaram, pelo grato acolhimento, apoio e ânimo que demonstraram, ... ¡ MUCHAS GRACIAS por todo!

À Angjelina Belaj pela sua amizade, ânimo e ajuda quando tudo parecia perdido.... Muito obrigada, por sempre estar aí ...! Sem ela teria sido ainda mais difícil finalizar esta tese.

A todos os amigos, de muitas parte do Mundo, que conheci em Córdoba e não esqueço, e com quem compartilhei inolvidáveis vivências, fazendo agradáveis e leves os momentos mais difíceis, ... ¡ MUCHAS GRACIAS A VOSOTROS!

Às amigas Emília Lúcia e Julieta, pelo ânimo e disponibilidade que sempre demonstraram.

A todos os amigos que sempre me acompanharam.

A Behailu por ter chegado à minha vida, ...!

Por último quero expressar o meu agradecimento aos meus pais, irmãos, cunhados e sobrinha, por estarem sempre aí, com carinho, paciência e apoio ... por eles esta tese chegou ao fim.

.... MUITO OBRIGADA!

Este trabalho foi financiado pela bolsa atribuída pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, com a referência SFRH/BD/1089/2000 e pelos projectos de investigação: PRAXIS XXI (Ref. 3/3.2/FLOR/2112/95); CICYT (AGL 2002-00530); INTERREG III; LEADER+.



NOME: Paula Cristina Lucas Caetano

FACULDADE: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

ORIENTADOR: Professor Doutor José Ferreira Pereira Ferraz (Universidade do Algarve)

CO-ORIENTADOR: Professora Doutora María Esperanza Sánchez Hernández

(Universidade de Córdoba)

DATA: 2007

TITULO DA TESE:

Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*: estudo da influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio

RESUMO

Estudou-se a evolução do declínio de sobreiros (*Quercus suber*) e azinheiras (*Q. rotundifolia*) em Portugal e na província de Andaluzia em Espanha. A observação do sistema radicular das árvores afectadas, revelou muitas raízes necróticas e elevadas percentagens de raízes absorventes mortas. Das raízes, assim como do solo associado, isolou-se o oomicete *Phytophthora cinnamomi*, patogénio radicular de numerosas espécies lenhosas, entre as quais se encontram espécies mediterrâneas do género *Quercus*.

Registou-se, em diferentes condições edafo-climáticas, a progressão da incidência e da severidade do declínio de *Q. suber*, que aumentaram progressivamente, ao longo de 5 anos.

O estudo de crescimento *in vitro* dos isolamentos de *P. cinnamomi* obtidos nas prospecções em sobreirais e montados, permitiu determinar temperaturas óptimas de crescimento bastante elevadas (26.9 – 30,1°C).

O desenvolvimento da infecção por *P. cinnamomi* foi mais severo em condições de permanente saturação hídrica do solo. A temperatura não influenciou a infecção. O método semi-quantitativo da avaliação visual de sintomas foi o que melhor expressou a severidade da doença, pois permitiu examinar a funcionalidade das raízes, que não era possível ser detectada com os métodos quantitativos ensaiados.

Avaliou-se o efeito de diferentes substâncias químicas no controlo da infecção em sobreiros e azinheiras jovens e sobreiros adultos, tendo-se verificado uma grande variabilidade de eficácia entre si.

Palavras-chave: *Phytophthora cinnamomi*, *Quercus suber*, *Q. rotundifolia*, declínio, controlo químico

***Phytophthora cinnamomi* in the decline of *Quercus suber* and *Q. rotundifolia*: influence of biotic and abiotic factors on the progression of the disease. Attempt of chemical control**

ABSTRACT

The evolution of the cork oak (*Quercus suber*) and holm oak (*Q. rotundifolia*) decline disease was studied in Portugal and Andalucia region in Southern Spain. The observation of the root system of the affected trees revealed many necrotic roots and high percentage of dead feeder roots. From the roots and the associated soil, *Phytophthora cinnamomi*, was isolated. This oomycete is a root pathogen of numerous woody species, among which is Mediterranean *Quercus* spp.

The progression and incidence of the disease severity of *Q. suber*, in different edafo-climatic conditions increased gradually throughout 5 years.

In vitro studies with isolates of *P. cinnamomi* showed high optimal growth temperatures (26.9 – 30,1°C).

The development of the infection by *P. cinnamomi* was more severe in conditions of permanent water soil saturation. The temperature did not influence the infection. The half-quantitative method of the visual evaluation of symptoms was the better to express the severity of the disease. This method allowed evaluating the functionality of the roots which was not possible to be detected with the assayed quantitative methods.

The capacity to control infection by different chemical substances was evaluated in young cork and holm oak plants and in adult cork oak trees. There was a great variability of effectiveness among them.

Key-words: *Phytophthora cinnamomi*, *Quercus suber*, *Q. rotundifolia*, decline, chemical control

ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vii

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O SOBREIRO E A AZINHEIRA	3
1.1.1. Distribuição	4
1.1.2. Importância dos montados de sobreiro e azinho	7
1.2. O DECLÍNIO DE ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS	9
1.2.1. Sintomatologia associada	13
1.2.2. O declínio do género <i>Quercus</i>	13
1.2.3. O declínio de <i>Quercus</i> na Península Ibérica	15
1.2.3.1. Sintomatologia em sobreiros e azinheiras	18
1.2.4. Doenças associadas ao declínio de <i>Quercus</i> na Península Ibérica	21
1.2.4.1. Cancros causados por fungos e bactérias	21
1.2.4.2. Destruição do sistema radicular	23
1.3. A ESPÉCIE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	25
1.3.1. Caracterização morfológica	26
1.3.2. Caracterização patogénica	28
1.4. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	31
1.4.1. Medidas preventivas	33
1.4.2. Medidas de controlo onde a doença existe	37
1.5. OBJECTIVOS	41

CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* E MONITORIZAÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA DO DECLÍNIO EM POVOAMENTOS DE SOBREIRO

2.1. INTRODUÇÃO	45
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.2.1. Zonas de estudo	48
2.2.2. Avaliação do estado sanitário das árvores e sintomatologia geral da doença	49
2.2.3. Obtenção de isolamentos	50
2.2.4. Progressão do declínio de <i>Quercus suber</i> em Portugal	53
2.2.5. Análise estatística	56
2.3. RESULTADOS	56
2.3.1. Prospecção da doença	56
2.3.2. Sintomatologia da doença	61
2.3.3. Progressão do declínio de <i>Quercus suber</i> em Portugal	64
2.4. DISCUSSÃO	72

CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA* SPP. ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DE *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

3.1. INTRODUÇÃO	79
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	79

3.2.1. Isolamentos utilizados	79
3.2.2. Morfologia das colónias	81
3.2.3. Caracterização de estruturas reprodutivas assexuadas	81
3.2.4. Caracterização de estruturas reprodutivas sexuadas	82
3.2.5. Taxa de crescimento a diferentes temperaturas	83
3.2.6. Análise estatística	84
3.3. RESULTADOS	85
3.3.1. Morfologia da colónia	85
3.3.2. Caracterização das estruturas vegetativas	86
3.3.3. Caracterização das estruturas reprodutivas assexuadas	87
3.3.4. Caracterização das estruturas reprodutivas sexuadas	89
3.3.5. Taxa de crescimento a diferentes temperaturas	91
3.3.6. Identificação dos isolamentos	98
3.4. DISCUSSÃO	99

CAPÍTULO 4: PATOGENICIDADE DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

4.1. INTRODUÇÃO	105
4.2. EXPERIÊNCIAS SOBRE PATOGENICIDADE	107
4.2.1. Efeito do método de infestação em <i>Quercus suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> (<i>Experiência 4.A</i>) ...	107
4.2.1.1. Infestação com inóculo sólido	108
4.2.1.2. Infestação com inóculo em suspensão aquosa	109
4.2.1.3. Condições de desenvolvimento da experiência	110
4.2.1.4. Avaliação da severidade de sintomas	110
4.2.1.5. Reisolamento do patógeno a partir de raízes	111
4.2.1.6. Delineamento experimental e análise estatística	111
4.2.1.7. Resultados	111
4.2.2. Métodos de avaliação da severidade de sintomas e influência do tipo de substrato na infecção de sobreiros e azinheiras por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	114
4.2.2.1. Infestação das plantas sem remoção da terra das raízes, em abrigo (<i>Experiência 4.B</i>)	114
4.2.2.2. Infestação das plantas com remoção da terra das raízes, em abrigo (<i>Experiência 4.C</i>)	119
4.2.2.3. Infestação das plantas com remoção da terra das raízes, em estufa (<i>Experiência 4.D</i>)	121
4.2.3. Patogenicidade dos isolamentos de diferentes grupos morfológicos em <i>Quercus suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> (<i>Experiência 4.E</i>)	124
4.2.4. Desenvolvimento de um método rápido para o estudo da patogenicidade de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	126
4.2.4.1. Avaliação da susceptibilidade à infecção de espécies de <i>Lupinus</i> crescendo numa mistura de areia, limo e turfa (<i>Experiência 4.F</i>)	127
4.2.4.2. Avaliação da susceptibilidade à infecção de <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em cultura hidropónica (<i>Experiência 4.G</i>)	130
4.2.4.3. Avaliação da susceptibilidade à infecção de <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em vermiculite (<i>Experiência 4.H</i>)	133
4.2.5. Influência da concentração de inóculo na severidade de sintomas em <i>Quercus suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> (<i>Experiência 4.I</i>)	135
4.3. DISCUSSÃO	139

CAPÍTULO 5: EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS NA SEVERIDADE DE SINTOMAS CAUSADOS POR *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

5.1. INTRODUÇÃO	147
5.2. EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS	149
5.2.1. Influência da temperatura na severidade de sintomas em azinheiras (<i>Experiência 5.A</i>)	149

5.2.2. Influência do teor de água no solo na severidade de sintomas em <i>Quercus suber</i> e <i>Q. rotundifolia</i> (Experiência 5.B)	152
5.3. DISCUSSÃO	155

CAPÍTULO 6: CONTROLO QUÍMICO DO DECLÍNIO

6.1. INTRODUÇÃO	159
6.2. EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> (Experiência 6.A).....	165
6.3. ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS <i>IN VIVO</i>	168
6.3.1. Controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em <i>Lupinus albus</i> (Experiência 6.B)	168
6.3.2. Controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em sobreiros e azinheiras (Experiência 6.C)	171
6.3.3. Controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em sobreiros e azinheiras infestados com uma concentração 2,5 x (Experiência 6.D)	173
6.3.4. Controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em sobreiros e azinheiras submetidos a encharcamento contínuo (Experiência 6.E)	175
6.3.5. Controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em sobreiros e azinheiras submetidos a encharcamento 2 dias sucessivos por semana (Experiência 6.F)	178
6.3.6. Efeito da aplicação de sais potássicos de fosfitos e de fosfatos no controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Experiência 6.G)	180
6.3.7. Efeito de dois métodos de aplicação de substâncias químicas no controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em sobreiros submetidos a encharcamento 2 dias sucessivos por semana (Experiência 6.H)	185
6.3.8. Efeito da aplicação de substâncias químicas por injeções no tronco em sobreiros adultos (Experiência 6.I)	189
6.4. DISCUSSÃO	192

CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ÍNDICE de FIGURAS

	Páginas
Figura 1.1 -Distribuição do sobreiro no Mundo	5
Figura 1.2 -Distribuição da azinheira no Mundo	6
Figura 1.3 -Factores implicados nos declínios florestais	10
Figura 1.4 -Modelo em espiral do declínio	11
Figura 1.5 -Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	30
Figura 2.1 -Distribuição das zonas de estudo em Portugal e Andaluzia (Espanha)	49
Figura 2.2 -Distribuição das parcelas de estudo em Portugal	54
Figura 2.3 -Sintomatologia associada ao declínio do sobreiro e da azinheira	62
Figura 2.4 -Distribuição de árvores afectadas	63
Figura 2.5 -Percentagem de árvores em cada uma das classes de desfoliação ao longo de cinco avaliações efectuadas nas doze parcelas de estudo	66
Figura 2.6 -Flutuações mensais de precipitação, temperatura máxima e mínima registadas nas cinco estações meteorológicas mais próximas das parcelas de estudo, com indicação do mês da recolha de amostras (solo e raiz) e resultado da sua análise	71
Figura 3.1 -Morfologia das colónias aos 4 dias de crescimento a 20°C em meio de cultura CMA e CA	85
Figura 3.2 -Tipo de micélio dos isolamentos estudados	86
Figura 3.3 -Clamidósporos dos isolamentos do grupo "B"	87
Figura 3.4 -Esporângios produzidos em meio líquido de extracto de solo	88
Figura 3.5 -Gametângios produzidos em cultura dupla a 22°C em meio cultura de extracto de cenoura-agar (CA)	90
Figura 3.6 -Curvas de crescimento dos isolamentos nos meios de cultura CMA e CA	98
Figura 4.1 -Sintomas na parte aérea e radicular em plantas de sobreiro e azinheira infectadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	112
Figura 4.2 -Experiência de patogenicidade em abrigo	116
Figura 4.3 -Câmara húmida com sementes de <i>Lupinus</i> spp.	127
Figura 4.4 - <i>Lupinus albus</i> em cultura hidropónica	131
Figura 4.5 -Sintomatologia nas plantas de <i>Lupinus albus</i> que se desenvolveram em vermiculite	134
Figura 4.6 -Aspecto geral das plantas na câmara de crescimento	135
Figura 4.7 -Sintomas nas plantas infestadas com diferentes concentrações de zoósporos	137
Figura 4.8 -Influência da concentração de zoósporos na severidade de sintomas nas raízes de plantas de sobreiro e azinheira com 18 meses	139
Figura 5.1 -Plantas em vermiculite dentro da incubadora	150
Figura 6.1 -Diâmetro da colónia dos isolamentos PA ₂₀ e PE ₁₃ ao longo de 5 dias de crescimento em meio de cultura Corn Meal Agar (CMA) com várias substâncias químicas	167
Figura 6.2 -Pulverização de sobreiros e azinheiras com fosfito de potássio	182
Figura 6.3 -Sintomatologia das plantas ao fim de 1 ano do início da experiência. Plantas de sobreiro e azinheira previamente tratadas com sais potássicos de fosfitos e de fosfatos e posteriormente pulverizadas com fosfito de potássio	183
Figura 6.4 -Aspecto geral das plantas na estufa	186
Figura 6.5 -Sintomatologia dos sobreiros tratados por dois métodos de aplicação de substâncias químicas para controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	188
Figura 6.6 -Sobreiro adulto tratado com duas injecções	190
Figura 6.7 -Índice de desfoliação médio dos sobreiros tratados com injecções no tronco	191

ÍNDICE de TABELAS

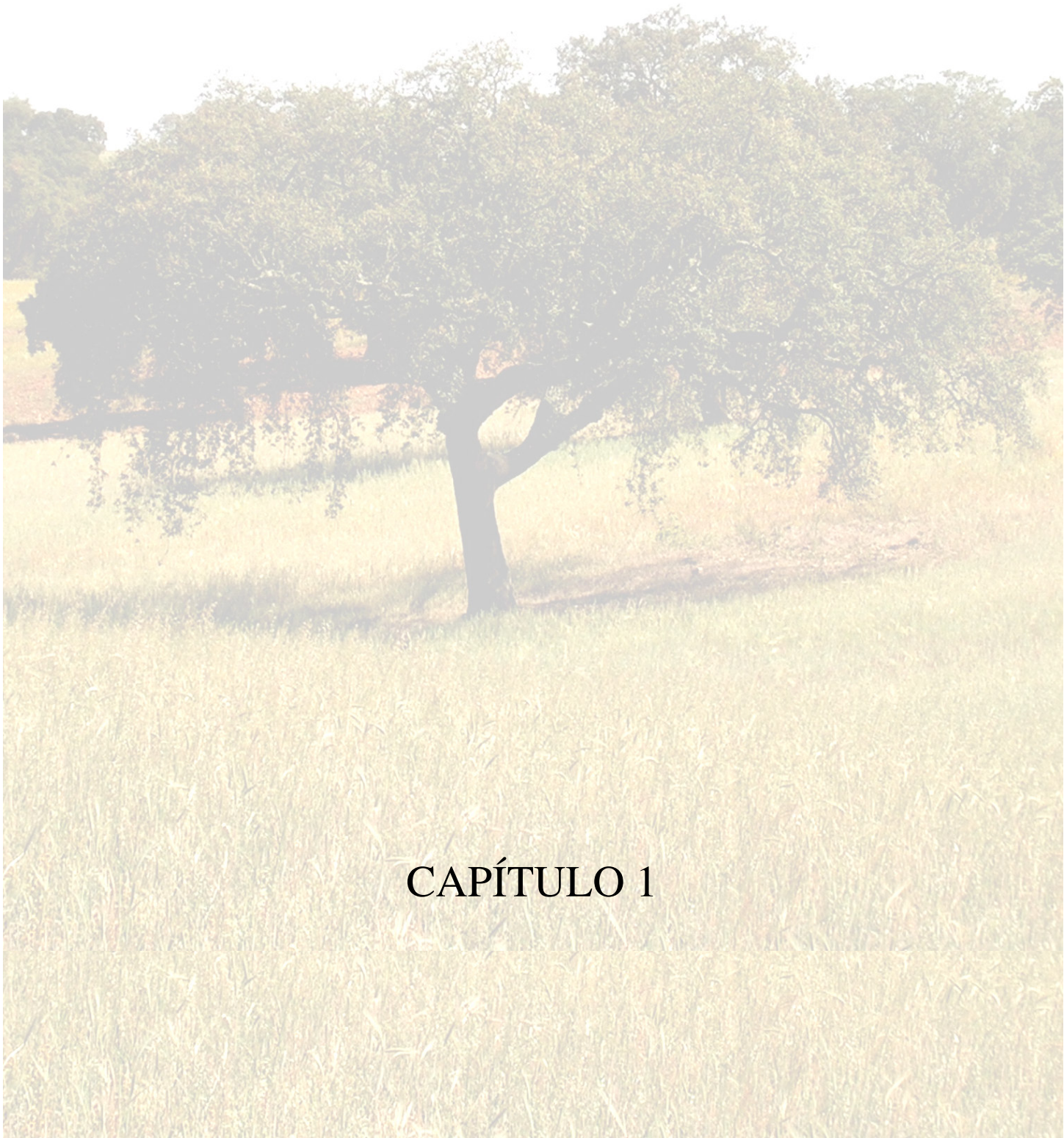
	Páginas
Tabela 2.1 - Parcelas para o estudo da progressão do declínio de <i>Quercus suber</i> em Portugal	54
Tabela 2.2 - Prospecção de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	57
Tabela 2.3 - Área, número de sobreiros e densidade nas parcelas de estudo	64
Tabela 2.4 - Características topográficas, físicas e químicas dos solos das parcelas de estudo	64
Tabela 2.5 - Índice de desfoliação médio dos sobreiros nas parcelas de estudo	65
Tabela 2.6 - Índice de desfoliação média, teor de humidade média do solo e percentagem de isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> obtidas nas parcelas de estudo	70
Tabela 3.1 - Isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. utilizados na caracterização morfológica	80
Tabela 3.2 - Dimensões dos esporângios produzidos pelos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio líquido de extracto de solo	89
Tabela 3.3 - Dimensões das estruturas sexuadas dos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA)	91
Tabela 3.4 - Taxas de crescimento máximo (mm/dia) dos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio de cultura <i>Corn Meal Agar</i> (CMA) a diferentes temperaturas	92
Tabela 3.5 - Taxas de crescimento máximo (mm/dia) dos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA) a diferentes temperaturas	93
Tabela 3.6 - Ajuste de regressão, temperatura óptima e taxa máxima de crescimento dos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio de cultura <i>Corn Meal Agar</i> (CMA)	95
Tabela 3.7 - Ajuste de regressão, temperatura óptima e taxa máxima de crescimento dos isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA)	96
Tabela 4.1 - Escala para avaliação da severidade de sintomas nas plantas	110
Tabela 4.2 - Efeito do método de infestação na patogenicidade de isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira	113
Tabela 4.3 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira sem remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em abrigo	117
Tabela 4.4 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira com remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em abrigo	120
Tabela 4.5 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira com remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em estufa	122
Tabela 4.6 - Quantidade de inóculo utilizada para infestar plantas jovens de sobreiro e azinheira	124
Tabela 4.7 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira causada por isolamentos de <i>Phytophthora</i> spp. de três grupos morfológicos	126
Tabela 4.8 - Efeito da infestação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> na germinação de sementes de <i>Lupinus albus</i> e <i>L. angustifolius</i>	129
Tabela 4.9 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de <i>Lupinus albus</i> e <i>L. angustifolius</i> desenvolvendo-se numa mistura de areia, limo e turfa	129
Tabela 4.10 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em cultura hidropónica	132
Tabela 4.11 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em vermiculite	134
Tabela 4.12 - Efeito da concentração de zoósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> na manifestação de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira, desenvolvendo-se em vermiculite	138
Tabela 5.1 - Efeito da temperatura no processo de infecção e na severidade de sintomas em plantas jovens de azinheira	151
Tabela 5.2 - Valores médios da severidade de sintomas em sobreiros e azinheiras submetidos a saturação constante e a rega normal	154

Tabela 6.1	- Formulação dos produtos ensaiados e concentração de substância activa	165
Tabela 6.2	- Efeito de substâncias químicas no crescimento das colónias de PA ₂₀ e PE ₁₃	167
Tabela 6.3	- Substâncias químicas e doses aplicadas em plantas de <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em vermiculite	169
Tabela 6.4	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em <i>Lupinus albus</i> desenvolvendo-se em vermiculite	170
Tabela 6.5	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com 13.000 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite	172
Tabela 6.6	- Substâncias químicas e doses aplicadas em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com 32.500 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite	173
Tabela 6.7	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com uma concentração de 32.500 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite	174
Tabela 6.8	- Substâncias químicas e doses aplicadas às plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento contínuo	176
Tabela 6.9	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento contínuo	177
Tabela 6.10	- Substâncias químicas e doses aplicadas às plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana	178
Tabela 6.11	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana	179
Tabela 6.12	- Substâncias químicas e doses aplicadas quinzenalmente a plantas jovens de sobreiro e azinheira, durante 2 meses e meio	181
Tabela 6.13	- Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro e azinheira tratadas com sais potássicos de fosfitos e de fosfatos	183
Tabela 6.14	- Substâncias activas, tipo de aplicação e doses aplicadas mensalmente a plantas jovens de sobreiro, durante 3 meses	186
Tabela 6.15	- Efeito de substâncias químicas e tipo de aplicação no controlo da infecção por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de sobreiro submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana	187

ÍNDICE de ANEXOS

	Páginas
Anexo I - DISTRIBUIÇÃO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	231
Anexo II - PROGRESSÃO DO DECLÍNIO DE <i>QUERCUS SUBER</i> EM PORTUGAL	233
Tabela AII.1. Classe de desfoliação das árvores nas parcelas de estudo	233
Tabela AII.2. Correlação entre o isolamento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , parâmetros de solo e variáveis meteorológicas	236
Anexo III - ANÁLISE DE VARIÂNCIA E COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DAS DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DOS ISOLAMENTOS DE <i>PHYTOPHTHORA</i>	237
Anexo IV - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TAXA DE CRESCIMENTO (mm/dia) DOS ISOLAMENTOS DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP. DESENVOLVIDOS EM MEIO DE CULTURA CA E CMA A VÁRIAS TEMPERATURAS	245
Anexo V - PATOGENICIDADE DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i>	259
A. EFEITO DO MÉTODO DE INFESTAÇÃO EM <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i>	259
B. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DE SINTOMAS E INFLUÊNCIA DO TIPO DE SUBSTRATO NA INFECÇÃO DE SOBREIROS E AZINHEIRAS POR <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	264
B.1. Infestação de plantas sem remoção da terra das raízes, em abrigo	264
B.2. Infestação de plantas com remoção da terra das raízes, em abrigo	272
B.3. Infestação de plantas com remoção da terra das raízes, em estufa	280
C. PATOGENICIDADE DE ISOLAMENTOS DE DIFERENTES GRUPOS MORFOLÓGICOS EM <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i>	287
D. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>LUPINUS</i> CRESCENDO NUMA MISTURA DE AREIA, LIMO E TURFA	290
E. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA ½ DE HOAGLAND	292
F. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i>	293
Anexo VI - EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS NA INFECÇÃO DO SISTEMA RADICULAR DE <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i> POR <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	297
A. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM AZINHEIRAS	297
B. INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO SOLO NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM <i>QUERCUS SUBER</i> E <i>Q. ROTUNDIFOLIA</i>	300
Anexo VII - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLAMENTOS DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> PA ₂₀ E PE ₁₃ EM MEIO DE CULTURA CMA	303
Anexo VIII - CONTROLO QUÍMICO DO DECLÍNIO	307
A. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM <i>LUPINUS ALBUS</i>	307
B. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM SOBREIROS E AZINHEIRAS INFESTADOS COM 13.000 zoósporos/ml, DESENVOLVENDO-SE EM VERMICULITE	308
C. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM SOBREIROS E AZINHEIRAS, INFESTADOS COM 32.500 zoósporos/ml, DESENVOLVENDO-SE EM VERMICULITE	309
D. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM SOBREIROS E AZINHEIRAS SUBMETIDOS A ENCHARCAMENTO CONTINUO	310

E. CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM DE SOBREIROS E AZINHEIRAS SUBMETIDAS A ENCHARCAMENTO 2 DIAS SUCESSIVOS POR SEMANA	312
F. EFEITO DA APLICAÇÃO DE SAIS POTÁSSICOS DE FOSFITOS E DE FOSFATOS NO CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i>	314
F.1. PLANTAS COM 6 MESES	314
F.2. PLANTAS COM 12 MESES	316
G. EFEITO DE DOIS MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO CONTROLO DE <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> EM SOBREIROS SUBMETIDOS A ENCHARCAMENTO 2 DIAS SUCESSIVOS POR SEMANA	319
H. EFEITO DA APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS POR INJEÇÃO NO TRONCO EM SOBREIROS ADULTOS	321



CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O SOBREIRO E A AZINHEIRA

O sobreiro (*Quercus suber* L.) e a azinheira (*Q. rotundifolia* Lam.) são espécies tipicamente mediterrâneas. Ambas pertencem à ordem Fagales, família Fagaceae e género *Quercus*. Este género possui mais de 600 espécies distribuídas pelo hemisfério Norte, sendo um dos mais extensos da família Fagaceae (Samuel *et al.* 1998).

O sobreiro é uma planta essencialmente alogâmica (Natividade 1950). Raramente tem mais de 25 m de altura (Montoya-Oliver 1988) e apresenta tronco mais ou menos sinuoso. As folhas são simples, alternas, persistentes, coriáceas, de forma variada, com 5-7 pares de nervuras secundárias (Natividade 1950; Cela *et al.* 1998). Floresce e frutifica a partir dos 15-20 anos. É uma espécie monóica. Os frutos (glande) são oblongos e a frutificação é alternada. Possui raiz aprumada a partir da qual se desenvolvem raízes laterais que se ramificam, dando origem às radículas e possibilitando grande expansão no sentido horizontal.

O sobreiro é a única espécie do género *Quercus* que possui felogéneo, produtor de tecido suberoso (cortiça) que envolve o tronco e os ramos, possuindo a capacidade de o regenerar indefinidamente quando lho retiram. A cortiça é constituída essencialmente por suberina, e em menor proporção por celulose, taninos, lenhina, ceras e outros polissacáridos que lhe conferem propriedades químicas, físicas e mecânicas únicas (Natividade 1950). Nos ramos jovens apresenta um aspecto liso mas ao crescer vai progressivamente abrindo sulcos. O sobreiro é uma espécie de vida longa podendo atingir os 500 anos. No entanto, a idade limite da cultura económica do sobreiro é de 150-200 anos, uma vez que depois desta idade, a produção de cortiça decai muito em qualidade e em espessura (Natividade 1950; Gil 2005).

A azinheira tem um porte variável, podendo alcançar os 25 m, embora na maioria das vezes, e geralmente pela acção do homem, não supera os 10-12 m (Navarro e Fernández 2000). Os ramos são abertos e cobertos por uma casca acinzentada ou parda espessa e com sulcos pouco profundos. As folhas são simples, persistentes, coriáceas, dispostas alternadamente, de forma muito variável, com 5 a 8 pares de nervuras laterais (*Ibidem*). São plantas monóicas. O fruto é a bolota que tem forma oval. Frutifica a partir dos 8-10 anos (*Ibidem*). A casca do tronco jovem, as folhas e as

bolotas são ricas em taninos. A raiz é muito profunda, pivotante e de rápido crescimento inicial (*Ibidem*), ao princípio quase sem ramificações, desenvolvendo depois raízes secundárias, grossas e profundas (Moro 1995). Tem a capacidade de emitir rebentos. A azinheira tem uma grande longevidade podendo encontrar-se exemplares com mais de 700 anos (Navarro e Fernández 2000).

O nome científico da azinheira é uma questão pertinente. Os romanos chamavam “*illex*” à azinheira e Linneu manteve este nome quando descreveu a espécie em 1753 (Cela *et al.* 1998). Actualmente, para alguns botânicos a azinheira compreende duas sub-espécies: *Q. illex* L. subsp. *illex*, com folhas lanceoladas e uma distribuição litoral ou sublitoral no norte de Espanha e Europa; e *Q. illex* L. subsp. *rotundifolia* (Lam.), também designada *Q. illex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp que se encontra no interior da Península Ibérica e apresenta folhas mais arredondadas e bolotas mais doces (Tutin 1993; Cela *et al.* 1998). Outros botânicos consideram *Q. rotundifolia* como uma espécie diferente de *Q. illex* e não como uma sub-espécie (Garcia-Rollan 1981). Pensa-se que *Q. rotundifolia* por dar as bolotas mais doces foi difundida pelo homem em lugares onde só havia *Q. illex* e actualmente é possível encontrar exemplares com características intermédias de uma e outra espécie. Ou, sendo a mesma espécie, sofreram diferentes adaptações em distintos ambientes e posteriormente foram misturadas pelo ser humano. Lebreton *et al.* (2001) referem que a extensão ecológica e a variabilidade biológica de *Q. illex* é tão complexa que é perigoso fazer qualquer caracterização sistemática. Estes autores estudaram a variabilidade de azinheiras provenientes de onze locais representativos da região mediterrânea ocidental pela determinação de dados químicos e morfológicos. Os resultados obtidos reflectem a existência de um elevado índice de polimorfismo, tal como o encontrado por Coelho *et al.* (2006a). Como conclusão Lebreton *et al.* (2001) consideram as azinheiras como um complexo específico *Quercus* aggr. *illex* L. que compreende duas espécies diferentes, *Q. illex* presente em França e Itália e *Q. rotundifolia* Lam. emend., presente na Península Ibérica e constituída por uma subespécie nova denominada *Q. rotundifolia* subsp. *maghrebiana* presente no Norte de África.

1.1.1. Distribuição

A distribuição do sobreiro e da azinheira está condicionada directa ou indirectamente por acções antrópicas. Ao longo do tempo, principalmente factores sociais e económicos, delinearão a área ocupada por estas espécies, nem sempre atendendo às suas preferências edafo-climáticas (Natividade 1950).

Quercus suber é uma espécie endémica do Sudoeste da Europa (Portugal, Espanha, Sul de França, Itália e Noroeste da antiga Jugoslávia) e Norte de África (zonas de influência mediterrânica - Marrocos, Argélia e Tunísia). A área mundial ocupada pela floresta de sobreiro ronda os

2.000.000 ha, situando-se 58% no Sudoeste da Europa e 42% no Maghreb, correspondendo a maior área de sobreiro a Portugal com cerca de 35-40% do total (Gil 2005).

O clima típico para a vegetação do sobreiro é o de transição entre características atlânticas e características mediterrâneas, sem grandes oscilações térmicas anuais, com estiagens prolongadas e humidade atmosférica relativamente elevada (Natividade 1950). A Figura 1.1 mostra a área de distribuição desta espécie e a clara preferência do sobreiro pela zona atlântica. O sobreiro adapta-se bem a vários tipos de solo, preferindo solos ácidos, não tolerando solos calcários nem salinos e suportando mal o excesso de água, quando retida persistentemente no solo (*Ibidem*; Gil 2005). Desenvolve-se em terrenos arenosos, não calcários, com pH entre 5 e 7 e em terrenos esqueléticos e muito pouco férteis.

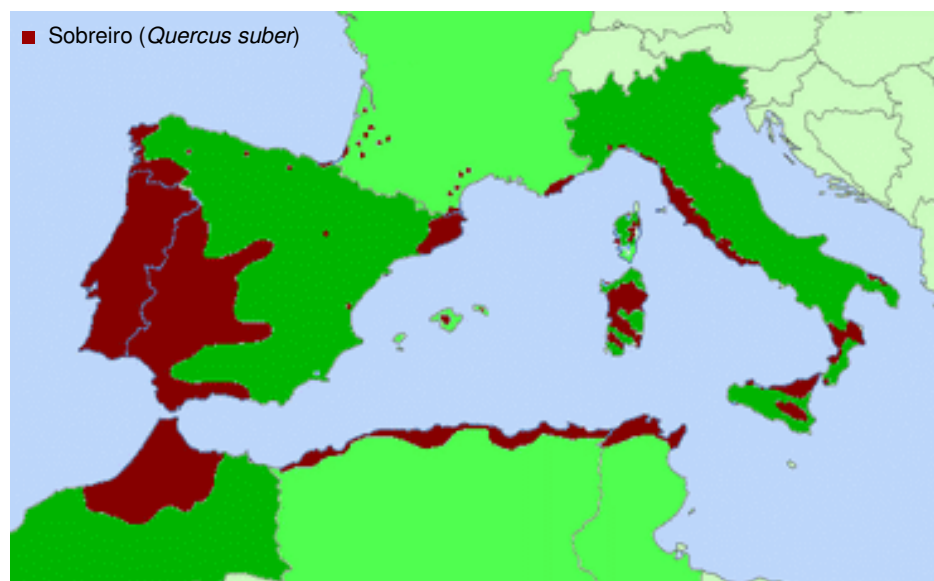


Figura 1.1 - Distribuição do sobreiro no Mundo.

Fonte: www.7decopas.com.ar/corcho2.htm

Em Portugal o sobreiro encontra-se por todo o território continental, em povoamentos puros e mistos. Ocupa uma área aproximada de 713.000 ha em povoamentos puros e mistos dominantes, e 140.000 ha de povoamentos mistos dominados e arvoredo disperso, representando 22% da área arborizada florestal nacional (Anónimo 2001a). Nos últimos anos muitos dos sobreiros foram substituídos por eucaliptos, no entanto, tem vindo a verificar-se um aumento da área ocupada por sobreiro em zonas em que a cultura agrícola tem sido abandonada e a regeneração natural devidamente protegida (Gil 2005).

Em Espanha, a área de sobreiro para povoamentos puros e mistos estima-se em cerca de 500.000 ha (*Ibidem*). As regiões de Andaluzia e Estremadura concentram aproximadamente 80% da área suberícola de Espanha (*Ibidem*).

A área de distribuição da azinheira é mais vasta que a do sobreiro, estendendo-se mais para Leste, passando por Chipre, Grécia e Mar Negro (Monteiro 1958) (Figura 1.2). Ao contrário do sobreiro, a azinheira mostra uma clara preferência por climas de influência mais continental. A azinheira suporta Invernos frios e Verões quentes. Vive em todos os tipos de solo excepto nos encharcados e nos excessivamente arenosos e salinos (Cela *et al.* 1998). Na região mediterrânea, a azinheira encontra-se nas zonas que o sobreiro despreza, à parte de algumas zonas onde as duas espécies convivem em povoamentos mistos.

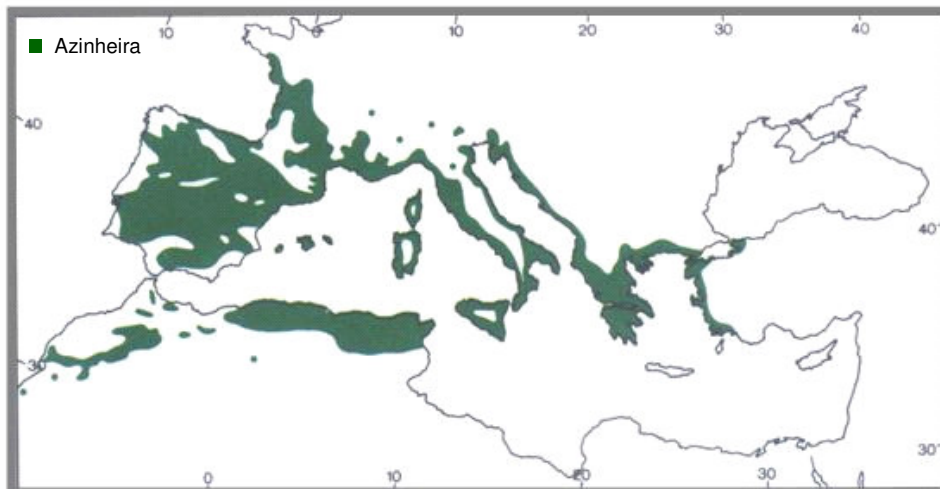


Figura 1.2 - Distribuição da azinheira no Mundo.

Fonte: Tenorio *et al.* 2001.

Em Portugal a azinheira ocupa uma área florestal de 462.000 ha, representando 14% da área florestal nacional em povoamentos puros e mistos dominantes (Anónimo 2001a), verificando-se um decréscimo desta área desde 1964 quando ocupava 534.000 ha. Esta espécie existe em todo o país, espontaneamente, semeada ou plantada, adquirindo uma maior importância no interior alentejano.

Espanha é o primeiro país quanto à extensão do domínio da azinheira. Existe em quase todas as províncias, chegando a ocupar uma superfície de 2.889.341 ha, o que representa 24,51% da área de povoamentos florestais do país (Moro 1995).

Segundo o 3º Inventário Florestal Nacional o sobreiro e a azinheira constituem povoamentos que ocupam em Portugal uma área aproximada de 1.500.000 ha (Anónimo 2001a). Nas zonas onde se verifica a influência atlântica, o domínio pertence ao sobreiro. À medida que se progride para o interior, o sobreiro coexiste com a azinheira, desaparecendo nas regiões com longos períodos de seca onde é substituído pela azinheira.

1.1.2. Importância dos montados de sobreiro e azinho

O sobreiro e a azinheira são árvores de inestimável valor, não só pela riqueza dos seus produtos, como pela resistência às condições adversas de solo e temperatura que lhes permite ocupar consideráveis extensões de terrenos, onde dificilmente vegetariam outras espécies. Na zona mediterrânea estas espécies aparecem em sistemas agrários de uso múltiplo designados “montados” em português e “dehesas” em espanhol. O montado é um sistema agroflorestal de uso agrário do solo, tipicamente agro-silvo-pastoril, onde a intervenção humana é essencial para manter o equilíbrio (Brito-de-Carvalho 1994). Localiza-se na metade meridional da Península Ibérica constituindo uma forma ecológica de utilização do solo e economicamente adequada e compatível com as condições biofísicas.

Embora se conheça a utilização da cortiça desde a época romana como artefacto flutuante e vedante, só no século XVIII os povoamentos de sobreiro passaram a ser olhados como geradores de um bem valioso renovável, a cortiça (Gil 2005). Em Portugal estas florestas foram protegidas através de leis agrárias, sendo a referência mais antiga do ano 1209 no reinado de D. Dinis (Natividade 1990; Gil 2005). Em Portugal a exploração da cortiça é muito remota, havendo referência de que no século XIV a cortiça já era exportada (Gil 2005). Em Espanha, as referências à exploração da cortiça datam do século XVIII, sendo também desta altura as primeiras leis de protecção do sobreiro (*Ibidem*). A partir dos meados do século XVIII iniciou-se a exploração do montado que se baseava na baixa densidade do arvoredo para aproveitamento agrícola sob coberto e utilização do fruto para a alimentação do gado, especialmente do suíno (Natividade 1950; Gil 2005). Desde então os montados transformaram-se no tipo de exploração mista suberícola, cerealífera e pecuária, assumindo o tipo de exploração actual que mantiveram a sua sustentabilidade económica, social e ambiental.

Nos sistemas agro-silvo-pastoris, a componente agrária é preenchida por culturas e pastagens geralmente utilizadas para consumo das pessoas e animais. A componente animal do montado reparte-se pela vida bravia, geralmente caça, e pela pastorícia, por vezes, o que tem maior peso económico (Brito-de-Carvalho 1992, 1994). O número de animais deve ser o equilibrado para manter uma regeneração natural de sobreiros e/ou azinheiras. Por outro lado, os animais ajudam na

eliminação da vegetação espontânea e na fertilização do solo. A componente florestal, no caso dos povoamentos de sobreiro, é essencialmente preenchida pela subericultura, exploração da cortiça, a qual constitui uma importante barreira ao avanço da desertificação de muitas zonas do Sul do País. A cortiça é uma matéria-prima florestal, natural e renovável, com propriedades muito particulares. A Península Ibérica detém cerca de 80% da cortiça produzida mundialmente (Gil 2005). Portugal é o primeiro produtor mundial de cortiça, assim como o primeiro no sector da transformação industrial e comercialização. Além disso, também lhe corresponde o maior rendimento de cortiça por hectare. Nas últimas décadas a produção de cortiça em Portugal é estimada entre 130.000 e 180.000 toneladas por ano, no entanto, nos últimos anos estes valores têm decrescido (*Ibidem*).

Em Espanha a produção máxima de cortiça é de 80.000 toneladas por ano, o que corresponde a cerca de 27 % da produção mundial (*Ibidem*).

Nas regiões do sul de Portugal, principalmente nas Serras onde os terrenos são delgados, e com encostas com declive acentuado encontra-se o sobreiro. Este sistema caracteriza-se por densidades mais elevadas de sobreiro o que não permite a consociação com a agricultura, associando-se a produção de cortiça principalmente à cinegética.

No caso de montados com azinheira, interessa principalmente a produção de fruto para o alimento do gado. As bolotas desta espécie são as mais doces do género *Quercus* e utilizam-se principalmente na alimentação do porco (de montanha). São ricas em hidratos de carbono e gorduras, e em conjunto com os pastos, proporcionam uma alimentação completa ao gado suíno, resultando numa produção de presunto e chouriços de alta qualidade e elevado valor comercial.

Dos montados de sobreiro e azinho o homem retira como rendimento a madeira, a cortiça, os frutos para dieta dos animais que pastam, a carne, o leite, a pele, a lã, a lenha, o carvão, o mel, os cogumelos, as essências aromáticas e medicinais. São também importantes por serem ecossistemas onde vivem uma grande variedade de animais selvagens, alguns são espécies raras em risco de extinção. São ainda usados para o turismo rural.

Apesar das vantagens do sistema agro-silvo-pastoril e da sua adaptação às regiões do sul da Península Ibérica, nos últimos anos, o montado tem vindo a deteriorar-se. Por volta dos anos 60 do século XX, o aparecimento da peste suína africana em Portugal e Espanha, arruinou a produção de porco e levou a uma desvalorização da bolota provocando uma redução da rentabilidade dos montados e o seu progressivo abandono. Este abandono originou a invasão dos povoamentos por vegetação arbustiva e subarbustiva, o que tem tido uma influência negativa na vitalidade das árvores, além de aumentar o risco de incêndio.

Actualmente, devido a vários factores como a cinegética, turismo rural, criação de gado porcino, bovino e caprino, a importância económica do montado tem vindo a ressurgir lentamente. Por outro lado, os montados de sobro e azinho representam um importante papel ambiental, pela protecção que conferem ao solo, combatendo a erosão e a desertificação e valorizando solos muito pobres onde dificilmente outras espécies vegetariam.

1.2. O DECLÍNIO DE ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS

O declínio é uma das doenças de etiologia complexa mais importante nos ecossistemas florestais. Sendo as doenças das plantas o efeito da interacção entre o hospedeiro, o patógeno e o ambiente (Agrios 1997) o declínio pode ser definido como uma doença resultante da acção complexa de factores de *stress*, quer bióticos quer abióticos, actuando em sucessão ou ao mesmo tempo num determinado local. Estes factores actuam por largos intervalos de tempo com o hospedeiro, de forma sequencial e permutável, produzindo um progressivo depauperamento ou decadência na saúde das árvores afectadas, o que na maioria das vezes termina com a morte da árvore (Manion 1991; Manion e Lachance 1992).

O declínio é considerado por alguns autores como uma sequência de doenças cuja etiologia não está claramente definida. Outros autores consideram que as doenças de etiologia complexa são uma norma e não uma excepção, pois embora estando identificado o seu agente causal primário, no desenvolvimento de qualquer doença, estão sempre implicados vários factores bióticos e abióticos (Manion 1991). Neste caso, os factores de *stress* abióticos alteram a fisiologia da árvore, predispondo-a ao declínio causado por agentes bióticos (Houston 1992). A morte de árvore resulta então do ataque de organismos patogénicos oportunistas que invadem e colonizam com êxito as árvores previamente debilitadas (Wargo 1996).

Independentemente das causas do declínio, todos os episódios de declínio de espécies florestais têm em comum o facto das árvores desenvolverem sintomas visuais característicos de perda de vigor (McLaughlin *et al.* 1992).

Os declínios são muitas vezes confundidos com a alteração fisiológica dos povoamentos devido ao natural envelhecimento das árvores. Neste caso não estão envolvidos factores específicos associados e trata-se de um processo normal na dinâmica das populações. O desenvolvimento normal e a deterioração da floresta estão intimamente relacionados com as condições climáticas e na maior parte dos casos estão associados a algum tipo de desvio do clima local ou regional (Manion 1991).

Existem muitos modelos para explicar os declínios (Manion 1991; Manion e Lachance 1992). O primeiro fitopatologista a sugerir uma teoria de declínio em que interactuavam diferentes grupos de factores foi W. A. Sinclair nos anos 60 do século XX (Manion 1991). Na sua teoria agrupou os factores em três categorias: factores de predisposição, factores de indução e factores de contribuição (Figura 1.3). Esta teoria foi incorporada por Manion num modelo conhecido por espiral da doença do declínio (Figura 1.4). Neste modelo, a morte das árvores ocupa a parte central e os diferentes factores vão-se ordenando de fora para dentro (*Ibidem*).

Os factores de predisposição são factores de natureza biótica ou abiótica que predis põem a vegetação a uma perda de vigor e a deixa sensível à actuação de agentes perturbadores, ou cria condições adequadas para que estes actuem. São factores que produzem variações lentas e a longo prazo, tais como características do solo (quantidade de nutrientes, água, capacidade de retenção), clima e sua interacção com factores intrínsecos da vegetação (idade da árvore e base genética).

Os factores de indução são factores de natureza fisiológica ou biológica. Actuam, por períodos curtos, sobre as árvores previamente predispostas e dão lugar à expressão dos sintomas de declínio. Podem ser do tipo abiótico como geadas tardias na Primavera, seca, salinidade, contaminação atmosférica, danos mecânicos, ou devidos à acção de seres vivos, como os insectos perfuradores ou desfoliadores.

Os factores de contribuição são os que aceleram o processo de declínio, actuando nas últimas etapas do seu desenvolvimento e produzindo a morte da árvore com sintomas. São factores bióticos, como os fungos, insectos, nemátodos e vírus.

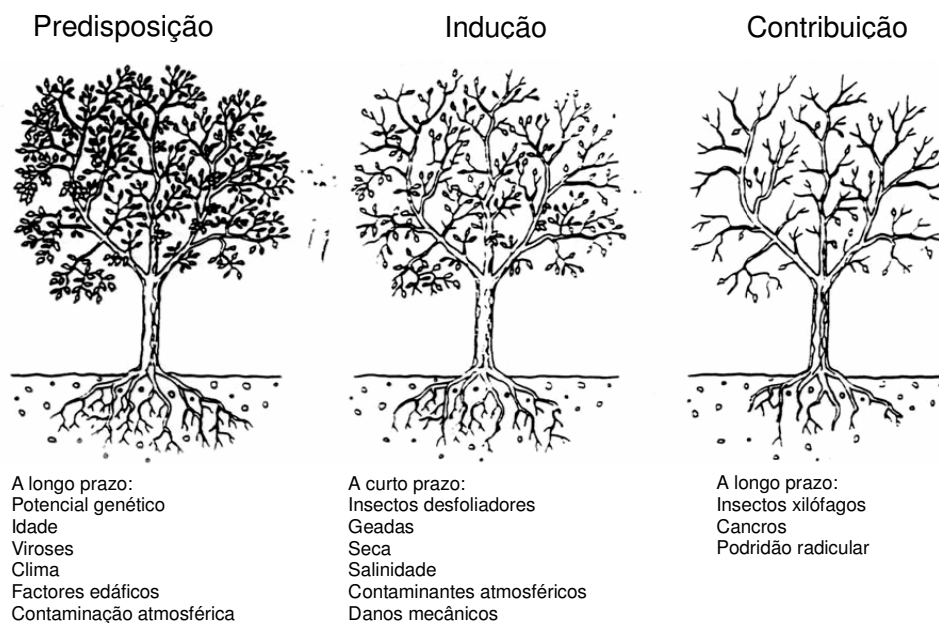


Figura 1.3 - Factores implicados nos declínios florestais.
 Fonte: Adaptado de Manion 1991.

Segundo o modelo de Manion (1991), todas as árvores submetidas a factores de indução, reagem com o desenvolvimento da sintomatologia associada, no entanto, somente as árvores que previamente estão sujeitas a factores de predisposição, não serão capazes de recuperar e entram na espiral de declínio (Figura 1.4).

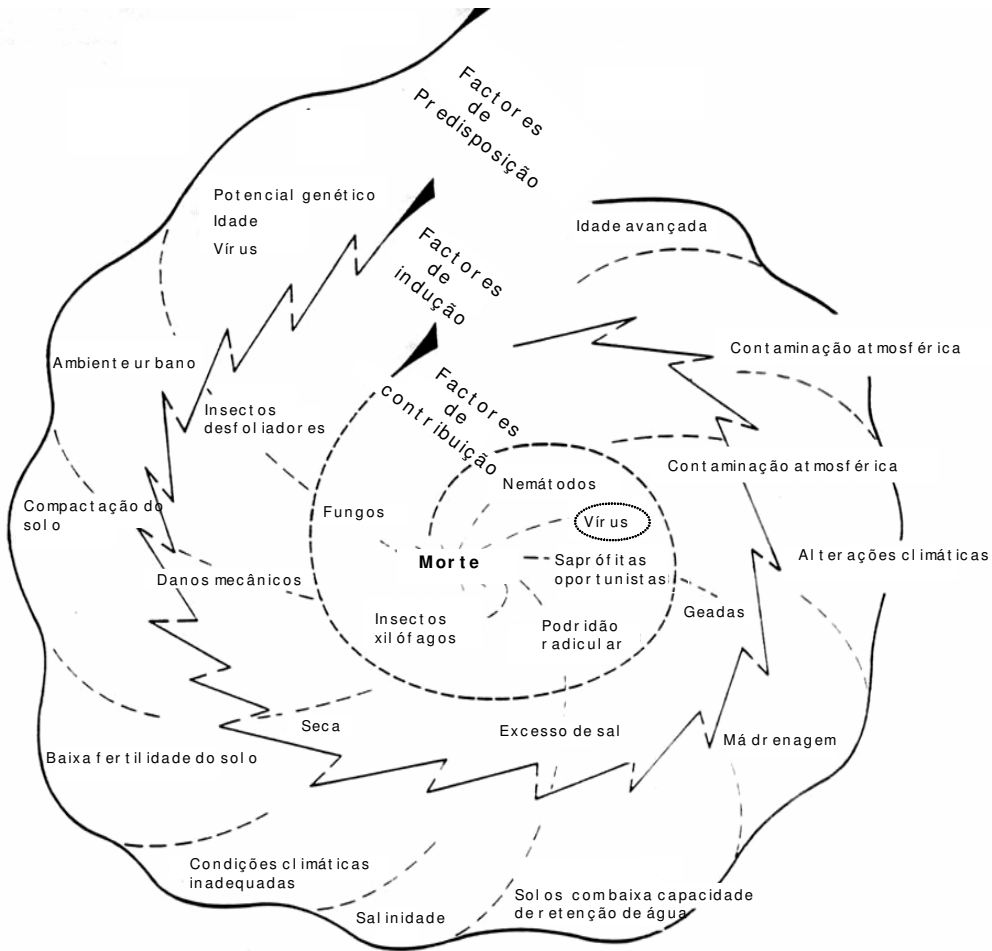


Figura 1.4 - Modelo em espiral do declínio.
 Fonte: Adaptado de Manion 1991.

Outros modelos de declínio foram recompilados e discutidos por Manion (1991) e Manion e Lachance (1992). Em 1978 Wallace apresenta um modelo radial em que a planta se encontra no centro de uma série de linhas nas quais se situam os diferentes factores, de modo que os factores mais importantes no desenvolvimento do declínio são os que se encontram mais próximo do centro.

No modelo linear que Houston propôs em 1981 observa-se a transição de uma árvore sã para uma árvore doente. O desaparecimento dos agentes de *stress* dá lugar à recuperação da árvore. O

reaparecimento do factor de *stress* ou o aparecimento de outros factores provoca o desenvolvimento do declínio. Quando a árvore tem pouco vigor actuam organismos saprófitas secundários que podem dar lugar à morte da árvore (Manion 1991; Manion e Lachance 1992).

Mueller-Dombois em 1983 expõe um modelo de envelhecimento sincrónico de povoamentos. Segundo este modelo, um povoamento vegetal da mesma idade vai desenvolvendo-se ao longo do tempo até à sua velhice, em função do potencial genético e dos parâmetros ecológicos da zona. O *stress* que os factores ambientais produzem nestes povoamentos actua simultaneamente e inicia-se o declínio que pode acentuar-se pela acção de insectos e patógenos secundários (*Ibidem*).

Em 2002 Thomas e colaboradores sugeriram um modelo conceptual de interacção de factores abióticos e bióticos responsáveis pelo declínio dos *Quercus*. Este modelo é válido para a Europa Central em zonas de solo com pH ácido [$\text{pH}(\text{H}_2\text{O}) \leq 4,2$], uma vez que em solos com pH mais alto as espécies de *Phytophthora* estão envolvidas na ocorrência do declínio. Neste modelo a desfoliação por insectos, a seca no Verão e as geadas no Inverno/Primavera são considerados os factores decisivos para explicar o aparecimento do declínio ao longo do tempo. Pelo menos, dois destes factores, sempre incluindo a desfoliação por insectos, têm que acontecer simultaneamente para a ocorrência do declínio (Thomas *et al.* 2002).

Ao longo do tempo têm sido referidos declínios em diferentes espécies florestais por todo o mundo, resultando sempre num impacto negativo para a conservação dos ecossistemas. Na Austrália o problema do declínio afecta florestas de *Eucalyptus marginata* Donn. ex Smith, sendo conhecido a partir dos anos 20 do século XX como “jarrah dieback” (Shearer e Tippett 1989). A doença atinge muitas espécies da comunidade florística destas florestas com consequências negativas na indústria da madeira e sobretudo na conservação da biodiversidade destes ecossistemas naturais (Davison e Shearer 1989).

Na América do Norte foram descritos vários declínios afectando espécies de *Castanea* (Crandall *et al.* 1945) de *Quercus* (Oak *et al.* 1988; Manion 1991; Tainter *et al.* 2000; Rizzo *et al.* 2002; Anónimo 2004) em *Lithocarpus* (Rizzo *et al.* 2002; Anónimo 2004) e em cedros (*Chamaecyparuss lawsoniana*) (Goheen e Marshall 2001; Oh e Hansen 2004).

Na Europa o declínio também tem vindo a afectar várias espécies florestais em muitos países, principalmente dos géneros *Alnus*, *Castanea*, *Fagus*, *Juglans* e *Quercus*, com graves consequências económicas, sociais e ambientais (Lopes-Pimentel 1953; Brasier *et al.* 1993b, 1996; Brito-de-Carvalho 1993; Jung *et al.* 1996, 1999, 2000; Tuset *et al.* 1996; Robin *et al.* 1998; Gallego *et al.* 1999; Balci e Halmschlager 2001, 2003; Brasier e Jung 2001; Moreira-Marcelino 2001; Vettraino *et al.* 2001, 2002; Sánchez *et al.* 2002b; Streito *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2002; Jönsson *et al.* 2003; Moreira 2003; Jung e Blaschke 2004; Jung *et al.* 2005; Moreira e Martins 2005).

1.2.1. Sintomatologia associada

A sintomatologia associada aos declínios de espécies florestais não é específica. Os factores de declínio têm a característica de ser múltiplos e nenhum só por si ser capaz de reproduzir os sintomas. Além disso, actuam de forma aleatória e podem ser diferentes no tempo e no espaço, dando no entanto lugar aos mesmos sintomas (Manion 1991). Pode ocorrer desfoliação, morte regressiva de rebentos e ramos (*dieback*), abundante emissão de rebentos adventícios (ladrões), exsudações no tronco e ramos, redução do tamanho das folhas, lesões foliares (clorose e/ou necrose), redução do diâmetro do tronco, necrose do sistema radicular e morte completa da árvore (Oak *et al.* 1988; Manion 1991; Brasier *et al.* 1993a; Brasier 1996; Tuset *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 2000a, 2000c; Rizzo *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2002; www.defra.gov.uk/planth/pramorum4.htm). Algumas vezes observa-se que os períodos de declínio são seguidos por períodos de recuperação da floresta. Estes períodos dependem das características ambientais em que se desenvolvem os agentes implicados no declínio (Manion 1991; Manion e Lachance 1992).

1.2.2. O declínio do género *Quercus*

No declínio de espécies do género *Quercus* aparecem frequentemente implicados ciclos de seca severa, encharcamentos prolongados, rápidas flutuações do conteúdo hídrico do solo e baixas temperaturas inverniais. Todos estes processos podem ter grande importância ao iniciar o síndrome de declínio, predispondo as árvores à invasão de insectos e/ou fungos patogénicos radiculares ou aéreos (Oak *et al.* 1988; Brasier 1996; Jung *et al.* 2001; Sánchez *et al.* 2002b; Thomas *et al.* 2002).

Na América do Norte foram descritos várias situações de declínio de *Quercus* spp. A situação mais importante foi a que ocorreu no Sudeste desta região em que os focos de declínio estavam associados às condições do meio e às características meteorológicas (Oak *et al.* 1988; Manion 1991).

No México, o declínio de espécies de *Quercus* tem vindo a ser observado desde 1987 e o patogénio de solo *Phytophthora cinnamomi* foi associado à morte de *Q. glaucooides*, *Q. peduncularis* e *Q. salicifolia*, as três principais espécies da zona de Colima a Oeste da cidade do México (Tainter *et al.* 2000).

Na Califórnia desde 1995 tem ocorrido a morte de muitos *Q. agrifolia* e *Q. kelloggii*. Foram descritos casos de morte súbita e outros de evolução progressiva (morte lenta). Estes casos estão associados com desfoliação, clorose das folhas num período de poucas semanas, exsudações no tronco, cancos no tronco e ramos, que em alguns casos podem abranger todo o perímetro. Actualmente este problema é vulgarmente conhecido por “Sudden Oak Death” (Garbelotto *et*

al. 2001; Rizzo *et al.* 2002; Anónimo 2004). *Phytophthora ramorum* é o principal agente causal descrito. Este fungo penetra no tronco produzindo cancras no tronco e ramos. É dispersado pela chuva, vento e através de plantas ornamentais oriundas de viveiros (Anónimo 2001b). Uma vez que a árvore está debilitada, é colonizada por numerosos insectos e outros fungos como *Hypoxylon thouarsianum*, que causa cancro nos ramos e tronco.

As florestas de *Quercus* europeias têm uma enorme importância tanto ecológica como hidrológica, e ocupam uma ampla gama de habitats. A sua perda teria um impacto negativo na erosão do solo, hidrologia, biodiversidade, economia, turismo e história cultural. As espécies dominantes no Centro e Norte da Europa são *Q. petraea* (Matt.) Liebl. e *Q. robur* L. e o seu principal aproveitamento é a obtenção de madeira (Brasier 1996). Com menor representação aparecem *Q. pubescens* Willd. e *Q. cerris* L. Na parte oriental e mediterrânea da Europa, além destas duas últimas espécies, aparecem *Q. frainetto* Tem., *Q. coccifera* L., *Q. ilex* L., *Q. rotundifolia* Lam. e *Q. suber* L. No Sul da Europa esta última espécie é comercialmente importante pela sua cortiça.

Ao longo do século XX as espécies de *Quercus* no Norte e Centro da Europa mostraram diversos episódios de declínio que levaram em muitos casos à morte das árvores. Muitos estudos foram desenvolvidos no sentido de estudar as causas do declínio (Delatour 1983; Oleksyn e Przbyl 1987; Luisi *et al.* 1993). Como resultado pensou-se que o declínio era causado por murchidões vasculares provocadas por um ou vários fungos do género *Ophiostoma*, ou *Ceratocystis* (Brasier 1996). No entanto, actualmente esta teoria tem-se por pouco provável, recaindo a atenção principal sobre outros factores bióticos, como o agente patogénico radicular *Phytophthora quercinea* (Jung *et al.* 1999, 2000; Vettraino *et al.* 2002) ou *P. uliginosa* (Jung *et al.* 2002), factores abióticos (Thomas *et al.* 2002) e factores climáticos (Brasier 1996).

Nas últimas décadas também têm sido descritas situações de declínio na floresta de *Quercus* na zona da Europa mediterrânea. Observaram-se casos de morte lenta e morte súbita em *Q. suber*, *Q. ilex*, *Q. cerris* e outras espécies do género (Brasier *et al.* 1993b; Brito-de-Carvalho 1993; Brasier 1996; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2000a, 2000b, 2003c; Moreira-Marcelino 2001; Tuset *et al.* 2001; Vettraino *et al.* 2002; Moreira 2003; Moreira e Martins 2005; Rodríguez-Molina *et al.* 2005). A sul do mar Mediterrâneo também foi referida a ocorrência de declínio em *Q. suber* na Tunísia (Brito-de-Carvalho 1993) e em Marrocos (Graf *et al.* 1993).

Factores associados

Os factores associados aos declínios de *Quercus* spp. são múltiplos. Assim, na América do Norte, como factores de predisposição têm sido referidos a má drenagem do solo e a idade das árvores

(Manion 1991). Os factores de indução mais comuns são a seca e geadas, aparecendo também referência a insectos desfoliadores e patogénios foliares (Manion 1991). Os factores contribuintes mais frequentes são patogénios radiculares como *Armillaria mellea* e *Collybia fusipes* e insectos xilófagos. Na parte sudoeste dos Estados Unidos estão implicado fungos do tronco e raiz como *Hypoxylon atropunctatum*, *Ganoderma* spp., *Inonotus dryadeus* e *Armillaria tabescens* (Manion 1991). No Norte e Centro da Europa, *P. quercina* tem sido consistentemente isolada de raízes e solo da rizosfera e é a espécie mais amplamente distribuída depois de *P. citricola* e *P. cambivora*, (Jung *et al.* 2000; Jönsson *et al.* 2003; Balci e Halmschlager 2003), aparecendo também implicado *Pythium undulatum* (Jung *et al.* 2000).

Na Europa mediterrânea muitos factores têm sido associados, como por exemplo secas, poluição, mudança de práticas silvícolas, ataque de insectos, fungos (Luisi *et al.* 1993; Ragazzi *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2000b). Ragazzi *et al.* (2000) associam ao declínio de *Q. cerris*, *Q. fraineto*, *Q. pubescens* e *Q. robur* em Itália vários factores. Assim, como factores de predisposição apontam as condições de solo e os factores climáticos. Como factores de indução estão os insectos desfoliadores (*Totrix viridana* e *Lymantria dispar*), seca, geadas, vírus, aumento da temperatura do solo e redução da microflora do solo. Os factores de contribuição incluem os insectos da cortiça e tronco (*Sinoxylon performans*, *Coroebus florentinus* e *Agrilus biguttatus*) e fungos patogénicos [*Diplodia mutila*, *Armillaria* spp. e *Biscogniauxia mediterranea* (*Hypoxylon mediterraneum*)]. Mais recentemente aparece associado ao declínio de *Quercus* no Norte e Centro de Itália *P. quercina* (Vettrano *et al.* 2002).

1.2.3. O declínio de *Quercus* na Península Ibérica

A floresta de *Quercus* na Península Ibérica é constituída essencialmente por espécies de folha perene como *Q. suber*, *Q. ilex* e *Q. coccifera* que se sobrepõem com espécies adaptadas ao clima mediterrâneo de folha caduca como *Q. pyrenaica*, *Q. faginea* e *Q. canariensis* (Ceballos e Ruiz-de-la-Torre 1979).

Desde finais do século XIX a floresta de *Quercus* na Península Ibérica tem mostrado sinais de *stress* e em muitos sítios tem sofrido períodos de considerável declínio e morte. Especialmente a morte de sobreiros (*Q. suber*) tem vindo a ser relatado por diversos autores.

Em Portugal, a primeira referência data de 1898 em que Veríssimo-d'Almeida chama a atenção do Governo para os prejuízos causados pelas mortes de sobreiros que ocorriam na zona de Santarém, independentemente da sua idade. No mesmo ano Câmara-Pestana (1898) refere a clorose das folhas que começa nos ramos da parte superior da árvore e, que num curto intervalo de tempo, se estende por toda a copa. No ano seguinte o mesmo autor descreve a observação de necroses, no tronco,

ramos e raízes de árvores doentes, atribuindo a doença a um fungo (Câmara-Pestana 1899). Mais tarde, em 1927, Silva-Tavares atribui a morte de sobreiros no Vale do Tejo ao fungo responsável pela doença da tinta do castanheiro, quando sendo um entomologista, intuiu que a causa do declínio dos sobreiros era a mesma que matava os castanheiros, pela semelhança dos sintomas que ambas as espécies manifestavam. A referência seguinte é do ano 1944 (Natividade 1950) onde se cita o trabalho de Lopes-Pimentel sobre a elevada mortalidade de sobreiros em montados na zona de Vale do Tejo, a grande maioria dos quais recentemente descortiçados. Lopes-Pimentel (1946) analisou amostras de um sobreiro apresentando sintomas de declínio e descortiçado na altura. Este sobreiro apresentava extensas necroses na zona cambial que se estendiam por toda a altura do tronco, não apresentando sinais de *Endothiella gyrosa* Sacc. causador da “ferrugem alaranjada do entrecasco” e inicialmente apontado como responsável pela morte dos sobreiros. Destas amostras foi isolado um fungo que o autor identificou como *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., agente da doença da tinta do castanheiro (*Ibidem*). No ano seguinte Lopes-Pimentel (1947) rectificou a nomenclatura do fungo para *P. cinnamomi* Rands.

Baeta-Neves refere-se também às doenças do sobreiro: o carvão, a ferrugem do entrecasco e a *seca quase fulminante por causas ainda mal conhecidas* (Baeta-Neves 1948) e ao grande número de sobreiros que morrem na região do Vale do Tejo (Baeta-Neves 1949). Em 1954 Baeta-Neves verifica que desde trabalhos realizados por ele em 1947, do trabalho realizado por Branquinho-d’Oliveira (1931) em que a ferrugem do entrecasco era apontada como responsável pelo problema do sobreiro, e de informações sobre a importância económica e dispersão da doença, não foi feita nada *com a profundidade e rigor científico indispensáveis*, no sentido de apurar as causas das mortes do sobreiro, uma vez que o problema continuava a manter a mesma gravidade (Baeta-Neves 1954).

As referências acima citadas mostram que a morte do sobreiro é um problema que vem afligindo muitos agricultores e técnicos desde há várias décadas, pelo elevado número de árvores mortas e, que a descrição deste problema, não difere do panorama actual. Contudo, foi nos anos 80 do século XX que esta situação se tornou mais alarmante na Península Ibérica, devido a uma série de notícias na imprensa local que davam conta da incidência e rápida expansão do declínio na zona Sudoeste peninsular, principalmente na região do Alentejo e Algarve em Portugal e na região de Andaluzia, Estremadura, Castilha Leão e Castilha La Mancha em Espanha (Tuset *et al.* 1996). A primeira notícia em Portugal é da autoria do deputado António Chagas em 1982 (Brito de Carvalho 1993) que referia a *...existência de “um agente patogénico” que corroe, impiedosamente os sobreiros, provocando-lhes a sua destruição em curtíssimo espaço de tempo...*

Em 1989 a Câmara Municipal de S. Brás de Alportel alertada pela população da zona para o que vinha acontecendo aos sobreiros, solicitou a atenção dos Serviços Oficiais que contactaram a Universidade do Algarve no sentido de procurar de uma solução para o problema. Nesse mesmo

ano, elementos da Estação Agronómica Nacional recolheram amostras do colo de dois sobreiros recentemente mortos, das quais isolaram *P. cinnamomi* (Brito de Carvalho 1993; Brasier *et al.* 1993a; Moreira *et al.* 1993). Também em Espanha, em 1991, os Serviços de Sanidade Vegetal estabeleceram um convénio com a Forestry Commission inglesa com o objectivo de estudar a etiologia da doença (Sánchez *et al.* 2000b). Deste estudo resultou o isolamento de *P. cinnamomi* a partir de amostras de raízes e colo de árvores afectadas e de solo da rizosfera, recolhidas em prospekções na zona Sudoeste de Espanha (Brasier *et al.* 1993a; Brasier 1996).

Em Portugal, em 1992 foi concluído um projecto no qual se fez uma análise sistemática das causas que vinham a ser atribuídas ao surto de mortalidade (Anónimo 1992). Este trabalho foi realizado em colaboração com a Estação Florestal Nacional, Direcção Geral das Florestas, Universidade de Évora e Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza e teve o apoio das Caixas de Crédito Agrícola Mútuo de Grândola, Santiago do Cacém e Sines. Deste estudo ressaltam algumas conclusões que de acordo com Ferraz (2006), contradizem ideias frequentemente defendidas por vários autores e veiculadas pelos mais diversos meios de comunicação. Assim, verificou-se que: a mortalidade não está relacionada com a idade das árvores; não existe relação causa/efeito entre doença e as secas ocorridas nos últimos decénios; as pragas não constituem um importante factor de mortalidade; nenhum dos fungos encontrados no entrecasco, são e afectado, assumia uma clara liderança na indução da sintomatologia observada nos sobreiros afectados, tendo o carvão do entrecasco (*B. mediterranea*) só sido detectado em árvores em fase final de declínio. Este projecto, embora multidisciplinar, infelizmente não realizou a prospekção sistemática dos fungos de solo que os sintomas da doença e a distribuição de árvores afectadas nos povoamentos sugeriam (Anónimo 1996; Ferraz 2006).

Este declínio, que se conhece em Portugal como “declínio do sobreiro” e em Espanha como “Seca de los *Quercus*” afecta principalmente *Q. suber* e *Q. rotundifolia* embora também se tenha observado em *Q. pyrenaica* Willd, *Q. faginea* Lamk, *Q. canariensis* Willd e *Q. coccifera* L. Por vezes, o declínio também afecta outras espécies lenhosas associadas aos povoamentos de *Quercus*, como *Cistus* spp., *Crataegus monogyna* Jacq, *Genista* spp., *Arbutos unedo* L. e *Calluna vulgaris* (Montoya-Oliver 1994; Moreira-Marcelino 2001; Moreira e Martins 2005).

Actualmente o declínio de *Quercus* é possivelmente o problema fitossanitário de maior importância na floresta da Península Ibérica, pois ameaça seriamente a permanência de ecossistemas florestais de grande potencial produtivo: os montados (ou *dehesas*) e os sobreirais (Sánchez *et al.* 2000b) e a sua extinção deixaria improdutivas vastas zonas do sul da Península, além de representar uma ameaça de desertificação, por ser o género arbóreo mais representativo dessas zonas. Desde os anos 90 do século XX este tema tem vindo a ser objectivo de estudo em diversos projectos de investigação, tanto em Portugal como em Espanha.

1.2.3.1. Sintomatologia em sobreiros e azinheiras

A sintomatologia associada ao declínio é complexa e variada. Enquanto que a maioria das árvores apresenta diferentes graus de declínio (morte lenta), outras morrem repentinamente (morte súbita ou apoplexia). No primeiro caso verifica-se uma quebra gradual do vigor das plantas que se manifesta por alteração da cor das folhas, que passam de verde-escuro para verde amarelado. Ocorre simultaneamente a queda das folhas, o que conduz ao aparecimento de ramos parcial ou totalmente desfoliados. Dá-se a morte das extremidades dos ramos, a rebentação de tufos em ramos aparentemente secos, aparecem exsudações de seiva ao longo do tronco e junto ao colo, necroses no sistema radicular e por fim a morte completa da árvore. Relativamente à morte súbita, verifica-se que ocorre nos finais do Verão e princípios do Outono. Neste caso, as folhas da árvore secam rapidamente permanecendo algum tempo aderentes aos ramos. A morte da árvore tem lugar em poucas semanas depois do aparecimento dos primeiros sintomas visíveis (Brasier *et al.* 1993a; Montoya-Olivier 1994; Brasier 1996; Tuset *et al.* 1996, 2001).

Factores implicados

Tal como o declínio de *Quercus* do Centro e Norte da Europa, um grande número de factores têm sido associados ao declínio de *Quercus* na Península Ibérica. Entre as causas desencadeantes deste declínio encontram-se factores bióticos, abióticos e antrópicos. O declínio dos *Quercus* pode explicar-se com base na terminologia de Sinclair (Manion 1991) referida em 1.2. Segundo este autor, o declínio implicará pelo menos um factor em cada grupo.

→ *Factores de predisposição*

A orientação do terreno relativamente aos pontos cardeais, as condições edáficas às vezes contraditórias, e o aumento da temperatura, são alguns dos factores que têm sido apontados como factores de predisposição do declínio. Um estudo realizado no Parque de “Los Alcornocales” em Cádiz (Espanha) refere que em zonas de exposição sul e em solos com défice hídrico desenvolveram-se com maior facilidade os sintomas da doença (Sánchez-Gutiérrez e Cabello-Medina 1993). Também num estudo realizado no Algarve, concelho de S. Brás de Alportel, verificou-se que nas zonas voltadas a sul (soalheira) os sobreiros apresentaram um índice de desfoliação mais elevado do que os que se encontravam nas encostas voltadas ao norte (umbria) (Caetano 1994; Correia 1994). Posteriormente isto também foi verificado num estudo alargado a várias regiões do País (Moreira-Marcelino 2001; Moreira 2003; Moreira e Martins 2005).

Tuset *et al.* (1996) referem que os solos delgados e de drenagem insuficiente, com tendência para a retenção de água, tais como vales ou linhas de água, são as zonas onde o impacto da doença é mais elevado. No “Valle de los Pedroches” na província de Córdoba em Espanha, Sillero (1999) não

conseguiu encontrar uma correlação consistente entre focos de declínio, exposição e factores edáficos. Observou que o declínio se manifestava primeiro nas zonas menos favoráveis para o desenvolvimento normal da vegetação, nas encostas, onde o solo é pouco profundo, com escassa capacidade de retenção de água. No entanto, em zonas com condições edáficas similares, como os cerros, a incidência do declínio era menor.

No caso do declínio de *Quercus* mediterrânicos os factores de predisposição parecem ser do tipo silvícola. Várias práticas silvícolas influenciam o estado das árvores e a sua predisposição para o aparecimento do declínio. A poda é uma destas práticas e tem uma acção directa sobre a árvore. Apesar de ser uma prática generalizada nos montados não existe unanimidade sobre o resultado da sua realização (Natividade 1950; Rupérez 1957; Porras *et al.* 1997; Navarro e Fernández 2000). Podas mal realizadas no passado têm contribuído para a decrepitude das árvores e influído negativamente no seu vigor e estado fitossanitário (Torres-Juan 1985; Muñoz e Rupérez 1897; Muñoz *et al.* 1995).

A limpeza do mato e a mobilização do solo são práticas silvícolas realizadas no montado e que afectam em simultâneo o conjunto de árvores, condicionando o seu estado vegetativo. A intensidade, época e forma de execução destes trabalhos relacionam-se com determinado tipo de danos ou situações onde o vigor das árvores está afectado (danos físicos no tronco, erosão do solo, raízes expostas ao ar, etc.) (Navarro e Fernández 2000). Por outro lado, a densidade de vegetação arbustiva limita a disponibilidade de água para as árvores além de criar condições favoráveis a incêndios.

Outro factor que debilita as árvores e perturba os processos de conservação e regeneração no montado é a pastorícia, quando o encabeçamento é exagerado. O gado actua directamente afectando a compactação do solo, eliminando o potencial regenerador, consumindo a regeneração natural e provocando erosão. Contudo, as referências que existem sobre a incidência do gado na perda de vigor das árvores são indirectas e pontuais (*Ibidem*).

→ *Factores de indução*

Em termos gerais o principal factor de indução do declínio do género *Quercus* é a seca prolongada (Manion 1991; Montoya-Oliver 1994). Nos últimos anos, o aumento da temperatura estival, períodos secos mais longos e em meses frios, tem vindo a contribuir para agravar o estado geral das coberturas vegetais, sendo um factor desencadeador do declínio (Fernández e Montero 1993; Allué 1995; García-Cebrián *et al.* 1996). Estas alterações climáticas são factores desencadeantes do declínio em sobreiros, azinheiras, pinheiros e outras plantas, previamente predispostas por si mesmas ou por favorecer o desenvolvimento de pragas ou doenças associadas ao declínio da floresta. Nos últimos anos, a alternância entre anos secos e chuvosos tem favorecido a propagação destas pragas e doenças (Brasier 1996; Fernández-Cancio 2000). Estas alterações provocam a

redução do período vegetativo das plantas em muitas zonas da Península Ibérica e um défice hídrico importante nas árvores, causando a morte principalmente em zonas de soalheira e em solos pouco profundos. No entanto, em zonas topograficamente privilegiadas do ponto de vista hídrico também há árvores mortas (Muñoz-López *et al.* 1995; Fernández-Cancio 2000). A seca é apontada como o factor determinante no declínio do montado de azinho em “Valle de los Pedroches”, Córdoba (Espanha). Ao longo dos anos, a seca tem provocado uma debilitação progressiva nas árvores que, juntamente com o seu envelhecimento, tem conduzido a uma elevada mortalidade (Navarro e Fernández 2000).

Os insectos desfoliadores também podem ser factores de indução (*Ibidem*). *Lymantria díspar* L. (lagarta do sobreiro) e *Tortrix viridana* L. (burgo) têm sido referidos como provocando danos generalizados em algumas áreas (Baeta-Neves 1950; Romanyk e Cadahía 1992).

→ *Factores de contribuição*

Estes factores incluem pragas e doenças, que muitas vezes representam agentes naturais de equilíbrio num ecossistema. No entanto, devido à debilidade das árvores cria-se uma situação muito favorável para o seu ataque (Navarro e Fernández 2000). Entre os factores bióticos associados ao declínio destacam-se os fungos *P. cinnamomi* (Brasier *et al.* 1993a; 1993b; Brasier 1996; Cobos *et al.* 1993; Tuset *et al.* 1996; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2000b), *Botryosphaeria stevensii* (Luque *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2003c) e *Biscogniauxia mediterranea* (= *Hypoxylon mediterraneum*) (Vannini *et al.* 1996; Navarro e Fernández 2000; Sánchez *et al.* 2000b). Também são considerados factores contribuintes do declínio a bactéria *Brenneria* (*Erwinia*) *quercina* (López *et al.* 1996; Soria *et al.* 1997; Biosca *et al.* 2003) e as pragas *Coroebus* spp. e *Cerambyx* spp. (Navarro e Fernández 2000).

Os factores de contribuição apresentam duas características importantes. Primeiro, actuam de forma progressiva no tempo, de tal forma que podem aparecer ligados directamente aos factores de indução (por exemplo mortes súbitas ligadas a períodos prolongados de seca), ou podem, inclusivamente, manifestar-se muito tempo depois dos factores de indução terem deixado de actuar (morte lentas). Em segundo lugar, numa mesma zona, podem actuar simultaneamente vários agentes de mortalidade, de forma individual ou conjuntamente. Sendo assim, é possível encontrar árvores que morreram de um ataque de uma praga junto a árvores mortas por doenças.

1.2.4. Doenças associadas ao declínio de *Quercus* na Península Ibérica

1.2.4.1. Cancros causados por fungos e bactérias

Um patogénio que aparece nas últimas etapas do declínio é o ascomicete *Biscogniauxia mediterranea* (*Hypoxilon mediterraneum*) causador do carvão de entrecasco. Este fungo está amplamente distribuído na zona mediterrânea e foi considerado como um factor de contribuição do declínio dos *Quercus* mediterrâneos em Portugal (Branquinho-d'Oliveira 1931; Baeta-Neves 1948), em Itália (Vannini *et al.* 1996) e em Espanha: Andaluzia (Navarro e Fernández 2000; Sánchez *et al.* 2000b; Trapero *et al.* 2000) e Catalunha (Luque *et al.* 2000).

Biscogniauxia mediterranea é frequente no sobreiro, embora também apareça na azinheira (Muñoz e Rupérez 1987; Luque *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2000c). Pode afectar árvores aparentemente vigorosas, no entanto, o ataque só é severo em indivíduos enfraquecidos (Natividade 1950; Jiménez *et al.* 2005). Nestes últimos, pode provocar a morte de ramos ou árvores completas (Navarro e Fernández 2000). Os ascósporos são as estruturas responsáveis pela infecção. São transportados pela chuva, vento ou nas ferramentas utilizadas na poda ou descortiçamento e penetram no hospedeiro através de feridas de origem meteorológica ou causadas durante as podas, descortiçamento, ou por insectos (*Ibidem*). O fungo coloniza os tecidos do hospedeiro formando um estroma em forma de placas carbonosas. Estas placas são constituídas por uma massa de hifas, que dão origem a estruturas reprodutivas sexuadas, as peritecas, no interior das quais amadurecem os esporos (ascósporos). As placas formam-se nos ramos, troncos e colo das árvores de todas as idades, facilitando o diagnóstico da doença (Torres-Juan 1985).

Em Portugal, Branquinho-d'Oliveira em 1931 estudou o efeito de inoculações experimentais em sobreiro mas não pôde concluir se este fungo se tratava de um parasita verdadeiro ou de um parasita facultativo que normalmente se comporta como saprófita. Em Espanha esta doença passou praticamente despercebida até 1985, quando se denunciaram graves danos em azinheiras e sobreiros que foram atribuídos ao abandono destas espécies e à falta de medidas fitossanitárias (Torres-Juan 1985).

Alguns autores evidenciaram o carácter endófito de *B. mediterrânea* em diversas espécies de *Quercus* em Itália (Anselmi *et al.* 2000) e em Espanha (Jiménez *et al.* 2005). Estes últimos autores estudaram a patogenicidade de *B. mediterranea* sobre três espécies de *Quercus* (*Q. suber*, *Q. ilex* e *Q. coccifera*) e demonstraram que os ascósporos deste fungo são capazes de atravessar a casca de sobreiros e azinheiras, originando a mesma severidade de sintomas que quando infectam através de ferida. Apesar das plantas inoculadas estarem infectadas, muitas vezes não apresentavam sintomas, o que indica que a presença de feridas e de *stress* hídrico não parecem ser condições indispensáveis para causar doença. O fungo manteve-se em estado latente, sem originar sintomas, durante os 5 meses que durou a experiência. A sintomatologia observada em plantas infectadas (lesões

necróticas debaixo da casca e necrose dos vasos vasculares) mostrou-se mais severa nas plantas submetidas a *stress* hídrico. Das espécies estudadas o sobreiro foi a espécie mais susceptível, indicando que o fungo tem capacidade patogénica muito limitada em *Q. ilex* e *Q. coccifera* (Jiménez *et al.* 2005).

Outros fungos que têm sido indicados como factores implicados no declínio de *Quercus* são diversas espécies do género *Botryosphaeria* (von Arx 1987; Ragazzi *et al.* 1997). Estas espécies foram descritas como saprófitas e, ocasionalmente, como parasitas num grande número de hospedeiros lenhosos, principalmente quando se encontram predispostos devido a algum tipo de *stress* (ambiental, nutricional, hídrico, etc.), sofrerem danos mecânicos ou devido ao facto de serem muito susceptíveis (Sinclair *et al.* 1987). São por isso muitas vezes descritas como parasitas de debilidade.

Nos Estados Unidos *B. quercuum* foi descrito como o agente causador de cancos graves em *Q. rubra* (Morehart 1994). Em Itália, outra espécie, *B. stevensii*, foi considerada como o agente causal da morte regressiva de ramos e associado ao declínio de *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. ilex*, *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. suber* (Ragazzi *et al.* 1989, 2000). Em Marrocos também tem sido associado ao declínio de *Q. suber* (El-Badri e Abadie 2000). Em Espanha *B. stevensii* (anamorfo: *Diplodia mutila*) causou a morte de ramos de sobreiro, demonstrando que é um patogénio primário (Luque e Girbal 1989; Luque *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2003c) e foi mencionado como factor contribuinte para o declínio de *Q. suber* na Catalunha (Luque *et al.* 2000). Recentemente, determinou-se que os isolamentos deste fungo, obtidos a partir de *Quercus*, pertencem a uma nova espécie, *B. corticola* e não a *B. stevensii* (Alves *et al.* 2004). Outra espécie deste género, *B. dothidea* (anamorfo: *Fusicoccum aesculi*) foi descrita em Espanha como sendo o agente responsável do cancro e dessecação de ramos da esteva (*Cistus ladanifer*) na Andaluzia (Sánchez *et al.* 2002c) e de cancos de debilidade em ramos de sobreiro e azinheira (Sánchez *et al.* 2003c). A esteva tem a mesma distribuição geográfica que o género *Quercus* na Andaluzia e desde 1997 é frequente encontrar zonas com estevas doentes em zonas de *Quercus* afectadas por declínio. No entanto, no caso do cancro da esteva, o fungo actua como patogénio primário, não associado a situações de *stress* (Sánchez *et al.* 2002c).

Uma terceira espécie que causa cancos de debilidade em Andaluzia descreveu-se como *Othia spiraeae* (anamorfo: *Diplodia sarmentorum*) (Sánchez *et al.* 2003c). Actualmente, esta espécie foi classificada no género *Botryosphaeria* como *B. iberica* (anamorfo: *Dothiorella iberica*) (Phillips *et al.* 2005).

O ciclo de patogénese do género *Botryosphaeria* inicia-se com as infecções por ascósporos que se formam durante a fase sexuada do fungo (*B. corticola*, *B. dothidea*, *B. iberica*) ou por conídios, que se formam na fase assexuada (*Diplodia corticola*, *F. aesculi*, *D. iberica*). Os esporos infecciosos mais comuns são os conídios que se dispersam fundamentalmente através da chuva. As ferramentas

utilizadas no descortiçamento também podem constituir um meio de transmissão de doença. As lesões aparecem em poucos dias ou semanas depois da infecção e são visíveis depois do descortiçamento. A colonização dos tecidos corticais do sobreiro ou azinheira provoca necrose e consequentemente o aparecimento de cancos nos ramos, ou tronco, dando origem aos sintomas foliares: clorose e perda de viço. Depois da colonização dos tecidos corticais, inicia-se a produção de conídios nos picnídios, que se dispersam com a ajuda da chuva, vento ou insectos e originam os ciclos secundários da doença (Ragazzi *et al.* 1997).

Associado a exsudações do tronco em *Q. ilex* e *Q. pyrenaica* foi isolado a bactéria *Brenneria* (*Erwinia quercina*) (López *et al.* 1996; Biosca *et al.* 2003). A infecção desta bactéria caracteriza-se por feridas (cancros) de diferente dimensão nos ramos e tronco, que libertam uma substância espessa, viscosa, que se torna escura em contacto com o ar. As bolotas também apresentam este melão. *Brenneria quercina* foi isolada de exsudados do tronco e do melão das bolotas de *Q. ilex* e de exsudados do tronco e de gomos apicais de *Q. pyrenaica* em prospecções realizadas em Espanha na zona de Madrid e Segóvia, demonstrando uma associação consistente deste patógeno com os cancos (Biosca *et al.* 2003). Nenhum fungo foi associado a estes cancos, ou melão das bolotas ou gomos e não foi isolada nenhuma espécie de *Phytophthora* das raízes nem do solo da rizosfera das árvores afectadas (Soria *et al.* 1997). Experiências de inoculação com estes isolamentos reproduziram os sintomas em bolotas e plantas jovens e adultas em condições controladas e de campo (Biosca *et al.* 2003).

1.2.4.2. Destruição do sistema radicular

A distribuição de árvores afectadas em manchas, mais ou menos circulares, sugere a possibilidade de se estar em presença de uma doença radicular (Brasier *et al.* 1993a; 1993b). A morte de sobreiros em manchas e a hipótese de se tratar de um fungo de solo, já tinha sido referida no final do século XIX, princípio de século XX (Veríssimo-d'Almeida 1889; Silva-Tavares 1927). Embora este último autor não tivesse realizado trabalhos, intuiu que a morte dos sobreiros seria devido ao fungo que causava a morte dos castanheiros. No entanto, só alguns anos mais tarde se conseguiu isolar o fungo (Lopes-Pimentel 1946, 1947, 1953; Natividade 1950) mas a sua patogenicidade não foi demonstrada em sobreiro.

A associação das árvores doentes a linhas de água e a terrenos mobilizados, também se verifica (Brasier *et al.* 1993a, 1993b; Brasier 1996). Outro factor indicativo do envolvimento de fitopatogénios das raízes é a morte de arbustos, como por exemplo várias espécies do género *Cistus* (Brasier 1993; Moreira-Marcelino 2001; Moreira e Martins 2005).

A hipótese da existência de uma estreita associação entre *P. cinnamomi* e o declínio de sobreiros e azinheiras, foi apresentada no Congresso Internacional sobre o declínio dos carvalhos, realizado em Itália, em 1992 (Brasier 1993; Brasier *et al.* 1993a). Desde então, foi possível demonstrar a associação entre a presença deste patogénio nas raízes e o desenvolvimento de sintomas de declínio. Foram realizadas numerosas prospeções em Portugal e Espanha e *P. cinnamomi* foi isolado de raízes ou de solo da rizosfera de árvores que exibiam sintomas de declínio, ou que tinham morrido subitamente, sem que apresentassem outros sinais ou sintomas que levassem a supor terem sido induzidos por outros patogénios. Além disso, a patogenicidade de *P. cinnamomi* foi comprovada em condições controladas e de campo (Moreira *et al.* 1993, 1997; Brasier 1996; Tuset *et al.* 1996, 1997; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2000a, 2002a; Moreira-Marcelino 2001; Moreira e Martins 2005). Todos estes trabalhos levam a considerar *P. cinnamomi* como principal agente implicado no problema do declínio de sobreiro e azinheira na Península Ibérica.

Recentemente, uma nova espécie de *Pythium* (*P. spiculum*) (Paul *et al.* 2006) tem sido consistentemente isolado de raízes e solo da rizosfera de sobreiros e azinheiras afectadas com declínio, tanto em prospeções realizadas em Espanha como em Portugal e foi demonstrada a sua patogenicidade em azinheira (Romero *et al.* 2007).

O sistema radicular das árvores é constituído por raízes grossas e lenhosas que penetram profundamente no solo para fixar a planta. Estas raízes originam outras mais finas, que se desenvolvem principalmente nos primeiros 40-50 cm de solo e têm a função de alimentar a planta, absorvendo água e nutrientes. É também nesta zona que se encontram a maior parte dos fungos patogénicos de raízes. Estes fungos podem viver saprofiticamente ou formar estruturas de resistência, que persistem no solo, muitas vezes, durante vários anos (Tattar 1989).

No caso dos géneros *Phytophthora* e *Pythium*, quando as condições são favoráveis para a infecção, estes patogénios invadem o tecido cortical da raiz da planta hospedeira causando a sua necrose (Manion 1991). A invasão pode ter lugar através de feridas mas também podem penetrar directamente na planta por uma acção enzimática e mecânica combinada (Agrios 1997). O patogénio é capaz de invadir e matar rapidamente o tecido vivo das raízes da planta hospedeira. Esta destruição do sistema radicular produz carências hídricas e nutricionais na planta e finalmente a sua morte (Tattar 1989; Manion 1991). Existem outros fungos que parasitam o sistema radicular do hospedeiro durante muito tempo, causando podridão do tecido lenhoso da raiz e redução de crescimento das árvores. A longo prazo podem contribuir para a morte da árvore. É por exemplo, o caso dos fungos dos géneros *Armillaria* e *Heterobasidium* (Manion 1991).

1.3. A ESPÉCIE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

A palavra *Phytophthora* deriva do grego e significa destruidor de plantas. *Phytophthora cinnamomi* Rands é um patógeno de solo e foi descrito pela primeira vez por Rands em 1922, quando foi isolado da árvore da canela (*Cinnamomum burmannii* Blume) que estava afectada por cancro no tronco, na Samatra. É actualmente a espécie do género *Phytophthora* mais amplamente distribuída e o patógeno mais destrutivo, com uma ampla gama de hospedeiros, provocando doença em aproximadamente 1000 espécies de plantas (Zentmyer 1980, 1983; Erwin e Ribeiro 1996).

Várias espécies de *Phytophthora* constituem uma ameaça para ecossistemas naturais, culturas hortícolas, frutícolas tropicais e sub-tropicais, ornamentais e florestais, podendo causar graves perdas económicas. A maior parte das espécies de *Phytophthora* são fungos de solo que causam a destruição do sistema radicular e podem sobreviver longos períodos de tempo no solo sem a presença do hospedeiro (Erwin e Ribeiro 1996). Algumas espécies são específicas do hospedeiro, só atacando uma ou duas espécies de plantas, como *P. infestans*, mas outras têm uma ampla gama de hospedeiros e podem produzir sintomas similares ou diferentes em muitas espécies de plantas hospedeiras (Agrios 1997; Erwin e Ribeiro 1996).

O género *Phytophthora* relaciona-se muito com o género *Pythium*. Ambos se incluem no reino Chromista, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae (Hawksworth *et al.* 1995). As espécies de *Phytophthora*, de *Pythium*, assim como de outros Oomicetes, possuem características que as permitem distinguir de muitos outros fungos patogénicos (Zentmyer 1983). Assim, ao contrário de outros fungos (fungos verdadeiros), a maior parte do seu ciclo de vida é diplóide, as paredes celulares são compostas por celulose e β -glucanos em vez de quitina, produzem zoósporos biflagelados e não sintetizam esteróis, por isso são resistentes aos antibióticos polienes, como a pimaricina, necessitando no entanto, esteróis para esporularem (Erwin e Ribeiro 1996).

As diferenças entre *Phytophthora* e *Pythium* são principalmente a forma como são produzidos os zoósporos: no género *Phytophthora* são formados dentro do esporângio, em *Pythium* formam-se depois de uma vesícula de protoplasma fluir para fora do esporângio (Erwin e Ribeiro 1996). Existem também diferenças entre os dois géneros em relação à morfologia dos esporângios, clamidósporos e oósporos, além de todas as espécies de *Phytophthora* necessitarem de tiamina para crescerem em meio de cultura sintético e todas as espécies de *Pythium*, com excepção de *Py. vexans*, crescerem na sua ausência (Erwin e Ribeiro 1996).

Recentemente Dick (2002), baseando-se nas características dos flagelos dos zoósporos, propôs o reino Straminipila para incluir os Oomycetes, em vez do reino Chromista.

Phytophthora cinnamomi comporta-se como um habitante do solo e como tal, é um patogénio não especializado de raízes, provocando doença em muitas plantas lenhosas em regiões tropicais e nas zonas mais quentes das regiões temperadas (Roberts e Boothroyd 1984). Considera-se que é originário da Nova Guiné-Celebes-Malásia mas foi introduzido no Sul da Austrália, Havai, África Central, Continente americano e Europa (Zentmyer 1980). Este patogénio tem sido citado como a principal causa de declínio da floresta de eucaliptos (*Eucalyptus marginata* Donn. Ex Sm.) e de mais de 90 espécies indígenas no Oeste da Austrália (Newhook e Podger 1972). É responsável pela destruição do sistema radicular e de podridão do colo de uma vasta gama de plantas ornamentais e culturas agrícolas, como o ananás [*Ananás comosus* (L.) Merr.], o kiwi (*Actinidia chinensis* Planch.) e o abacateiro (*Persea americana* Miller). É o agente causal da doença da “tinta” no castanheiro (*Castanea sativa* Miller), tanto na Europa (Grente 1961; Vettraino *et al.* 2005) como nos Estados Unidos (Crandall 1950), da doença da folha pequena no pinheiro (*Pinus echinata* Mill. e *P. taeda* L.) no Sul dos Estados Unidos (Lorio 1966) e também tem sido referido como causa de prejuízos em muitas plantas de viveiro (Zentmyer 1983; Sánchez *et al.* 2005). Mais recentemente este patogénio tem sido referido como implicado no declínio de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* que vem acontecendo na zona mediterrânea (Brasier *et al.* 1993, 1996; Moreira *et al.* 1993, 1996; Caetano *et al.* 2003; Sánchez *et al.* 2002b, 2003b).

A primeira variedade conhecida de *P. cinnamomi* e a única desde 1922, quando a espécie foi descrita pela primeira vez, foi *P. cinnamomi* var. *cinnamomi*. No entanto, em 1993 Kröber e Marwitz descreveram *P. cinnamomi* var. *parvispora*, isolada de plantas ornamentais do género *Beaucarnea* na Alemanha (Erwin e Ribeiro 1996). Esta variedade difere da *cinnamomi* principalmente por apresentar clamidósporos de menor tamanho (16-43µm). Também é referido a menor dimensão dos esporângios (média de 36.9 x 25,5 µm) e uma temperatura de crescimento mais alta (36-37°C) (*Ibidem*).

Outra variedade de *P. cinnamomi* foi identificada por Ho (2002) a partir de isolamentos obtidos de *Robinia pseudoacacia* L. na China (*P. cinnamomi* var. *robiniae* H.H.Ho var. nov.). Esta nova variedade difere das anteriores pela ausência de clamidósporos.

Nenhuma destas variedades foi associada ao declínio de *Quercus* spp.

1.3.1. Caracterização morfológica

O micélio de *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* é constituído por hifas tubulares ramificadas, com 6 a 14 µm de diâmetro (Erwin e Ribeiro 1996). As hifas podem ser lisas, nodosas ou apresentar dilatações (*hyphal swellings*). O micélio é cenocítico, diplóide e quando jovem, apresenta-se hialino, quase transparente. As dilatações das hifas são uma característica de *P. cinnamomi* que

permite diferenciá-la de outras espécies. Estas dilatações não estão delimitadas por septos e o seu conteúdo celular e parede são idênticos aos das hifas. Podem ser intercalares ou terminais, de forma esférica, elipsóide ou angular e aparecerem isoladas, ou agrupadas em forma de racimos de tamanho variável. Estas estruturas podem-se observar principalmente em meio de cultura líquido (*Ibidem*).

Estruturas reprodutivas assexuadas

Os esporângios são as principais estruturas reprodutivas assexuadas. São produzidos na parte final de hifas especializadas, os esporangióforos. Os esporângios são estruturas multinucleadas separadas do esporangióforo por um septo basal. Podem ser de forma ovóide, piriforme ou elipsóide e na sua parte apical não apresentam papila (engrossamento apical). As dimensões variam muito segundo o isolamento, podendo apresentar valores entre 11-103 μm para o comprimento e de 11-53 μm para a largura (*Ibidem*). Os esporangióforos são simples ou com ramificação simpodial, apresentando muitas vezes ramificação interna. Os esporângios permanecem sempre no esporangióforo (*Ibidem*).

Os esporângios têm a capacidade de poder germinar directamente como micélio ou emitir zoósporos móveis. Na parte apical do esporângio está o poro de saída dos zoósporos, que normalmente é estreito (5 μm) (Stamps *et al.* 1990). Os zoósporos têm forma de rim e são biflagelados, com dois flagelos diferentes entre si, que saem da parte côncava. São produzidos no interior do esporângio e saem já formados. Pelo contrário, no género *Pythium*, o esporângio expulsa uma vesícula com protoplasma que, uma vez fora, se diferencia em zoósporos (Erwin e Ribeiro 1996).

Outras estruturas reprodutivas assexuadas que se observam mais frequentemente em meio líquido são os clamidósporos. Estes podem ser intercalares ou terminais, aparecendo muitas vezes em racimos de 3 a 10. Em geral têm forma esférica, com 31 a 50 μm de diâmetro e por vezes elipsoidal. São delimitados por uma parede grossa e lisa. Normalmente são hialinos mas podem tornar-se escuros. O seu conteúdo é denso, observando-se por vezes um corpo central. São as estruturas de resistência mais frequentes e persistentes no solo (Hwang e Ko 1978; Erwin e Ribeiro 1996).

Estruturas reprodutivas sexuadas

A reprodução sexuada envolve a formação de gametângios femininos (oogónios) e masculinos (anterídeos). Ambos se formam normalmente no extremo das hifas, embora possam ser intercalares. O oogónio cresce através do anterídio, de modo que depois de formado, o anterídeo apresenta-se como um corpo que rodeia o pedúnculo do oogónio, denominando-se anterídeo anfigino. Os anterídios podem ser unicelulares ou bicelulares de dimensões entre 17-19 μm (Erwin

e Ribeiro 1996). O oósporo resultante da união dos gametângios é plerótico, ocupando todo o oogónio. Tem parede grossa, forma esférica, é hialino ou de cor amarelada e de dimensão entre 19-54 µm (*Ibidem*). A meiose ocorre nos gametângios antes da sua união para formar os oósporos, o que é uma característica dos oomicetes.

Phytophthora cinnamomi é uma espécie maioritariamente heterotática, produzindo as estruturas sexuadas a partir de formas ou *mating types* de tipo de emparelhamento oposto. Geralmente as formas complementares designam-se por A1 e A2. A forma A2 de *P. cinnamomi* é a mais comum e encontra-se distribuída mundialmente. A forma A1 tem uma distribuição mais restrita. Os oósporos são estruturas de resistência, permitindo ao fungo sobreviver fora do hospedeiro longos períodos de tempo (Zentmyer 1980). No entanto, devido à ausência da forma A1 na Península Ibérica, os oósporos não serão comuns nesta zona.

A produção de oósporos pode contudo ser induzida em culturas do tipo A2 quando crescem na presença de extracto de raiz de abacateiro, grãos de aveia ou na presença de exsudados de *Trichoderma viride* (Zentmyer 1952, 1979; Royle e Hickman 1964; Brasier 1978). McCarren (2006) refere a produção de oósporos de culturas heterotáticas de *P. cinnamomi* A2 *in vitro* que se comportam como espécies homotáticas na ausência de factores de *stress*.

A reprodução sexuada possibilita a recombinação genética e o aparecimento de novas raças ou biótipos (Zentmyer 1980; Erwin e Ribeiro 1996). No entanto, na Austrália em áreas onde existem as formas A1 e A2, não se encontraram evidências de reprodução sexuada. (Dobrowolski *et al.* 2002).

1.3.2. Caracterização patogénica

Ciclo de vida

Phytophthora cinnamomi encontra-se no solo, normalmente na forma de estruturas de sobrevivência (principalmente clamidósporos mas também oósporos). Se as condições ambientais são as adequadas, principalmente temperatura apropriada e existência de água livre no solo, estas estruturas germinam, produzindo esporângios que libertam zoósporos. Os zoósporos são considerados os propágulos de infecção mais importantes, pois podem produzir várias gerações durante o período em que as condições ambientais se mantiverem apropriadas (Zentmyer 1980; Erwin e Ribeiro 1996). Podem deslocar-se activamente na água livre do solo, através do movimento dos seus flagelos, ou serem arrastados pela água das chuvas (Zentmyer 1980; Weste 1983). Podem nadar durante horas e são atraídos quimicamente pelos exsudados dos tecidos jovens da zona de alongação da raiz (quimiotaxia positiva) de potenciais plantas hospedeiras (Carlile 1983; Shearer e Tippett 1989; Hardham 2001). Aminoácidos, açúcares e etanol, são exemplos de substâncias que atraem os zoósporos (Carlile 1983; Erwin e Ribeiro 1996). Algumas espécies de

Phytophthora e *Pythium*, especialmente as que têm um restrito número de hospedeiros, apresentam uma maior especificidade na sua atracção para os exsudados de raiz (Carlile 1983). A especificidade está correlacionada com a carga eléctrica que apresentam os flagelos anterior e posterior dos zoósporos (Tyler 2002). Além dos zoósporos conterem informação sobre o ambiente químico, podem também integrar informação sobre o ambiente eléctrico, o que parece permitir aos zoósporos distinguir as raízes vivas das mortas e contribuir para a selecção do local da infecção na superfície da raiz (Moris e Gow 1993). Os zoósporos de *P. cinnamomi* nadam ao longo da superfície da raiz com o lado ventral voltado para baixo antes de enquistarem (Hardham e Gubler 1990).

Ao encontrarem a superfície de uma raiz os zoósporos enquistam. Nessa altura, perdem os flagelos, segregam material adesivo e no curto período de 5 a 10 min tomam a forma arredondada (quisto) dando origem a uma parede celular espessa (Erwin e Ribeiro 1996; Hardham 2001). Depois de permanecerem nesta fase 20-30 min os quistos germinam, produzindo tubos germinativos que penetram nas células da raiz (Hardham 2001). Uma vez dentro das células hospedeiras, o tubo germinativo ramifica-se, formando micélio que cresce intercelularmente, macerando a parede das células dos tecidos cortical e vascular não lenhificados e não suberizados (Shearer e Tippett 1989). Geralmente a infecção inicia-se na zona de elongação das raízes ou através de feridas. Diferentes componentes da raiz, como polissacáridos, presença de cálcio ou nutrientes (Deacon e Donaldson 1993) podem contribuir para estimular ou provocar o enquistamento dos zoósporos. A germinação dos quistos para formar hifas também é estimulada por cálcio e outros nutrientes (Hardham e Gubler 1990).

Dois ou 3 dias após o início da invasão dos tecidos do hospedeiro, o patogénio pode esporular, formando clamidósporos nas células corticais e esporângios na superfície da raiz (Ho e Zentmyer 1977). E novamente os esporângios libertam zoósporos e o ciclo recomeça. Os zoósporos continuam a infecção na raiz ou infectam raízes adjacentes. Quando as condições não são favoráveis o fungo sobrevive no solo ou nos tecidos infectados sob a forma de clamidósporos que se mantêm no estado de latência por períodos mais ou menos longos. Quando estimulados pela presença de um hospedeiro e condições ambientais favoráveis, os clamidósporos germinam dando origem a novas hifas infecciosas. A Figura 1.5 esquematiza o ciclo de vida de *P. cinnamomi*.

Epidemiologia

A infecção por microrganismos do género *Phytophthora* é favorecida pela presença de água livre no solo. Estes microrganismos têm grande capacidade reprodutiva, aumentando o inóculo inicial rapidamente, por essa razão, as doenças que provocam são consideradas multiciticas (Erwin e Ribeiro 1996).

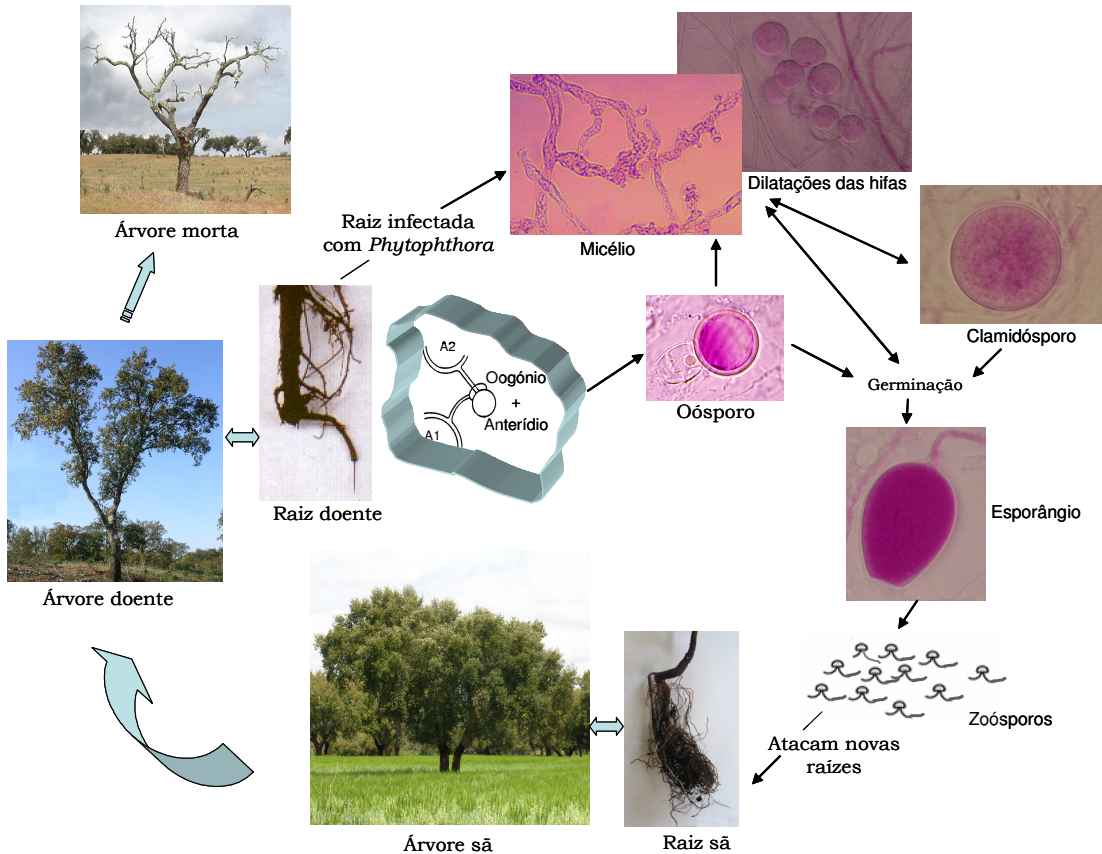


Figura 1.5 - Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*.

Phytophthora cinnamomi é, como anteriormente se refere, um dos patógenos mais destrutivos conhecidos, causando a morte massiva de raízes absorventes, o que reduz a capacidade da planta de absorver água e nutrientes (Zentmyer 1980). Muitos hospedeiros deste patógeno são plantas lenhosas de regiões temperadas e subtropicais, incluindo áreas no Sul e Este da Austrália.

As plantas infectadas muitas vezes começam por mostrar sintomas de seca e/ou deficiência nutricional, debilitam-se e tornam-se susceptíveis ao ataque por outros patógenos ou outras causas que, muitas vezes erradamente, se consideram a causa primária da morte das plantas (Agrios 1997).

As plantas jovens com grande proporção de raízes absorventes em solos encharcados, assim como raízes que sofreram *stress* hídrico ou feridas, são especialmente susceptíveis ao ataque por *P. cinnamomi*. Em zonas sujeitas a encharcamentos, a incidência de raízes afectadas aumenta, observando-se muitas vezes a perda quase total de raízes absorventes e necroses na parte inferior do tronco e na zona do colo (Sánchez *et al.* 2002b, 2003b). Locais onde o patógeno existe em elevada densidade e a expressão da doença é reduzida, revela um equilíbrio ecológico do patógeno

com as espécies de hospedeiros. A baixa incidência de raízes afectadas em solos onde existe o patogénio atribui-se a características do solo, principalmente à falta de humidade e à presença de microrganismos antagonistas do patogénio (Erwin e Ribeiro 1996).

A deficiência em oxigénio causada pelo encharcamento causa *stress* na planta. A estrutura da raiz e as suas funções são alteradas. Entre outros efeitos, dá-se uma prematura senescência e deficiências minerais nas folhas, retarda-se o crescimento de novos rebentos, suprime-se a associação com micorrizas e admite-se que a biossíntese de fitoalexinas é afectada (Drew e Lynch 1980). A influência e a duração das condições de encharcamento na severidade dos danos diferem com o hospedeiro (Browne e Mircetich 1988).

Se bem que, de forma geral, as infecções por *P. cinnamomi* sejam favorecidas pelo encharcamento do solo, os danos mais graves têm lugar em zonas assoladas por longos períodos de seca, principalmente quando, depois de uma Primavera chuvosa, ocorrem Verões e Outonos secos e com altas temperaturas (Erwin e Ribeiro 1996; Agrios 1997). Na Primavera, as condições de temperatura e de humidade favorecem a germinação dos clamidósporos, que germinam libertando zoósporos que infectam novas raízes. No Verão e no Outono, as árvores com o sistema radicular infectado não são capazes de resistir ao défice hídrico e morrem. Em climas mais frescos e húmidos as árvores sobrevivem durante vários anos, apresentando sintomatologia semelhante aos causados pela falta de água e nutrientes. Nestes casos, a árvore tem capacidade de emitir novas raízes para repor as afectadas pelo fungo, por períodos mais ou menos longos, antes de morrer. Noutros casos, as árvores morrem repentinamente, devido à severidade da infecção radicular (Zentmyer 1980).

1.4. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

Controlo de doenças radiculares

A escolha das medidas a adoptar para o controlo de doenças em plantas pressupõe um correcto entendimento do que é doença e da importância do papel desempenhado por cada um dos componentes envolvidos na manifestação de doenças em plantas. Para o controlo de doenças radiculares, como a que causa *P. cinnamomi* em *Q. suber* e *Q. rotundifolia* na Península Ibérica, este entendimento pressupõe particular acuidade.

Uma doença é o resultado da interacção simultânea de três factores: um patogénio, um hospedeiro, e condições ambientais favoráveis à interacção patogénio-hospedeiro (Agrios 1997). Este conceito costuma representar-se esquematicamente em forma de triângulo, no entanto os factores não se

situam ao mesmo nível. Assim, o envolvimento das condições ambientais no processo infeccioso dá-se só depois do hospedeiro e patogénio entrarem em contacto, como salientam Roberts e Boothroyd (1984). Estes autores referem que as condições ambientais podem influenciar a actividade dos agentes que causam doença; podem determinar a extensão e gravidade dos sintomas manifestados pelo hospedeiro; podem afectar a complexa interacção entre plantas e agentes causais, mas não são a causa primária do processo infeccioso. No entanto, o ambiente é tão importante que, quanto mais tempo perdurarem as condições ambientais favoráveis à interacção hospedeiro-patogénio, tanto mais severa será a doença. Como os sintomas de doenças radiculares se assemelham aos provocados por factores ambientais é, embora erradamente, muito comum a sobrevalorização destes factores como causa destas doenças.

Ao contrário do que se passa com as doenças da parte aérea das plantas, as doenças do sistema radicular, por se desenvolverem fora do alcance visual do observador, passam despercebidas durante a fase inicial da doença, verificando-se que quando os primeiros sintomas nas folhas e ramos se tornam perceptíveis já o sistema radicular se encontra severamente danificado (Ferraz 1985b; Erwin e Ribeiro 1996). Este facto tem implicações na forma de abordar o controlo e tratamento destas doenças.

A diferença mais evidente ao nível do controlo de doenças da parte aérea e radicular é a fase do ciclo de vida do patogénio que é o alvo das medidas de controlo. No caso de doenças da parte aérea o controlo incide directamente sobre o patogénio, durante a sua fase parasítica, por ser nesta fase que apresenta maior vulnerabilidade. O controlo em doenças radiculares é essencialmente preventivo, realizando-se durante a fase em que o patogénio sobrevive no solo na ausência do hospedeiro, ou seja, quando o patogénio não coloniza os tecidos vivos do seu hospedeiro, que é a fase em que constitui o maior risco potencial para as culturas susceptíveis.

Relativamente ao hospedeiro as medidas de controlo a considerar são diferentes conforme se trata de uma cultura anual ou vivaz, herbácea ou lenhosa. Para algumas culturas herbáceas ou frutícolas, devido às suas valiosas produções, o tratamento pode ser economicamente aceitável, mas para espécies florestais já instaladas, o tratamento poderá ser questionável. Por outro lado, os diferentes modos como os patogénios se comportam no solo determinam, em última análise, as medidas de controlo a utilizar.

Devido à dificuldade de controlar o alastramento de uma doença radicular, uma vez iniciada em espécies arbóreas, as estratégias de controlo deverão ser definidas no momento da instalação dessas espécies no terreno.

Medidas de controlo de *Phytophthora cinnamomi*

O patógeno *P. cinnamomi* é considerado um parasita não especializado, mas por outro lado, a sua reduzida capacidade de competição saprofítica assemelha-o aos parasitas especializados (Garret 1970; Ferraz 1985a). Esta reduzida capacidade competitiva é evidenciada pela dificuldade, ou mesmo impossibilidade, do seu isolamento a partir de raízes mortas do seu hospedeiro, de onde terá sido desalojado por outros microrganismos com mais elevada capacidade de competição saprofítica. No entanto, para compensar esta reduzida capacidade saprofítica, este patógeno tem a faculdade de sobreviver activamente em hospedeiros alternativos e na forma latente como clamidósporos no solo.

O controlo de *P. cinnamomi* é complexo devido ao período, às vezes longo, entre o estabelecimento da infecção e a manifestação dos sintomas, à vasta gama de hospedeiros e à longevidade das suas estruturas de resistência no solo (Erwin e Ribeiro 1996). Por outro lado, as plantas que exibem sintomas de infecção severos raramente sobrevivem, independentemente do tipo de tratamento a que sejam sujeitas (Ribeiro e Linderman 1991). Também a erradicação das infecções em plantas lenhosas é muito difícil ou mesmo impossível se as plantas crescem em solo contaminado (Coffey 1991; Ribeiro e Linderman 1991). No entanto, algumas medidas podem ser tomadas para evitar ou atenuar os efeitos causadas por *P. cinnamomi*.

Segundo Phillips e Burdekin (1992) as medidas de controlo podem ser divididas em dois grupos:

- as que evitam a disseminação de *P. cinnamomi* para regiões ainda livres deste patógeno;
- as que impedem a progressão da doença onde já existe.

1.4.1. Medidas preventivas

Porque a infecção por espécies de *Phytophthora* ocorre muitas vezes durante a fase de propagação das plantas ou no seu estado juvenil, mas os sintomas só aparecem quando as plantas já estão no estado de produção ou no local definitivo de plantação, as medidas de controlo devem ser principalmente preventivas (Ribeiro e Linderman 1991). Estas medidas de controlo podem ser dirigidas para cada um dos três factores que condicionam o aparecimento da doença. Assim, as dirigidas ao hospedeiro podem ser:

- *Utilização de variedades de hospedeiro resistentes*

A utilização de variedades de espécies lenhosas resistentes a *Phytophthora* spp. é limitada. A bibliografia consultada refere a existência de algumas variedades resistentes em espécies frutícolas

(citrinos, abacateiro, pessegueiro, macieira) além de variedades de oliveira, castanheiro e eucalipto. No entanto, verifica-se que muitas vezes a resistência não é completa.

O estudo de variedades resistentes de sobreiro e azinheira à infecção por *P. cinnamomi* tem sido desenvolvido desde 2004 no âmbito de um projecto de investigação entre a Universidade de Huelva (Espanha), a Universidade do Algarve e a Estação Agronómica Nacional (Portugal). Os resultados preliminares deste estudo indicam que existe uma grande variedade de resposta à infecção por *P. cinnamomi* por parte de plantas de sobreiro e azinheira procedentes de diferentes regiões (Tapias *et al.* 2005, 2006). Estudos moleculares concluíram que os sobreiros que morrem de morte súbita não têm o gene que codifica a proteína QsCAD1 (cinamil álcool desidrogenase 1), que está envolvida na resposta à infecção por *P. cinnamomi*. Estes sobreiros não são capazes de converter o factor de virulência (toxina) produzido pelo patogénio, num produto não tóxico para a célula e morrem rapidamente (Coelho 2003; Coelho *et al.* 2006b).

- *Utilização de plantas sãs*

A utilização de plantas certificadas é uma das medidas mais importantes para evitar a disseminação da doença em novas plantações. Várias espécies de *Phytophthora* foram detectadas em *Quercus* spp. em viveiros comerciais (Sánchez *et al.* 2005). As medidas de controlo em viveiros devem ser principalmente preventivas e são fundamentais para evitar a dispersão da doença no campo. No entanto, para muitas culturas, este controlo é difícil devido a vários factores, nomeadamente, elevada densidade de plantas, difícil detecção precoce da infecção, realização da mesma cultura num mesmo lugar durante muito tempo, utilização de grande quantidade de água e fertilizantes, possível infestação de áreas livres de inóculo por água contaminada, reutilização de material contaminado e falta de fungicidas eficazes (Ribeiro e Linderman 1991). Muitos viveiros fazem tratamentos profiláticos com metalaxil ou fosetil de alumínio, no entanto, deverá ter-se em conta que as substâncias químicas não erradicam completamente o patogénio e que algumas destas substâncias são fungistáticas e não fungicidas. Recomenda-se, por isso, desinfestar os recipientes onde se encontram as plantas para eliminar algum possível inóculo e tratar a água quimicamente ou por filtração nos sistemas em que a água de rega se reutiliza (*Ibidem*).

- *Utilização de plantas micorrizadas*

As micorrizas são fungos que vivem em simbiose com as plantas ajudando-as na captura de água e nutrientes, no crescimento, e no estado sanitário geral. As ectomicorrizas, micorrizas que envolvem a raiz e crescem entre as suas células corticais (Bergero *et al.* 2000) reduzem a infestação de *P. cinnamomi* numa ampla gama de árvores hospedeiras (Ross e Marx 1972; Marx 1973). Esta redução é conseguida devido à protecção que proporciona o manto fúngico nas raízes, à produção de antibióticos inibidores do patogénio e ao aumento das populações de microrganismos antagonistas na rizosfera (Ribeiro e Linderman 1991; Shea e Brodbent 1983). A eficácia das

ectomicorrizas no controlo da infecção depende do estado fisiológico da raiz micorrizada e do tipo de fungo que a forma.

A simbiose formada entre fungos e plantas é extremamente importante num ambiente em que o equilíbrio ecológico é bastante frágil e manipulado pelo homem, como são os montados ou *dehesas*. É importante que as plantas utilizadas na reflorestação de áreas afectadas pelo declínio de *Quercus* spp. apresentem uma adequada micorrização de forma a garantir a sobrevivência das jovens plantas transplantadas e o seu bom estado sanitário. Para tal, é necessário que a inoculação com a micorriza seja realizada durante a propagação das plantas, para que o fungo possa estabelecer-se nas raízes, antes da transplantação para o lugar definitivo. Especial atenção deve ser dada ao tipo de micorriza, para que esteja adaptado às condições edafo-climáticas para onde as plantas serão transplantadas.

As medidas de controlo dirigidas ao patogénio podem ser:

- *Evitar a disseminação de Phytophthora cinnamomi*

O patogénio pode ser rapidamente disseminado ao introduzir solo infestado em locais que se encontram livres. Medidas que visam a redução da dispersão do patogénio por utilizadores da floresta foram estabelecidas por entidades de gestão florestal na Austrália e nos Estados Unidos da América. Estas medidas foram apresentadas e discutidas em congressos internacionais: *International Workshop of IUFRO Working Party 7.02.09: Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems* que se realizaram desde 1999 e consistem, por exemplo no mapeamento actualizado de áreas infestadas, na cuidadosa calendarização de operações a realizar na floresta; na restrição do movimento de veículos, pessoas e materiais de áreas infestadas para áreas não infestadas, assim como na limpeza destes veículos e materiais e prevenção da drenagem da água de zonas infestadas para zonas não infestadas (Colquhoun 1999).

Novas infestações com o patogénio podem induzir novos tipos de patogenicidade e aumentar o impacto da doença na vegetação da floresta que ainda permanece viva ou que está a regenerar (Tommerup *et al.* 1999). A quarentena à escala local, regional, nacional e internacional, visa minimizar os riscos da introdução de novas raças de *P. cinnamomi*. Por outro lado, a ausência de sintomas nas plantas fornecidas pelos viveiros é uma ameaça à quarentena e à certificação de *livre de doença*, por isso o diagnóstico em laboratórios especializados deverá ser uma rotina para detectar a importação do patogénio para novas áreas.

- *Solarização do solo*

Vários estudos indicam que a solarização reduz a densidade de população de *Phytophthora* spp. e reduz a incidência da doença (López-Herrera *et al.* 1997; Coelho *et al.* 1999; McGovern *et*

al. 2000; May-de-Mio *et al.* 2002). Esta medida é praticável em algumas situações e para algumas culturas com alto valor económico, porém não é realizável numa floresta.

Das medidas de controlo destinadas a modificar as condições ambientais no sentido de impedir que estas favoreçam a interacção hospedeiro-patogénio destacam-se as seguintes:

- *Utilizar o tipo de solo adequado à cultura*

Quanto mais as condições ambientais se aproximarem do óptimo das espécies cultivadas, maior será a sua resistência às doenças (Garret 1970; Ferraz 1990). Por isso, ao instalar uma cultura susceptível a *P. cinnamomi*, deverá dar-se especial atenção ao tipo de solo. A instalação de plantas em solos não infestados com o patogénio requer previamente conhecimento sobre a presença deste no terreno ou sobre as culturas susceptíveis ao patogénio que precederam a instalação das plantas (Fry 1982). O solo deverá estar livre de restos de culturas anteriores e sempre que possível deverá ser supressivo para o patogénio. Os solos supressivos para *P. cinnamomi* são aqueles onde este patogénio não se consegue estabelecer ou, no caso de se estabelecer, não produz doença ou a sua severidade vai diminuindo com o passar do tempo (Erwin e Ribeiro 1996). Estes solos têm elevadas populações de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*) e fungos (*Trichoderma*) que provocam a lise das hifas de *Phytophthora* spp. (Malajczuk 1983) e impedem a formação de esporângios (Weste 1983).

Vários estudos têm analisado o efeito de presença de microrganismos e compostos anti-fúngicos no crescimento de *P. cinnamomi* e na infecção que causa este patogénio. Algumas espécies de *Streptomyces* mostram efeito inibidor *in vitro* para isolamentos de *P. cinnamomi* (Finlay e McCracken 1991). No entanto, apesar do efeito inibitório no crescimento de *P. cinnamomi*, o seu potencial com agente de biocontrolo é limitado porque os Actinomicetes encontram-se mais nos solos secos e produzem grandes quantidades de antibióticos em situações de baixo potencial de água, ou seja, em condições desfavoráveis ao desenvolvimento de *P. cinnamomi* (*Ibidem*). Apesar de várias espécies de *Trichoderma* serem capazes de controlar o desenvolvimento de espécies de *Phytophthora* (Erwin e Ribeiro 1996; Ribeiro e Linderman 1991), *T. harzianum* tem um efeito estimulador na produção de esporângios, o que pode provocar um aumento do inóculo potencial (Finlay e McCracken 1991). *Myrothecium verrucaria* causa distorção das hifas de *P. cinnamomi* e inibe ligeiramente o crescimento *in vitro* (*Ibidem*; Erwin e Ribeiro 1996). Em ensaios em estufa *M. roridum* proporcionou controlo da infecção por *P. cinnamomi* em plantas de *Persea indica* (Gees e Coffey 1989). O crescimento de *P. cinnamomi* também é inibido *in vitro* por compostos anti-fúngicos produzidos por *Epicoccum purpurascens* (Finlay e McCracken 1991). Foi também estudado o efeito de *E. purpurascens* na infecção por *P. cinnamomi* em plantas de *Lupinus albus* e *Erica vagans*. Embora não se tenham observado diferenças no tamanho das plantas, não se reisolou

P. cinnamomi das raízes de *Lupinus* infestadas, nem se verificaram sinais de infecção nas raízes das duas espécies de plantas (*Ibidem*).

- *Práticas culturais adequadas*

Os factores ambientais que predis põem o hospedeiro à infecção por *Phytophthora*, como por exemplo a salinidade do solo, o excesso de fertilização nitrogenada, o *stress* hídrico, por seca ou encharcamento, podem atenuar-se mediante práticas culturais apropriadas (Erwin e Ribeiro 1996).

A alteração do pH do solo pela aplicação de sais pode ser uma medida efectiva de controlo. Embora as espécies de *Phytophthora* tolerem uma ampla gama de pH a aplicação de produtos para reduzir o pH foi eficaz no controlo de problemas radiculares causado por *P. cinnamomi* (Zentmyer 1980).

A aplicação de compostos orgânicos ao solo proporciona uma microflora e fauna mais complexa e antagonista, além de melhorar o vigor do hospedeiro ao melhorar a estrutura do solo, regular a humidade e adicionar nutrientes (Shea e Broadbent 1983). Os ácidos húmicos e fúlvicos existentes na matéria orgânica podem reduzir a incidência da infecção por espécies de *Phytophthora*, como por exemplo quando se aplica em macieira (Ellis *et al.* 1986; Ribeiro e Linderman 1991) ou nos arbustos *Thryptomene calycina* e *Banksia spinulosa* (Aryantha *et al.* 2000).

Actualmente, em alguns povoamentos de sobreiros já é uma prática habitual o corte do mato, a sua trituração e incorporação no solo.

1.4.2. Medidas de controlo onde a doença existe

Neste caso torna-se necessário aplicar estratégias de controlo para reduzir a incidência e severidade da doença e impedir a dispersão do patogénio para plantas sãs. De entre as várias medidas que se podem realizar destacam-se algumas:

- *Práticas culturais*

Algumas práticas culturais podem potenciar factores físicos do solo desfavoráveis ao crescimento de espécies de *Phytophthora*. Por exemplo, a manutenção de uma adequada drenagem do solo, evita o *stress* nas plantas e condições propícias à multiplicação e dispersão de *Phytophthora* spp. Também a incorporação de matéria orgânica melhora a estrutura do solo, disponibiliza nutrientes para o hospedeiro e incrementa a actividade da microfauna, designadamente, os microrganismos antagonistas.

Nos sobreirais e montados ou *dehesas* na Península Ibérica acontecem muitas vezes, mais do que seria desejado, situações de incêndio. O fogo faz parte do ambiente em muitas regiões do mundo, especialmente em climas mediterrâneos e tem sido usado em algumas florestas para a regeneração de árvores e para remover detritos vegetais, que são uma ameaça de incêndio (Shea e Broadbent 1983). Controlando a frequência, a intensidade e a época em que acontecem, pode-se alterar a estrutura e a composição do ecossistema, influenciando o controlo de *P. cinnamomi*. Na Austrália, o fogo foi usado nas florestas de eucaliptos, e os resultados indicam que tanto pode ter influência negativa como positiva, no controlo de *P. cinnamomi* (*Ibidem*). Também em zonas afectadas pelo declínio do sobreiro na Serra do Caldeirão (Portugal), foram observadas situações em que áreas que recuperavam de um incêndio acontecido 2 anos antes, apresentavam sobreiros com índices de desfoliação inferiores aos que se encontravam em zonas não ardidas, quer em zonas intervencionadas recentemente pelo homem, quer em zonas não intervencionadas há mais de 10 anos (Anónimo 2006).

O fogo afecta o hospedeiro, o patogénio e o ambiente e o seu efeito no desenvolvimento do declínio do sobreiro e azinheira deverá ser devidamente estudado.

- *Aplicação de produtos biológicos e químicos*

O controlo biológico de *P. cinnamomi* é uma prática estabelecida na indústria comercial e hortícola, no entanto isso ainda não acontece em florestas naturais (D'Souza *et al.* 2004). Ensaio de campo na parte Ocidental da Austrália concluíram que a leguminosa *Acacia pulchella* é capaz de proteger *Banksia grandis* da infecção por *P. cinnamomi* por mais de um ano, nos sítios reabilitados onde se extraía a bauxite (*Ibidem*). Este facto, confirmou o potencial de *A. pulchella* como um agente de controlo biológico de *P. cinnamomi* em comunidades de plantas infectadas.

Em Portugal, trabalhos realizados na Universidade do Algarve demonstraram que os extractos alcoólicos de raízes de *Phlomis purpurea* reduzem significativamente o crescimento de *P. cinnamomi in vitro* (Neves 2007). Este autor, também estudou a patogenicidade de *P. cinnamomi* nestas plantas e não conseguiu reisolar o patogénio das raízes infestadas que, não apresentavam sintomas de infecção.

Os fungicidas raramente pode curar plantas arbóreas infectadas, quando a sua aplicação não é conjugada com outros métodos de controlo (Ribeiro e Linderman 1991). Não obstante, a aplicação de produtos químicos, constitui uma opção tentadora no controlo de doenças, pois geralmente são fáceis de aplicar, actuam rapidamente, são persistentes, eficazes e de custo relativamente baixo.

Porém, o controlo químico dos Oomycetes é difícil dadas as características que os diferenciam dos outros fungos: como têm celulose na sua parede celular em vez de quitina, são insensíveis aos antibióticos polioxínicos; ao não sintetizarem esteróis, os fungicidas que inibem a sua síntese não

são eficazes; como a estrutura da tubulina, proteína implicada na divisão celular, é diferente no género *Phytophthora*, o benomil, fungicida muito utilizado para outros fungos, também não é eficaz (Griffith *et al.* 1992).

Uma vez que as plantas mostram sintomas de infecção avançada raramente poderão ser recuperadas pelo tratamento. Os fungicidas sistémicos por se moverem no interior da planta apresentam a vantagem de estarem menos sujeitos a perderem-se por lixiviação e degradação no solo, comparado com os fungicidas protectores, que têm um relativo efeito curativo.

No mercado existem vários fungicidas sistémicos como carbamatos, acetamidas, acilalaninas, outras amidas e fosfonatos que têm sido descritos como eficazes no controlo de fungos da família Pythiaceae.

A erradicação das infecções provocadas por espécies de *Phytophthora* em plantas lenhosas é muito difícil, ou mesmo impossível, quando já estão implantadas no terreno. No entanto, plantas jovens de espécies lenhosas podem ser tratadas com produtos químicos, aquando da sua transplantação, verificando-se que os fungicidas metalaxil e fosetil-Al aplicados só, ou em combinação, têm-se mostrado eficazes.

A introdução de substâncias directamente no xilema por infusão (utilização da transpiração para a entrada da substância) ou injeção (emprego de uma força adicional) é um método alternativo de aplicação de fungicidas. As injeções tem sido usadas na luta contra doenças provocados por fungos de solo e micoses vasculares e mais recentemente no declínio de *Quercus* (Fernandez-Escobar *et al.* 1994, 1999; Romero *et al.* 2004) com resultados muito encorajadores.

Os fungicidas sistémicos podem inibir a produção de clamidósporos e a libertação de zoósporos, mas rapidamente se desenvolve resistência na população do patogénio (Schwinn 1983; Cohen e Coffey 1986; Finlay e McCracken 1991).

Embora o controlo químico seja amplamente utilizado em horticultura, nem sempre é praticável e económico em outras situações. Segundo D'Souza *et al.* (2004) este controlo justifica-se em florestas de eucalipto na parte Ocidental da Austrália para proteger espécies em vias de extinção.

A utilização de um controlo que integre todas as medidas disponíveis na luta contra espécies de *Phytophthora* parece ser a forma mais correcta de actuar (Coffey 1991; Ribeiro e Linderman 1991). Em abacateiro, por exemplo, a utilização de variedade resistentes, o uso de técnicas culturais apropriadas e a aplicação de fungicidas, tem dado resultado no controlo de *P. cinnamomi* (Coffey 1991).

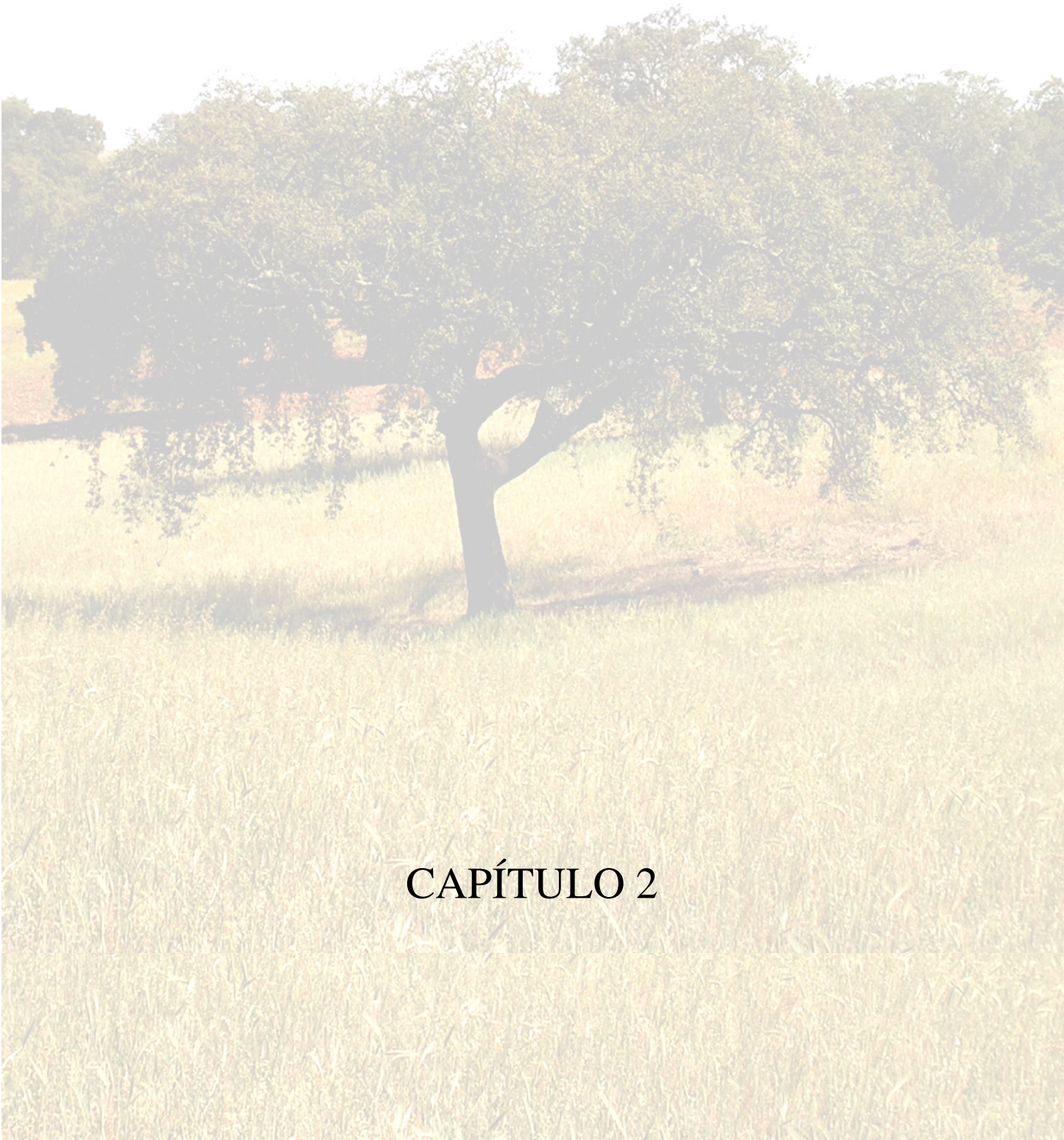
No caso do declínio de espécies de *Quercus* causado por *P. cinnamomi*, o controlo a curto e médio prazo, deverá principalmente incidir na utilização de práticas culturais que promovam o bom desenvolvimento do hospedeiro e previnam a ocorrência de condições ambientais propícias à infecção por este patogénio.

1.5. OBJECTIVOS

Este trabalho tem como objectivo geral contribuir para o estudo da distribuição, incidência, severidade e controlo da doença causada por *Phytophthora cinnamomi* em *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*.

Como objectivos específicos procurou-se:

- Determinar a distribuição de *P. cinnamomi* nas áreas ocupadas por sobreiros e azinheiras em Portugal e na zona Ocidental da Andaluzia (Espanha);
- Analisar a progressão do declínio em povoamentos de sobreiro infestados com *P. cinnamomi*, determinando a influência de factores ambientais na incidência e severidade da doença em Portugal;
- Caracterizar do ponto de vista morfológico e fisiológico isolamentos de *P. cinnamomi* associados ao declínio de *Q. suber* e *Q. rotundifolia*;
- Reproduzir em condições controladas o ciclo biológico da doença, recriando diferentes situações de campo com vista a estudar a influência do tipo e grau de infestação dos substratos, do regime hídrico e da temperatura, no processo de infecção e na severidade de sintomas da doença;
- Encontrar um método sensível para avaliar a severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira infestadas com *P. cinnamomi*;
- Avaliar o efeito da aplicação de substâncias químicas, no controlo da infecção por *P. cinnamomi* em plantas de sobreiro e azinheira jovens e sobreiros adultos.



CAPÍTULO 2

CAPITULO 2

ISOLAMENTO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* E MONITORIZAÇÃO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA DO DECLÍNIO EM POVOAMENTOS DE SOBREIRO

2.1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Phytophthora* são muitas vezes difíceis de detectar e isolar e em muitas regiões do mundo, os problemas radiculares causados por estas espécies, não têm sido convenientemente diagnosticados. Isto acontece principalmente pelo uso de métodos e procedimentos de diagnóstico inapropriados (Tsao 1990).

A detecção ou isolamento de espécies de *Phytophthora* de plantas recentemente infectadas, com micélio viável em crescimento activo, costuma ser fácil. No entanto, o isolamento do patogénio a partir de amostras de solo, especialmente se têm baixas concentrações de propágulos, ou a partir de restos de plantas afectadas, secos ou em avançado estado de decomposição, é muito difícil ou mesmo impossível. Estas dificuldades são normalmente devidas à presença de microrganismos antagonistas presentes na microflora do solo, que são capazes de crescer mais rapidamente no meio de cultura inibindo o desenvolvimento de *Phytophthora*, em conjunto com a lenta germinação dos seus propágulos de sobrevivência (clamidósporos). Para superar estas dificuldades utilizam-se técnicas especiais de isolamento, tais como meios selectivos e iscos (Tsao 1983, 1990) e técnicas de biologia molecular (Moreira *et al.* 1999; Nechwatal *et al.* 2001).

Os meios selectivos utilizam substâncias químicas anti-microbianas que inibem o crescimento de bactérias e fungos não desejados, mas têm pouco ou nenhum efeito no crescimento das espécies de *Phytophthora* (Erwin e Ribeiro 1996). A partir dos anos 60 do século XX, vários foram os meios ensaiados para o isolamento de espécies de *Phytophthora* até que em 1986 Jeffers e Martin obtiveram o meio conhecido como PARPH. Este meio utiliza pimaricina (antibiótico polieno contra a maioria dos fungos, excepto para os da família Pythiaceae e algumas espécies de *Mortierella*), ampicilina (antibiótico contra bactérias gram-positivas), rifampicina (antibiótico microcíclico activo, principalmente, para micobactérias e bactérias gram-negativas), pentacloronitrobenzeno (PCNB) (fungicida activo contra muitos fungos, excepto Oomicetes) e himexazol (fungicida tóxico para a maioria das espécies de *Pythium*, mas não para todas, assim

como não tem efeito para muitas espécies dos géneros *Mortierella* e *Phytophthora* a concentrações de 25-50 µg/ml) (Erwin e Ribeiro 1996).

O isolamento de espécies de *Phytophthora* pode ser conseguido colocando o tecido afectado (segmentos de raiz, folhas ou frutos), ou gotas de uma suspensão de solo em água ou água-agar, directamente em meio selectivo (Erwin e Ribeiro 1996). Vários autores seguiram este procedimento no isolamento de *P. cinnamomi* de amostras de solo da rizosfera e raízes de sobreiros e azinheiras (Hermoso *et al.* 2001; Moreira-Marcelino 2001; Sánchez *et al.* 2002b; 2003b; 2005; Moreira 2003; Rodríguez *et al.* 2004; Moreira e Martins 2005). Também se consegue isolar *P. cinnamomi* utilizando iscos (frutos, raízes, ou folhas de hospedeiros) que são infectados preferencialmente por esta espécie, e em que as lesões causadas são fáceis de identificar. Para tal, procede-se à imersão de frutos ou raízes, numa camada de água em contacto com o solo ou à colocação de folhas e/ou fragmentos à superfície da água em contacto com o solo a analisar. Este procedimento favorece a produção de esporângios e zoósporos, no solo ou no tecido vegetal, aumentando o inóculo inicial (Erwin e Ribeiro 1996). Tsao (1983) indica uma relação de solo:água, no mínimo de 1:4. Outros autores (Moreira-Marcelino 2001; Moreira *et al.* 1993; Moreira e Martins 2005) utilizaram relações de solo:água 1:2 e folhas jovens de sobreiro e azinheira como iscos para isolar *P. cinnamomi* de solo da rizosfera de sobreiros e azinheiras. Hermoso *et al.* (2001) ensaiaram diferentes relações e a que melhor resultou para isolamento de *P. cinnamomi* foi a relação solo:água 1:6, incubando 4 dias a 22°C e utilizando como isco segmentos de folhas de *Eucalyptus globulus*. Este método foi também utilizado por Sánchez *et al.* (2003b) para isolamento de *P. cinnamomi* a partir de amostras de solo. Rodríguez *et al.* (2004) utilizaram os mesmos iscos em meio selectivo NAHPH em que a pimaricina foi substituída por nistatina, para isolamento de *P. cinnamomi* de solo procedente de focos de declínio de azinheiras. Torres-Álvarez *et al.* (2006) utilizaram pétalas imaturas de cravo para o isolamento de *P. cinnamomi* de solo procedente de focos de declínio na zona da Estremadura espanhola.

Outra forma de conseguir o isolamento de *P. cinnamomi* é colocando o solo ou tecido vegetal a analisar (por exemplo, raízes), directamente dentro de um fruto susceptível, como por exemplo maçã. Neste caso o fruto funciona como uma armadilha. Trabalhos realizados na Universidade do Algarve no âmbito de projectos de investigação sobre o estudo do declínio do sobreiro em S. Brás de Alportel e S. Marcos da Serra e envolvimento de *Phytophthora* em montados (Anónimo 1992; Brasier *et al.* 1993b; Moreira-Marcelino 2001) utilizaram este método para isolamento de *P. cinnamomi*.

O isolamento de *P. cinnamomi* é normalmente conseguido a partir de amostras de raiz e solo da rizosfera de árvores que exibem os sintomas referidos no Capítulo 1 sobre o declínio de *Quercus* na Península Ibérica (1.2.3.1). O facto destes sintomas serem semelhantes aos originados por factores abióticos, como a carência de água e nutrientes, tem induzido a diagnósticos errados sobre o que

anda a afectar os sobreiros e azinheiras na Península Ibérica. Daí a importância do isolamento do patogénio para um correcto diagnóstico.

Um dos sintomas que mais ressalta na observação de montados e/ou povoamentos de sobreiros e azinheiras atacadas pela doença do declínio, é a desfoliação que sofrem estas árvores.

A queda de folhas das árvores ao longo do ano é um processo natural. No entanto, quando esta queda é mais severa do que o normal as árvores aparecem desfolhadas. A desfoliação pode ser definida pela perda anormal de folhas que a árvore sofre. Para a avaliação da desfoliação de espécies florestais mediterrâneas Cadahia *et al.* (1991) propôs uma escala de classes com cinco valores (0-4). A classe 0 corresponde a árvores não desfolhadas, ou com uma desfoliação menor que 10%; na classe 1 as árvores encontram-se ligeiramente desfolhadas com percentagens entre 10 e 25%; a classe 2 são árvores moderadamente desfolhadas com valores entre 25 e 60%; na classe 3 estão as árvores bastante desfolhadas com valores compreendidos entre 60 e 90%; e à classe 4 pertencem as árvores secas ou mortas. Esta escala de desfoliação foi usada para a avaliação de danos em ecossistemas florestais em Andaluzia (Sánchez *et al.* 2000a, 2002b; Navarro *et al.* 2004). A mesma escala foi utilizada por outros autores que realizaram trabalhos em Portugal (Caetano 1994; Correia 1994; Moreira-Marcelino 2001; Moreira 2003; Moreira e Martins 2005). Ultimamente, para avaliar a desfoliação no género *Quercus* tem sido utilizada uma escala com seis valores (0-5) (Sánchez *et al.* 2003b). Nesta escala, as classes 0 e 1 são semelhantes à escala (0-4); na classe 2 as árvores apresentam desfoliação entre 26 e 50%; na classe 3 a desfoliação varia entre 51 e 75%; a classe 4 tem valores de 76 a 99% e à classe 5 pertencem as árvores completamente mortas (Ferreti 1994).

A prospecção de *P. cinnamomi* em zonas de sobreiros e azinheiras, tanto de amostras de solo, como de raiz, assim como a relação entre o isolamento deste patogénio e o grau de declínio das árvores foram estudadas em quatro diferentes regiões de Portugal desde 1995 por Moreira-Marcelino (2001). Neste estudo, foi possível isolar *P. cinnamomi* em mais de 42% dos sítios amostrados, sendo a região do Algarve a mais afectada, com 73% dos locais infestados com o patogénio. É também nesta região onde a expressão da doença tem um maior impacto encontrando-se sítios com mais de 90% das árvores afectadas ou mortas (Moreira-Marcelino 2001; Moreira 2003). Noutro estudo realizado por Sánchez *et al.* (2003b) em oito herdades com sobreiros e azinheiras, distribuídas pelas províncias andaluzas de Cádiz, Córdoba, Huelva e Sevilha, seis estavam infestadas com *P. cinnamomi*. Nas províncias de Córdoba e Huelva foi onde se encontrou o maior número de árvores afectadas por *P. cinnamomi*.

Mais recentemente, em prospecções realizadas entre 2003 e 2005, em zonas de sobreiros e azinheiras, conseguiu-se isolar *P. cinnamomi* em 47% das amostras procedentes de Andaluzia e em 68% das amostras procedentes do Sul de Portugal (Algarve e Alentejo) (Romero *et al.* 2007).

Noutras prospeções realizadas entre 1991-92 e 1999-2000 em focos de declínio em herdades de sobreiros e azinheiras na Estremadura espanhola, verificou-se que a percentagem de focos onde se isolou *P. cinnamomi* permaneceu relativamente estável entre as duas prospeções (40 e 30% respectivamente) (Torres-Álvarez *et al.* 2006). Percentagens semelhantes foram obtidas pela análise de amostras de solo e raiz procedentes de focos de azinheiras das províncias de Huelva e Sevilha (Sánchez *et al.* 2004).

Um outro importante aspecto a considerar no estudo da dinâmica da doença é a sua progressão ao longo do tempo em povoamentos de sobreiro e azinheira. Muitos autores procuraram medir a taxa anual da progressão da doença nas florestas da Austrália, através do estudo do aumento do diâmetro de manchas de doença (Peters & Weste 1997; Weste *et al.* 1999; Shearer 2001; Weste *et al.* 2002; Bluett *et al.* 2003; Weste 2003). Em Espanha, refere-se o trabalho de Sánchez *et al.* (2003b) em que se estudou a taxa de incidência e o aumento da severidade da doença do declínio, causada por *P. cinnamomi*, em povoamentos de sobreiro e azinheira. Em Portugal desconhece-se qualquer estudo sobre este tema.

Assim, este trabalho teve três objectivos. O primeiro foi contribuir com dados complementares para o aprofundamento do conhecimento da distribuição de *P. cinnamomi* nas áreas ocupadas por *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Nesta análise procurou-se assinalar a presença de *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras em Portugal e em azinheiras na Andaluzia (Espanha), por ser esta a espécie de *Quercus* mais representativa nesta província. O segundo objectivo foi acompanhar a progressão do declínio durante 5 anos, em 12 parcelas de sobreiro distribuídas pelas regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, Alentejo e Algarve, pela avaliação da incidência e severidade da doença nas árvores da parcela. Por último, pretendeu-se relacionar a percentagem de isolamento de *P. cinnamomi* nas 12 parcelas de estudo com diferentes factores abióticos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Zonas de estudo

Em Portugal visitou-se um total de 39 locais distribuídos por herdades públicas e privadas. Os locais de estudo pretendiam abranger zonas com diferentes situações topográficas, litológicas e de exposição, além de serem representativos da zona quanto à percentagem de árvores mortas e estado sanitário das árvores afectadas.

Em Espanha, as zonas de estudo localizaram-se na região fronteiriça com o Algarve na província de Huelva, comarca de Andévalo, onde se visitaram cinco locais distribuídos por duas herdades: *El Cuco* e *La Pizarra* e na província de Córdoba, comarca de *Valle de los Pedroches*, onde se visitaram quatro locais em duas herdades: *Dehesa Pedroche* e *La Rozuela*.

A Figura 2.1 indica a distribuição das zonas de estudo em Portugal e na Andaluzia Ocidental.



Figura 2.1 - Distribuição das zonas de estudo em Portugal e Andaluzia (Espanha).

2.2.2. Avaliação do estado sanitário das árvores e sintomatologia geral da doença

Em cada local de estudo seleccionaram-se 3-4 árvores e avaliou-se visualmente o seu grau de desfoliação. Esta avaliação consistiu na observação das árvores no terreno, registando os sintomas na parte aérea, folhas e ramos das árvores e na atribuição de uma classe de desfoliação a cada árvore. As classes de desfoliação utilizadas foram as propostas por Cadahia *et al.* (1991). As percentagens de cada classe de desfoliação são:

- CLASSE 0: desfoliação nula (0-10% de desfoliação)
- CLASSE 1: desfoliação ligeira (11-25%)
- CLASSE 2: desfoliação moderada (26-60%)
- CLASSE 3: desfoliação acentuada (mais de 60%)
- CLASSE 4: árvore morta

Além de se registarem os sintomas na parte aérea, observaram-se os sintomas a nível radicular, tanto das raízes absorventes (diâmetro < 2 mm), como das raízes lenhosas (> 2 mm). Para a observação dos sintomas nas raízes elegeram-se 3-4 árvores representativas de cada zona, árvores muito, medianamente e pouco afectadas, segundo a observação prévia dos sintomas na parte aérea. Nestas árvores abriu-se uma cova com cerca de 20-40 cm de profundidade e 50 cm a 1 m de diâmetro, distanciada 1 m da base do tronco, até deixar a descoberto o sistema radicular superficial. Quando era necessário lavavam-se as raízes *in situ* com água corrente para facilitar a sua observação.

Em cada local recolheram-se amostras de raiz e solo da rizosfera de árvores pertencentes à classe de desfoliação predominante no foco. A recolha das amostras seguiu o procedimento que se descreve em seguida.

2.2.3. Obtenção de isolamentos

Recolha de amostras no campo

A recolha de amostras de raízes de árvores e de solo da rizosfera realizou-se principalmente nos meses de Primavera e Outono, por ser nestas épocas do ano que a temperatura e a humidade são mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo e permitem uma maior probabilidade de isolamento (Brasier 1996).

As amostras retiraram-se debaixo da copa distanciadas 1 metro do tronco e nos primeiros 10-30 cm de solo, onde se encontravam as raízes absorventes. Primeiro removeram-se ervas e pequenos arbustos existentes à superfície e seguidamente escavou-se o solo com uma enxada até à profundidade conveniente à observação e colheita das raízes. De cada árvore recolheram-se, sempre que possível, 4 sub-amostras de raízes e solo da rizosfera, retiradas de quatro pontos diametralmente opostos dois a dois. As sub-amostras misturaram-se e constituíram uma única amostra. Estas amostras eram formadas por raízes de diâmetro inferior a 5 mm, com coloração castanho escura e/ou desprendimento da sua epiderme. Não se incluíram na amostra raízes secas, desprovidas de casca ou excessivamente grossas. As raízes foram colocadas em sacos de plástico, nos quais também se colocou terra procedente da rizosfera (aproximadamente 1 kg). Os sacos fecharam-se para evitar a perda de humidade, etiquetaram-se com a referência do local e árvore correspondente e transportaram-se para o laboratório em caixas isotérmicas.

Processamento das amostras em laboratório e isolamento de fungos associados à destruição do sistema radicular

As amostras foram processadas em laboratório no próprio dia da colheita ou, se isso não era possível, nos dias imediatamente a seguir. Neste caso, e até ao seu processamento, foram guardadas no escuro a 5°C. As amostras de cada árvore foram tratadas separadamente. O processamento destas amostras foi dirigido para o isolamento de *Phytophthora* spp.

► Isolamento a partir de raízes

As raízes foram seleccionadas, lavadas com cuidado para desprender partículas de solo, colocadas dentro de uma bolsa de tule devidamente etiquetada e lavadas em água corrente durante 2-3 horas. Em condições de assepsia, cortaram-se segmentos de raízes, sempre menores que 1 cm de comprimento que se colocaram em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio selectivo PARPH à razão de 6 segmentos por placa e 6 placas por amostra. Este meio é constituído por *Corn Meal Agar* (17 g/l), os antibióticos pimaricina (5 ml/l), ampicilina (250 mg/l) e rifampicina (10 mg/l) e os fungicidas pentacloronitrobenzeno - PCNB (100 mg/l) e himexazol (50 mg/l) (Jeffers e Martin 1986). Nas amostras analisadas em 2005 utilizou-se meio selectivo NARPH, em que a pimaricina foi substituída por nistatina (30 mg/l) (Rodríguez *et al.* 2004).

Todo o processamento realizou-se em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar. As placas selaram-se com parafilme e incubaram-se no escuro a 22°C. Após 3-4 dias de incubação procedeu-se à identificação e quantificação do número de colónias desenvolvidas a partir dos segmentos de raiz.

► Isolamento a partir de solo

Para o isolamento a partir de amostras de solo utilizaram-se iscos vegetais: folhas jovens de sobreiro e segmentos de folhas de eucalipto. Nas primeiras amostragens realizadas, utilizou-se como isco vegetal folhas jovens de sobreiro (Moreira *et al.* 1993). Para tal, prepararam-se suspensões de solo em água desionizada, em placas de Petri, na proporção de cerca de 10-15 g de solo por 20 ml de água. Após agitar a mistura, colocaram-se segmentos de folhas de sobreiro de forma a flutuarem na superfície da suspensão.

As placas de Petri permaneceram no laboratório à temperatura ambiente (20-25°C) e à luz natural durante dois dias. Ao fim deste tempo, os segmentos de folhas foram removidos com uma pinça, lavados com água estéril, secos com papel absorvente estéril e colocados em placas de Petri com meio selectivo PARPH.

Por cada amostra prepararam-se duas placas de Petri, com meio selectivo, cada uma com 6 segmentos de folhas de sobreiro. As placas selaram-se com parafilme e incubaram-se no escuro a 22°C durante 3-4 dias, altura em que se procedeu à identificação e quantificação do número de colónias crescidas a partir dos iscos.

Para as amostras de solo recolhidas a partir do ano 2000, passou-se a utilizar como armadilha vegetal folhas de eucalipto. Trabalhos realizados por R. Hermoso da Universidade de Córdoba (comunicação pessoal) demonstraram que com eucalipto se obtinham quantitativamente melhores resultados no isolamento de *P. cinnamomi*. Por outro lado, as suspensões de solo e água desionizada passaram a realizar-se em copos de 250 ml, onde se colocaram 20 g de solo livre de partículas grossas com 120 ml de água desionizada (relação solo:água de 1:6) (Hermoso *et al.* 2001). Os segmentos de folhas de eucalipto, que se obtiveram eliminando as margens e a nervura principal, colocaram-se a flutuar na superfície da suspensão. Estas suspensões permaneciam no escuro a 22°C durante quatro dias. O processamento seguinte foi igual ao descrito para os segmentos de folhas de sobreiro.

Posteriormente, as amostras recolhidas em 2005 foram analisadas dispersando o solo sobre meio selectivo NARPH (Rodríguez *et al.* 2004) à razão de 1 ml de suspensão de solo por placa de Petri. Esta suspensão era constituída por 2,5 g de solo em 50 ml de solução água-agar 0,2% esterilizada em autoclave a 1 atm durante 20 min. As placas incubaram-se no escuro a 24°C durante 24 h. Passado este tempo, foram lavadas em água corrente e incubadas nas mesmas condições durante 3 dias, a partir dos quais se procedeu à detecção e quantificação do número de colónias desenvolvidas.

► Cálculo do teor de humidade do solo

Para o cálculo do teor de humidade do solo colocaram-se 10 g de solo livre de partículas grossas, numa placa de Petri de vidro, numa estufa a 70°C. No dia seguinte, realizaram-se várias pesagens até que o peso se mantivesse constante. A humidade calculou-se como a percentagem de perda de peso.

Conservação dos isolamentos obtidos

As colónias obtidas, tanto a partir de raízes, como do solo, seleccionaram-se em função da sua morfologia. Aquelas que por observação directa ao microscópio das estruturas vegetativas, apresentaram características pertencentes ao género *Phytophthora*, como sejam, micélio asseptado, botrioso ou coraloide e dilatações das hifas (*hyphal swellings*) (Erwin e Ribeiro 1996) foram conservadas. A partir destas colónias procedeu-se à obtenção de culturas puras em placas com meio selectivo PARPH (Jeffers e Martin 1986).

A partir de cada uma das culturas puras transferiram-se pequenas quantidades de micélio para placas de Petri, com meio de extracto de cenoura-agar (CA) (Dhingra e Sinclair 1995). Para a preparação deste meio utilizaram-se 200 g de cenouras descascadas, lavadas, cortadas em pequenos troços e congeladas. Depois de descongeladas, foram trituradas com um homogeneizador em 500 ml de água da torneira. De seguida filtrou-se a mistura duas vezes com gaze. Perfez-se o

volume com água até 1 litro e adicionaram-se 15 g de agar. Este meio esterilizou-se na autoclave a 115°C (0.7 kp/cm²) durante 10 min e, depois de passar uma noite no escuro à temperatura ambiente, voltou-se a esterilizar a 115°C durante 15 min. O meio arrefeceu até 45°C, em banho-maria com temperatura controlada e verteu-se em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Depois dos isolamentos crescerem em placas de Petri com meio CA, transferiu-se uma pequena quantidade de micélio de cada uma das colónias para tubos de ensaio de polietileno esterilizados, com tampa incorporada (25 x 90 mm), contendo meio de cultura CA disposto de forma inclinada. A superfície inclinada do meio de cultura permitia uma maior área para o crescimento do micélio do fungo. Os tubos incubaram-se no escuro a 22°C até que o fungo tivesse micélio aéreo. Nesta altura, os tubos encheram-se com parafina espessa, esterilizada em autoclave a 1 atm durante 20 min e guardaram-se no escuro a uma temperatura de 4°C.

Estes isolamentos passaram a constituir a colecção de culturas utilizadas no presente estudo e pertencem às colecções micológicas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Algarve e do Departamento de Agronomia da *Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes* (ETSIAM), Universidade Córdoba - Espanha.

2.2.4. Progressão do declínio de *Quercus suber* em Portugal

Parcelas de estudo

As parcelas de estudo foram demarcadas de forma a abrangerem diferentes situações litológicas e serem representativas da zona, quanto à percentagem de árvores mortas e estado sanitário das árvores afectadas. Delimitaram-se 12 parcelas experimentais, localizadas nas principais zonas suberícolas do País e distribuídas pelas regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, Alentejo e Algarve (Figura 2.2).

Nas regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro e Algarve seleccionaram-se quatro zonas de estudo, duas por região. Em cada zona marcaram-se duas parcelas, uma com acentuada exposição sul (soalheira) e outra com acentuada exposição norte (umbria). Quando as condições do terreno permitiam, as parcelas marcaram-se, uma na continuação da outra. Quando isso não era possível, marcaram-se as parcelas em sítios próximos, de forma que as condições de local não variassem muito. Na região do Alentejo delimitaram-se quatro parcelas, em diferentes zonas de declive suave. A Tabela 2.1 indica a localização aproximada das parcelas de estudo.

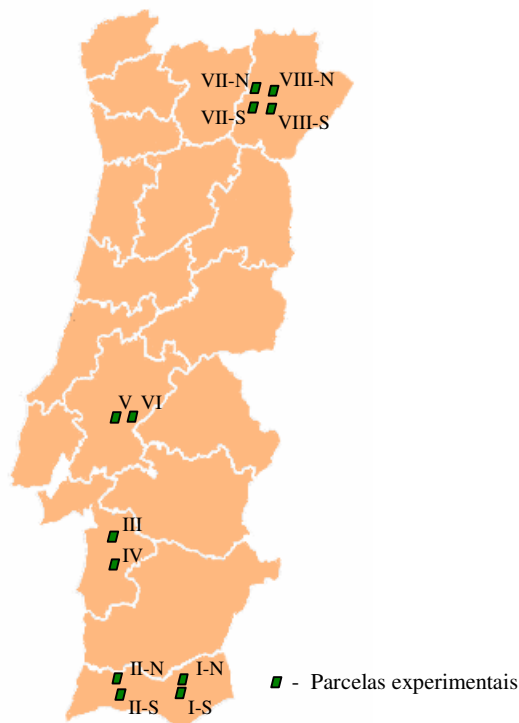


Figura 2.2 - Distribuição das parcelas de estudo em Portugal.

Uma vez eleito o local para estabelecer a parcela, com a ajuda de uma bússola, estendeu-se uma corda, de forma a traçar uma linha recta desde o topo da encosta até ao vale, ou vice-versa. Em seguida, estendeu-se outra corda paralela à primeira e distanciada 15 metros desta, de modo a delimitar uma faixa de terreno ao longo da encosta. Desta forma, as parcelas de estudo eram constituídas por uma faixa de terreno, com 15 metros de largura e comprimento variável, dependendo do tamanho da encosta.

Tabela 2.1 - Parcelas para o estudo da progressão do declínio de *Quercus suber* em Portugal

Parcela	Localização	Concelho	Região
I-N	Barranco do Velho	S. Brás de Alportel	Algarve
I-S	Barranco do Velho	S. Brás de Alportel	Algarve
II-N	Herdade da Parra	Silves	Algarve
II-S	Herdade da Parra	Silves	Algarve
III	Serra do Loureiro	Alcácer do Sal	Alentejo
IV	Tanganhal	Grândola	Alentejo
V	Herdade dos Leitões	Ponte de Sor	Alentejo
VI	Herdade do Salgueiro	Ponte de Sor	Alentejo
VII-N	Vilaverdinho	Mirandela	Trás-os-Montes e Alto Douro
VII-S	Jerusalém do Romeu	Mirandela	Trás-os-Montes e Alto Douro
VIII-N	Açoreira	Mirandela	Trás-os-Montes e Alto Douro
VIII-S	Açoreira	Mirandela	Trás-os-Montes e Alto Douro

Avaliação do estado sanitário das árvores

Todos os sobreiros existentes nas parcelas de estudo numeraram-se e avaliaram-se anualmente durante 5 anos. Esta avaliação realizou-se segundo a escala 0-4 valores, descrita em 2.2.2. Além da classe de desfoliação registaram-se para cada árvore alguns sintomas e sinais, causados por outros patogénios ou insectos, nas folhas e tronco.

Recolha de amostras

Em cada uma das parcelas foram colhidas amostras de solo e efectuadas análises das suas características físicas e químicas. A observação das características morfológicas dos perfis de solos e a recolha de amostras de solo para análise foram realizadas em trincheiras, espaçadas entre 10 a 20 m, ao longo de transectos no sentido do maior declive da parcela. As análises de solo foram realizadas pelo Departamento da Pedologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e consistiram na determinação dos lotes estruturais, teores de azoto, fósforo, potássio, matéria orgânica, pH, capacidade de troca catiónica e condutividade eléctrica.

Além da recolha de amostras de solo para análises pedológicas, realizaram-se anualmente, entre Maio e Julho e em Outubro, colheitas de amostras de raiz e solo da rizosfera de 3-4 árvores em cada parcela experimental, segundo o descrito em 2.2.3. Estas amostras foram processadas no sentido de isolar *P. cinnamomi* e também de se medir a percentagem de humidade do solo.

A primeira recolha de amostras teve lugar em 1999 e elegeram-se árvores de forma a que estas se encontrassem dispersas por toda a área da parcela. As amostras foram recolhidas sempre das mesmas árvores ao longo do período de estudo. As árvores escolhidas para a recolha de amostras apresentavam diferentes graus de severidade de sintomas, tais como maior ou menor intensidade do amarelecimento das folhas, ou diferentes graus de desfoliação. No entanto, evitaram-se árvores mortas ou severamente afectadas.

Dados meteorológicos

Os valores de temperatura máxima, média e mínima mensal e da precipitação total mensal desde Janeiro de 1998 até Julho de 2002, das estações meteorológicas mais próximas às parcelas de estudo, foram solicitados ao Instituto de Meteorologia de Portugal. As estações meteorológicas foram as de Faro/Aeroporto, para os dados das parcelas I-S e I-N; de Portimão, para as parcelas II-N e II-S; de Alcácer do Sal, para a parcela III; de Sines/Monte Chãos, para a parcela IV; de Alvega para as parcelas V e VI; e de Mirandela, para as VII-N, VII-S, VIII-N e VIII-S.

2.2.5. Análise estatística

Para correlacionar a percentagem de isolamento de *P. cinnamomi* de amostras de solo e raiz em Portugal e na Andaluzia Ocidental, percentagem de humidade do solo e índice de desfoliação das árvores, preparou-se uma matriz de dados no programa "Statistix" (Analytical Software 2000) e aplicou-se o teste de Pearson com um nível de significância de 95% ($P=0,05$).

Aos valores de desfoliação das árvores nas parcelas de estudo aplicou-se uma análise global de variância utilizando o programa *Statistix* (Analytical Software 2000).

Para correlacionar a severidade do declínio nas parcelas de estudo em Portugal com factores abióticos preparou-se outra matriz de dados. As variáveis utilizadas foram: percentagem de amostras (solo e raiz) em que se isolou *P. cinnamomi*; índice médio de desfoliação da parcela; exposição; percentagem de humidade do solo; elementos da análise química de solo; precipitação mensal; temperatura média, máxima e mínimas mensais. O teste aplicado foi o de correlação de Pearson com um nível de significância de 95% ($P=0,05$).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Prospecção da doença

Para o estudo da incidência e distribuição de *P. cinnamomi* em Portugal e na Andaluzia Ocidental foram visitados 39 locais para recolha de amostras de raízes e solo da rizosfera, num total de 58 focos. Na Tabela 2.2 indicam-se a localização e número de focos, a data da prospecção, a espécie de *Quercus* amostrada, o número de árvores amostradas, o seu índice de desfoliação médio, a humidade média do solo e a percentagem de isolamento de *Phytophthora* spp. a partir de solo e de raiz.

Na região do Algarve os focos amostrados situaram-se em sobreirais com declive acentuado com aproveitamento principalmente corticeiro e cinegético. Os focos com azinheiras localizaram-se em zonas de declive moderado, com aproveitamento cinegético e ganadeiro, principalmente ovino.

Na região do Alentejo, os focos demarcaram-se em zonas de montado de sobreiro (sobre), de azinheira (azinho) ou mistos (sobre+azinho), de declive suave, com aproveitamento corticeiro, ganadeiro (ovino e vacum) e cinegético.

Tabela 2.2 - Prospecção de *Phytophthora cinnamomi*

PROVÍNCIA	CONCELHO/ REGIÃO	LOCALIDADE	DATA DA PROSPECÇÃO	ESPÉCIE AMOSTRADA	Nº DE FOCOS AMOSTRADOS	Nº DE ÁRVORES AMOSTRADAS	ÍNDICE DE DESFOLIAÇÃO MÉDIO (ID) ^a	HUMIDADE MÉDIA DO SOLO (%) ^b	ISOLAMENTO DE <i>P. CINNAMOMI</i> (%) ^c	
									SOLO	RAIZ
Loulé	Ameixial	<i>Quercus rotundifolia</i>	Junho 2000	2	8	2,5	5,3	12,5	12,5	57,1
			Julho 1999		7	2,4	7,3	71,4	0	0
			Junho 2000	2	4	2,8	12,1	0	0	0
			Outubro 2001		7	2,9	18,6	0	0	0
	Lagos	Bensafrim	<i>Q. suber</i>	Maio 2000	1	4	1,8	6,4	0	14,3
				Maio 2000		4	1,8	24,0	50,0	50,0
	Algarve	Ameixeira	<i>Q. suber</i>	Maio 2000	1	3	1,7	18,7	100,0	66,7
				Maio 2000	2	5	2,0	21,8	20,0	60,0
		Cova da Muda	<i>Q. suber</i>	Maio 2000	2	6	1,2	19,5	66,7	33,3
				Julho 1999		7	1,7	5,6	57,1	0
Silves	Quinta da Parra	<i>Q. suber</i>	Outubro 2001	2	8	1,9	17,1	0	12,5	
			Julho 2002		7	2,4	5,0	0	50,0	
			Outubro 2002	2	4	2,0	18,0	75,0	25,0	
Tavira	S. Marcos da Serra	<i>Q. rotundifolia</i>	Outubro 2002	2	2	0,5	6,0	0	0	
			Novembro 2000		4	3,3	12,0	0	25,5	
	Cachopo	<i>Q. rotundifolia</i>	Dezembro 2000	6	6	2,0	17,8	0	33,3	
			Julho 2002		8	2,8	4,3	0	0	
	Alcácer do Sal	Serra do Loureiro	<i>Q. suber</i>	Julho 1999		4	2,8	2,3	^d	0
				Julho 2000	1	4	2,3	2,8	25,0	0
Alcácer do Sal		<i>Q. suber</i>	Julho 2001		4	2,3	4,3	0	25,0	
			Julho 2002		8	2,3	2,5	0	25,0	
Alentejo	Santiago	<i>Q. suber</i>	Maio 2005	1	3	1,7	2,3	0	0	
			Maio 2005		1	2,0	5,0	100,0	100,0	
	Torrão	<i>Q. rotundifolia</i>	Maio 2005	1	2	1,5	3,0	0	100,0	
			Maio 2005		2	1,5	5,0	100,0	0	
	Aljustrel	<i>Q. rotundifolia</i>	Maio 2005	1	1	1,0	6,5	0	50,0	
			Maio 2005		2	1,5	6,0	0	0	
	Beja	Quintos	<i>Q. rotundifolia</i>	Maio 2005	1	1	2,0	6,5	100,0	0
				Maio 2005		2	1,5	4,0	50,0	0
	Cabeça Gorda	<i>Q. rotundifolia</i>	Maio 2005	1	2	2,0	5,0	0	0	
			Maio 2005		1	2,0	5,0	0	0	

Tabela 2.2 - Prospecção de *Phytophthora cinnamomi* (Cont.)

PROVÍNCIA	CONCELHO/ REGIÃO	LOCALIDADE	DATA DA PROSPECÇÃO	ESPÉCIE AMOSTRADA	Nº DE FOCOS AMOSTRADOS	Nº DE ÁRVORES AMOSTRADAS	ÍNDICE DE DESFOLHAÇÃO MÉDIO (ID) ^a	HUMIDADE MÉDIA DO SOLO (%) ^b	ISOLAMENTO DE <i>P. CINNAMOMI</i> (%) ^c		
									SOLO	RAIZ	
Cuba	Vila Ruiva	Tanganhil	Maio 2005	<i>Q. suber</i>	1	3	2,0	11,0	66,7	0	
			Julho 1999				2,0	5,0	^d	0	
			Julho 2000	<i>Q. suber</i>	1	4	2,0	5,0	25,0	0	
			Julho 2001				2,5	6,0	25,0	25,0	
	Grândola	Canal caveira	Julho 2002				2,5	5,8	0	0	
			Maio 2000	<i>Q. rotundifolia</i>	1	3	2,3	17,0	0	0	
	Évora	Santa Margarida do Sado	Maio 2005	<i>Q. rotundifolia</i>	1	2	1,5	8,0	50,0	100,0	
			Julho 2002	<i>Q. suber</i>	1	2	1,5	10,5	50,0	100,0	
	Alentejo	Portel	Julho 2002	<i>Q. rotundifolia</i>	1	3	3,0	4,0	0	0	
			S. Sebastião da Giasteira	<i>Q. suber</i>	1	3	2,0	16,0	100,0	0	
	Alentejo	Montemor-o- Novo	S. Cristovão	Maio 2005	<i>Q. rotundifolia</i>	1	1	3,0	5,0	100,0	0
				Julho 2002	<i>Q. suber</i>	1	2	2,0	6,0	100,0	50,0
Maio 2005				<i>Q. rotundifolia</i>	1	3	2,0	6,3	100,0	100,0	
Maio 2005				<i>Q. rotundifolia</i>	1	3	1,7	6,3	0	0	
Ourique		Aldeia de Palheiros	Julho 2002	<i>Q. rotundifolia</i>	2	4	2,3	3,8	0	0	
			Maio 2005	<i>Q. rotundifolia</i>	1	2	2,0	10,0	50,0	0	
Odemira		Herdade do Seixo	Maio 2005	<i>Q. suber</i>	1	1	3,0	4,0	0	0	
			Maio 2005	<i>Q. suber</i>	1	3	1,3	7,7	0	33,3	
			Maio 2005	<i>Q. suber</i>	1	3	1,7	11,7	33,3	100,0	
			Maio 2005	<i>Q. suber</i>	1	3	1,7	9,0	0	33,3	
Ponte de Sor		Montargil	Julho 1999				2,3	1,0	^d	37,7	
			Julho 2000	<i>Q. suber</i>	2	10	2,6	2,3	30,0	30,0	
	Julho 2001					2,5	2,3	58,3	8,3		
	Julho 2002					2,6	3,4	0	0		
Sarpa	Vila Nova São Bento	Maio 2005	<i>Q. rotundifolia</i>	1	3	1,7	4,3	100,0	33,3		

Tabela 2.2 - Prospecção de *Phytophthora cinnamomi* (Cont.)

PROVÍNCIA	CONCELHO/ REGIÃO	LOCALIDADE	DATA DA PROSPECÇÃO	ESPÉCIE AMOSTRADA	Nº DE FOCOS AMOSTRADOS	Nº DE ÁRVORES AMOSTRADAS	ÍNDICE DE DESFOLIAÇÃO MÉDIO (ID) ^a	HUMIDADE MÉDIA DO SOLO (%) ^b	ISOLAMENTO DE <i>P. CINNAMOMI</i> (%) ^c	
									SOLO	RAIZ
Trás os Montes	Mirandela	Jerusalém do Romeu	Julho 2000	<i>Q. suber</i>	1	3	2,3	d	0	0
			Outubro 2001						5,7	0
			Julho 2002						3,7	0
Alto Douro	Mirandela	Vila Verdinho	Julho 2000	<i>Q. suber</i>	1	4	2,5	d	0	0
			Outubro 2001						8,3	0
			Julho 2002						3,8	0
Alto Douro	Açoreira	Açoreira	Julho 2000	<i>Q. suber</i>	2	8	2,1	d	0	0
			Outubro 2001						9,9	0
			Julho 2002						4,5	0
Córdoba	Pedroches	Morais	Julho 2000	<i>Q. rotundifolia</i> <i>Q. suber</i>	1	4	2,0	6,0	0	0
			Novembro 1998						1,5	16,7
Huelva	Andévalo	El Cuco	Janeiro 1998	<i>Q. rotundifolia</i>	3	3	1,8	15,5	100,0	100,0
			Dezembro 1998						3,2	0
			Janeiro 1998						2,0	75,0
Córdoba	Valle de los Pedroches	La Pizarra	Dezembro 1998	<i>Q. rotundifolia</i>	2	2	1,5	6,0	0	50,0
			Novembro 1998						1,7	83,3
			Novembro 1998						1,5	100,0

^a Índice de desfoliação médio das árvores amostradas em cada parcela. ID é a média ponderada do número de árvores existentes em cada classe de desfoliação; ^b Percentagem de perda de peso depois de secar em estufa a 70°C até peso constante; ^c Percentagem de amostras (raiz ou solo) de onde se isolou *P. cinnamomi*; ^d Valor não calculado.

Em Trás-os-Montes e Alto Douro os focos com sobreiro situaram-se em zonas com declive acentuado com aproveitamento corticeiro e cinegético. O foco misto de sobreiros e azinheiras marcou-se numa zona de declive suave, com aproveitamento corticeiro, cinegético e ganadeiro.

Em Huelva e Córdoba os focos amostrados localizaram-se em zonas de montado de azinho com aproveitamento principalmente cinegético de caça menor e em menor grau ganadeiro, ovino e vacum.

Pela análise da Tabela 2.2 pode apreciar-se que em todos os locais amostrados na região do Algarve foi isolado o fungo *P. cinnamomi* a partir de amostras de solo e/ou raiz. O mesmo aconteceu na Andaluzia Ocidental, em que se conseguiu isolar, quer a partir de amostras de solo, quer de raiz. No Alentejo, 77,3% dos locais nesta região estavam infestados e conseguiu-se isolar a partir de amostras de solo e/ou raiz. Na região de Trás-os-Montes e Alto Douro não foi possível isolar este patogénio em nenhum dos locais amostrados.

Com excepção da região de Trás-os-Montes e Alto Douro, e do concelho de Moura na região do Alentejo, em todos os concelhos/região amostrados foi isolado *P. cinnamomi*. A percentagem mais elevada de isolamentos ocorreu nas últimas prospecções, (ano 2005) em que 81,3% dos locais amostrados foi isolado *P. cinnamomi*, ou seja obteve-se pelo menos uma colónia do fungo a partir de amostras de solo ou de raiz procedentes de um local (ver Tabela 2.2). Assinale-se que as prospecções de 2005 incidiram unicamente na região do Alentejo.

Em meio de cultura selectivo PARPH e NARPH, além de *P. cinnamomi*, isolaram-se esporadicamente espécies dos géneros *Pythium* e *Rhizoctonia*, tolerantes aos antibióticos e fungicidas utilizados no meio selectivo. As espécies do género *Pythium* eram as que apareciam mais frequentemente.

Em 37,1% dos locais amostrados em Portugal, incluindo na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, foi isolado, com bastante frequência a partir de amostras de solo, uma espécie fúngica que, à primeira vista parecia ser uma espécie de *Phytophthora*, mas que foi posteriormente identificada como *Pythium spiculum* (Paul *et al.* 2006). Somente em 11,4% dos locais foi isolada esta espécie a partir de amostras de raiz.

Não se apreciou nenhuma correlação significativa entre a percentagem de isolamento de *P. cinnamomi* a partir de amostras de solo e de raiz com o índice médio de desfoliação das árvores amostradas nem com a percentagem de humidade no solo (Anexo I).

2.3.2. Sintomatologia da doença

O declínio manifestou-se em povoamentos de sobreiro e azinheira, em árvores de todas as idades. Assim, observou-se tanto em sobreiros ainda com cortiça virgem, como em sobreiros já sujeitos a maior ou menor número de tiragens e tanto em árvores recentemente descortçadas como naquelas prestes a serem sujeitas à extracção da cortiça. Nas azinheiras a manifestação da doença foi análoga mas ao contrário dos sobreiros, as azinheiras não são perturbadas por extracções periódicas da casca.

As árvores com declínio apresentavam elevada percentagem de folhas com falta de viço e/ou cloróticas, muitas vezes de menor tamanho que o normal e morte regressiva da extremidade dos ramos e rebentos. Com frequência ocorre rebentação adventícia em ramos aparentemente mortos, rebentação essa, que tem uma existência efémera. As exsudações no tronco eram também sintomas característicos do declínio apresentado por estas espécies. A observação do sistema radicular das árvores revelava raízes com uma cor escura desprendendo a sua epiderme muito facilmente. Em árvores com infecção radicular muito severa, observou-se a quase total ausência de raízes absorventes, que quando existiam, estavam na sua maioria mortas. Em alguns casos, árvores aparentemente sãs, secavam rapidamente, permanecendo as folhas secas aderentes à copa durante algum tempo (morte súbita). Porém, na maior parte dos casos, a morte das árvores acontecia após vários anos de progressiva quebra de vigor (morte lenta ou declínio) (Figura 2.3).

As árvores afectadas dão origem a manchas mais ou menos circulares que vão alastrando e coalescendo, originando por vezes vastas clareiras no povoamento, após remoção das árvores que vão morrendo (Figura 2.4). Estas árvores encontram-se tanto em encostas como nas cumeadas, linhas de água e junto a caminhos.



Figura 2.3 - Sintomatologia associada ao declínio do sobreiro e da azinheira: a) sobreiro com exsudações no tronco; b), c) morte regressiva de ramos; d) morte súbita de sobreiro jovem; e) morte súbita de azinheira adulta.



Figura 2.4 - Distribuição de árvores afectadas: a) foco; b) e c) mancha.

2.3.3. Progressão do declínio de *Quercus suber* em Portugal

Parcelas de estudo

A Tabela 2.3 indica a área, o número de árvores e a densidade de cada uma das 12 parcelas de estudo.

Tabela 2.3 - Área, número de sobreiros e densidade nas parcelas de estudo

Parcela	Localização	Área (m ²)	Número de sobreiros	Densidade (Sobreiros/ha)
I-N	Barranco do Velho - Loulé	2175	31	142,5
I-S	Barranco do Velho - Loulé	1065	14	131,5
II-N	Herdade da Parra - Silves	1200	12	100,0
II-S	Herdade da Parra - Silves	1995	24	120,3
III	Serra do Loureiro - Alcácer do Sal	2595	46	177,3
IV	Tanganhal - Grândola	3150	24	76,2
V	Herdade dos Leitões - Ponte de Sor	4020	33	82,1
VI	Herdade do Salgueiro - Ponte de Sor	2400	31	129,2
VII-N	Vilaverdinho - Mirandela	975	36	369,2
VII-S	Jerusalém do Romeu - Mirandela	1425	30	210,5
VIII-N	Açoreira - Mirandela	1650	21	127,3
VIII-S	Açoreira - Mirandela	1800	24	133,3
Nº TOTAL de sobreiros			326	

A Tabela 2.4 indica algumas características dos solos das parcelas. Estas situaram-se em diferentes situações litológicas desde sedimentos com materiais grosseiros de diferente granulometria misturados com material argiloso a diferentes tipos de xisto e granitos.

Tabela 2.4 - Características topográficas, físicas e químicas dos solos das parcelas de estudo

Parcela	Localização	Orientação	Areia (%)	Limo (%)	Argila (%)	Matéria orgânica (%)	N Total (%)	P ₂ O ₅ (mg/Kg)	K ₂ O (mg/Kg)	pH	Soma de bases de troca (cmol/Kg)	Acidez de troca (cmol/Kg)	Litologia
I-N	Barranco do Velho	Norte	34,5	37,5	27,9	4,48	0,151	1	135	5,3	3,75	1,17	Xistos
I-S	Barranco do Velho	Sul	42,2	35,6	23,1	3,28	0,114	9	86	5,0	2,08	1,94	Xistos
II-N	Herdade da Parra	Norte	22,5	40,6	31,0	3,77	0,172	17	147	5,2	3,24	2,56	Xistos
II-S	Herdade da Parra	Sul	32,1	53,5	23,8	2,82	0,146	7	210	6,3	7,26	0,47	Xistos
III	Serra do Loureiro	Plano	65,5	11,9	14,4	1,87	0,063	8	60	4,8	3,65	1,08	Sedimentos
IV	Tanganhal	Plano	35,9	28,8	14,2	2,86	0,164	8	167	4,6	4,64	0,82	Xistos
V	Herdade dos Leitões	Plano	8,0	1,3	0,8	0,2	*	5	57	4,9	*	0,66	Sedimentos
VI	Herdade do Salgueiro	Plano	8,4	0,8	0,8	0,1	*	6	69	4,9	*	0,55	Sedimentos
VII-N	Vilaverdinho	Norte	89,7	8,0	6,3	2,27	0,208	85	45	5,4	1,53	0,61	Granitos
VII-S	Jerusalém do Romeu	Sul	78,2	12,2	8,2	2,85	0,190	52	74	5,1	2,40	0,84	Granitos
VIII-N	Açoreira	Norte	73,7	17,1	9,2	2,74	0,220	9	119	5,6	4,85	0,86	Xistos
VIII-S	Açoreira	Sul	73,0	16,8	10,0	3,22	0,220	13	92	5,8	9,14	0,36	Xistos

* Valores não disponíveis.

Avaliação do estado sanitário das árvores

As classes de desfoliação de cada sobreiro em cada uma das parcelas de estudo desde 1998 até 2002 indicam-se no Anexo II: Tabela AII.1. Estes dados resumem-se na Tabela 2.5 e Figura 2.5. Esta Tabela indica o índice de desfoliação médio (ID) das árvores em cada parcela ao longo dos 5 anos de avaliação. Este índice é a média ponderada do número de árvores existentes em cada classe de desfoliação, em cada parcela.

Tabela 2.5 - Índice de desfoliação médio dos sobreiros nas parcelas de estudo

Parcela	Região	Índice de desfoliação médio (ID) ^a				
		1998	1999	2000	2001	2002
I-N	Algarve	1,9	2,1	2,2	2,5	2,4
I-S	Algarve	2,1	2,2	2,4	2,6	2,5
II-N	Algarve	1,5	1,8	2,2	2,6	2,9
II-S	Algarve	0,5	0,9	1,3	1,8	2,2
III	Alentejo	1,2	1,8	2,2	2,7	3,0
IV	Alentejo	1,5	1,9	2,0	2,2	2,3
V	Alentejo	1,1	2,2	2,5	2,8	2,8
VI	Alentejo	1,6	2,0	2,4	2,7	2,7
VII-N	Trás-os-Montes e Alto Douro ^b	—	1,8	2,0	2,2	2,2
VII-S	Trás-os-Montes e Alto Douro	1,6	1,5	1,9	2,0	2,0
VIII-N	Trás-os-Montes e Alto Douro	1,4	2,0	2,0	2,3	2,3
VIII-S	Trás-os-Montes e Alto Douro	1,3	1,8	1,9	2,3	2,3

^a ID = (n° sobreiros classe 0 x 0 + n° sobreiros classe 1 x 1 + n° sobreiros classe 2 x 2 + n° sobreiros classe 3 x 3 + n° sobreiros classe 4 x 4) / n° total de sobreiros da parcela; ^b A parcela marcada foi afectada por um incêndio em 1998. Em 1999 marcou-se nova parcela.

Incidência e severidade do declínio

No início do estudo em 1998, a incidência do declínio em metade das parcelas já era de 100%, dado que todas as árvores apresentavam pelo menos desfoliação ligeira (classe 1). Com excepção da parcela II-S situada na Herdade da Parra, Silves, as restantes parcelas apresentavam uma incidência do declínio superior a 80%. (Figura 2.5). No final deste estudo a incidência do declínio era de 100% em todas as parcelas.

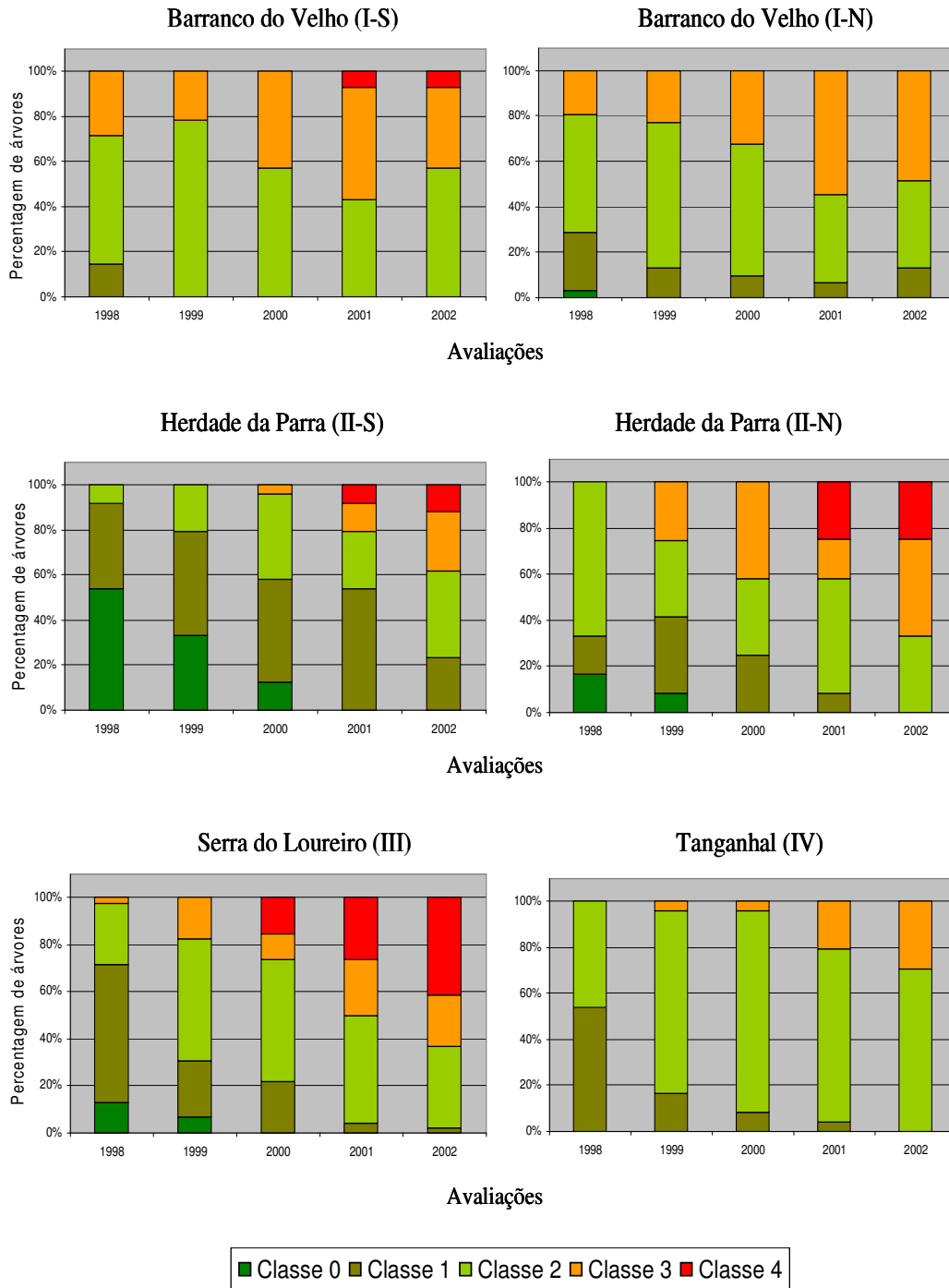


Figura 2.5 - Percentagem de árvores em cada uma das classes de desfoliação ao longo de cinco avaliações efectuadas nas doze parcelas de estudo. (Classes de desfoliação: Classe 0 = 0-10% de desfoliação, Classe 1 = 11-25%, Classe 2 = 26-60%, Classe 3 = > 60%, Classe 4 = árvore morta. A parcela VII-N foi afectada por um incêndio em 1998, em 1999 marcou-se nova parcela).

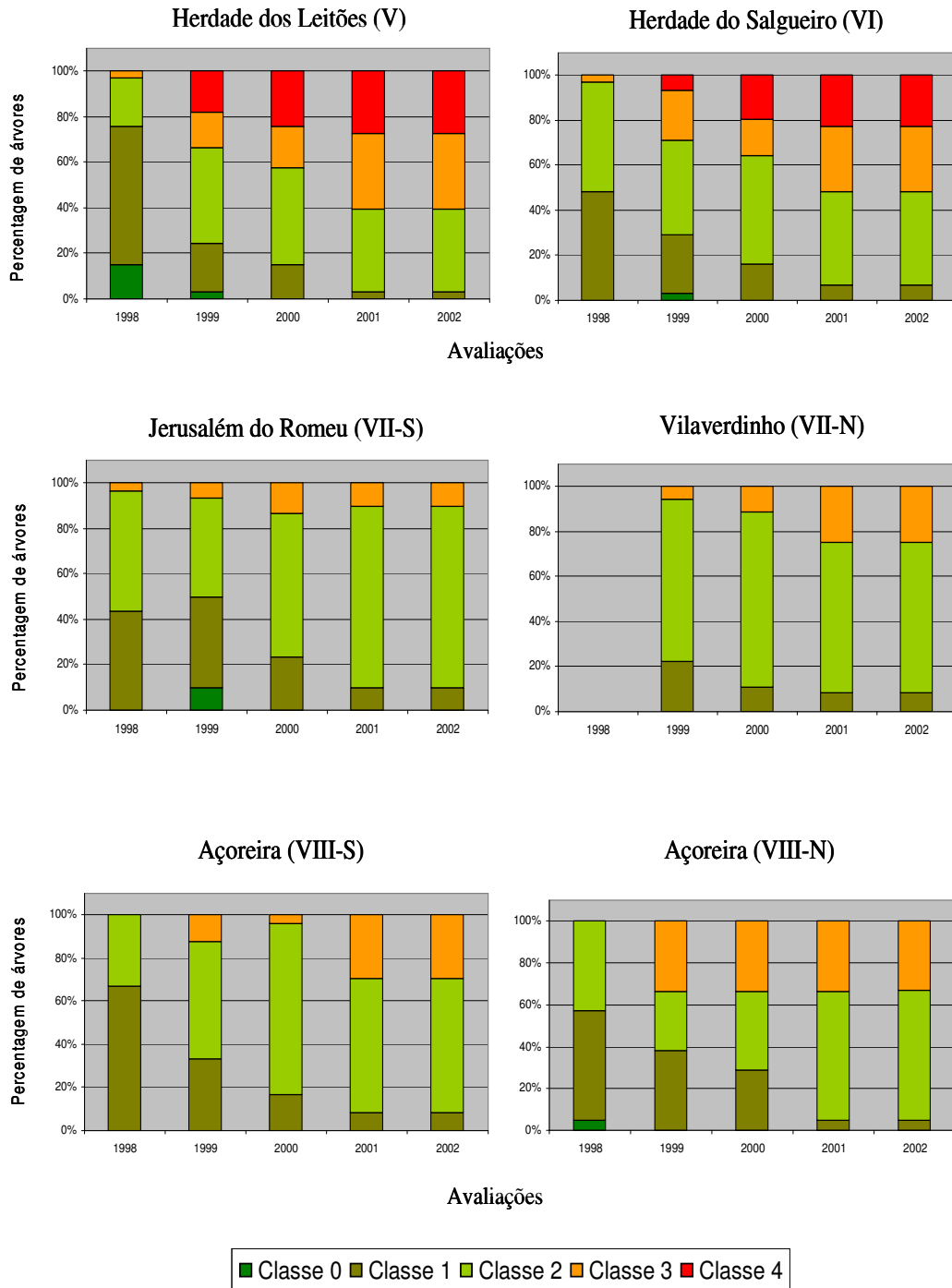


Figura 2.5 - (Cont.) Percentagem de árvores em cada uma das classes de desfoliação ao longo de cinco avaliações efectuadas nas doze parcelas de estudo. (Classes de desfoliação: Classe 0 = 0-10% de desfoliação, Classe 1 = 11-25%, Classe 2 = 26-60%, Classe 3 = > 60%, Classe 4 = árvore morta. A parcela VII-N foi afectada por um incêndio em 1998, em 1999 marcou-se nova parcela).

A análise de variância da classe de desfoliação de todas as árvores, nos 5 anos de estudo, mostrou diferenças significativas entre as diferentes avaliações (diferentes anos), verificando-se que desde a primeira avaliação as árvores experimentaram sempre um aumento significativo do grau de desfoliação (Anexo II: 1.; 1.1.). Embora em 2002 a classe de desfoliação média tivesse aumentado, este aumento não foi significativo em relação à avaliação anterior (ano 2001). No último ano de avaliações, verifica-se que o ID diminuiu ligeiramente nas parcelas I-N e I-S e permaneceu sem alteração, em relação ao ano anterior, em duas parcelas do Alentejo (V e VI) e nas quatro parcelas de Trás-os-Montes e Alto Douro (Tabela 2.5). De facto, observou-se uma alta correlação (80,9%) entre as classes de desfoliação no ano 2001 e 2002. No entanto, entre a primeira avaliação (ano 1998) e a última avaliação (ano 2002) a correlação foi somente de 14,6% (Anexo II: 2.), o que significa que os índices de desfoliação médios foram bastante diferentes e que em geral o ID aumentou ao longo do período de estudo.

No primeiro ano de estudo não foram detectadas árvores mortas em nenhuma das parcelas. No entanto, passados 5 anos, 12,9% de todas as árvores analisadas tinham morrido, ou seja apresentavam classe de desfoliação 4. Esta percentagem foi especialmente alta na Parcela III, localizada na Serra do Loureiro, Alcácer do Sal, onde 41,3% das árvores inicialmente avaliadas morreram durante o período de estudo (Figura 2.5). Nas parcelas da região de Trás-os-Montes e Alto Douro não se detectou nenhuma árvore morta durante o mesmo período (Figura 2.5; Anexo II: Tabela AII.1.).

A análise global de variância do índice de desfoliação médio das parcelas mostrou diferenças significativas entre diferentes anos de avaliação e exposição (Anexo II: 3.). Assim, a comparação de médias mostrou que o índice de desfoliação foi mais elevado nos 2 últimos anos de estudo, não havendo diferenças significativas entre 2001 e 2002, embora no último ano o índice de desfoliação fosse ligeiramente mais alto (Anexo II: 3.1.). Também se verificou que as parcelas em zonas planas e de exposição a norte foram aquelas onde ocorreram os índices de desfoliação mais elevados, sendo as parcelas com exposição a sul as que apresentaram os índices de desfoliação médios significativamente mais baixos (Anexo II: 3.2.).

Os sintomas observados, relacionados com a parte aérea das árvores foram a desfoliação de ramos, falta de viço, morte regressiva de ramos e morte completa da árvore. Não se observaram feridas ou outro tipo de danos no tronco e ramos. Deu-se especial atenção à detecção de sintomas ou sinais de agentes biológicos descritos como associados ao declínio de *Quercus* (Torres-Juan 1985; Muñoz e Rupérez 1987; Soria *et al.* 1997; Sánchez *et al.* 2000a, 2000b, 2000c, 2003b, 2003c). Em nenhum caso foram detectados danos produzidos por insectos perfuradores, inclusivé em árvores decrépitas ou mortas. Nomeadamente não se observaram ataques de carvão do entrecasco causado pelo fungo

Biscogniauxia mediterranea (sinónimo: *Hypoxylon mediterraneum*), nem de nenhum outro agente causador de cancos ou podridão de madeira.

A observação do sistema radicular de algumas árvores revelou uma escassez de raízes absorventes (< 1 mm) e as que ainda permaneciam unidas às raízes mais grossas, apresentavam necroses sendo que a maior parte delas já estavam mortas.

Isolamento de Phytophthora cinnamomi

A partir de amostras de raiz e solo obtiveram-se isolamentos em meio de cultura PARPH. A Tabela 2.6 indica a percentagem de colónias de *P. cinnamomi* originadas a partir das amostras colhidas em cada uma das parcelas.

Como se pode observar, nas parcelas situadas no Algarve (I-N, I-S, II-N, II-S) e no Alentejo (III, IV, V, VI) foi possível isolar *P. cinnamomi* a partir de amostras de solo e/ou raiz. No entanto, nas parcelas situadas na região de Trás-os-Montes e Alto Douro (VII-N, VII-S, VIII-S, VIII-N) não se conseguiu isolar quaisquer espécies de *Phytophthora* a partir das amostras de solo e raiz recolhidas em nenhuma das prospecções realizadas. No entanto, nestas parcelas foi isolado com bastante frequência a espécie *Pythium spiculum*.

O número de isolamentos de *P. cinnamomi* a partir de amostras de raiz foi superior ao obtido a partir de amostras de solo, contudo, o número de colónias por placa obtidas a partir de solo foi mais elevado (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Índice de desfoliação média, teor de humidade média do solo e percentagens de isolamentos de *Phytophthora cinnamomi* obtidas nas parcelas de estudo

Data	Parcela	Índice de desfoliação médio (ID) ^a	Teor de humidade média do solo (%) ^b	Isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (%) ^c	
				Solo	Raiz
Julho 1999	I-N	2,8	7,8	21,9	0,7
	I-S	2,0	6,7	33,3	2,8
	II-N	2,0	5,0	33,3	0,9
	II-S	1,5	6,0	50,0	2,1
	III	2,8	2,3	^d	0
	IV	1,8	1,4	^d	0
	V	2,0	1,0	^d	2,5
VI	2,5	1,0	^d	2,5	
Junho 2000	I-N	2,8	12,1	0	0
	III	2,3	^d	25,0	0
	IV	2,0	^d	25,0	0
	V	2,8	^d	35,0	4,7
	VI	2,4	^d	20,0	1,7
	VII-N	2,5	^d	0	0
	VII-S	2,7	^d	0	0
	VIII-N	2,3	^d	0	0
VIII-S	2,0	^d	0	0	
Julho 2001	III	2,3	4,3	0	0,7
	IV	2,5	6,0	16,7	0,7
	V	2,8	3,5	21,1	0
	VI	2,4	1,8	26,4	0
Outubro 2001	I-N	3,0	20,0	0	0
	I-S	2,7	16,7	0	0
	II-N	2,3	21,0	0	0
	II-S	1,6	14,3	0	0,6
	VII-N	2,0	8,3	0	0
	VII-S	2,0	5,7	0	0
	VIII-N	2,5	11,8	0	0
VIII-S	2,5	10,0	0	0	
Julho 2002	I-N	2,5	7,0	0	0,7
	I-S	2,7	5,7	0	0
	II-N	2,7	5,3	0	4,6
	II-S	2,3	4,8	0	0,7
	III	2,3	2,5	0	0,7
	IV	2,5	5,8	0	0
	V	3,0	3,0	0	0
	VI	2,3	3,8	0	0
	VII-N	2,3	3,8	0	0
	VII-S	2,3	3,7	0	0
	VIII-N	2,3	5,0	0	0
VIII-S	2,3	4,8	0	0	

^a Índice de desfoliação médio das árvores amostradas em cada parcela. ID é a média ponderada do número de árvores existentes em cada classe de desfoliação; ^b Percentagem de perda de peso depois de secar em estufa a 70°C até peso constante; ^c Percentagem expressa pelo número de segmentos de raiz ou de folhas de sobreiro e/ou eucalipto que originaram uma colónia sobre o número total de segmentos de raiz ou de folhas de sobreiro e/ou eucalipto colocados em meio de cultura selectivo PARPH; ^d Valor não calculado.

Dados meteorológicos

Com os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia elaboraram-se os gráficos da Figura 2.6 onde se mostra a flutuação da precipitação e da temperatura máxima e mínima em cada uma das estações meteorológicas consultadas.

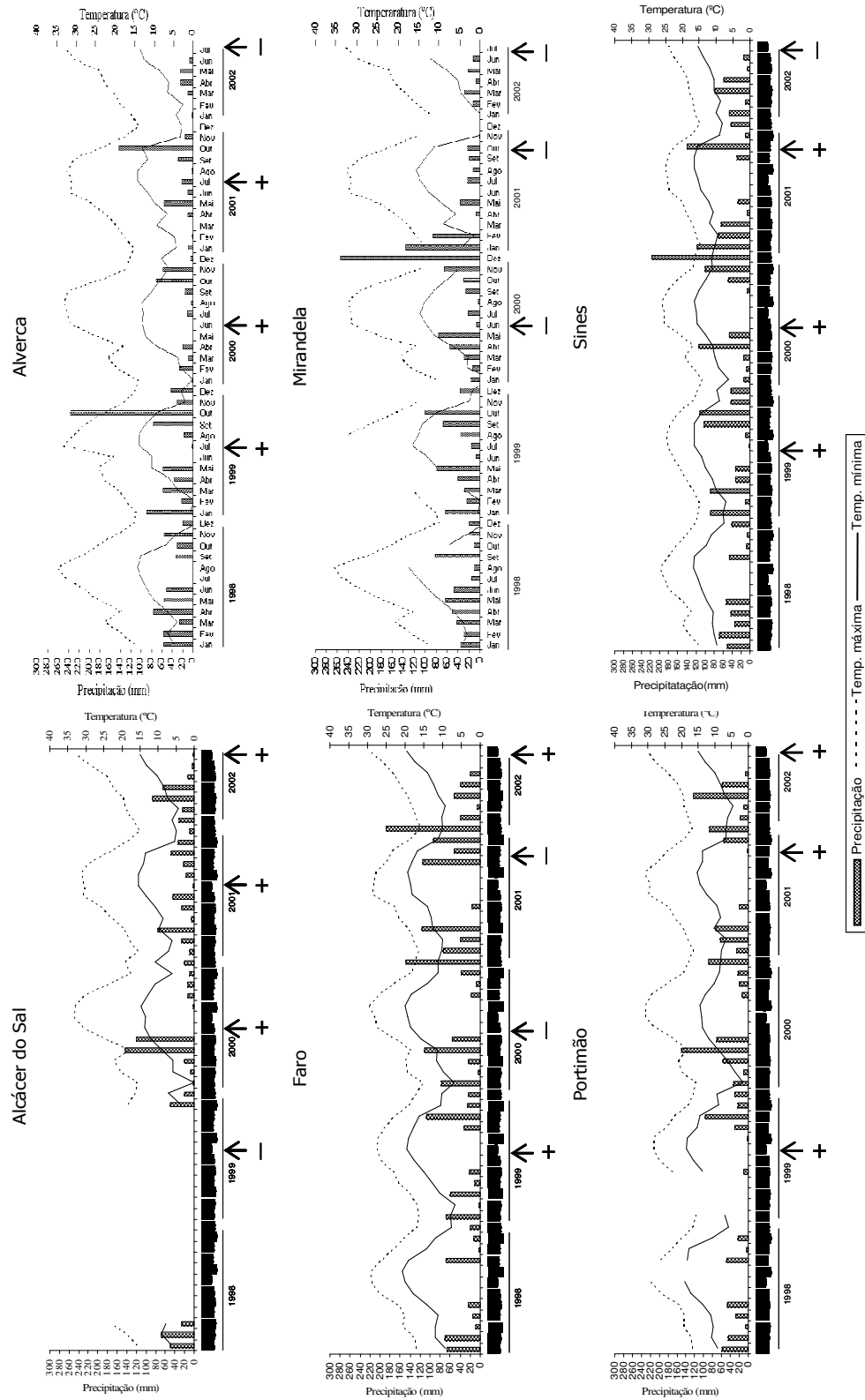


Figura 2.6 - Flutuações mensais de precipitação, temperatura máxima e mínima registadas nas cinco estações meteorológicas mais próximas das parcelas de estudo, com indicação do mês da recolha de amostras (solo e raiz) e resultado da sua análise. As setas indicam o momento em que se efectuaram as recolhas de amostras e os símbolos de baixo, indicam se o isolamento de *Phytophthora cinnamomi* foi positivo (+) ou negativo (-).

Nos gráficos da Figura 2.6 pode observar-se que a estação meteorológica de Sines foi a que registou maior quantidade de precipitação total, sendo 1998 o ano em que esta quantidade foi menor. A estação meteorológica de Alverca registou a menor quantidade de precipitação no período de 2000-2002. Em Mirandela o Inverno de 2000/2001 foi o mais chuvoso, sendo o ano de 2002 onde se registou menor quantidade de precipitação nos primeiros meses. Em Faro a quantidade de precipitação foi sempre aumentando desde 1998. As estações meteorológicas de Mirandela e Alverca registaram as temperaturas mínimas mais baixas, alcançando valores abaixo dos 0°C no Inverno de 1998/99 e de 1999/2000.

Nestes gráficos também se indicam as épocas em que se realizaram colheitas de amostras de solo e raízes para isolamento de *P. cinnamomi*, bem como se o resultado foi positivo ou negativo.

Correlação entre severidade do declínio nas parcelas de estudo em Portugal e factores abióticos

A matriz de correlação entre a percentagem de amostras (solo e raiz) em que se isolou *P. cinnamomi*, índice médio de desfoliação da parcela, exposição, percentagem de humidade do solo, elementos da análise química de solo, precipitação mensal, temperatura média, máxima e mínima mensais, apresentam-se no Anexo II: Tabela AII.2. Não se verificou nenhuma correlação significativa entre a percentagem de isolamento de *P. cinnamomi* a partir de amostras de raiz ou de solo da rizosfera e nenhum dos parâmetros de solo medidos (teor de humidade do solo, percentagem de areia, limo e argila, matéria orgânica, azoto total, fósforo, potássio, pH, soma de bases de troca, acidez de troca), variáveis meteorológicas (temperatura mínima, média, máxima e precipitação mensal) nem com a litologia, exposição da parcela, nem tão pouco com o índice de desfoliação médio dos sobreiros.

2.4. DISCUSSÃO

Nas prospeções realizadas para o estudo da incidência e distribuição da doença do declínio de sobreiros e azinheiras em Portugal e na Andaluzia Ocidental, em mais de 79% dos focos de declínio foi possível isolar *P. cinnamomi*. Todos os nove focos amostrados na Andaluzia Ocidental estavam infestados. Este resultado é superior ao encontrado por Sánchez *et al.* (2003b) na Andaluzia e por Torres-Álvares *et al.* (2006) na Estremadura espanhola. Percentagens menores foram encontradas por J. Sánchez da Universidade de Córdoba (comunicação pessoal) em prospeções de *P. cinnamomi* realizadas entre 2001 e 2002 em castanheiros na zona de Huelva.

Em relação ao resultado da prospeção de *P. cinnamomi*, tendo em atenção somente a amostragem em Portugal, verificou-se que mais de 75% dos locais estavam infestados com este patogénio. Num

total de dezanove concelhos distribuídos de norte a sul do país somente em dois concelhos (Moura e Mirandela) não foi possível isolar *P. cinnamomi*. Este resultado é mais elevado que o encontrado por Moreira-Marcelino (2001), Moreira (2003) e Moreira e Martins (2005). Tal como no trabalho realizado por estes autores, neste estudo, o Algarve foi também a região portuguesa mais afectada, só não sendo possível isolar *P. cinnamomi* de um foco de amostragem, num total de 20 amostrados. Em 2005 foi quando se obtiveram com mais frequência, maiores percentagens de isolamento de *P. cinnamomi*. Isto parece indicar que o meio de cultura NARPH que se utilizou para a análise destas amostras, em conjunto com o aperfeiçoamento da técnica de isolamento de *P. cinnamomi*, que ao longo do tempo de estudo foi acontecendo, foi possível melhorar quantitativamente o isolamento deste patógeno.

Ao contrário do que aconteceu com o estudo de Moreira-Marcelino (2001), Moreira e Martins (2005) e Sánchez *et al.* (2003b), foram mais as vezes em que se conseguiu isolar *P. cinnamomi* a partir de amostras de raízes (80%) do que do solo da rizosfera (68,9%). Em 48,9% das amostras foi possível isolar *P. cinnamomi* simultaneamente de raiz e de solo. Isto pode ser explicado porque quando se conseguia isolar *P. cinnamomi* de raiz e, numa primeira tentativa não se conseguia do solo adjacente a essas raízes, já não se faziam novas tentativas de isolar o patógeno desse solo, pois essa amostra já era positiva. Pelo contrário, se das raízes de uma amostra não se obtinham isolamentos, então realizavam-se mais tentativas para isolar o patógeno do solo dessa amostra. Contudo, desde que se começou a utilizar o meio selectivo NARPH, o isolamento de *P. cinnamomi* foi mais frequente a partir de amostras de solo. Assinale-se ainda que neste estudo, obtiveram-se em geral, percentagens mais elevadas de isolamento de *P. cinnamomi* de amostras de solo do que as obtidas por outros autores (Shearer e Tippet 1989; Davison e Tay 2005).

Apesar de se utilizar meio selectivo específico para isolar *P. cinnamomi* em que a maior parte das espécies de *Pythium* não cresce, foi possível ainda assim, isolar espécies do género *Pythium* em muitas das amostras. Uma dessas espécies, *Py. spiculum* nunca tinha sido descrita (Paul *et al.* 2006). Contudo, recentemente foi provada a sua patogenicidade em plantas de *Q. rotundifolia* (Romero *et al.* 2007). Esta espécie de *Pythium* foi isolada muitas vezes, principalmente a partir de amostras de solo procedentes da região de Trás-os-Montes e Alto Douro, embora também tenha aparecido noutras regiões de Portugal (dados não mostrados). Da região de Trás-os-Montes e Alto Douro nunca foi possível isolar *P. cinnamomi*, embora Moreira-Marcelino (2001) o tenha conseguido de amostras procedentes de azinheiras. Isto pode ter sido devido ao facto das amostras recolhidas nesta região passarem mais tempo armazenadas antes de serem processadas, o que pode ter provocado a perda de humidade das raízes ou a sua colonização por outros microrganismos mais competitivos, provocando a morte de *Phytophthora*. Além disso, estas amostras foram analisadas em 2000 e 2001, quando ainda não se utilizava o meio de cultura NARPH que permite melhorar quantitativamente o isolamento de *P. cinnamomi*.

Embora ainda não tenha sido realizado um estudo completo das temperaturas cardinais de crescimento de *Py. spiculum* (Paul *et al.* 2006), pode ser que esta espécie seja favorecida pelas temperaturas mínimas mais baixas na região (menores que 5°C), crescendo mais rapidamente e disputando com *P. cinnamomi* a colonização dos tecidos das raízes de *Quercus*.

A sintomatologia da parte aérea apresentada pelas árvores afectadas por declínio não é específica. As árvores exibem sintomas parecidos aos provocados pela falta de água e nutrientes, originados pela incapacidade das raízes infectadas absorverem água e nutrientes. A sintomatologia aérea é por isso de pouca utilidade para fazer o diagnóstico da doença, sendo necessário o isolamento do patogénio a partir das raízes para confirmar a doença (Moreira *et al.* 1993; Brasier *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 2002b). Apesar de se ter tomado especial atenção no reconhecimento de sinais e sintomas associados a outros agentes implicados no declínio de sobreiros e azinheiras, durante as prospekções em Portugal somente se observaram alguns sobreiros atacados pelo insecto *Dryomyia lichtensteini* mas sempre em árvores situadas fora do foco de declínio. Na Andaluzia Ocidental, somente na primeira prospekção realizada na zona de Huelva, se observaram ligeiros sintomas de “olho de pavão da azinheira” originado pelo fungo *Spilocaea quercus-ilicis* (Muñoz e Rupérez 1987), em azinheiras não afectadas com declínio. Estas árvores também se localizavam fora do foco de declínio e não foram seleccionadas para amostragem. Este fungo nunca foi referido como associado ao declínio de *Quercus* e não chegou a produzir a queda das folhas das árvores.

Além do isolamento de *P. cinnamomi* a partir de raízes de sobreiros e azinheiras em zonas afectadas por declínio, este patogénio também tem sido isolado de raízes de plantas arbustivas e herbáceas que manifestam os sintomas da doença e que se encontram associadas aos povoamentos de *Quercus* (Moreira-Marcelino 2001; Moreira e Martins 2005). Em algumas prospekções realizadas neste estudo na zona do Algarve, logrou-se isolar *P. cinnamomi* em espécies de *Cistus* (dados não publicados), o que vem corroborar os resultados daqueles autores.

Relativamente ao estudo da progressão do declínio de *Q. suber* em Portugal, não tendo sido possível definir previamente manchas de declínio nos povoamentos visitados para a monitorização da variação da área afectada, devido à elevada incidência da doença, optou-se por avaliar anualmente a incidência e severidade da doença em parcelas previamente marcadas. Apesar de se partir de diferentes situações quanto à incidência e severidade dos sintomas associados ao declínio (desfoliação das árvores), a evolução da doença foi bastante similar. Ao longo dos 5 anos de estudo, o estado geral dos sobreiros avaliados foi sempre deteriorando-se. Este agravamento manifestou-se, quer no aparecimento de sintomas nas árvores, que no início não os apresentavam ou eram ligeiros, quer no agravamento dos sintomas em árvores muito afectadas, que muitas vezes morreram. Nota-se no entanto, uma ligeira quebra desta tendência no último ano de avaliação. No

entanto, para este facto podem ser apontadas algumas explicações. Assim, para as parcelas situadas no Barranco do Velho, Loulé (I-N e I-S), todas as avaliações foram realizadas no início do Verão (Junho ou Julho), com excepção da avaliação do ano 2001 que foi realizada em Outubro, depois das árvores terem passado um período de vários meses de seca. Quando a última avaliação se realizou, em Julho de 2002, o aspecto geral das árvores não era tão grave como o apresentado anteriormente, uma vez que depois de uma Primavera chuvosa houve uma ligeira recuperação do aspecto aéreo do arvoredo.

Nas parcelas situadas na zona de Ponte de Sor (V e VI) a época de avaliação decorreu sempre no Verão e o aspecto geral das árvores em 2002 foi semelhante ao que apresentavam em 2001. Isto pode dever-se às obras de drenagem que entretanto se realizaram nestas parcelas, pois estes solos permitiam uma acumulação de água por períodos prolongados, o que favorece a infecção por *P. cinnamomi* (Shearer e Tippett 1989).

Os índices de desfoliação médios dos sobreiros das parcelas localizadas no concelho de Mirandela (VII-N, VII-S, VIII-N, VIII-S) também se mantiveram sem alterações nas duas últimas avaliações. Neste caso, a época de avaliações foi igual à efectuada nas parcelas de Loulé e a manutenção do estado geral das árvores nas parcelas de Mirandela e não uma melhoria, como ocorreu em Loulé, poderá ter sido devido à menor quantidade de água disponível, uma vez que a quantidade de chuva que se registou no concelho de Mirandela, no período que decorreu entre as duas últimas avaliações, foi bastante menor da que ocorreu no mesmo período em Loulé.

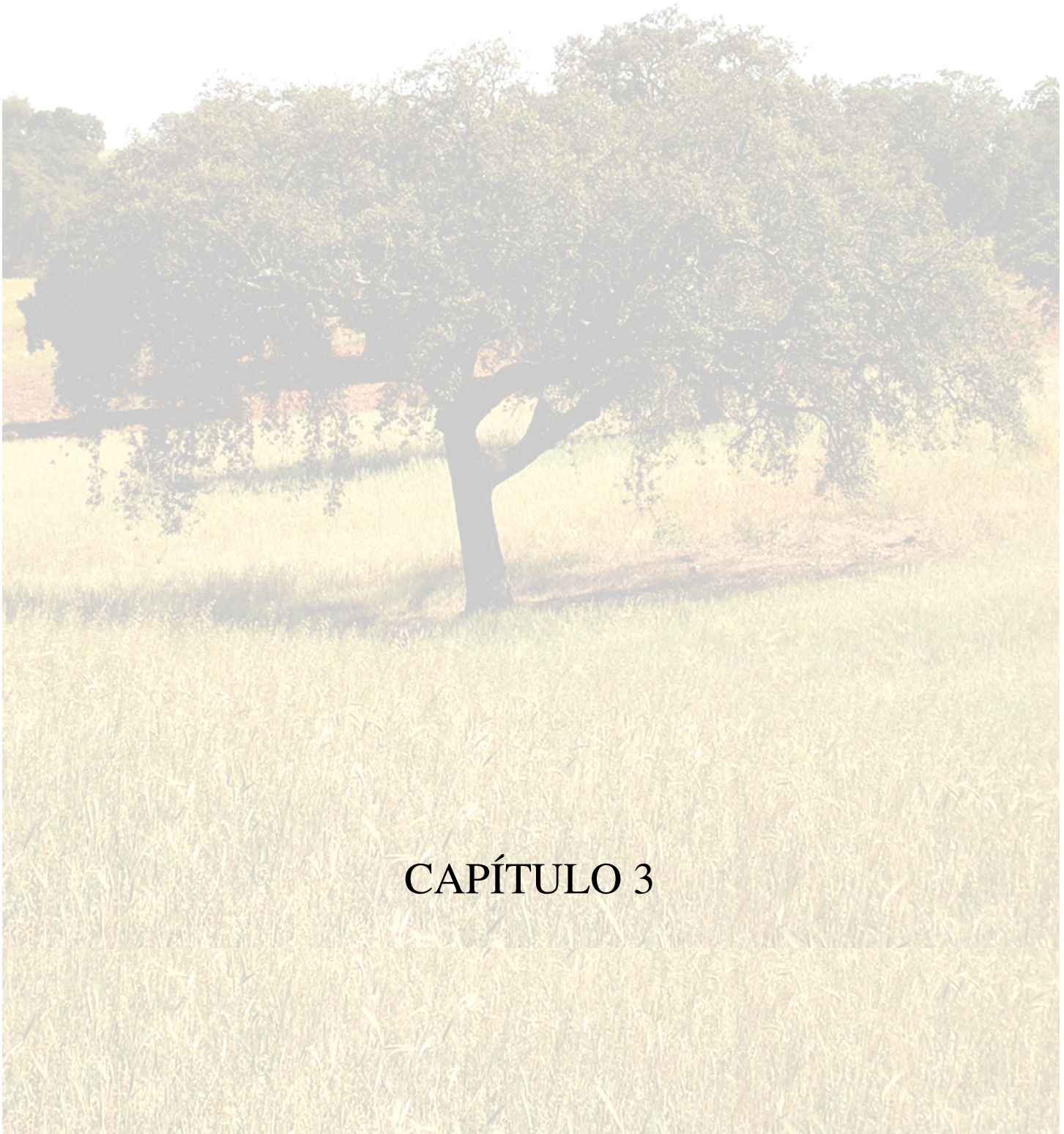
No final de 5 anos de avaliações a grande maioria dos sobreiros (mais de 92%) apresentaram-se com desfoliação moderada sendo considerados claramente danificados segundo a classificação de Cadahia *et al.* (1991). De facto, em todas as parcelas, os índices de desfoliação médios são iguais ou superiores a 2, apresentando os sobreiros da parcela situada na zona de Alcácer do Sal, desfoliação média superior a 60% (ID=3). Estes valores são similares aos valores de índice de desfoliação médio de sobreiros e azinheiras encontrados por Sánchez *et al.* (2003b) em Andaluzia, mas bastante superiores aos observados por Caetano (1994) e Correia (1994) em sobreiros no concelho de S. Brás de Alportel.

Em todas as parcelas delimitadas a sintomatologia das raízes das árvores amostradas indicou problemas a nível radicular, tendo sido possível isolar *P. cinnamomi* em oito das 12 parcelas de estudo.

Neste estudo não se verificou nenhuma correlação entre frequência de isolamento de *P. cinnamomi*, com variáveis meteorológicas e parâmetros de solo. Nas parcelas da zona de Trás-os-Montes em que não se isolou *P. cinnamomi* também não se observou nenhuma correlação entre a classe de desfoliação das árvores e os parâmetros de solo (Martins *et al. in press*). Igualmente, no estudo realizado por Moreira-Marcelino (2001) e Moreira e Martins (2005) não foi encontrada nenhuma

associação entre a distribuição de *P. cinnamomi* e textura do solo. No entanto, verificou-se que o isolamento de *P. cinnamomi* era significativamente mais frequente em solos com $\text{pH} \geq 5,1$ e em encostas voltadas ao sul (soalheira), indicando que nestas encostas as árvores estão mais afectadas pela doença do declínio. Navarro *et al.* (2000) também verificaram que a maior parte dos focos de declínio de espécies de *Quercus* na Andaluzia se encontravam nas zonas de soalheira. No presente estudo, os sobreiros com índice de desfoliação médio mais elevado localizaram-se nas zonas planas, ou seja, na zona do Alentejo e nas encostas voltadas ao norte (umbria). Esta aparente contradição, em relação aos autores citados, poderá dever-se a que Moreira-Marcelino (2001), Moreira (2003) e Moreira e Martins (2005) no seu estudo somente avaliaram quatro árvores por encosta, em zonas, que à partida pareciam afectadas por declínio causado por *P. cinnamomi* e posteriormente se confirmou. No caso de Navarro *et al.* (2000) a avaliação do declínio foi realizada de uma forma geral, incluindo no mesmo foco árvores afectadas por várias causas (seca, patogénios de solo, foliares, pragas, ...) nunca se procedendo à análise das raízes das árvores e do solo da rizosfera. Pelo contrário, neste estudo foram avaliadas várias árvores numa encosta (todas incluídas numa faixa de terreno previamente definida), e em zonas que, tal como Moreira-Marcelino (2001), Moreira (2003) e Moreira e Martins (2005), pareciam à partida, afectadas por declínio causado por *P. cinnamomi*. Mais tarde, confirmou-se a infestação desses solos e a infecção das raízes das árvores por este patogénio, na maior parte dos focos estudados. Sendo assim, nas encostas norte (umbria), o aspecto da vegetação é geralmente mais exuberante, devido principalmente ao ambiente mais fresco. No entanto, este aspecto deve-se em geral mais à parte arbustiva que à arbórea. No estudo realizado por Caetano (1994) verificou-se uma relação significativa entre a classe de desfoliação apresentada pelos sobreiros e o grau de cobertura do solo, indicando que índices de desfoliação média mais elevados correspondiam a graus de cobertura de solo maiores. Nas encostas sul (soalheira) devido ao ambiente mais quente, as árvores podem, naturalmente, apresentar um aspecto menos viçoso que o apresentado na encosta norte. Por outro lado, se nas encostas norte há disponibilidade de água durante mais tempo, isto favorece a infecção por *P. cinnamomi* (Shearer e Tippett 1989). Wilson *et al.* (2000) observaram que na Austrália a maior percentagem de locais afectados por *P. cinnamomi* situam-se em zonas baixas e em encostas com orientação de norte a oeste. Estes dados parecem sugerir que a infecção por este patogénio não tem relação com a orientação da encosta.

Embora alguns trabalhos sugeriram que o isolamento de *P. cinnamomi* é mais frequente em meses mais chuvosos (Anónimo 1994), a quantidade de precipitação não influenciou a frequência de isolamento e, tal como Sánchez *et al.* (2003b), conseguiu-se isolar *P. cinnamomi* tanto em meses com mais precipitação, como em meses mais secos, comprovando o que sugerem estes autores em relação à acumulação de água no solo durante longos períodos ser o factor que mais influi no isolamento do patogénio.



CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA* SPP. ASSOCIADOS AO DECLÍNIO DE *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

3.1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, tem-se observado um progressivo agravamento do estado sanitário geral de sobreiros e azinheiras no sudoeste de Espanha e Sul de Portugal, afectando as árvores independentemente da sua idade. Este declínio dos *Quercus* na Península Ibérica é causado por um número variável de factores bióticos e abióticos que vão produzindo uma deterioração gradual nas árvores até à sua morte (Brasier 1993; Brasier *et al.* 1993a; 1993b; Cobos *et al.* 1993; Brasier 1996; Tuset *et al.* 1996; Navarro e Fernández 2000; Sánchez *et al.* 2000a, 2000c, 2003b; Moreira-Marcelino 2001; Moreira 2003; Moreira e Martins 2005). Entre os principais factores bióticos implicados no declínio de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* na Península Ibérica, destaca-se o patogénio de solo *P. cinnamomi* que provoca a destruição do sistema radicular das árvores.

Desde 1995 foram realizadas diversas prospecções de *P. cinnamomi* em zonas afectadas por declínio de sobreiros e azinheiras em Portugal e em Espanha. O objectivo deste estudo foi caracterizar a morfologia e o crescimento de 42 isolamentos obtidos em prospecções realizadas entre 1995 e 2000 em diferentes zonas de sobreiro e azinheira em Portugal (Algarve e Alentejo) e Espanha (Huelva e Cádiz).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Isolamentos utilizados

Os isolamentos de *Phytophthora* spp. utilizados pertencem às colecções micológicas referidas no Capítulo 2. A recolha de amostras processou-se de acordo com o descrito em 2.2.3.

Estudaram-se 24 isolamentos procedentes de sobreiro (a partir de agora denominados isolamentos PA) e 18 procedentes de azinheira (adiante denominados isolamentos PE).

Para cada isolamento atribuiu-se um número de ordem e indicou-se o hospedeiro, a sua origem, o local de proveniência e a data em que foi isolado (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Isolamentos de *Phytophthora* spp. utilizados na caracterização morfológica

Código	Árvore	Origem	Concelho / Província	País	Data
PA ₁	Sobreiro	Raiz	S. Brás de Alportel	Portugal	Out. 1995
PA ₃	Sobreiro	Solo	Loulé	Portugal	Maió 1995
PA ₆	Sobreiro	Solo	Lagos	Portugal	Nov. 1995
PA ₇	Sobreiro	Raiz	Lagos	Portugal	Maió 1995
PA ₈	Sobreiro	Raiz	Grândola	Portugal	Jun. 1995
PA ₁₁	Sobreiro	Solo	Sines	Portugal	Jun. 1995
PA ₁₂	Sobreiro	Raiz	Sines	Portugal	Jun. 1995
PA ₁₃	Sobreiro	Solo	S. Brás de Alportel	Portugal	Jun. 1995
PA ₁₄	Sobreiro	Raiz	S. Brás de Alportel	Portugal	Jun. 1995
PA ₁₉	Sobreiro	Solo	S. Brás de Alportel	Portugal	Jun. 1995
PA ₂₀	Sobreiro	Solo	S. Brás de Alportel	Portugal	Nov. 1995
PA ₂₁	Sobreiro	Raiz	S. Brás de Alportel	Portugal	Nov. 1995
PA ₂₅	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Maió 2000
PA ₃₀	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Jun. 2000
PA ₃₁	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Dez. 2000
PA ₃₂	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Dez. 2000
PA ₃₃	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Dez. 2000
PA ₃₅	Sobreiro	Solo	Cádiz	Espanha	Dez. 2000
PA ₃₇	Sobreiro	Raiz	Cádiz	Espanha	Dez. 2000
PA ₄₀	Sobreiro	Raiz	Ponte de Sôr	Portugal	Jul. 2000
PA ₄₁	Sobreiro	Solo	Ponte de Sôr	Portugal	Jul. 2000
PA ₄₂	Sobreiro	Raiz	Ponte de Sôr	Portugal	Jul. 2000
PA ₄₃	Sobreiro	Solo	Alcácer do Sal	Portugal	Jul. 2000
PA ₄₄	Sobreiro	Solo	Grândola	Portugal	Jul. 2000
PE ₈	Azinheira	Raiz	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₁₀	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₁₁	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₁₂	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₁₃	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₁₆	Azinheira	Raiz	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₅₂	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jan. 1998
PE ₅₄	Azinheira	Raiz	Huelva	Espanha	Mar. 1998
PE ₅₅	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Mar. 1998
PE ₅₆	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Mar. 1998
PE ₅₈	Azinheira	Raiz	Huelva	Espanha	Jul. 1998
PE ₅₉	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jul. 1998
PE ₆₀	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jul. 1998
PE ₆₁	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jul. 1998
PE ₆₂	Azinheira	Solo	Huelva	Espanha	Jul. 1998
PE ₉₅	Azinheira	Raiz	S. Brás de Alportel	Portugal	Jun. 2000
PE ₉₆	Azinheira	Solo	S. Brás de Alportel	Portugal	Jun. 2000
PE ₉₇	Azinheira	Raiz	Cachopo	Portugal	Nov. 2000

A caracterização morfológica e fisiológica destes isolamentos realizou-se com base nas características macroscópicas das suas colónias e na caracterização microscópica das suas estruturas vegetativas e reprodutivas sexuadas e assexuadas.

3.2.2. Morfologia das colónias

A morfologia das colónias foi estudada em meio de cultura de referência *Corn Meal Agar* (CMA). O meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA) (Dhingra e Sinclar 1995) também foi utilizado para a caracterização das colónias, dado que na bibliografia utilizada na identificação de espécies de *Phytophthora*, há referência à morfologia das colónias neste meio de cultura (Brasier e Griffin 1979; Erwin e Ribeiro 1996). Para tal transferiram-se discos de agar da margem das colónias em crescimento activo, para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio CMA e CA.

Para a obtenção de colónias em crescimento activo retiraram-se, com uma ansa esterilizada à chama, pequenas porções de micélio de cada um dos isolamentos conservados no frio em tubos com parafina. O micélio removido foi colocado em placas de Petri com CA que se selaram com parafilme e se incubaram no escuro a 22°C. As placas foram mantidas com uma inclinação de aproximadamente 20° para que a parafina aderente ao micélio se depositassem no bordo da placa e não interferisse no crescimento das colónias.

Quando se observou o desenvolvimento das colónias, retiraram-se discos de agar da sua margem que foram transferidos para placas com CA. Estas placas também se incubaram no escuro a 22°C durante cinco dias. Ao fim deste tempo as colónias cobriam a totalidade da superfície do meio de cultura.

Para o estudo da morfologia das colónias, transferiram-se com o auxílio de um furador de rolhas de 5 mm de diâmetro, discos de agar de uma placa, com o isolamento em crescimento activo, para o centro de placas de Petri de 9 cm com meio CMA e CA. Estas placas selaram-se com parafilme e incubaram-se no escuro a 20°C. Realizaram-se 3 repetições (placas), desfasadas no tempo, por cada isolamento e por meio de cultura. A observação das placas realizou-se aos 4 e 6 dias de crescimento.

As características observadas foram a cor e forma da colónia, o tipo de margem, o tipo de micélio aéreo e as estruturas vegetativas (dilatações de micélio).

A observação das estruturas vegetativas fez-se directamente ao microscópio óptico invertido. Uma vez verificada a sua produção realizaram-se preparações para a observação ao microscópio óptico. O micélio foi corado com fucsina ácida em lactofenol (0,01%).

3.2.3. Caracterização de estruturas reprodutivas assexuadas

Para induzir a produção das estruturas reprodutivas assexuadas utilizou-se uma solução líquida de extracto de solo (Ribeiro 1978), uma vez que não se observou nenhum tipo destas estruturas em

qualquer dos meios de cultura utilizados (CMA e CA). A suspensão de solo preparou-se misturando 10 g de solo com 1 l de água desionizada, agitando durante alguns minutos e deixando depois repousar a mistura durante 24 h a 22°C. Com papel de filtro filtrou-se o líquido resultante. O solo utilizado procedeu de um campo experimental de oliveiras pertencente ao CIFA (*Centro de Investigación y Formación Agraria, Alameda del Obispo, Córdoba - Espanha*) que não estava infestado por nenhuma espécie de *Phytophthora* (Sánchez *et al.* 2001).

Com um furador de roldanas transferiram-se discos de agar de 18 mm de diâmetro, de uma placa de Petri com meio CA, onde o isolamento crescia activamente, para placas de Petri vazias de 5 cm de diâmetro. Seguidamente deitou-se na placa extracto de solo de modo a que o líquido circundasse a margem do disco. Prepararam-se duas placas por isolamento. O extracto de solo nas placas foi renovado cada 24 h com o auxílio de uma seringa. A produção de esporângios ensaiou-se à luz à temperatura de 15, 20 e 25°C.

Após 48 h de contacto dos discos com o extracto de solo, realizaram-se observações periódicas das placas ao microscópio óptico invertido até ao aparecimento de esporângios. Uma vez que, se verificou a produção de esporângios realizaram-se preparações para a observação ao microscópio óptico. Para tal, com uma agulha estéril, removeram-se pequenas porções de micélio, onde os esporângios maduros eram abundantes e coraram-se com fucsina ácida em lactofenol (0,01%).

Em alguns isolamentos que cresciam em meio de cultura CA a 22°C, verificou-se uma abundante formação de clamidósporos ao fim de 1 semana. Nessa altura, também se realizaram preparações com micélio para a observação de clamidósporos ao microscópio óptico.

Para a caracterização das estruturas reprodutivas assexuadas consideraram-se: tamanho e forma dos esporângios (presença ou ausência da papila, tamanho e forma do poro, persistência ou não do esporângio, tipo de proliferação), ramificação dos esporangióforos e diâmetro dos clamidósporos.

Por cada isolamento observaram-se e mediram-se o comprimento e a largura de 30 esporângios maduros e o diâmetro de 30 clamidósporos ao microscópio óptico com objectiva de 40x e ocular de 10x. A ramificação dos esporangióforos e a proliferação dos esporângios observaram-se directamente em colónias crescendo em placas de Petri com extracto de solo, utilizando o microscópio óptico invertido.

3.2.4. Caracterização de estruturas reprodutivas sexuadas

Para a produção de estruturas reprodutivas sexuadas prepararam-se culturas de cada isolamento que foram cruzadas com isolamentos de referência de diferente *mating type* de *P. cinnamomi*, pois nenhum dos isolamentos por si só foi capaz de produzir estruturas sexuadas. Para estes

cruzamentos utilizaram-se como isolamentos de referência *P. cinnamomi* A1 (Ref. Pc138 A1, cedido pela Doutora R. Pérez Giménez, CIFA, Málaga, procedente de Califórnia, USA), *P. cinnamomi* A2 (obtido da Micoteca do Departamento de Agronomia da ETSIAM, Córdoba - Espanha) e *P. drechsleri* A1 e A2 (cedido pelo Doutor C. M. Brasier, Forest Research Station, Surrey - UK). Os cruzamentos realizaram-se em meio de cultura CA, pois em experiências preliminares foi este o meio em que se observou a maior produção de estruturas reprodutivas sexuadas.

Para a realização dos cruzamentos retirou-se um disco de agar de 5 mm de diâmetro de cada um dos isolamentos crescendo activamente em meio de cultura CA e colocaram-se, cada um dos discos, no extremo de placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio de cultura CA. No extremo oposto de cada uma destas placas, colocou-se outro disco de agar de 5 mm de um dos isolamentos de referência, que igualmente se retirou de placas com meio de cultura CA em crescimento activo. Desta forma, cada isolamento cruzou-se, separadamente, com cada um dos isolamentos de referência. Prepararam-se três repetições por cada combinação. As placas incubaram-se no escuro a 22°C.

Realizaram-se observações periódicas ao microscópio óptico invertido e verificou-se que as estruturas de reprodução sexuada começavam a aparecer 20 dias após o início da incubação. Quando se observou que os oógonios estavam completamente maduros e os oósporos se diferenciaram claramente, realizaram-se preparações microscópicas. Estas preparações realizaram-se ao microscópio óptico invertido, com a ajuda de duas agulhas estéreis, tomando pequenos troços de agar da zona mais próxima ao disco de agar do isolamento que se queria identificar. O corante usado nas preparações foi fucsina ácida em lactofenol (0,01%).

Para a caracterização das estruturas sexuadas considerou-se: diâmetro do oógonio e tipo de parede; diâmetro da oósporo, tipo e grossura da sua parede, comprimento do anterídio e tipo de união ao oógonio.

Para cada isolamento e, sempre que foi possível, observaram-se e mediram-se 30 estruturas maduras, utilizando uma objectiva de 40x e uma ocular de 10x.

3.2.5. Taxa de crescimento a diferentes temperaturas

Para caracterizar o crescimento dos isolamentos utilizaram-se os mesmos meios de cultura que se haviam usado para estudar a morfologia das colónias: CMA e CA. Seleccionaram-se estes meios porque ambos são muito utilizados para caracterizar o crescimento de espécies de *Phytophthora*

(Eckert *et al.* 1962; Waterhouse 1963; Kaosiri *et al.* 1978; Tsao 1983; Erwin e Ribeiro 1996; Sánchez *et al.* 2001; 2005).

De cada isolamento, crescendo activamente numa placa de Petri com meio de cultura CA, retirou-se, com um furador de rolhas, um disco de 5 mm de diâmetro que se colocou no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de cultura (CMA e CA). As placas selaram-se com parafilme e incubaram-se no escuro a 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C (com variação de $\pm 1^\circ\text{C}$). Para cada isolamento fizeram-se 3 repetições (placas), desfasadas no tempo, por meio de cultura e por temperatura.

Mediu-se o diâmetro maior e menor das colónias a 1, 2, 4, 6, 10 e 15 dias de incubação.

Às medidas do diâmetro da colónia obtidas, subtraiu-se os 5 mm do diâmetro do disco de agar e calculou-se a taxa de crescimento para 2, 4, 6, 10 e 15 dias, dividindo o diâmetro médio da colónia pelo número de dias transcorridos.

3.2.6. Análise estatística

Para a análise estatística das medidas das estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas utilizou-se o programa *Statistix* (Analytical Software 2000). Realizou-se uma análise global de variância (ANOVA) somente com os isolamentos em que foi possível medir 30 estruturas. Para estes isolamentos as comparações de médias realizaram-se segundo o teste LSD (mínima diferença significativa) de Fisher para $P = 0,05$ (Steel e Torrie 1985).

Para a taxa de crescimento dos isolamentos calculou-se a taxa de crescimento diária para cada temperatura (média de três repetições) e escolheu-se a taxa diária maior, tendo em conta que, se a colónia ocupasse completamente a placa, se considerava a medida anterior como último valor. Para cada isolamento e para cada temperatura elaboraram-se curvas de crescimento. Para expressar a taxa de crescimento em função da temperatura, os dados ajustaram-se matematicamente a uma curva de regressão, seleccionando-se os modelos que melhor se ajustavam para cada um dos isolamentos quanto à distribuição de resíduos, coeficiente de determinação (R^2) e significado dos coeficientes de determinação.

Utilizando a equação resultante, calcularam-se as temperaturas máxima, mínima e óptima de crescimento para cada isolamento, assim como a sua taxa máxima de crescimento diária.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Morfologia da colónia

Aos 6 dias de crescimento, 37 isolamentos que cresciam em meio de cultura CMA formaram colónias circulares de morfologia radial, micélio hialino com pouco crescimento aéreo e com margem regular. Os isolamentos que apresentaram esta morfologia incluíram-se no grupo “A”. Os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ apresentaram colónias em forma petaloide sem micélio aéreo e com margem regular e incluíram-se no grupo “B”. Os isolamentos PE₆₁ e PE₆₂ apresentaram colónias com aspecto liso com o micélio de aspecto semelhante ao grupo “B” e classificaram-se no grupo “C”.

Em meio CA verificou-se que os grupos formados segundo a morfologia da colónia correspondiam aos formados em meio CMA. Assim, em meio de cultura CA a grande maioria dos isolamentos (37), tanto os procedentes de sobreiro como os de azinheira, apresentaram colónias esbranquiçadas de aspecto uniforme ou ligeiramente petaloide com margens regulares aos 4 dias de crescimento e com micélio aéreo cotonoso muito abundante aos 6 dias de crescimento (isolamentos do grupo “A”). Os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ (grupo “B”) aos 4 e 6 dias de crescimento apresentaram uma colónia esbranquiçada, tipo crisântemo, com micélio aéreo cotonoso menos abundante do que os isolamentos do grupo “A”. Os isolamentos PE₆₁ e PE₆₂ (grupo “C”) aos 4 e aos 6 dias de crescimento apresentavam uma colónia tipo roseta com pouco micélio aéreo e margem regular. Na Figura 3.1 apresentam-se os diferentes tipos de colónia.

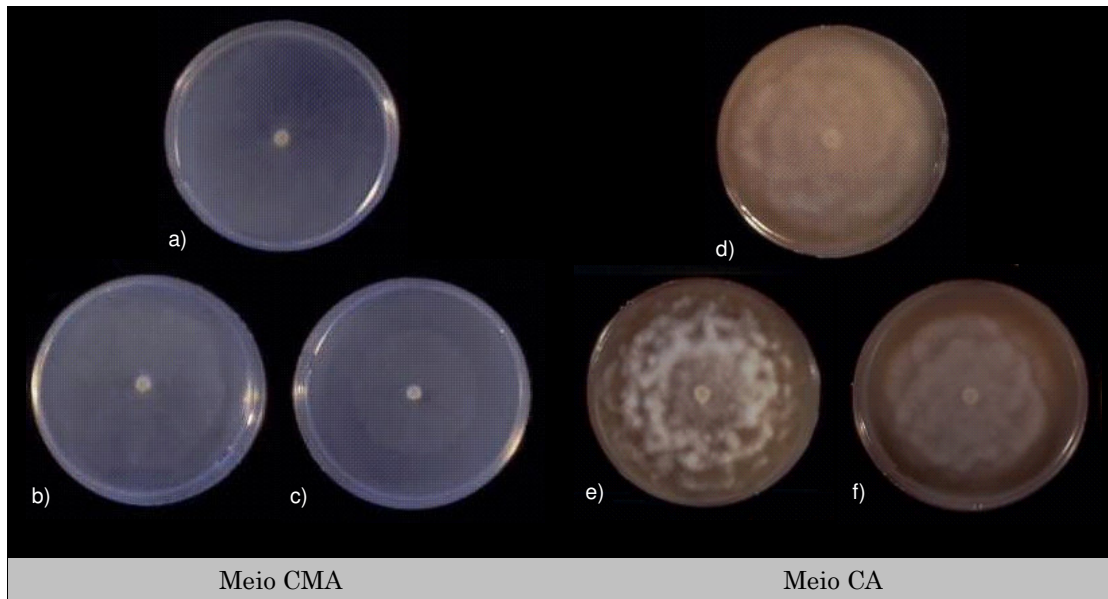


Figura 3.1 - Morfologia das colónias aos 4 dias de crescimento a 20°C em meio de cultura CMA e CA: a) e d) morfologia do grupo “A”; b) e e) do grupo “B”; c) e f) do grupo “C”.

3.3.2. Caracterização das estruturas vegetativas

Nas observações realizadas ao microscópio óptico, normal e invertido, todos os isolamentos apresentaram micélio cenocítico ramificado. Em alguns isolamentos do grupo “A” que cresciam em meio CA, observou-se a formação de dilatações nas hifas (*hyphal swellings*), com forma esférica, intercalares ou terminais e em racimos. Estes isolamentos eram em geral procedentes de sobreiro. Noutros isolamentos, normalmente os procedentes de azinheira da zona de Huelva, as dilatações nas hifas eram em forma de ramificações botriosas, formando micélio coraloide (Figura 3.2). Nos isolamentos do grupo “B” não se observaram dilatações das hifas e nos isolamentos de grupo “C” estas foram escassas. Em meio de cultura CMA não se observaram dilatações nas hifas em nenhum dos isolamentos.

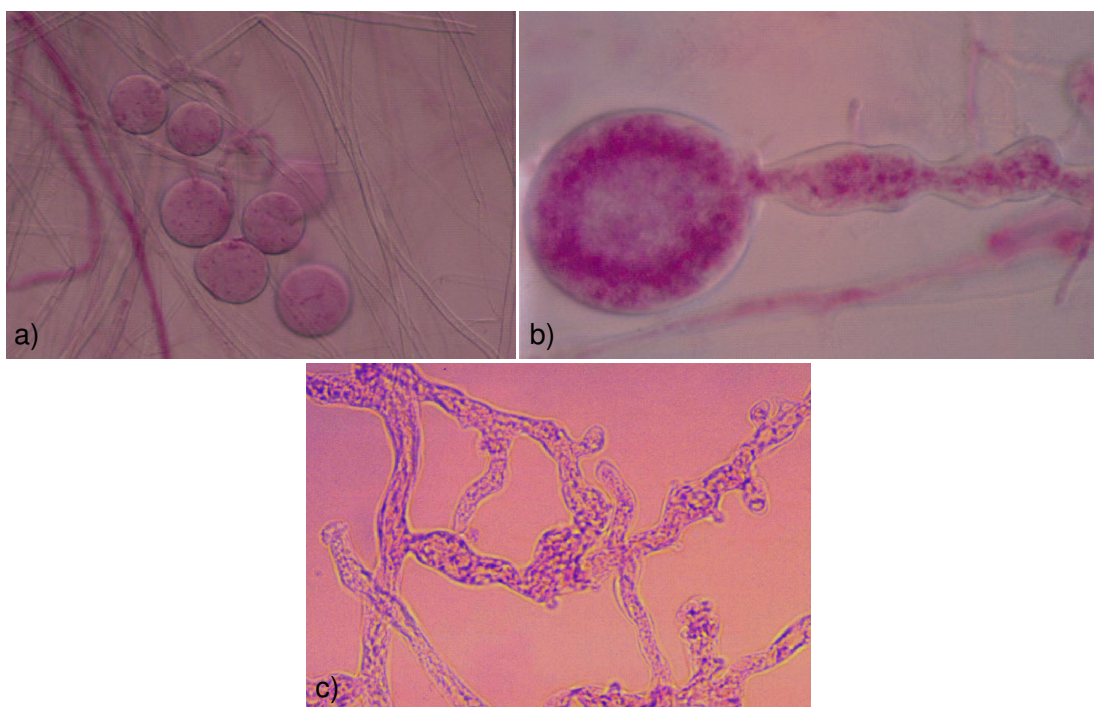


Figura 3.2 - Tipo de micélio dos isolamentos estudados: a) dilatações das hifas em racimos; b) dilatação da hifa na parte terminal; c) micélio coraloide.

Nos isolamentos do grupo “B” em meio CA observaram-se muitos clamidósporos esféricos, terminais e intercalares e de parede pouco espessa, de diâmetro compreendido entre 25 e 40 μm com uma média de $31,5 \pm 2,0 \mu\text{m}$ (Figura 3.3). A análise de variância para o diâmetro dos clamidósporos mostrou diferenças significativas entre isolamentos. A comparação das médias mostrou que o isolamento PE₁₂ tem clamidósporos significativamente maiores que os isolamentos

PE₁₆ e PE₅₂ (Anexo III: 1.; 1.1.). Nos restantes isolamentos e nos dois meios de cultura, a produção de clamidósporos foi muito baixa e em alguns casos praticamente inexistente.

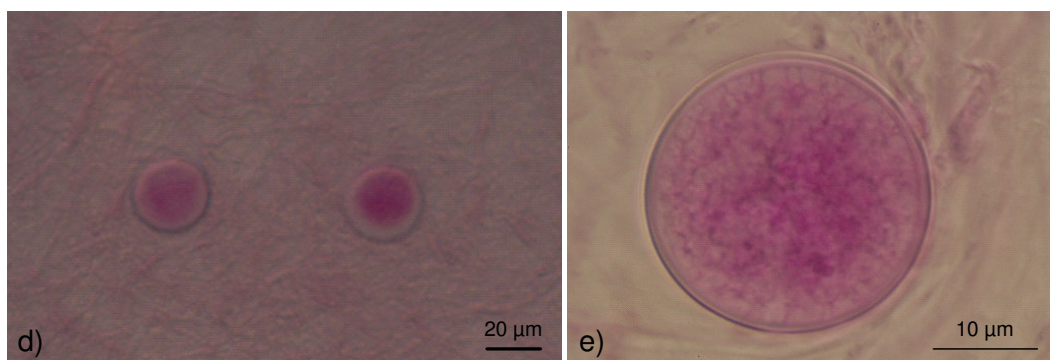


Figura 3.3 - Clamidósporos dos isolamentos do grupo “B”.

3.3.3. Caracterização das estruturas reprodutivas assexuadas

Os esporângios de todos os isolamentos formaram-se em meio líquido de extracto de solo. Das várias temperaturas ensaiadas a de 25°C foi a mais favorável para a formação destas estruturas. A esta temperatura o tempo que os esporângios demoravam a formar-se variou entre 3-5 dias, enquanto que a 15 e a 20°C os primeiros esporângios tardavam mais de 5 dias a aparecer.

Em alguns isolamentos foi necessário esperar mais do que 1 semana para ver esporângios e nos isolamentos PE₁₆ e PE₅₂ só houve produção de esporângios a 15°C e estes eram sempre escassos, não se incluindo por isso na análise estatística.

Em todos os isolamentos os esporângios formados foram persistentes, não papilados e encontravam-se na parte terminal do esporangióforo. A morfologia predominante dos esporângios foi ovóide. Também se observaram esporângios ovóides-elipsóides e elipsóides. O isolamento PE₁₂ foi o único que produziu esporângios na sua maioria em forma de limão e em menor proporção elipsóides. Os esporangióforos foram na grande maioria simples e longos, embora em alguns casos apresentassem ramificação simpodial. A Figura 3.4 mostra estruturas de reprodução assexuada dos isolamentos.

Praticamente a totalidade dos esporângios produzidos apresentaram o ápice truncado. Somente os esporângios produzidos por PE₁₂ apresentaram o ápice predominantemente não truncado.

As dimensões dos esporângios dos vários isolamentos apresentam-se na Tabela 3.2.

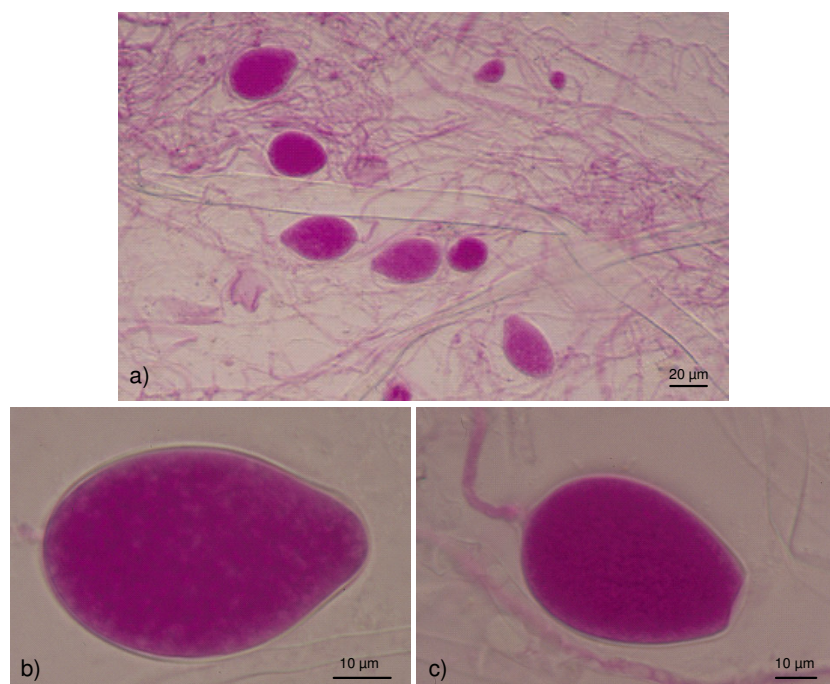


Figura 3.4 - Esporângios produzidos em meio líquido de extracto de solo: a) esporângios e micélio; b) esporângio elipsóide; c) esporângio ovóide com ápice truncado.

A análise de variância das dimensões dos esporângios mostra diferenças significativas entre isolamentos, para todas as medidas (comprimento, largura, comprimento/largura e tamanho do poro), como se pode observar no Anexo III: 2.; 3.; 4.; 5. No entanto, a comparação de médias não sugere a formação de grupos homogêneos nem segundo a procedência geográfica nem segundo o hospedeiro (Anexo III: 2.1.; 3.1.; 4.1.; 5.1.).

A comparação de médias para o comprimento dos esporângios indica que existe um grupo de isolamentos, procedentes tanto de sobreiro como de azinheira, com comprimento significativamente maior que todos os restantes isolamentos. Por outro lado, os isolamentos procedentes de azinheira PE₁₂ e PE₅₅ são os que apresentaram um tamanho menor, sendo significativamente mais pequenos que os restantes. Em relação à largura dos esporângios, o isolamento procedente de sobreiro PA₂₅ apresentou uma largura significativamente maior que os restantes, enquanto que o isolamento PE₁₂ procedente de azinheira foi, novamente, o que apresentou uma largura significativamente menor.

Por outro lado, em relação à forma do esporângio, indicada pela relação Comprimento/Largura (C/L) observo-se que os valores variaram entre 1,6 para o isolamento PE₅₈, o que indica uma forma mais elipsóide e 1,3 para o isolamento PE₅₅ que apresentou uma forma mais ovóide.

Tabela 3.2 - Dimensões dos esporângios produzidos pelos isolamentos de *Phytophthora spp.* em meio líquido de extracto de solo

Isolamento	Comprimento do esporângio (C) ^a	Comprimento máximo – mínimo ^a	Largura do esporângio (L) ^a	Largura máxima – mínima ^a	Tamanho do poro ^{a, b}	C/L ^c
PA ₁	40,1 ± 5,9	52,5 - 32,5	29,7 ± 4,7	40,0 - 22,5	^d	1,4
PA ₃	49,3 ± 5,6	58,0 - 40,0	33,1 ± 3,3	40,0 - 26,0	9,9 ± 1,1	1,5
PA ₆	48,2 ± 7,8	72,0 - 38,0	33,0 ± 3,9	40,0 - 26,0	10,7 ± 1,8	1,5
PA ₇	52,0 ± 9,8	72,5 - 35,0	35,5 ± 6,6	52,5 - 22,5	^d	1,5
PA ₈	40,3 ± 5,4	57,5 - 30,0	28,3 ± 4,2	38,8 - 20,0	9,0 ± 1,2	1,4
PA ₁₁	43,2 ± 4,8	58,0 - 36,0	28,7 ± 3,4	36,0 - 22,0	9,7 ± 1,1	1,5
PA ₁₂	42,4 ± 5,7	56,0 - 30,0	28,2 ± 2,9	34,0 - 22,0	9,5 ± 1,2	1,5
PA ₁₃	42,5 ± 4,4	52,0 - 36,0	29,2 ± 3,4	36,0 - 24,0	9,3 ± 0,9	1,5
PA ₁₄	38,8 ± 3,0	46,0 - 34,0	27,7 ± 2,2	32,0 - 24,0	8,6 ± 1,0	1,4
PA ₁₉	41,7 ± 8,2	57,5 - 25,0	30,3 ± 5,5	43,8 - 20,0	^d	1,4
PA ₂₀	55,6 ± 8,7	67,5 - 38,8	37,2 ± 5,6	45,0 - 25,0	^d	1,5
PA ₂₁	48,8 ± 6,5	65,0 - 40,0	32,2 ± 3,9	37,5 - 25,0	^d	1,5
PA ₂₅	58,2 ± 7,9	72,5 - 50,0	41,3 ± 3,8	50,0 - 35,0	12,6 ± 1,0	1,4
PA ₃₀	54,4 ± 5,4	70,0 - 45,0	37,4 ± 3,5	45,0 - 30,0	10,9 ± 1,3	1,5
PA ₃₁	44,9 ± 3,9	50,0 - 37,5	32,8 ± 2,4	37,5 - 27,5	9,9 ± 1,0	1,4
PA ₃₃	40,9 ± 4,7	50,0 - 32,5	29,6 ± 2,5	35,0 - 25,0	9,1 ± 1,4	1,4
PA ₃₅	53,2 ± 4,0	65,0 - 47,5	37,5 ± 2,9	42,5 - 32,5	12,3 ± 0,8	1,4
PA ₃₇	42,5 ± 3,9	52,5 - 37,5	31,6 ± 3,2	40,0 - 27,5	10,0 ± 1,2	1,3
PA ₄₀	60,5 ± 8,7	82,5 - 47,5	39,3 ± 3,9	50,0 - 32,5	13,1 ± 2,1	1,5
PA ₄₁	48,6 ± 6,7	65,0 - 40,0	34,0 ± 3,5	42,5 - 27,5	9,5 ± 1,9	1,4
PA ₄₂	50,3 ± 3,4	62,5 - 45,0	34,8 ± 3,5	45,0 - 30,0	11,0 ± 1,7	1,5
PA ₄₄	54,9 ± 4,8	65,0 - 50,0	34,7 ± 3,1	40,0 - 30,0	10,7 ± 1,3	1,6
PA ₄₃	55,4 ± 5,3	62,5 - 47,5	37,1 ± 3,5	42,5 - 30,0	11,4 ± 1,4	1,5
PE ₈	48,8 ± 8,3	67,5 - 32,5	32,2 ± 4,5	42,5 - 22,5	^d	1,5
PE ₁₀	40,6 ± 2,3	45,0 - 37,5	25,8 ± 1,9	30,0 - 22,5	^d	1,6
PE ₁₁	51,2 ± 8,8	70,0 - 35,0	34,3 ± 5,7	42,5 - 22,5	^d	1,5
PE ₁₂	32,1 ± 3,0	37,5 - 25,0	21,0 ± 2,0	25,0 - 15,0	^d	1,5
PE ₁₃	50,6 ± 5,5	62,5 - 40,0	32,6 ± 2,4	40,0 - 30,0	^d	1,6
PE ₅₄	39,4 ± 4,5	50,0 - 30,0	28,1 ± 3,2	36,0 - 22,0	8,6 ± 1,0	1,4
PE ₅₅	35,5 ± 3,0	42,0 - 30,0	26,9 ± 2,3	32,0 - 22,0	8,8 ± 1,1	1,3
PE ₅₆	41,4 ± 5,0	56,0 - 34,0	30,1 ± 3,9	40,0 - 22,0	8,4 ± 1,3	1,4
PE ₅₈	56,6 ± 9,7	82,5 - 45,0	35,3 ± 4,2	42,5 - 27,5	^d	1,6
PE ₅₉	52,0 ± 6,9	72,5 - 42,5	34,6 ± 3,5	42,5 - 28,8	^d	1,5
PE ₆₀	50,1 ± 4,3	62,5 - 45,0	33,6 ± 3,3	40,0 - 27,5	^d	1,5
PE ₆₁	40,9 ± 2,9	47,5 - 37,5	28,0 ± 2,1	32,5 - 23,8	^d	1,5
PE ₆₂	39,8 ± 3,1	50,0 - 35,0	28,5 ± 3,3	37,5 - 22,5	^d	1,4
PE ₉₅	55,2 ± 5,0	65,0 - 47,5	38,3 ± 3,7	47,5 - 32,5	12,0 ± 1,5	1,4
PE ₉₆	41,5 ± 2,8	47,5 - 37,5	30,0 ± 2,7	37,5 - 25,0	9,9 ± 1,1	1,4
PE ₉₇	52,6 ± 5,0	62,5 - 42,5	37,2 ± 3,4	42,5 - 27,5	11,6 ± 1,2	1,4

^a Valores expressos em µm. Cada valor é a média de 30 observações ± desvio padrão; ^b Média do tamanho do poro medido nos esporângios com ápice truncado; ^c Relação comprimento/largura; ^d Não foi possível medir.

3.3.4. Caracterização das estruturas reprodutivas sexuadas

Nenhum dos isolamentos estudados produziu em cultura pura gametângios, o que indica que derivam de uma espécie heterotálica. As estruturas reprodutivas sexuadas só foram obtidas em cultura de pares de isolamentos, combinando cada um dos isolamentos, com isolamentos de referência *P. cinnamomi* e *P. drechsleri* do *mating type* A1. Confirma-se assim que todos os isolamentos estudados são do *mating type* A2.

As estruturas reprodutivas desenvolveram-se na zona de intercepção das duas culturas, isto é, na área em que os micélios dos dois isolamentos entraram em contacto. Também se formaram estruturas nas proximidades do disco de agar usado como inóculo, do isolamento a identificar. Foi sempre dessas zonas que se retiraram estruturas para fazer preparações microscópicas, evitando assim a possibilidade de remover gametângios produzidos pelos isolamentos de referência.

Nem todos os isolamentos produziram estruturas reprodutivas sexuadas. Nos isolamentos que as produziram, os oógonios eram esféricos, de parede lisa, os oósporos claramente pleuróticos e os anterídios anfíginios (Figura 3.5).

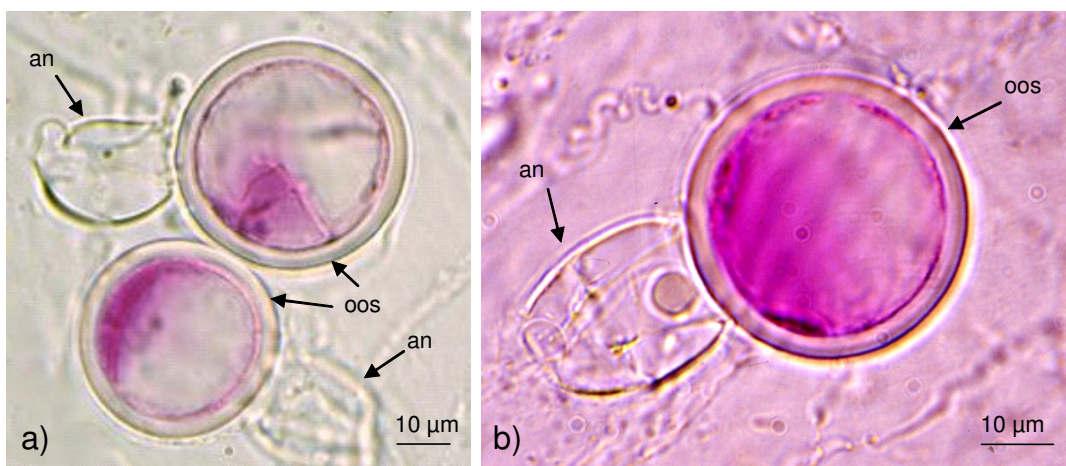


Figura 3.5 - Gametângios produzidos em cultura dupla a 22°C em meio cultura de extracto de cenoura-agar (CA). Oogónios esféricos, de parede lisa, com oósporos pleróticos e anterídios anfíginios: a) anterídios unicelulares; b) anterídio bicelular. an - anterídio; oos - oósporo.

As dimensões dos oósporos, espessura da parede e tamanho dos anterídios que se formaram indicam-se na Tabela 3.3. Em alguns isolamentos não foi possível observar e medir 30 estruturas sexuadas. Os oósporos de maiores dimensões corresponderam aos isolamentos PE₅₄ com uma dimensão média de 58,0 µm, sendo os mais pequenos produzidos pelos isolamentos PA₃ e PE₅₆ com umas dimensões médias de 34,7 e 35,9 µm respectivamente. A espessura da parede do oósporo variou entre 2,7 µm do isolamento PE₅₄ e 4,7 µm do isolamento PA₁₄. Verificou-se que o isolamento PE₅₄ é o que apresentou oósporos maiores com menor espessura da parede. Os anterídios apresentaram formas rectangulares e cilíndricas e foram na sua maioria unicelulares, raramente aparecendo anterídios bicelulares. As maiores dimensões dos anterídios corresponderam aos isolamentos PE₅₆ e PA₃ com 18,5 e 18,3 µm respectivamente e as menores a PE₆₀ (12,0 µm) e a PA₂₁ (12,2 µm).

Tabela 3.3 - Dimensões das estruturas sexuadas dos isolamentos de *Phytophthora* spp. em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA)

Isolamento	Nº de estruturas	Diâmetro do oósporo ^a	Espessura da parede do oósporo ^a	Comprimento do anterídio ^a
PA ₁	4	45,0 ± 2,6	3,0 ± 0,0	14,0 ± 1,6
PA ₃	30	34,7 ± 2,4	3,2 ± 0,5	18,3 ± 2,5
PA ₆	23	38,6 ± 1,8	3,7 ± 0,4	13,8 ± 1,3
PA ₇	30	38,0 ± 2,4	4,3 ± 0,5	16,3 ± 2,5
PA ₈	6	44,7 ± 3,9	3,7 ± 1,4	16,3 ± 3,4
PA ₁₁	11	43,3 ± 4,7	3,5 ± 0,8	14,7 ± 2,7
PA ₁₂	13	43,4 ± 2,8	3,8 ± 0,6	13,7 ± 2,0
PA ₁₃	30	41,0 ± 3,9	4,3 ± 1,0	16,6 ± 2,2
PA ₁₄	30	41,5 ± 3,0	4,7 ± 1,1	16,1 ± 2,7
PA ₁₉	13	40,6 ± 4,0	3,5 ± 0,7	14,5 ± 2,3
PA ₂₁	10	39,8 ± 2,7	4,2 ± 0,9	12,2 ± 2,4
PE ₈	30	40,9 ± 3,0	4,5 ± 0,9	14,2 ± 2,8
PE ₁₀	19	41,3 ± 2,8	3,9 ± 0,5	12,9 ± 2,7
PE ₁₁	30	41,3 ± 2,7	4,1 ± 0,5	14,1 ± 2,1
PE ₁₃	24	43,7 ± 3,4	3,7 ± 0,5	14,8 ± 3,5
PE ₅₄	3	58,0 ± 9,2	2,7 ± 0,6	12,7 ± 1,2
PE ₅₅	30	38,9 ± 3,4	4,3 ± 0,8	16,3 ± 2,5
PE ₅₆	30	35,9 ± 2,8	3,7 ± 0,5	18,5 ± 1,9
PE ₅₈	30	41,3 ± 2,6	3,9 ± 0,7	13,9 ± 2,7
PE ₅₉	24	41,0 ± 2,8	4,3 ± 0,8	14,0 ± 2,3
PE ₆₀	3	39,3 ± 1,5	3,0 ± 0,0	12,0 ± 2,0

^a Valores expressos em µm. Valor médio do nº de estruturas ± desvio padrão.

A análise de variância das dimensões dos gametângios somente se realizou com os isolamentos em que foi possível medir 30 estruturas. Dessa análise foi possível constatar diferenças significativas entre isolamentos, relativamente ao diâmetro e espessura da parede do oósporo, e comprimento dos anterídios (Anexo III: 6.; 7.; 8.). A comparação de médias para o diâmetro do oósporo definiu três grupos, sendo os isolamentos PA₃ e PE₅₆ os que apresentaram oósporos significativamente mais pequenos do que os restantes isolamentos (Anexo III: 6.1.). Os isolamentos PA₃ e PE₅₆ são também os que apresentaram os maiores anterídios (Anexo III: 7.1.). A comparação de médias para o comprimento do anterídio também indicou a formação de três grupos significativamente diferentes entre si, embora ligeiramente diferentes dos grupos formados pelo tamanho do oósporo. Quanto à espessura da parede do oósporo, a comparação de médias (Anexo III: 8.1.) indicou variabilidade entre os vários isolamentos, sendo o PA₃ o que apresentou a parede do oósporo significativamente menos grossa.

3.3.5. Taxa de crescimento a diferentes temperaturas

Para caracterizar o desenvolvimento de cada um dos isolamentos calculou-se a taxa de crescimento diária máxima em cada um dos dois meios de cultura ensaiados: CMA e CA. As taxas de

crescimento de cada isolamento nas diferentes temperaturas ensaiadas para cada um destes meios de cultura indicam-se nas Tabelas 3.4 e 3.5.

Tabela 3.4 - Taxas de crescimento máximo (mm/dia) dos isolamentos de *Phytophthora spp.* em meio de cultura *Corn Meal Agar* (CMA) a diferentes temperaturas

Isolamento	TEMPERATURAS (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
PA ₁	0,5	2,4	9,5	13,5	17,0	16,5	0
PA ₃	0,8	3,9	11,1	15,0	18,9	22,0	0
PA ₆	0,4	2,2	9,4	13,5	16,7	16,5	0
PA ₇	0,6	3,5	11,0	15,8	20,5	23,3	0
PA ₈	0,4	2,2	7,4	10,9	14,8	16,1	0
PA ₁₁	0,6	4,1	7,6	10,3	13,3	15,7	0
PA ₁₂	0,6	2,7	7,1	9,7	13,5	15,3	0
PA ₁₃	0,4	2,5	7,6	10,6	13,1	14,8	0
PA ₁₄	0,4	2,3	7,2	12,2	12,3	14,9	0
PA ₁₉	0,7	2,6	9,5	13,8	17,3	16,8	0
PA ₂₀	0,6	2,8	9,6	13,3	17,4	18,3	0
PA ₂₁	0,6	2,1	7,5	11,0	14,2	15,6	0
PA ₂₅	0,5	2,2	11,3	15,1	17,6	16,1	0
PA ₃₀	0,4	2,2	11,0	14,8	17,7	17,8	0
PA ₃₁	0,5	2,3	10,5	14,0	17,0	16,7	0
PA ₃₂	0,4	1,8	9,1	14,8	18,0	13,7	0
PA ₃₃	0,5	2,6	11,1	14,9	18,0	17,1	0
PA ₃₅	0,5	3,0	11,6	15,6	17,8	16,3	0
PA ₃₇	0,5	2,3	11,0	15,1	17,5	16,7	0
PA ₄₀	0,3	1,5	8,6	13,5	17,5	16,6	0
PA ₄₁	0,5	2,1	11,2	15,1	18,7	16,7	0
PA ₄₂	0,5	2,8	11,6	15,6	18,7	20,5	0
PA ₄₃	0,4	2,1	8,0	10,5	13,2	14,4	0
PA ₄₄	0,3	2,1	7,3	9,9	12,4	13,6	0
PE ₈	0,6	3,0	8,6	12,4	14,6	15,8	0
PE ₁₀	0,8	2,9	8,1	11,7	14,6	15,7	0
PE ₁₁	0,6	3,0	8,3	12,2	14,5	17,3	0
PE ₁₂	6,3	8,2	16,0	20,3	22,9	28,0	22,0
PE ₁₃	0,8	2,8	8,6	12,2	14,6	15,8	0
PE ₁₆	5,2	9,1	16,2	20,0	23,7	28,6	23,7
PE ₅₂	5,7	9,6	18,0	21,9	26,3	30,3	24,8
PE ₅₄	0,4	2,7	8,6	11,9	14,9	15,2	0
PE ₅₅	0,6	2,7	8,1	11,8	15,0	16,4	0
PE ₅₆	0,5	2,6	8,2	12,3	14,9	14,2	0
PE ₅₈	0,6	3,2	8,2	11,8	14,8	15,9	0
PE ₅₉	0,6	3,0	8,1	11,3	14,5	15,9	0
PE ₆₀	0,6	3,0	7,9	11,4	14,0	15,4	0
PE ₆₁	4,7	7,6	12,2	14,0	15,7	16,1	0
PE ₆₂	4,7	7,5	12,0	13,7	15,3	16,4	0
PE ₉₅	0,5	3,0	10,9	14,5	18,0	17,5	0
PE ₉₆	4,1	6,1	11,1	13,0	14,5	13,2	0
PE ₉₇	0,5	2,4	8,3	10,8	13,2	15,1	0
LSD *	1,0	1,4	1,3	1,7	1,5	2,2	1,7

* Mínima Diferença Significativa segundo o teste de Fisher ao nível de probabilidade de P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

À temperatura mais alta ensaiada, 35°C, os isolamentos só cresceram no primeiro dia, não se verificando qualquer crescimento nos dias subsequentes. Confirmou-se que os isolamentos morreram, uma vez que ao colocá-los posteriormente a 20°C se verificou que não cresceram. A excepção foi os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ que cresceram normalmente a 35°C.

Tabela 3.5 - Taxas de crescimento máximo (mm/dia) dos isolamentos de *Phytophthora spp.* em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA) a diferentes temperaturas

Isolamento	TEMPERATURAS (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
PA ₁	1,3	5,9	14,3	21,1	25,1	26,8	0
PA ₃	1,3	6,2	15,5	19,5	23,9	27,0	0
PA ₆	0,6	5,1	14,3	18,5	22,9	24,9	0
PA ₇	1,8	6,4	15,3	21,3	25,7	28,5	0
PA ₈	1,2	4,2	12,3	17,1	21,6	25,1	0
PA ₁₁	1,7	3,9	12,2	16,9	21,2	22,7	0
PA ₁₂	1,4	4,1	12,0	16,8	20,4	24,9	0
PA ₁₃	1,0	4,4	12,3	17,0	20,7	24,8	0
PA ₁₄	1,1	4,4	13,3	19,8	22,0	25,5	0
PA ₁₉	2,2	6,3	15,4	20,9	26,8	29,5	0
PA ₂₀	1,4	6,2	15,1	20,9	24,8	30,2	0
PA ₂₁	1,2	5,3	12,4	16,8	21,5	24,4	0
PA ₂₅	0,5	3,1	13,8	17,8	22,4	21,8	0
PA ₃₀	0,1	2,1	12,4	16,5	21,7	22,5	0
PA ₃₁	0,3	3,2	14,0	18,7	23,4	23,8	0
PA ₃₂	0,3	2,8	11,2	19,4	23,1	18,3	0
PA ₃₃	0,3	3,1	12,6	18,0	22,8	20,9	0
PA ₃₅	0,5	4,0	15,9	19,6	22,8	23,2	0
PA ₃₇	0,6	3,1	13,5	18,0	21,9	23,4	0
PA ₄₀	0,2	2,3	13,3	18,5	22,7	22,2	0
PA ₄₁	0,5	3,4	14,7	17,6	23,6	23,7	0
PA ₄₂	0,6	3,5	13,8	19,1	23,1	24,3	0
PA ₄₃	0,4	1,8	10,8	15,8	20,5	22,8	0
PA ₄₄	0,3	2,1	10,7	15,7	19,6	20,9	0
PE ₈	0,8	3,8	11,7	17,7	21,5	25,6	0
PE ₁₀	0,9	4,2	12,0	17,3	21,3	24,6	0
PE ₁₁	1,0	5,4	11,4	17,6	21,1	25,4	0
PE ₁₂	4,8	8,6	12,7	20,5	23,8	29,8	23,3
PE ₁₃	0,8	4,2	11,5	17,1	21,3	25,3	0
PE ₁₆	4,6	8,3	15,5	19,0	22,4	25,7	20,5
PE ₅₂	4,9	8,7	16,6	21,1	24,8	27,3	21,8
PE ₅₄	1,3	5,3	14,6	19,7	24,4	26,4	0
PE ₅₅	1,1	5,4	14,1	19,1	21,7	25,6	0
PE ₅₆	0,9	5,4	14,5	19,5	25,3	28,3	0
PE ₅₈	0,8	4,1	10,9	16,2	21,1	23,9	0
PE ₅₉	1,1	4,1	11,5	17,4	21,8	25,8	0
PE ₆₀	1,2	4,1	11,7	17,5	21,6	25,3	0
PE ₆₁	4,7	7,7	12,6	16,6	18,8	19,6	0
PE ₆₂	4,8	7,5	12,6	16,1	18,3	19,4	0
PE ₉₅	0,9	3,1	14,1	18,0	23,3	25,4	0
PE ₉₆	4,2	6,2	11,8	15,0	16,9	15,5	0
PE ₉₇	0,6	2,6	12,3	15,8	20,5	22,5	0
LSD *	1,7	1,7	2,8	2,7	3,4	4,2	2,7

* Mínima Diferença Significativa segundo o teste de Fisher ao nível de probabilidade de P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância das taxas de crescimento dos isolamentos mostrou diferenças significativas em função do isolamento, temperatura de crescimento e meio de cultura utilizado, assim como nas interações entre todas estas variáveis (Anexo IV: 1.). Verificou-se que a taxa de crescimento máxima diária foi significativamente maior em meio de cultura CA que em meio CMA (Anexo IV: 1.2.). No geral, os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ apresentaram taxas de crescimento significativamente maiores do que os restantes isolamentos (Anexo IV:1.3.) e, excluindo a temperatura 35°C, onde somente estes isolamentos cresceram, a taxa de crescimento máxima diária de todos os isolamentos aumentou com a temperatura (Anexo IV: 1.4.). As mesmas observações são válidas quando se analisa separadamente os dois meios de cultura (Anexo IV: 2.; 2.1.; 2.2.; 3.; 3.1.; 3.2.).

Devido à grande variabilidade manifestada, os dados não se ajustaram a uma única curva representativa do crescimento de todos os isolamentos ensaiados. Assim, depois de avaliar vários modelos para o ajuste dos dados elegeu-se a curva que melhor cumpria as condições de distribuição de resíduos, coeficientes de determinação (R^2) e significação de coeficientes de regressão (Anexo IV: 4.). A equação escolhida foi o polinómio de terceiro grau:

$$y = a t^3 + b t^2 + c t$$

em que y representa a taxa máxima de crescimento diário, t a temperatura de crescimento, a , b e c os coeficientes de regressão.

A partir deste polinómio calcularam-se as equações de crescimento para cada um dos isolamentos em cada meio de cultura, CMA e CA. Para os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ utilizaram-se os dados de todas as temperaturas estudadas, para os restantes 39 isolamentos, as equações de crescimento calcularam-se para temperaturas entre 5 e 30°C.

Uma vez conhecida a equação para cada isolamento, estimou-se a temperatura óptima e mínima de crescimento, mediante a derivação dos polinómios e a taxa máxima de crescimento diário.

Nas Tabelas 3.6 e 3.7 indicam-se para cada isolamento, assim como para os ajustes globais, a equação de regressão, os coeficientes de regressão, a temperatura óptima e mínima de crescimento e a taxa de máxima crescimento diário. O ajuste realizado não serve para o cálculo da temperatura máxima de crescimento dos isolamentos uma vez que, para os 39 isolamentos que não cresceram a 35°C, indica temperaturas máximas de crescimento acima deste valor.

Tabela 3.6 - Ajuste de regressão, temperatura óptima e taxa máxima de crescimento dos isolamentos de *Phytophthora spp.* em meio de cultura *Corn Meal Agar (CMA)*

Grupo	Isolamento	Ajuste	R ²	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C) ^a	Taxa máxima de crescimento (mm/dia) ^b
1	PA ₁	$y = -0,00246 t^3 + 0,10867 t^2 - 0,50084 t$	0,996	5,2	26,9	17,3
	PA ₃	$y = -0,00164 t^3 + 0,07837 t^2 - 0,15225 t$	0,994	2,0	30,8	21,7
	PA ₆	$y = -0,00246 t^3 + 0,10946 t^2 - 0,52076 t$	0,990	3,7	27,1	23,1
	PA ₇	$y = -0,00198 t^3 + 0,09604 t^2 - 0,32972 t$	0,997	3,7	30,5	23,1
	PA ₈	$y = -0,00154 t^3 + 0,07466 t^2 - 0,31650 t$	0,992	4,7	30,0	16,1
	PA ₁₁	$y = -0,0007592 t^3 + 0,03725 t^2 + 0,08443 t$	0,997	0	33,8	16,1
	PA ₁₂	$y = -0,00103 t^3 + 0,05187 t^2 - 0,11592 t$	0,984	2,3	32,4	15,7
	PA ₁₃	$y = -0,00137 t^3 + 0,06413 t^2 - 0,20087 t$	0,993	3,4	29,6	14,7
	PA ₁₄	$y = -0,00158 t^3 + 0,07202 t^2 - 0,26284 t$	0,996	4,0	28,4	14,4
	PA ₁₉	$y = -0,00242 t^3 + 0,10698 t^2 - 0,47066 t$	0,997	4,9	27,1	17,6
	PA ₂₀	$y = -0,00201 t^3 + 0,09250 t^2 - 0,35989 t$	0,994	4,3	28,5	18,3
	PA ₂₁	$y = -0,00152 t^3 + 0,07218 t^2 - 0,28230 t$	0,994	4,3	29,6	15,5
	PA ₄₃	$y = -0,00153 t^3 + 0,07022 t^2 - 0,25265 t$	0,994	3,9	28,7	14,4
	PA ₄₄	$y = -0,00141 t^3 + 0,06458 t^2 - 0,22523 t$	0,994	3,8	28,7	13,4
	PE ₈	$y = -0,00172 t^3 + 0,07660 t^2 - 0,23458 t$	0,995	3,3	28,1	15,7
	PE ₁₀	$y = -0,00154 t^3 + 0,07012 t^2 - 0,20208 t$	0,997	3,1	28,8	15,6
	PE ₁₁	$y = -0,00129 t^3 + 0,06231 t^2 - 0,13689 t$	0,991	2,3	31,1	17,2
	PE ₁₃	$y = -0,00162 t^3 + 0,07300 t^2 - 0,20744 t$	0,996	3,0	28,4	15,9
	PE ₅₄	$y = -0,00191 t^3 + 0,08473 t^2 - 0,32249 t$	0,995	4,2	28,7	15,5
	PE ₅₅	$y = -0,00159 t^3 + 0,07459 t^2 - 0,25961 t$	0,995	3,8	27,5	15,5
	PE ₅₆	$y = -0,00219 t^3 + 0,09507 t^2 - 0,41242 t$	0,994	4,9	29,4	16,4
	PE ₅₈	$y = -0,00154 t^3 + 0,07017 t^2 - 0,19214 t$	0,996	2,9	28,9	15,9
	PE ₅₉	$y = -0,00139 t^3 + 0,06456 t^2 - 0,16022 t$	0,996	2,6	29,7	15,8
	PE ₆₀	$y = -0,00146 t^3 + 0,06688 t^2 - 0,18454 t$	0,997	2,9	29,1	15,3
	PE ₆₁	$y = -0,0002749 t^3 - 0,00368 t^2 + 0,89324 t$	0,996	0	28,7	16,1
	PE ₆₂	$y = -0,0001028 t^3 - 0,00962 t^2 + 0,92432 t$	0,993	0	31,8	16,4
	PE ₉₅	$y = -0,00255 t^3 + 0,11049 t^2 - 0,44335 t$	0,995	4,8	26,7	18,4
	PE ₉₇	$y = -0,00136 t^3 + 0,06312 t^2 - 0,17272 t$	0,995	2,9	29,5	14,9
	Global 1^c	$y = -0,00158 t^3 + 0,07133 t^2 - 0,17918 t$	0,974	2,6	28,8	16,3
2	PA ₂₅	$y = -0,00306 t^3 + 0,12955 t^2 - 0,60291 t$	0,987	5,3	25,7	18,1
	PA ₃₀	$y = -0,00268 t^3 + 0,11759 t^2 - 0,53280 t$	0,991	5,1	26,8	18,6
	PA ₃₁	$y = -0,00258 t^3 + 0,11229 t^2 - 0,49970 t$	0,989	5,0	26,7	17,6
	PA ₃₂	$y = -0,00361 t^3 + 0,15313 t^2 - 0,87476 t$	0,991	6,8	25,1	17,4
	PA ₃₃	$y = -0,00282 t^3 + 0,12146 t^2 - 0,54152 t$	0,991	5,1	26,3	18,5
	PA ₃₅	$y = -0,00299 t^3 + 0,12489 t^2 - 0,51565 t$	0,987	4,6	25,6	18,5
	PA ₃₇	$y = -0,00287 t^3 + 0,12287 t^2 - 0,55708 t$	0,992	5,2	26,1	18,1
	PA ₄₀	$y = -0,00274 t^3 + 0,12439 t^2 - 0,70553 t$	0,992	6,6	27,1	17,7
	PA ₄₁	$y = -0,00320 t^3 + 0,13751 t^2 - 0,68712 t$	0,993	5,8	25,9	18,8
	PA ₄₂	$y = -0,00235 t^3 + 0,10650 t^2 - 0,40940 t$	0,994	4,2	28,1	20,4
	Global 2^d	$y = -0,00289 t^3 + 0,12502 t^2 - 0,59265 t$	0,987	5,4	26,2	18,3
3	PE ₁₂	$y = -0,00131 t^3 + 0,04668 t^2 + 0,62432 t$	0,989	0	29,1	25,4
	PE ₁₆	$y = -0,00123 t^3 + 0,04498 t^2 + 0,63747 t$	0,996	0	30,1	26,4
	PE ₅₂	$y = -0,00150 t^3 + 0,05465 t^2 + 0,65439 t$	0,996	0	29,3	28,4
	Global 3^e	$y = -0,00135 t^3 + 0,04877 t^2 + 0,63873 t$	0,992	0	29,4	26,6
	PE ₉₆	$y = -0,0008901 t^3 + 0,02257 t^2 + 0,56514 t$	0,995	0	25,3	14,3

^a As temperaturas óptimas foram estimadas a partir da derivada das equações de regressão ajustadas para cada meio e isolamento; ^b A taxa máxima de crescimento foi calculada substituindo t pela temperatura óptima estimada; ^c Ajuste geral para os 28 isolamentos do Grupo 1; ^d Ajuste geral para os 10 isolamentos do Grupo 2; ^e Ajuste geral para os três isolamentos do Grupo 3.

Tabela 3.7 - Ajuste de regressão, temperatura óptima e taxa máxima de crescimento dos isolamentos de *Phytophthora spp.* em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA)

Grupo	Isolamento	Ajuste	R ²	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C) ^a	Taxa máxima de crescimento (mm/dia) ^b
1	PA ₁	$y = -0,00273 t^3 + 0,12120 t^2 - 0,29404 t$	0,989	2,6	28,3	26,9
	PA ₃	$y = -0,00205 t^3 + 0,09122 t^2 - 0,00420 t$	0,993	0,0	29,6	26,6
	PA ₆	$y = -0,00245 t^3 + 0,10936 t^2 - 0,25831 t$	0,992	2,5	28,5	24,8
	PA ₇	$y = -0,00231 t^3 + 0,10347 t^2 - 0,08705 t$	0,993	0,9	29,4	28,2
	PA ₈	$y = -0,00205 t^3 + 0,09122 t^2 - 0,00420 t$	0,993	0,0	29,6	26,6
	PA ₁₁	$y = -0,00245 t^3 + 0,10936 t^2 - 0,25831 t$	0,992	2,5	28,5	24,8
	PA ₁₂	$y = -0,00205 t^3 + 0,09122 t^2 - 0,00420 t$	0,993	0,0	29,6	26,6
	PA ₁₃	$y = -0,00245 t^3 + 0,10936 t^2 - 0,25831 t$	0,992	2,5	28,5	24,8
	PA ₁₄	$y = -0,00205 t^3 + 0,09122 t^2 - 0,00420 t$	0,993	0,0	29,6	26,6
	PA ₁₉	$y = -0,00215 t^3 + 0,09883 t^2 - 0,04935 t$	0,995	0,5	30,4	29,4
	PA ₂₀	$y = -0,00183 t^3 + 0,08739 t^2 + 0,00735 t$	0,987	0	31,9	29,8
	PA ₂₁	$y = -0,00170 t^3 + 0,07986 t^2 - 0,05935 t$	0,995	0,8	30,9	24,3
	PA ₄₃	$y = -0,00248 t^3 + 0,12016 t^2 - 0,61321 t$	0,994	5,8	29,5	22,8
	PA ₄₄	$y = -0,00264 t^3 + 0,12256 t^2 - 0,61169 t$	0,992	5,7	28,2	21,0
	PE ₈	$y = -0,00200 t^3 + 0,09809 t^2 - 0,30136 t$	0,992	3,3	31,1	25,3
	PE ₁₀	$y = -0,00201 t^3 + 0,09569 t^2 - 0,25068 t$	0,991	2,8	30,4	24,3
	PE ₁₁	$y = -0,00156 t^3 + 0,07684 t^2 - 0,06252 t$	0,992	0,8	32,4	25,6
	PE ₁₃	$y = -0,00183 t^3 + 0,09043 t^2 - 0,23503 t$	0,988	2,8	31,6	25,1
	PE ₅₄	$y = -0,00249 t^3 + 0,11189 t^2 - 0,24175 t$	0,993	2,3	28,8	26,4
	PE ₅₅	$y = -0,00200 t^3 + 0,08989 t^2 - 0,06341 t$	0,991	0,7	29,6	25,0
	PE ₅₆	$y = -0,00229 t^3 + 0,10764 t^2 - 0,23340 t$	0,996	2,3	30,2	28,0
	PE ₅₈	$y = -0,00189 t^3 + 0,09213 t^2 - 0,27274 t$	0,987	3,2	30,9	23,8
	PE ₅₉	$y = -0,00182 t^3 + 0,09067 t^2 - 0,23115 t$	0,990	2,7	31,9	25,8
	PE ₆₀	$y = -0,00188 t^3 + 0,09152 t^2 - 0,22358 t$	0,992	2,8	31,2	25,0
	PE ₆₁	$y = -0,0007126 t^3 + 0,01951 t^2 + 0,71079 t$	0,990	0	29,5	19,7
	PE ₆₂	$y = -0,0005465 t^3 + 0,01277 t^2 + 0,75627 t$	0,989	0	30,6	19,4
	PE ₉₅	$y = -0,00268 t^3 + 0,12404 t^2 - 0,47489 t$	0,988	4,2	28,8	25,2
	PE ₉₇	$y = -0,00237 t^3 + 0,11080 t^2 - 0,44581 t$	0,991	4,4	29,0	22,5
	Global 1^c	$y = -0,00200 t^3 + 0,09296 t^2 - 0,15988 t$	0,980	1,8	30,1	24,9
2	PA ₂₅	$y = -0,00328 t^3 + 0,14332 t^2 - 0,62909 t$	0,990	5,0	26,7	22,9
	PA ₃₀	$y = -0,00298 t^3 + 0,13737 t^2 - 0,69417 t$	0,992	5,8	28,0	22,8
	PA ₃₁	$y = -0,00328 t^3 + 0,14672 t^2 - 0,66057 t$	0,994	5,1	27,4	24,6
	PA ₃₂	$y = -0,00456 t^3 + 0,19450 t^2 - 1,10880 t$	0,978	6,8	25,2	22,6
	PA ₃₃	$y = -0,00362 t^3 + 0,15789 t^2 - 0,78464 t$	0,997	5,7	26,3	22,7
	PA ₃₅	$y = -0,00333 t^3 + 0,14191 t^2 - 0,50211 t$	0,971	3,9	26,5	24,4
	PA ₃₇	$y = -0,00287 t^3 + 0,12935 t^2 - 0,52894 t$	0,988	4,5	27,8	23,6
	PA ₄₀	$y = -0,00365 t^3 + 0,16194 t^2 - 0,83744 t$	0,987	6,0	26,7	23,6
	PA ₄₁	$y = -0,00305 t^3 + 0,13568 t^2 - 0,54558 t$	0,985	4,5	27,4	24,2
	PA ₄₂	$y = -0,00309 t^3 + 0,13854 t^2 - 0,57684 t$	0,995	4,6	27,6	24,6
	Global 2^d	$y = -0,00337 t^3 + 0,14872 t^2 - 0,68682 t$	0,983	5,2	26,9	23,5
3	PE ₁₂	$y = -0,00173 t^3 + 0,07368 t^2 + 0,24659 t$	0,977	0	30,9	27,0
	PE ₁₆	$y = -0,00139 t^3 + 0,05057 t^2 + 0,53271 t$	0,992	0	28,7	24,1
	PE ₅₂	$y = -0,00166 t^3 + 0,06182 t^2 + 0,50900 t$	0,995	0	28,4	26,3
	Global 3^e	$y = -0,00159 t^3 + 0,06202 t^2 + 0,42944 t$	0,985	0	29,1	25,8
	PE ₉₆	$y = -0,00126 t^3 + 0,04024 t^2 + 0,44923 t$	0,987	0	25,9	16,7

^a As temperaturas óptimas foram estimadas a partir da derivada das equações de regressão ajustadas para cada meio e isolamento; ^b A taxa máxima de crescimento foi calculada substituindo t pela temperatura óptima estimada; ^c Ajuste geral para os 28 isolamentos do Grupo 1; ^d Ajuste geral para os 10 isolamentos do Grupo 2; ^e Ajuste geral para os três isolamentos do Grupo 3.

Obtiveram-se três grupos de isolamentos com padrões de crescimento diferentes:

Grupo 1 - Inclui 28 isolamentos com uma temperatura mínima de crescimento de 2,6°C e ótima de 28,8°C e uma taxa de crescimento máximo de 16,3 mm/dia em meio CMA e temperatura mínima de crescimento de 1,8°C e ótima de 30,1°C e uma taxa de crescimento máximo de 24,9 mm/dia em meio CA, correspondendo a isolamentos com temperaturas ótimas de crescimento altas, que não crescem a 35°C e temperaturas mínimas baixas;

Grupo 2 - Compreende 10 isolamentos com uma temperatura ótima de crescimento estimada de 26,2°C em meio CMA e de 26,9°C em meio CA, uma temperatura mínima de crescimento de 5,4°C em meio CMA e de 5,2°C em meio CA e uma taxa de crescimento máximo de 18,3 mm/dia em CMA e 23,5 mm/dia em meio CA. Este segundo padrão de crescimento corresponde a isolamentos que também não crescem a 35°C têm temperaturas mínimas de crescimento altas, temperaturas ótimas de crescimento similares nos dois meios de cultura mas mais baixas que no crescimento Grupo 1;

Grupo 3 - Distingue-se dos restantes por corresponder aos isolamentos que crescem a 35°C (PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂). Tem uma temperatura ótima de crescimento estimada de 29,4°C em meio CMA e de 29,1°C em meio CA, uma temperatura mínima de crescimento de 0°C nos dois meios de cultura e uma taxa de crescimento máximo de 26,6 mm/dia em CMA e 25,8 mm/dia em meio CA. Estes isolamentos correspondem ao tipo morfológico B referido em 3.3.1. e são os únicos que têm taxa de máxima de crescimento diária maior no meio de cultura CMA.

O isolamento PE₉₆ não se incluiu em nenhum dos padrões de crescimento por apresentar valores que não se ajustaram bem a nenhum padrão, apresentando taxas de crescimento mais baixas do que as dos restantes isolamentos.

A partir dos polinómios construíram-se curvas de crescimento para os 28 isolamentos do padrão de crescimento do Grupo 1, para os 10 isolamentos do padrão de crescimento do Grupo 2 e para os três isolamentos do padrão de crescimento do Grupo 3, nos dois meios de cultura, CMA e CA (Figura 3.6). Os ajustes das curvas, parâmetros e equações globais aparecem no Anexo IV: 5.; 6.

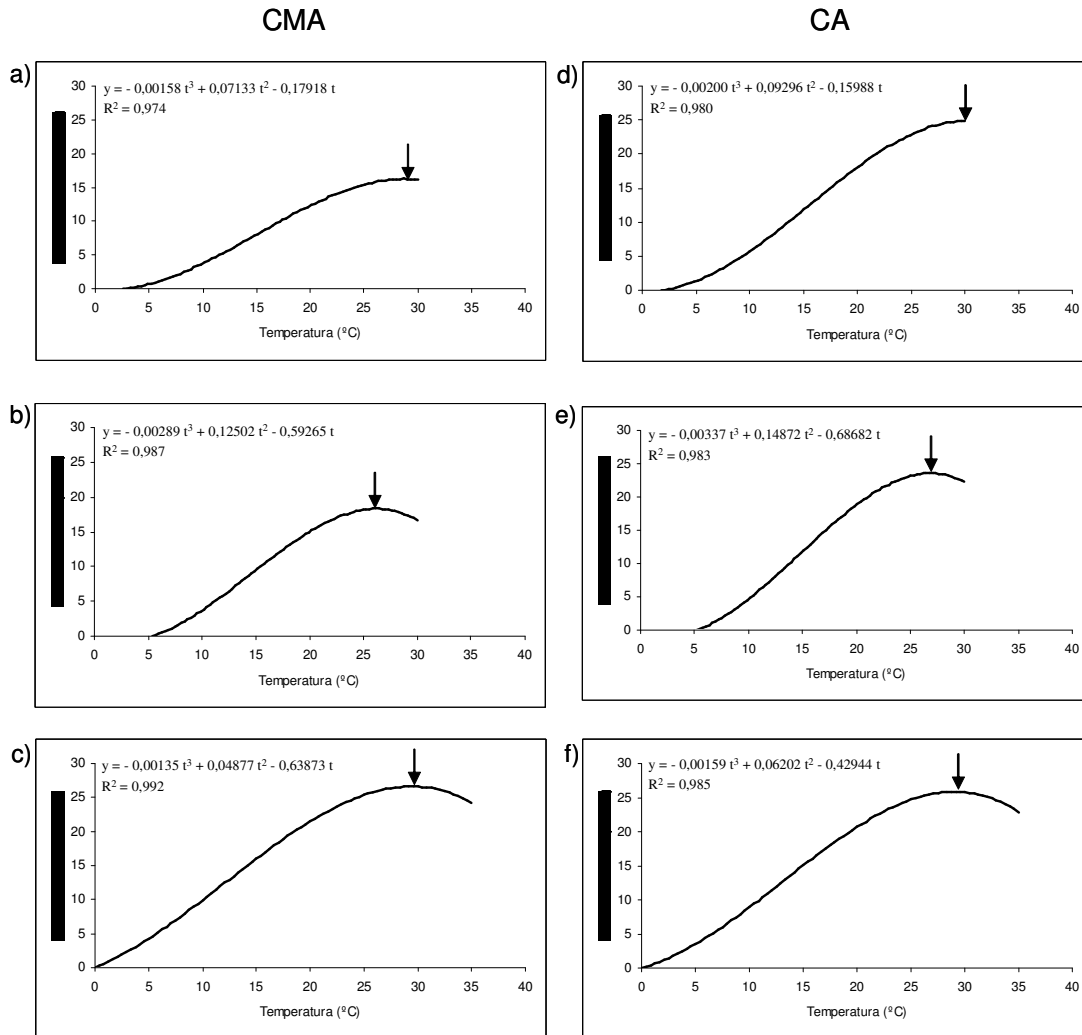


Figura 3.6 - Curvas de crescimento dos isolamentos nos meios de cultura CMA e CA.

a) e d) Curvas de crescimento de 28 isolamentos (Grupo 1); b) e e) Curvas de crescimento de 10 isolamentos (Grupo 2); c) e f) Curvas de crescimento dos isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ (Grupo 3). As setas indicam a temperatura óptima estimada: a) 28,8°C; b) 26,2°C; c) 29,4°C; d) 30,1°C; e) 26,9°C e f) 29,1°C.

3.3.6. Identificação dos isolamentos

Todos os isolamentos estudados produziram em meio líquido de extracto de solo esporângios não papilados, persistentes e em posição terminal no esporangióforo. Os isolamentos em que se conseguiram observar as estruturas sexuadas resultaram ser heterotáticos do *mating type* A2 com oósporos pleróticos e anterídios anfigíneos. Com estas características todos os isolamentos estão incluídos no Grupo VI de Waterhouse (1963).

As características observadas nos isolamentos em meio de cultura CA do Grupo 1, do Grupo 2 e no isolamento PE₉₆ foram: morfologia da colônia a 20°C de tipo petalado, com micélio aéreo esbranquiçado, muito abundante e cotonoso, formação de dilatações nas hifas (*hyphal swellings*) em meio sólido, de forma esférica, intercalares ou terminais e em racimos correspondendo às morfologias A e C (3.3.1.), esporângios de forma ovóide-elipsóide, oogónios esféricos, de parede lisa com oósporo plerótico e anterídio anfigíneo, com temperaturas ótimas de crescimento acima de 25°C, não crescendo a 35°C. Estas características correspondem às descritas por Stamps *et al.* (1990) e por Erwin e Ribeiro (1996) para a espécie *P. cinnamomi* Rands.

As características exibidas pelos isolamentos do Grupo 3 (PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂) foram: morfologia da colônia em meio de cultura CA do tipo crisântemo com micélio aéreo esbranquiçado, levemente cotonoso, não muito abundante, correspondendo à morfologia B (3.3.1.), esporângios elipsóides e com forma de limão, dilatações nas hifas, só observadas em meio líquido, agrupadas em racimos, e com uma temperatura ótima de crescimento estimada maior que 29°C, com crescimento a 35°C. Estas características ajustam-se melhor às descritas pelos autores, anteriormente referidos, para a espécie *P. drechsleri* Tucker.

3.4. DISCUSSÃO

Dos isolamentos obtidos de raízes e solo da rizosfera de sobreiros e azinheiras de Portugal e Espanha, os grupos morfológicos identificados como *P. cinnamomi* foram os que se isolaram maioritariamente. Na zona de Huelva em Espanha, além de *P. cinnamomi* foi isolado de amostras de raiz e solo *P. drechsleri*. Esta espécie já tinha sido isolada do solo da rizosfera de azinheiras (Sánchez *et al.* 2002b; Caetano *et al.* 2004) e de raiz de azinheiras afectadas com declínio em Huelva (Caetano *et al.* 2004).

As características morfológicas do micélio permitiram distinguir três grupos de isolamentos que foram equivalentes nos dois meios de cultura estudados. Em relação à forma do micélio também se puderam observar diferenças que pareciam, de uma forma geral, estar associadas ao hospedeiro. Estas diferenças também foram referidas por Sánchez *et al.* (2000a; 2003b) e estavam igualmente associadas ao hospedeiro. As variações morfológicas desta espécie não são devidas à recombinação inerente à reprodução sexuada uma vez que é uma espécie heterotálica e o *mating type* A1 não existe na Europa (Erwin e Ribeiro 1996). No entanto estas variações morfológicas que evidenciam a existência de diferentes grupos não correspondem a diferenças patogénicas (ver Capítulo 5). O grupo de isolamentos identificados como *P. drechsleri* não apresentava dilatações das hifas.

A morfologia dos esporângios dos isolamentos estudados coincide com a descrita por Erwin e Ribeiro (1996) para ambas as espécies identificadas. Destaca-se uma muito elevada percentagem de esporângios com ápice truncado. Esta característica foi observada em outros isolamentos, de *P. cinnamomi* procedentes de *Quercus* da zona de Andaluzia (Sánchez *et al.* 2002b; 2005) e de Portugal (Moreira-Marcelino 2001), isolamentos de *P. drechsleri* procedentes de *Pinus halepensis* (Sánchez *et al.* 2002a), isolamentos de *P. megasperma* procedentes de oliveira (Sánchez *et al.* 2001) e de grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) (Rodríguez-Tello 1994) e isolamentos de *P. cryptogea* procedentes de azinheira (Sánchez *et al.* 2005).

As dimensões dos esporângios observadas neste estudo estão dentro da gama indicada para *P. cinnamomi* por Haasis *et al.* (1964); Domsch *et al.* (1980) e Erwin e Ribeiro (1996) e das medidas observadas em isolamentos provenientes de *Quercus* de Andaluzia (Sánchez *et al.* 2003b) e de Portugal (Moreira-Marcelino 2001). No entanto, são ligeiramente superiores às encontradas por Sánchez *et al.* (2005) para isolamentos de *P. cinnamomi* provenientes de plantas de azinheiras de viveiros florestais andaluzes. Nos isolamentos em que foi possível medir o tamanho do poro, este apresenta dimensões muito maiores que as indicadas por Stamps *et al.* (1990).

O único isolamento identificado como *P. drechsleri* em que foi possível medir as dimensões dos esporângios, apresentou valores mais pequenos que os observados para *P. cinnamomi*. Estes valores foram também menores do que os encontrados por Sánchez *et al.* (2005), no entanto, foram semelhantes aos valores mais baixos indicados por Erwin e Ribeiro (1996) para a espécie *P. drechsleri*.

Embora se tenham observado clamidósporos em praticamente todos os isolamentos, estes foram especialmente abundantes em meio de cultura sólido nos isolamentos que foram identificados como *P. drechsleri*. Os resultados mostraram clamidósporos de dimensões superiores às descritas por Erwin e Ribeiro (1996) para esta espécie.

Somente foi possível medir as dimensões das estruturas de reprodução sexuada em alguns isolamentos identificados como *P. cinnamomi*. As medidas encontradas para o diâmetro do oósporo e comprimento do anterídio estão dentro dos valores indicados por Erwin e Ribeiro (1996) e dos encontrados por Sánchez *et al.* (2005). Neste estudo o diâmetro do oósporo foi superior ao observado por López-Herrera e Pérez-Jiménez (1995) em isolamentos provenientes de abacateiro, no entanto o comprimento do anterídio foi menor. A espessura da parede do oósporo também foi semelhante à encontrada por Sánchez *et al.* (2005) para os isolamentos de *P. cinnamomi*, contudo, foi bastante superior à indicada por Domsch *et al.* (1980) para esta espécie.

Os isolamentos identificados como *P. cinnamomi* apresentam dois padrões de crescimento distintos: um com temperaturas mínimas baixas (próximo de 2°C) e temperaturas óptimas altas

(30,1°C) (Grupo 1); outro com temperaturas mínimas mais altas (acima de 5°C) e temperaturas óptimas mais baixas (26,9°C) em meio CA (Grupo 2). As temperaturas mínimas encontradas neste estudo foram mais baixas que as referidas por Sánchez *et al.* (2003b) para isolamentos de *P. cinnamomi* provenientes de sobreiros e azinheiras da zona de Andaluzia e isolamentos provenientes de plantas de azinheira de viveiro (Sánchez *et al.* 2005).

A temperatura óptima de crescimento (30,1°C) do padrão Grupo 1 é mais alta que a indicada por Erwin e Ribeiro (1996) para esta espécie, mas está dentro dos valores indicados por Domsch *et al.* (1980) e Zentmyer (1980). Além disso, esta temperatura favorece a invasão dos tecidos por *P. cinnamomi* (Shearer e Tippet 1989). Valores igualmente altos de temperatura óptima de crescimento para esta espécie foram referidos por Sánchez *et al.* (2002b) para isolamentos procedentes de azinheiras da zona de Huelva. A temperatura óptima de crescimento do padrão Grupo 2, embora relativamente alta, aproxima-se mais à encontrada por Sánchez *et al.* (2003b) para isolamentos de *P. cinnamomi* provenientes de sobreiros e azinheiras da zona de Andaluzia e isolamentos procedentes de plantas de azinheira de viveiro (Sánchez *et al.* 2005).

O isolamento PE₉₆ apresentou um padrão distinto de crescimento, com temperaturas mínima e óptima de crescimento mais baixas além de uma taxa de crescimento máxima diária menor do que a dos restantes isolamentos.

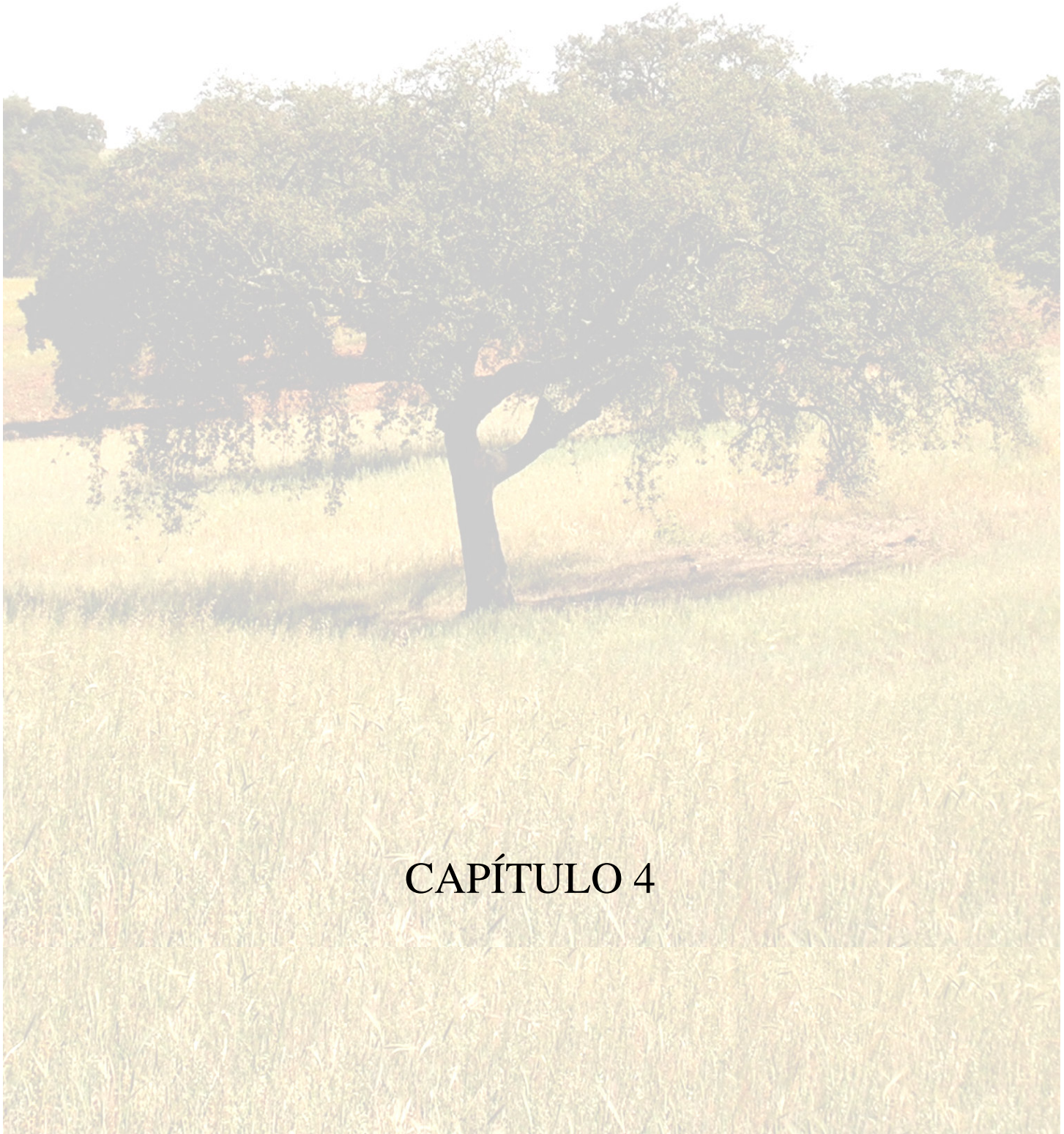
Os isolamentos dos padrões de crescimento do Grupo 1 e Grupo 2 apresentam taxas de crescimento máximo diário elevadas, embora os isolamentos com temperatura óptima mais baixa mostrem taxas máximas de crescimento diário ligeiramente mais baixas. Isolamentos provenientes de Austrália mostraram taxas de crescimentos muito mais baixas a 25°C (Shepherd e Pratt 1974), que os encontrados neste estudo, inclusivé para o isolamento PE₉₆.

Este estudo indica uma grande diversidade fisiológica dos isolamentos de *P. cinnamomi* e sugere uma adaptação do patogénio às condições climáticas predominantes na região. De facto, os isolamentos incluídos no padrão de crescimento Grupo 1, com elevadas temperaturas óptimas de crescimento e mínimas baixas, são provenientes da zona Sul de Portugal e do Oeste da Andaluzia; os isolamentos incluídos no padrão de crescimento do Grupo 2, com temperaturas menos elevadas de crescimento óptimo e mínimas mais altas, procedem da zona Centro de Portugal e do Sul de Andaluzia.

A formação destes grupos foi também sugerida pelo estudo dos isolamentos por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (dados não mostrados). Efectivamente, os resultados da análise molecular detectaram duas populações de *P. cinnamomi* que afectam os *Quercus spp.* na Península Ibérica: uma, constituída pelos isolamentos do Sul de Portugal e Sudoeste de Espanha, que correspondem aos do Grupo 1 anteriormente referido; a outra, pelos isolamentos da parte Oriental

desta área geográfica, ou seja, onde se incluem os do Grupo 2 definido pelo comportamento dos isolamentos em cultura (Caetano 2006).

Os isolamentos identificados como *P. drechsleri* cresceram a todas as temperaturas estudadas, ao contrário dos isolamentos identificados como *P. cinnamomi* que não cresceram a 35°C. Isto está de acordo com os valores indicados por Erwin e Ribeiro (1996) para estas espécies. Estes isolamentos apresentam curvas de crescimento bastante parecidas entre si, com temperaturas ótimas de crescimento superiores a 29°C. Este valor está dentro do intervalo indicado para esta espécie por Erwin e Ribeiro (1996), embora seja mais elevado do que o valor observado para isolamentos de *P. drechsleri* provenientes de plantas de azinheira de viveiro (Sánchez *et al.* 2005). Os valores de temperatura mínima de crescimento encontrados neste estudo são mais baixos que os encontrados por Sánchez *et al.* (2005) para isolamentos procedentes de viveiro, sugerindo também uma adaptação dos isolamentos às condições de campo, diferentes das condições de viveiro.



CAPÍTULO 4

CAPITULO 4

PATOGENICIDADE DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

4.1. INTRODUÇÃO

De entre os factores mais importantes a considerar em estudos de patogenicidade, referem-se a natureza e quantidade de inóculo.

No caso das doenças radiculares o conceito de inóculo potencial é de importância fundamental quando se pretende induzir experimentalmente a doença no hospedeiro. Garrett, na década de 60 do século XX, definiu este conceito como a energia mínima que o patógeno necessita para vencer a resistência do hospedeiro (Garrett 1970; Ferraz 1990).

No caso concreto de experiências em condições controladas, o inóculo deve ser o mais parecido com o que ocorre na natureza (Hüberli *et al.* 2002). Para tal, será necessário escolher um meio minimamente rico em nutrientes para que o patógeno obtenha a energia necessária para causar infecção.

Lopes-Pimentel (1945, 1946, 1947), que havia isolado pela primeira vez em Portugal *P. cinnamomi* a partir de *Castanea sativa*, *Q. suber*, *Q. robur*, *Juglans regia* e *Betula alba*, não conseguiu reproduzir a doença em *Q. suber* e *J. regia* que cresciam em solo artificialmente infestado. Também Moniz *et al.* (1996) não lograram provar a patogenicidade de *P. cinnamomi* em sobreiros. O insucesso destes autores em conseguir a infecção por *P. cinnamomi* foi possivelmente devido ao tipo de inóculo utilizado não ser o mais adequado ou a quantidade de inóculo não ter sido suficiente.

O meio usado por estes autores para a preparação foi gelose de extracto de batata que é constituído por um elevado teor de hidratos de carbono. Este extracto colonizado por *P. cinnamomi*, quando incorporado no solo, é rapidamente invadido por microrganismos com elevada capacidade de competição saprofítica, que inibem a actividade patogénica do fungo.

A quantidade de inóculo é outro dos factores importantes a considerar em estudos de patogenicidade. Esta quantidade não deve ser tão pequena que não seja capaz de induzir doença, nem tão grande que iniba ou mascare a resistência do hospedeiro (McIntyre e Taylor 1976; Eye *et al.* 1978; Bowers e Mitchell 1991). Vários autores referem que devem ser ensaiadas diferentes

concentrações de inóculo para uma melhor caracterização da relação entre a densidade de inóculo e a infecção da raiz (McIntyre e Taylor 1976; Fraedrich *et al.* 1989; Milholland *et al.* 1989). Além disso, deve-se procurar que as condições em que decorrem as experiências se aproximem o mais possível das condições de campo.

Trabalhos realizados por Rodríguez-Molina *et al.* (2002, 2005) revelam a importância que este factor desempenha na dinâmica da doença. Estes autores verificaram que em solos infestados com *P. cinnamomi*, na zona da Estremadura em Espanha, as sementes de azinheiras não conseguiram germinar ou morreram ao fim de poucos dias e as de sobreiro, embora tenham germinado, deram origem a plântulas que na sua grande maioria morreram, o que denota a presença no solo de uma elevada quantidade de inóculo.

A população de *P. cinnamomi* é essencialmente constituída por clamidósporos e oósporos, estruturas de repouso que sobrevivem no solo durante períodos mais ou menos longos. Quando estas estruturas são estimuladas pela proximidade de raízes de um hospedeiro, germinam e dão origem às primeiras infecções. Uma vez estas infecções terem tido lugar, sucessivas gerações de zoósporos se formam. A probabilidade de raízes jovens entrarem em contacto com estes esporos aumenta, possibilitando a ocorrência de múltiplas infecções secundárias. Estas infecções dão, por sua vez, origem a novas gerações de zoósporos e assim sucessivamente.

A flutuação da população de um patogénio está muito dependente das condições locais, ambientais e da presença de hospedeiros susceptíveis (Hansen 1999).

Na Austrália existem zonas infestadas com *P. cinnamomi* onde todas as plantas de regeneração natural de *Eucalyptus obliqua* morrem (Kennedy e Weste 1986) mas há locais menos favoráveis à doença, onde apenas se verifica uma redução no desenvolvimento das plantas desta espécie (Marks e Tippett 1978; Weste 1980). Noutros locais, antes altamente infestados, verifica-se mesmo uma regeneração de hospedeiros susceptíveis (Shearer e Dillon 1996), indicando uma redução da quantidade de inóculo ou da sua capacidade infecciosa. Também há que considerar, a actividade da flora microbiana do solo que interactua com *P. cinnamomi* e as características dos solos que podem promover ou suprimir a sua actividade e consequentemente a severidade da doença (Weste e Marks 1987).

Além da natureza e quantidade de inóculo, o substrato é, em doenças com origem no solo, um importante factor a considerar, visto que determina directamente a interacção entre o patogénio e as raízes do hospedeiro. Por este facto, diferentes tipos de substrato foram testados para determinar qual o mais favorável à manifestação da doença causada por *P. cinnamomi*.

Recentemente, vários autores conseguiram demonstrar a patogenicidade de *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras, em condições controladas (Moreira *et al.* 1997; Sánchez *et al.* 2000a, 2002b, 2005) e de campo (Tuset *et al.* 1996).

Neste capítulo prosseguem-se estes estudos de patogenicidade procurando reproduzir, em condições controladas, os sintomas da doença do declínio em plantas jovens de sobreiro e azinheira. Assim, os objectivos foram: a) escolher um método de infestação expedito capaz de induzir sintomas da doença; b) apreciar a sensibilidade de diferentes métodos de avaliação da severidade de sintomas; c) determinar a patogenicidade de isolamentos de *Phytophthora* spp. pertencentes a grupos morfológicos diferentes; d) avaliar a influência do tipo de substrato na infecção; e) estudar a influência da concentração de inóculo na severidade de sintomas.

4.2. EXPERIÊNCIAS SOBRE PATOGENICIDADE

4.2.1. Efeito do método de infestação em *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* (Experiência 4.A)

Para estudar o melhor método de infestação de plantas realizou-se uma experiência em que se utilizou um isolamento procedente de sobreiro (PA₁₂) e um isolamento procedente de azinheira (PE₂₅) para infestar plantas de sobreiro e azinheira de 12-18 meses de idade provenientes de um viveiro comercial. Nesta experiência foram utilizados os isolamentos PA₁₂ e PE₂₅ escolhidos aleatoriamente entre os isolamentos de *P. cinnamomi* pertencentes à colecção micológica do Departamento de Agronomia da ETSIAM - Universidade de Córdoba, referida no Capítulo 2 em 2.2.3.

Os isolamentos utilizados nesta e nas experiências seguintes foram sistematicamente inoculados em maçã e a seguir reisolados, para recuperar a patogenicidade eventualmente perdida, durante a sua conservação no frio em tubos com meio de cultura e cobertos com parafina. Para cada isolamento utilizou-se uma maçã da variedade *Granny Smith* em estado inicial de maturação e com a superfície intacta, na qual se faziam três incisões em locais equidistantes. Em cada incisão introduziu-se um disco de agar com micélio do fungo e selava-se com parafilme de modo a evitar a perda de humidade. As maçãs incubaram-se a 22-23°C durante aproximadamente 5-6 dias, ao fim dos quais se podiam ver, à volta das incisões, necroses típicas, com textura firme. Da zona de transição entre as necroses e o tecido são, retiraram-se pequenas fracções da polpa do fruto que se colocaram em placas de Petri com meio selectivo PARPH. Das colónias que se desenvolveram neste meio, transferiam-se pequenas porções de micélio para placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de cultura CA que se incubaram durante 5 dias no escuro a 22°C. Foi a partir das colónias assim obtidas que se preparou o inóculo para infestar as plantas.

Avaliaram-se dois tipos de inóculo: em meio sólido VAV8 (Vermiculite-grãos de aveia-sumoV8) (Wilcox e Mircetich 1985) modificado, e em suspensão aquosa (Dhingra e Sinclair 1995).

4.2.1.1. Infestação com inóculo sólido

Preparação do inóculo

O meio sólido utilizado foi o VAV8 modificado, substituindo o sumo de vegetais V8 por extracto de cenoura. Para cada isolamento a ensaiar preparou-se um balão Erlenmeyer com 400 ml de vermiculite lavada e 32 ml de grãos de aveia que foram demolhados durante 2 h. Os balões esterilizaram-se em autoclave a 1 kp/cm² durante 20 min.

Posteriormente preparou-se outro balão Erlenmeyer com 1 l de extracto de cenoura (CA) seguindo o procedimento descrito em 2.2.3. até à primeira esterilização. Depois de passar uma noite no escuro, adicionou-se o extracto de cenoura aos balões com vermiculite-aveia à razão de 240 ml por balão. De seguida esterilizaram-se os balões 0,7 kp/cm² em autoclave durante 15 min. Uma vez arrefecidos, procedeu-se à inoculação, adicionando separadamente a cada balão, metade do conteúdo de uma placa de Petri de 9 mm, em que cresceu o isolamento correspondente.

Os balões incubaram-se no escuro a 22°C durante 30 dias e agitaram-se manualmente cada 3-4 dias.

Infestação do substrato

O substrato utilizado consistiu numa mistura de areia, limo e turfa (1:1:1 em volume) (Trapero e Jiménez 1985), complementada com super fosfato (4,2 g/l), nitrato de potássio (458 ppm), carbonato de cálcio (250 ppm), sulfato de magnésio (250 ppm) e carbonato de magnésio (150 ppm). Uma vez transcorrido o tempo de incubação, o conteúdo dos balões correspondente a cada isolamento misturou-se com o substrato à razão de 35 ml de inóculo por litro. A mistura realizou-se manualmente num tabuleiro previamente desinfestado com uma solução de lixívia comercial (50g de cloro activo/l) a 10%.

As plantas, adquiridas num viveiro comercial, foram transferidas dos tabuleiros com alvéolos onde se encontravam, para vasos de plástico com as dimensões de 13 x 13 x 19 cm (aproximadamente 3 l de volume), contendo o substrato infestado. Estes vasos foram previamente desinfestados por imersão numa solução comercial de lixívia a 10%. Para as plantas testemunhas procedeu-se da mesma forma, excepto que se utilizou o mesmo substrato não infestado. Todas as plantas eram regadas imediatamente a seguir à transplantação.

Prepararam-se 6 vasos com substrato infestado por espécie e isolamento e o mesmo número dos correspondentes vasos para as testemunhas.

4.2.1.2. Infestação com inóculo em suspensão aquosa

Preparação do inóculo

Para a preparação da suspensão aquosa de *P. cinnamomi* transferiram-se discos de agar de culturas puras, de cada um dos isolamentos, para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com 20 ml de meio de extracto líquido de cenoura. Para a preparação deste meio seguiram-se as indicações descritas no ponto 2.2.3. na preparação do extracto de cenoura-agar (CA) mas neste caso não se adicionou agar para que o meio resultasse líquido. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 22°C no escuro durante 30 dias. Decorrido este período, o micélio tinha crescido e ocupava toda a área da placa de Petri. Através da observação das placas de Petri ao microscópio invertido e da realização de preparações microscópicas de micélio corado com fucsina ácida em lactoglicerol (0,01%), comprovou-se a presença de grande número de clamidósporos.

O micélio separou-se do meio nutritivo por filtração e lavou-se abundantemente com água desionizada. Seguidamente foi suspenso em água desionizada e triturado num liquidificador eléctrico durante 3 min de forma a obter-se uma suspensão aquosa de micélio e clamidósporos numa proporção de 3 placas de Petri /100 ml de água.

Infestação das plantas

A infestação das plantas, provenientes do mesmo viveiro e com a mesma idade que as anteriores, realizou-se aplicando directamente sobre o torrão, constituído pela terra e raízes de cada uma das plantas, 100 ml de inóculo, de forma a que todo o conjunto ficasse embebido com a suspensão aquosa de micélio. A transplantação das plantas para vasos, previamente lavados com lixívia a 10%, realizou-se conforme o indicado por Moreira *et al.* (1997). Assim, no fundo de cada vaso (13 x 13 x 25,5 cm) colocou-se uma pequena quantidade do substrato referido em 4.2.1.1. formando uma camada de aproximadamente 2 cm de altura. Sobre essa camada, colocou-se na zona central do vaso, um tubo de plástico, com cerca de 10 cm de diâmetro e 25 cm de altura. O espaço compreendido entre as paredes interior do vaso e exterior do cilindro foi preenchido com o substrato. No interior do cilindro colocou-se uma planta com o respectivo torrão intacto, que foi então impregnado com 100 ml da suspensão aquosa de inóculo. Desta forma, toda a quantidade de inóculo ficou contida na zona central do vaso. Finalmente, encheu-se todo o espaço restante no interior do cilindro com substrato, de modo a cobrir completamente o torrão. Seguidamente retirou-se o tubo com cuidado, de forma a causar a mínima perturbação.

As plantas testemunhas foram tratadas da mesma forma que as plantas infestadas, excepto que os torrões foram embebidos com 100 ml de água desionizada. Todas as plantas foram regadas de imediato a seguir à transplantação.

4.2.1.3. Condições de desenvolvimento da experiência

Tanto os vasos com substrato infestado com inóculo em meio sólido, como os vasos com plantas infestadas com a suspensão aquosa, colocaram-se em tabuleiros (80 x 50 x 20 cm), previamente lavados com lixívia a 10%. Em cada tabuleiro só se colocaram vasos com a mesma espécie de planta, o mesmo isolamento e o mesmo tipo de inóculo, para evitar contaminações cruzadas. As plantas testemunhas colocaram-se em tabuleiros separados.

Todas as plantas foram mantidas numa câmara de crescimento com 14 h/dia de luz, 19-24°C de temperatura e 49-87% de humidade relativa, onde se regaram e pulverizaram com água durante a primeira semana para se restabelecerem da transplantação.

Após este período, os vasos nos tabuleiros foram parcialmente inundados, de forma que o nível da água se situasse 2-3 cm abaixo da superfície do substrato nos vasos. Os vasos mantiveram-se nestas condições durante toda a experiência. O nível da água nos tabuleiros foi mantido adicionando periodicamente a água perdida por evapotranspiração (Sánchez *et al.* 2002b).

A experiência deu-se por concluída 4 semanas após a inundação dos vasos, tempo necessário para que as plantas infestadas apresentassem sintomas de doença na parte aérea. Nessa altura, retiraram-se as plantas dos vasos e lavaram-se cuidadosamente com água corrente para remoção de toda a terra das raízes.

4.2.1.4. Avaliação da severidade de sintomas

Uma vez terminada a experiência, procedeu-se à avaliação visual da severidade dos sintomas, tanto na parte aérea como na raiz. Esta avaliação realizou-se segundo uma escala de 0-4 valores, previamente utilizada em trabalhos com grão-de-bico (Trapero e Jiménez 1985; Trapero *et al.* 1990) e oliveiras (Sánchez *et al.* 1998a). A descrição da escala indica-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Escala para avaliação da severidade de sintomas nas plantas

VALOR DA SEVERIDADE	PROPORÇÃO DA PLANTA AFECTADA (parte aérea ou radicular)
0	0 % (plantas sem sintomas)
1	1-33%
2	34-66%
3	67-99%
4	100% (parte aérea ou raiz morta)

Também se utilizaram valores intermédios em função da gravidade dos sintomas: 0.3 = leve, 0.5 = moderado, 0.7 = grave.

4.2.1.5. Reisolamento do patogénio a partir de raízes

No final da experiência, depois de realizar a avaliação dos sintomas, fizeram-se tentativas de reisolamento de *P. cinnamomi* a partir das raízes, para verificar se estavam ou não infectadas. Para isso, recolheram-se amostras de raízes de todas as plantas de cada tratamento e das plantas testemunhas. Para o processamento das amostras em laboratório seguiu-se o processo descrito em 2.2.3. Utilizaram-se seis placas de Petri com meio selectivo PARPH por cada tratamento, incluindo as plantas testemunha (seis segmentos de raiz/placa de Petri). Ao fim de 3-4 dias procedeu-se à quantificação das colónias desenvolvidas e sua identificação.

4.2.1.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental consistiu em seis repetições por espécie de planta, isolamento utilizado e tipo de inóculo. A unidade experimental foi o vaso com uma planta.

Aos valores da severidade de sintomas na parte aérea e radicular, aplicou-se a análise global de variância utilizando o programa *Statistix* (Analytical Software 2000). Os valores médios de severidade de sintomas nos diferentes tratamentos compararam-se entre si e com as testemunhas mediante o teste LSD (mínima diferença significativa) de Fisher para $P = 0,05$ (Steel e Torrie 1985). Também se realizaram, para cada espécie de planta, análises individuais da variância e comparação dos valores médios para cada tratamento.

4.2.1.7. Resultados

Na Figura 4.1 apresenta-se o aspecto geral das plantas no final da experiência. Os sintomas foliares observados nas infestações artificiais consistiram em clorose e murchidão das folhas, redução do crescimento da planta e desfoliação. O sistema radicular apresentou-se com escassas raízes absorventes e necroses mais ou menos extensas nas raízes que ainda permaneciam unidas à raiz principal. Em nenhum caso se observou esta sintomatologia nas plantas testemunhas.



Figura 4.1 - Sintomas na parte aérea e radicular em plantas de sobreiro e azinheira infectadas com *Phytophthora cinnamomi*: sobreiros (a) e azinheiras (b) submetidos a enchafamento contínuo; pormenor de sobreiros (c) e azinheiras (d) dentro dos vasos (à esquerda plantas testemunha, à direita plantas infestadas); sobreiros (e) e azinheiras (f) com sistema radicular visível (da esquerda para a direita: planta testemunha, infestada com inóculo sólido e infestada com inóculo líquido).

Os valores médios da severidade de sintomas na parte aérea e radicular, correspondentes às diferentes espécies de plantas, isolamentos e métodos de infestação ensaiados, assim como, a comparação de médias, indicam-se na Tabela 4.2. As análises de variância e as comparações de médias correspondentes a este ensaio apresentam-se no Anexo V: A.

Tabela 4.2 - Efeito do método de infestação na patogenicidade de isolamentos de *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro e azinheira

Planta	Isolamento	Inóculo	Severidade média de sintomas ¹	
			Parte aérea	Parte radicular
Sobreiro	PA ₁₂	Líquido	4,0 a	4,0 a
		Sólido	3,9 a	4,0 a
	PE ₂₅	Líquido	3,8 a	3,3 bc
		Sólido	2,2 bc	2,7 cd
	Test. ²	—	3,0 ab	2,2 d
Azinheira	PA ₁₂	Líquido	4,0 a	3,8 ab
		Sólido	1,7 cd	3,3 abc
	PE ₂₅	Líquido	3,8 a	3,5 ab
		Sólido	3,0 ab	3,8 ab
	Test. ²	—	1,2 d	1,3 e

^a A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

Pela análise global da variância verificou-se que as plantas infestadas apresentaram uma severidade de sintomas nas raízes claramente superior às testemunhas, o que mostra o elevado carácter patogénico de ambos os isolamentos. O isolamento PA₁₂ induziu uma severidade de sintomas significativamente superior à causada pelo isolamento PE₂₅.

Relativamente aos métodos de infestação os resultados mostram que não há diferenças significativas entre a severidade de sintomas manifestados pelos sistemas radiculares de sobreiros e azinheiras infestados com os dois métodos.

Quanto à análise global de variância para a avaliação da severidade de sintomas na parte aérea, verificou-se igualmente que as plantas infestadas encontravam-se mais afectadas do que as testemunhas, não existindo no entanto, diferenças entre os dois isolamentos utilizados. Neste caso, as plantas infestadas com inóculo em suspensão aquosa apresentaram maior severidade de sintomas na parte aérea, ainda que os sistemas radiculares das plantas infestadas com ambos os métodos se encontrassem igualmente muito afectados. Para este resultado terá eventualmente contribuído a maior velocidade de destruição de raízes das plantas infestadas com inóculo líquido. Com efeito, o inóculo ao dispersar-se mais facilmente pelo sistema radicular conduziu a uma infecção

generalizada e a uma rápida destruição das raízes. Este facto terá permitido que, no curto período em que a experiência decorreu, os danos verificados nas raízes tivessem tido oportunidade de se reflectirem na parte aérea. Pelo contrário, nas plantas infestadas com inóculo sólido, a infecção ter-se-á processado mais lentamente, pelo que a destruição das raízes não terá sido tão rápida. Os sistemas radiculares destas plantas puderam assim, manter raízes funcionais durante mais tempo, o que conduziu a uma manifestação menos expressiva de sintomas na parte aérea.

Pela observação da Tabela 4.2 também se verifica que os sistemas radiculares das plantas testemunhas se mostraram ligeiramente afectados, o que denota a sensibilidade destas espécies ao encharcamento.

Phytophthora cinnamomi reisolou-se a partir das raízes com sintomas, independentemente do isolamento, do método de infestação utilizado e da espécie de planta, em percentagens que variaram entre 13 e 80%. Das plantas testemunhas não se reisolou o patógeno.

Como ambos os métodos de infestação conduziram a resultados semelhantes relativamente à manifestação de sintomas nas raízes de sobreiros e azinheiras, passou-se a utilizar o método de infestação com suspensão aquosa do patógeno, por ser este o método menos laborioso.

4.2.2. Métodos de avaliação da severidade de sintomas e influência do tipo de substrato na infecção de sobreiros e azinheiras por *Phytophthora cinnamomi*

4.2.2.1. Infestação das plantas sem remoção da terra das raízes, em abrigo (*Experiência 4.B*)

As plantas utilizadas nesta experiência foram sobreiros e azinheiras de 9-12 meses de idade, procedentes de um viveiro comercial.

Utilizaram-se dois tipos de substrato. Um solo procedente da *Finca La Conchuela*, herdade com oliveiras situada numa zona de lezíria próximo de Córdoba, Espanha. Este solo é do tipo argiloso, com uma textura de 14:34:52 (areia: limo: argila), contendo 1.29% de matéria orgânica oxidável, 3 ppm de fósforo assimilável, 285 ppm de potássio assimilável e 32% de carbonatos totais (Cuesta 1999). O outro substrato foi a mistura referida em 4.2.1.1.

Dado que em trabalhos anteriores se detectou *P. megasperma* no solo procedente da herdade *La Conchuela* (Sánchez *et al.* 1998b; 2003a), ambos os substratos foram esterilizados duas vezes em autoclave a 1.25 Kp/cm² durante 1,5 h.

Utilizaram-se dois isolamentos escolhidos aleatoriamente da coleção micológica referida em 2.2.3, um procedente de sobreiro, PA₂₀ e outro de azinheira PE₁₃.

As plantas utilizadas foram retiradas dos seus recipientes originais, pesadas individualmente numa balança e o seu peso anotado. Este valor era o peso da parte aérea da planta, da parte radicular e do substrato que estava aderente às raízes no alvéolo onde crescia a planta.

Para a infestação utilizou-se como inóculo uma suspensão aquosa de micélio e clamidósporos de cada um dos isolamentos. A preparação do inóculo, a infestação das plantas e o seu acondicionamento processou-se segundo o descrito em 4.2.1.2.

Depois de infestadas, todas as plantas foram colocadas em tabuleiros numa câmara de crescimento, a 18°C, às escuras, onde permaneceram durante uma primeira semana para se recompor da transplantação, tendo sido regadas e pulverizadas com água.

Ao fim deste tempo colocaram-se os tabuleiros com as plantas num abrigo ao ar livre. Em cada tabuleiro só se colocaram vasos com a mesma espécie, o mesmo isolamento e o mesmo tipo de substrato. As plantas testemunhas colocaram-se em tabuleiros separados.

Registaram-se a altura, o diâmetro do caule e a quantidade de clorofila de duas a oito folhas adultas, bem desenvolvidas, de cada planta. A altura das plantas foi medida com uma régua e o diâmetro do caule com um paquímetro. Para a determinação da clorofila utilizou-se o SPAD-502 *Chlorophyll Meter*, que mede a intensidade de cor verde nas folhas.

Depois de 3-4 dias no abrigo, as plantas foram submetidas à saturação hídrica do solo durante 2 dias sucessivos por semana, inundando os vasos nos tabuleiros de forma que o nível de água se situasse 2-3 cm abaixo da superfície do solo nos vasos. Findo esse período, os vasos eram retirados dos tabuleiros e deixados a escorrer até serem inundados novamente na semana seguinte (Figura 4.2).

A experiência deu-se por concluída ao fim de 3 meses, após a primeira inundação dos vasos, quando as plantas infestadas começaram a mostrar sintomas da doenç a nas folhas. Durante o tempo em que decorreu a experiência a temperatura média variou entre 10,4 e 28,2°C.

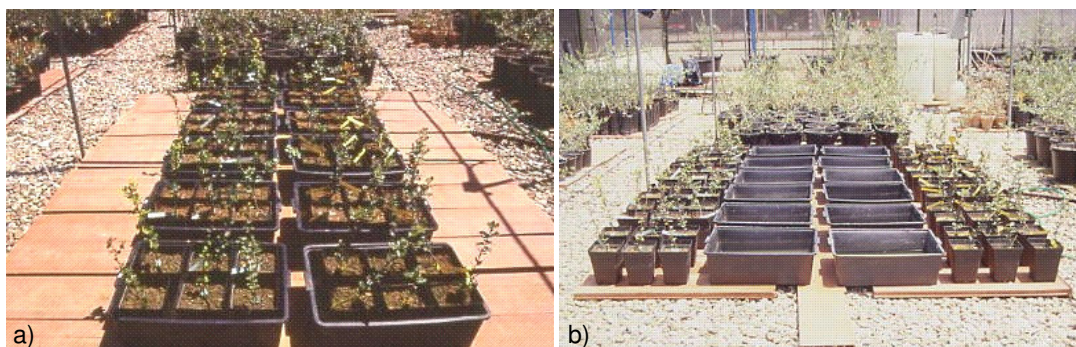


Figura 4.2 - Experiência de patogenicidade em abrigo: a) plantas submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana; b) as mesmas plantas fora de água.

No final da experiência foram novamente registados a altura, o diâmetro e o teor de clorofila de cada planta. Seguidamente as plantas foram retiradas dos vasos e as suas raízes lavadas cuidadosamente com água corrente, retirando-lhes as partículas de terra aderentes. De imediato pesou-se, cada uma das plantas. De seguida procedeu-se à avaliação da severidade dos sintomas segundo a escala de 0-4 valores descrita em 4.2.1.4. Fizeram-se tentativas de reisolamento de *P. cinnamomi* a partir de raízes das plantas de cada tratamento, em meio selectivo PARPH, tal como referido em 4.2.1.5.

O peso inicial das plantas (P_i) foi estimado, subtraindo ao peso da planta e da terra aderente às raízes, o peso médio da terra de cada alvéolo, calculado com base no peso da terra de 25 alvéolos. Com o peso inicial e final de cada planta calculou-se a variação do peso da planta através da seguinte fórmula:

$$\text{Variação do peso da planta (\%)} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$$

em que P_i indica o peso inicial de uma planta, antes da sua infestação e P_f o peso final, quando a experiência terminou.

Da mesma forma calculou-se a variação da altura, do diâmetro e da quantidade de clorofila de cada planta no final da experiência.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental consistiu em seis repetições por espécie de planta, tipo de solo e isolamento utilizado. A unidade experimental foi o vaso com uma planta.

A análise estatística processou-se de mesma forma que na experiência anterior. Aos valores da severidade de sintomas nas partes aérea e radicular, variação do peso (biomassa da planta), quantidade de clorofila, altura da planta e diâmetro do caule, aplicou-se a análise global de variância utilizando o programa *Statistix* (Analytical Software 2000). Os valores médios compararam-se entre si e com as testemunhas mediante o teste LSD (mínima diferença significativa) de Fisher ao nível de probabilidade $P = 0,05$ (Steel e Torrie 1985). Também se realizaram, para cada espécie de planta, análises individuais da variância e comparação de médias para cada tratamento.

Resultados

A sintomatologia da doença foi semelhante à referida na experiência anterior. Os valores médios da severidade de sintomas, assim como a comparação de médias correspondente às diferentes espécies de plantas, aos diferentes isolamentos e tipos de substrato apresentam-se na Tabela 4.3. As análises de variância e as comparações de médias correspondentes a esta experiência encontram-se no Anexo V: B.1.

Tabela 4.3 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira sem remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em abrigo

Planta	Tipo de substrato	Inóculo	Severidade de sintomas ¹		Variação do peso da planta (%) ²	Variação da quantidade de clorofila (%) ³	Variação da altura das plantas (%) ⁴	Variação do diâmetro do caule (%) ⁵
			Parte aérea	Parte radicular				
Sobreiro	Limoso	PA ₂₀	1,4 bc	2,4 bcd	- 19,7 abcd	⁶	11,9 cd	3,5 c
		PE ₁₃	1,4 bc	2,4 bcde	7,1 ab	- 11,8 b	23,3 bc	1,3 c
		Test. ⁷	2,1 ab	1,8 de	- 58,2 d	- 13,5 b	12,1 cd	7,2 bc
	Argiloso	PA ₂₀	2,1 ab	3,2 a	15,2 a	⁶	5,4 d	2,5 c
		PE ₁₃	2,3 a	2,8 ab	- 23,1 abcd	- 12,5 b	7,7 cd	1,9 c
		Test. ⁷	1,1 c	1,4 ef	3,0 abc	- 1,8 b	13,0 cd	12,3 bc
Azinheira	Limoso	PA ₂₀	1,2 c	2,8 ab	- 38,9 bcd	49,6 a	6,0 d	8,9 bc
		PE ₁₃	0,9 c	2,0 cde	- 60,3 d	51,7 a	35,4 ab	41,5 a
		Test. ⁷	0,1 d	0,8 f	- 45,1 d	63,4 a	44,5 a	3,5 c
	Argiloso	PA ₂₀	2,1 ab	2,5 abcd	- 64,2 d	60,7 a	16,9 cd	7,9 bc
		PE ₁₃	1,2 c	2,6 abc	- 40,8 d	42,5 a	24,3 bc	6,1 bc
		Test. ⁷	0,7 cd	0,9 f	- 45,8 d	43,8 a	38,3 ab	21,0 b

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² A variação do peso foi calculada como a % de peso ganho, ou perdido, pela planta no fim da experiência; ³ A variação da quantidade de clorofila foi calculada como a % do aumento ou diminuição de clorofila no fim da experiência; ⁴ A variação da altura das plantas foi calculada como a % do aumento da altura das plantas no fim da experiência; ⁵ A variação do diâmetro do caule das plantas foi calculada como a % do aumento do diâmetro no fim da experiência; ⁶ sem dados; ⁷ Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para $P = 0,05$ (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular mostrou diferenças significativas unicamente entre as plantas testemunhas e as infestadas, apresentando estas, uma severidade de sintomas nas raízes significativamente maior do que as suas correspondentes testemunhas. Não se observaram diferenças significativas na severidade de sintomas nas raízes produzidos pelos dois isolamentos estudados, tipo de substrato e espécie de planta.

Relativamente à análise global da variância para a avaliação de sintomas da parte aérea, os resultados não mostraram uma total correspondência, com os obtidos na parte radicular. Com efeito, verificaram-se diferenças significativas entre espécies de plantas e tipo de substrato, ao contrário do que a análise de variância mostrou para as raízes. Esta discordância poderá ter sido devida, ao facto de a infecção das raízes não ter atingido um grau muito elevado o que permitiu às plantas disporem de raízes suficientes para manter as suas funções vitais e assim retardar o aparecimento de sintomas na parte aérea, no período em que a experiência decorreu.

A análise global de variância para a variação do peso da planta (biomassa da planta) unicamente mostrou diferenças significativas entre espécies de planta. Não se observaram diferenças significativas na variação do peso em função do tipo de substrato e entre plantas testemunhas e infestadas.

Ambas as espécies de plantas perderam peso no final da experiência, no entanto, os sobreiros apresentaram um decréscimo significativamente menor que as azinheiras.

Durante o decurso desta experiência, muitas folhas das plantas infestadas caíram, por isso não foi possível medir os valores de clorofila, pelo que não se pôde fazer a análise global da variância da variação de clorofila. Apesar de faltarem esses valores, a análise individual de variância em função do tratamento permitiu observar que, no sobreiro a quantidade de clorofila diminuiu no final da experiência, mas o mesmo não se verificou na azinheira. O teor de clorofila registado para esta espécie, não reflectiu por isso, o verdadeiro estado fisiológico da planta, uma vez que resultou da medida das poucas folhas verdes que ainda permaneciam em algumas plantas.

Quanto à altura das plantas, a análise global de variância indicou diferenças de altura em função da espécie de planta e inóculo utilizado. As azinheiras apresentaram variações significativamente maiores do que os sobreiros. As plantas infestadas com o isolamento PA₂₀, apresentaram uma altura significativamente menor que as infestadas com o isolamento PE₁₃ que, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas de altura em relação às plantas testemunhas.

A análise global da variância para a variação do diâmetro do caule das plantas somente mostrou diferenças significativas em função da espécie de planta. A comparação de médias indicou que as azinheiras apresentaram um aumento significativamente maior do diâmetro do caule que os sobreiros. Não se verificaram diferenças entre plantas testemunhas e infestadas.

Reisolou-se *P. cinnamomi* a partir de raízes finas das plantas infestadas, independentemente do isolamento, em percentagens que variaram entre 8,3 e 44,4%. O patógeno não foi reisolado das testemunhas.

Nenhum dos parâmetros utilizados expressou quantitativamente a severidade de sintomas avaliada visualmente nas raízes. Não obstante estes resultados, estes parâmetros, com exceção do teor de clorofila, foram utilizados na experiência seguinte, em que as plantas em vez de serem utilizadas sem remoção da terra aderente às raízes, foram usadas depois de esta ter sido retirada.

4.2.2.2. Infestação das plantas com remoção da terra das raízes, em abrigo (*Experiência 4.C*)

Nesta experiência as plantas e os substratos utilizados foram idênticos ao da experiência anterior, no entanto, para a preparação do inóculo somente se utilizou o isolamento PA₂₀.

As plantas retiraram-se dos recipientes originais, onde cresciam e muito cuidadosamente lavaram-se as raízes com água corrente, procurando que estas permanecessem ao ar o menor tempo possível. Em seguida pesaram-se as plantas individualmente.

A infestação das plantas realizou-se aplicando directamente sobre as raízes 100 ml de suspensão aquosa de inóculo preparado conforme descrito no ponto 4.2.1.2.

Prepararam-se seis repetições por espécie de planta e tipo de substrato, assim como as correspondentes testemunhas. As plantas foram submetidas às mesmas condições verificadas na *Experiência 4.B*.

Tal com na experiência anterior, mediu-se o peso, a altura, e o diâmetro do caule das plantas no início e no final da experiência. No entanto, para o cálculo da variação de biomassa, utilizou-se o peso real das plantas, em vez do seu peso estimado.

Para as azinheiras a experiência deu-se por terminada 1 mês após a primeira inundação dos vasos, quando as plantas infestadas exibiam os sintomas da doença nas folhas, em que a temperatura média no abrigo variou entre 9,8 e 25,4°C. Como os sobreiros infestados ao fim deste período, ainda não apresentavam sintomas evidentes, permaneceram no abrigo por mais 1 mês, com uma temperatura média que variou entre 12,2 e 30,6°C.

No final da experiência seguiram-se os procedimentos descritos na experiência anterior para o registo dos resultados e sua análise estatística (4.2.2.1.).

Resultados

Os valores médios da severidade de sintomas, assim como a comparação de médias para cada tratamento apresentam-se na Tabela 4.4. As análises de variância desta experiência e respectivas comparações de médias aparecem no Anexo V: B.2.

Tabela 4.4 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira com remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em abrigo

Substrato	Inóculo	Severidade de sintomas ¹				Variação do peso da planta (%) ²		Variação da altura da planta (%) ³		Variação do diâmetro do caule (%) ⁴	
		Parte aérea		Parte radicular		Sobreiro	Azinheira ⁵	Sobreiro ⁵	Azinheira	Sobreiro ⁵	Azinheira
		Sobreiro	Azinheira	Sobreiro	Azinheira						
Limoso	PA ₂₀	3,4 a	3,9 a	3,7 a	3,8 a	-29,6 b	-27,5	1,4	0	0	0
	Test.	2,3 b	3,9 a	1,9 c	3,7 a	6,3 a	-25,7	8,0	0	0,8	0
Argiloso	PA ₂₀	2,0 bc	4,0 a	2,8 b	3,2 ab	-27,8 b	-26,0	4,6	0	0	0
	Test.	0,9 c	2,3 b	1,2 c	2,5 b	-27,0 b	-26,5	9,6	0	1,3	0

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado (azinheira ao fim de 1 mês, sobreiro ao fim de 2 meses); ² A variação do peso foi calculada como a % de peso ganho, ou perdido, pela planta no fim da experiência; ³ A variação da altura das plantas foi calculada como a % do aumento ou diminuição da altura das plantas no fim da experiência; ⁴ A variação do diâmetro do caule das plantas foi calculada como a % do aumento ou diminuição do diâmetro no fim da experiência; ⁵ Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; ⁶ Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular revelou diferenças significativas em função da espécie de planta, tipo de substrato e inóculo. Tal como na experiência anterior, as plantas infestadas mostraram uma severidade de sintomas significativamente superior às plantas testemunhas. No entanto, neste caso as azinheiras mostraram-se significativamente mais afectadas que os sobreiros e o solo limoso foi onde as plantas manifestaram sintomas significativamente mais severos.

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea, revelou uma total correspondência com os resultados da análise da severidade de sintomas na parte radicular, pelo

facto de ambas se apresentaram severamente afectadas. Igualmente houve diferenças significativas entre espécie de plantas, tipo de substrato e inóculo.

A análise global da variância para a variação do peso da planta mostrou diferenças significativas entre plantas infestadas e testemunhas. Todas as plantas registaram um decréscimo de peso no final da experiência, que foi significativamente maior nas plantas infestadas. Este resultado mostrou que a variação do peso traduziu a severidade de sintomas observada, tanto nas raízes como nas folhas.

Relativamente à variação da altura, a análise global de variância revelou diferenças significativas entre sobreiros e azinheiras. Os sobreiros tiveram variações significativamente maiores que as azinheiras, que ao fim de 1 mês, não apresentaram qualquer crescimento em altura. Este crescimento nulo está relacionado com o deficiente desenvolvimento vegetativo verificado nas azinheiras poucos dias após o início da experiência, desenvolvimento esse, que só parcialmente poderá ser atribuído à infestação.

Quanto à variação do diâmetro do caule da planta, os sobreiros aumentaram de diâmetro, ao contrário das azinheiras, cuja precoce quebra de vigor vegetativo, referida anteriormente, impediu qualquer variação de biomassa.

A partir das raízes finas de todas as plantas infestadas reisolou-se *P. cinnamomi* com percentagens que variaram entre 58,3 e 75%. Nas raízes das plantas testemunhas, a percentagem de recuperação de *P. cinnamomi* foi de 0% em todos os casos.

Apesar do manuseamento cuidado das plantas, verificou-se que as testemunhas também apresentaram sintomas severos na parte aérea, pouco tempo depois do início da experiência. Estes sintomas precoces poderão ser atribuídos às elevadas temperaturas que se fizeram sentir durante a preparação e o decurso do ensaio. Este facto levou a realizar outra experiência semelhante, que decorreu em estufa com temperatura ambiente mais favorável ao bom desenvolvimento das plantas.

4.2.2.3. Infestação das plantas com remoção da terra das raízes, em estufa (*Experiência 4.D*)

Nesta experiência utilizaram-se plantas de sobreiro e azinheira com 12 meses de idade, obtidas por sementeira na Universidade de Córdoba. O procedimento foi idêntico ao seguido na experiência anterior, diferindo no facto de se terem utilizado dois isolamentos (PA₂₀ e PE₁₃) para infestar as plantas e de este ensaio ter decorrido numa estufa onde se verificou uma temperatura média mínima de 10,1°C e uma temperatura média máxima de 25,8°C. Nesta experiência, ao contrário das

anteriores, só se utilizou como parâmetro aferidor da severidade de sintomas, o peso das plantas, porque a altura e o diâmetro do caule não se mostraram adequados para medir as pequenas variações de desenvolvimento das plantas, no curto espaço de tempo em que as experiências decorreram.

A experiência deu-se por concluída ao fim de 3 meses, após a primeira inundação dos vasos, altura em que, tal como nas experiências anteriores, se procedeu à avaliação dos sintomas, reisolamento de *P. cinnamomi* a partir das raízes e análise dos resultados.

Resultados

Os valores médios da severidade de sintomas correspondentes às diferentes espécies de plantas, aos diferentes isolamentos e tipos de substrato, bem como as comparações de médias apresentam-se na Tabela 4.5. As análises de variância e comparações de médias desta experiência encontram-se no Anexo V: B.3.

Tabela 4.5 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira com remoção da terra das raízes, desenvolvendo-se em estufa

Substrato	Inóculo	Severidade média de sintomas ¹				Variação do peso da planta (%) ²	
		Parte aérea		Parte radicular		Sobreiro	Azinheira
		Sobreiro ³	Azinheira	Sobreiro	Azinheira		
Limoso	PA ₂₀	2,2	3,9 a	2,8 a	4,0 a	3,5 bc	- 14,7 bc
	PE ₁₃	1,6	2,9 ab	1,7 bc	3,6 ab	5,3 bc	- 19,8 cd
	Test. ⁴	1,1	1,7 bc	1,6 bc	2,3 cd	34,1 a	- 1,3 ab
Argiloso	PA ₂₀	1,3	2,2 bc	2,0 ab	2,9 bc	- 3,0 c	- 18,5 bcd
	PE ₁₃	0,8	2,5 ab	2,2 ab	3,3 abc	- 12,7 c	- 34,8 d
	Test. ⁴	0,5	1,0 c	0,9 c	1,4 d	25,7 ab	6,4 a

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² A variação do peso foi calculada como a % de peso ganho, ou perdido, pela planta no fim da experiência; ³ Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; ⁴ Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

As análises globais da variância para a avaliação visual de sintomas, tanto na parte radicular como na parte aérea, mostraram diferenças significativas entre espécies de planta, substrato e inóculo. As plantas infestadas, tanto com o isolamento PA₂₀ como com o PE₁₃, apresentaram uma severidade de sintomas claramente superior à verificada nas testemunhas. Esta severidade é significativamente superior nas azinheiras do que nos sobreiros e nas plantas que crescem no substrato limoso em relação às do substrato argiloso.

A severidade de sintomas mais baixa verificada na parte aérea das plantas, em relação à parte radicular explica-se pelas razões referidas na *Experiência 4.B*.

A análise global da variância para a variação do peso da planta, tal como as análises da severidade de sintomas observada visualmente, revelou diferenças entre espécies de plantas e entre plantas testemunhas e infestadas. As comparações de médias indicaram que os sobreiros aumentaram significativamente de peso em relação às azinheiras e as plantas testemunhas aumentaram de peso ao contrário das infestadas, que diminuiriam.

A análise individual de variância para a variação do peso, para cada espécie de planta, indicou para os sobreiros, nos dois tipos de substrato, diferenças significativas entre plantas infestadas e testemunhas. Para as azinheiras estas diferenças foram mais claras no substrato argiloso. Para o substrato limoso, as azinheiras infestadas com PA₂₀ não diferiram das testemunhas, no entanto apresentaram valores muito elevados na avaliação visual da severidade de sintomas nas raízes, que estavam todas mortas.

Esta incapacidade para detectar a funcionalidade das raízes levou a concluir que a variação do peso não é um método adequado para avaliar a severidade de sintomas. Por isso, mais do que o peso da biomassa da planta, foi a avaliação visual da funcionalidade das raízes que melhor expressou o grau de severidade de sintomas.

Em todos os casos, o patogénio *P. cinnamomi* foi reisolado de todas as plantas infestadas, independentemente do tipo de substrato e da espécie de planta em percentagens de reisolamento que variaram entre 26,7% e 93,3%. Em nenhum caso foi reisolado das raízes das plantas testemunhas.

Em face destes resultados, passou a utilizar-se o método de avaliação visual para estimar a severidade de sintomas nas plantas.

4.2.3. Patogenicidade dos isolamentos de diferentes grupos morfológicos em *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* (Experiência 4.E)

Tendo-se definido três grupos morfológicos entre os isolamentos estudados no Capítulo 3, pretendeu-se saber se isolamentos de cada um dos grupos se distinguiam quanto à virulência causada em sobreiros e azinheiras.

Para este estudo seleccionaram-se dois isolamentos do grupo A (PA₁ e PE₁₀ - *P. cinnamomi* procedente respectivamente de sobreiro e azinheira), um isolamento do grupo B (PE₁₂ - *P. drechsleri* procedente de azinheira) e um isolamento do grupo C (PE₆₁ - *P. cinnamomi* procedente de azinheira).

Nesta experiência utilizaram-se plantas de sobreiro e azinheira com 18 meses de idade adquiridas num viveiro comercial.

A preparação do inóculo, assim como o método de infestação utilizado foram os descritos em 4.2.1.2.

Os 100 ml de suspensão do inóculo correspondiam ao peso seco referido na Tabela 4.6. Para a determinação do peso de micélio e clamidósporos, adicionado a cada planta, secaram-se as colónias de *Phytophthora* spp. formadas em cada placa de Petri, numa estufa a 60-65°C até peso constante. Calculou-se o peso médio do micélio contido numa placa de Petri e depois a quantidade de micélio aplicado a cada planta (conteúdo de três placas de Petri).

Tabela 4.6 - Quantidade de inóculo utilizada para infestar plantas jovens de sobreiro e azinheira

Isolamento	Quantidade média de micélio e clamidósporos por placa de Petri (mg) ^a	Quantidade média de micélio e clamidósporos em 100 ml de inóculo aplicada a cada planta (mg)
PA ₁	104	312
PE ₁₀	89	267
PE ₁₂	70	210
PE ₆₁	65	195

^a Micélio seco numa estufa a 60-65°C até peso constante. Valor médio de três repetições.

Os vasos com as plantas colocaram-se em tabuleiros previamente desinfestados com lixívia a 10% tal como nas experiências anteriores. Em cada tabuleiro só havia vasos com uma única espécie de planta infestada com o mesmo isolamento. Prepararam-se também plantas testemunhas de cada

espécie, que se trataram da mesma forma, com exceção da infestação que foi substituída pela adição de 100 ml de água.

As plantas foram colocadas num abrigo (temperatura média 9-27°C) em condições de encharcamento contínuo (tal como descrito em 4.2.1.3.), durante as 4 semanas que durou o ensaio. Ao fim deste tempo, retiraram-se as plantas dos vasos, lavaram-se cuidadosamente as suas raízes e avaliaram-se separadamente os sintomas na parte aérea e na raiz. Igualmente, fizeram-se tentativas de reisolamento a partir das raízes de todas as plantas (infestadas e testemunhas), para verificar se estavam ou não infectadas com o patogénio utilizado na infestação.

O delineamento experimental foi de seis repetições por espécie de planta e isolamento. A unidade experimental foi um vaso com uma planta.

Os resultados obtidos analisaram-se estatisticamente aplicando aos valores da severidade de sintomas na parte aérea e na raiz a análise global de variância utilizando o programa *Statistix* (Analytical Software 2000). Os valores médios de severidade de sintomas nas plantas infestadas e nas testemunhas compararam-se entre si mediante o teste LSD (mínima diferença significativa) de Fisher ao nível de probabilidade $P = 0,05$ (Steel e Torrie 1985).

Resultados

Os valores da severidade média de sintomas na parte aérea e radicular, correspondentes às espécies de plantas e aos isolamentos e a comparação de médias correspondentes aos diferentes tratamentos, apresentam-se na Tabela 4.7. As análises de variância e as comparações de médias, referentes a esta experiência, expõem-se no Anexo V: C.

A Tabela 4.7 mostra que não houve diferenças significativas da severidade de sintomas nas raízes das plantas infestadas com os diferentes isolamentos, o que indica que os isolamentos dos diferentes grupos morfológicos apresentaram um grau de patogenicidade semelhante, independentemente de se tratar de *P. cinnamomi* ou *P. drechsleri*. Tal como em experiências anteriores, as plantas infestadas mostraram uma severidade de sintomas na parte radicular significativamente mais elevada do que as plantas testemunhas. As plantas testemunhas também revelaram uma ligeira susceptibilidade ao encharcamento.

Relativamente à severidade de sintomas na parte aérea das plantas, a análise global de variância indicou que a severidade de sintomas foi mais elevada nos sobreiros do que nas azinheiras. Contudo, não se verificaram diferenças significativas entre plantas intestadas e testemunhas, ao contrário do que se verificou nas raízes.

Tabela 4.7 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira causada por isolamentos de *Phytophthora* spp. de três grupos morfológicos

Plantas	Inóculo		Severidade média de sintomas ¹	
	<i>Phytophthora</i> spp. / grupo morfológico	Isolamento	Parte aérea	Parte radicular
Sobreiro	<i>P. cinnamomi</i> / grupo A	PA ₁	2,6 abcd	3,2 a
	<i>P. cinnamomi</i> / grupo A	PE ₁₀	3,5 a	3,3 a
	<i>P. drechsleri</i> / grupo B	PE ₁₂	3,4 a	3,2 a
	<i>P. cinnamomi</i> / grupo C	PE ₆₁	3,1 a	3,2 a
	Test. ²		2,6 abcd	1,5 b
Azinheira	<i>P. cinnamomi</i> / grupo A	PA ₁	2,8 abc	3,4 a
	<i>P. cinnamomi</i> / grupo A	PE ₁₀	3,0 ab	3,2 a
	<i>P. drechsleri</i> / grupo B	PE ₁₂	1,7 cd	3,4 a
	<i>P. cinnamomi</i> / grupo C	PE ₆₁	1,9 bcd	3,1 a
	Test. ²		1,4 d	1,6 b

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

No final da experiência reisolaram-se *P. cinnamomi* e *P. drechsleri* das raízes finas das plantas infestadas com o respectivo isolamento, com percentagens que variaram entre 6,3 e 50%. Das raízes das plantas testemunhas não se isolou nenhuma espécie de *Phytophthora*.

4.2.4. Desenvolvimento de um método rápido para o estudo da patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi*

A utilização de plantas de sobreiro e azinheira obriga a ensaios mais ou menos demorados, por serem espécies de desenvolvimento lento. Além disso, o volume ocupado pelos vasos, torna por vezes difícil compatibilizar o espaço disponível nas incubadoras com o número de tratamentos e de repetições exigíveis. Numa tentativa de encontrar um método que permitisse reduzir o espaço ocupado pelos vasos das experiências e que reproduzisse os sintomas da doença de forma rápida, realizaram-se experiências utilizando plantas herbáceas, hospedeiras de *P. cinnamomi*. Assim, testaram-se duas espécies de *Lupinus* e seleccionou-se o melhor de três substratos ensaiados.

4.2.4.1. Avaliação da susceptibilidade à infecção de espécies de *Lupinus* crescendo numa mistura de areia, limo e turfa (*Experiência 4.F*)

Nesta experiência utilizaram-se sementes pré-germinadas de *L. albus* e *L. angustifolius* que foram obtidas a partir de sementes fornecidas por uma empresa Córdoba. Estas sementes foram desinfestadas com uma solução aquosa de lixívia comercial (50 g de cloro activo/l) a 10% durante 2 min. Depois de deixar secar as sementes à temperatura ambiente, fez-se uma pequena incisão em cada semente, com um escalpelo esterilizado, para favorecer a entrada de água. Seguidamente colocaram-se numa câmara húmida para acelerar a germinação, seguindo as recomendações de Hermoso (2001). A câmara húmida consistia num recipiente que continha no fundo uma pequena quantidade de água desionizada e na zona intermédia duas redes de plástico, cobertas com papel de filtro que comunicava com a água que cobria o fundo do recipiente. As sementes colocaram-se entre as duas redes de plástico e assim permaneceram sempre húmidas (Figura 4.3). O recipiente fechava-se hermeticamente, conseguindo 100% de humidade relativa. As câmaras húmidas colocaram-se numa câmara de crescimento com condições controladas: temperatura de 22°C e 12 h luz/dia. As sementes germinavam ao fim de 2 ou 3 dias.

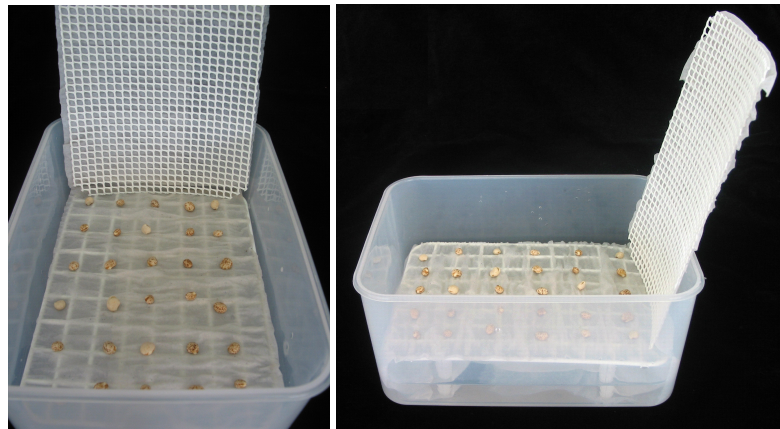


Figura 4.3 - Câmara húmida com sementes de *Lupinus* spp.

Utilizou-se como inóculo uma suspensão aquosa de micélio e clamidósporos, preparada como descrito em 4.2.1.2. Este inóculo era constituído pela mistura de dois isolamentos (PA₂₀ e PE₁₃). A concentração de inóculo foi calculada de forma a suspender o conteúdo de uma placa de Petri em 200 ml de água destilada.

As sementes pré-germinadas de *Lupinus* transferiram-se para vasos de 0,5 l, previamente lavados com lixívia a 10%, que continham substrato constituído por uma mistura de areia, limo e turfa (1:1:1 em volume).

Prepararam-se 12 vasos para cada espécie de *Lupinus*, repartidos segundo o seguinte esquema: seis vasos levavam cada um, uma semente pré-germinada, que foi imediatamente infestada com 100 ml de uma solução aquosa de inóculo; nos restantes seis, colocou-se igualmente uma semente pré-germinada por vaso e ao fim de 10 dias, quando as plantas apresentaram folhas verdadeiras, procedeu-se à sua infestação, vertendo em cada vaso 100 ml de solução de inóculo. Prepararam-se também as suas correspondentes testemunhas, que foram tratadas da mesma forma, com a diferença de terem sido regadas com água desionizada, livre do patogénio. A unidade experimental foi o vaso com uma semente.

A experiência decorreu em câmara de crescimento (22-25°C de temperatura e 14 h luz/dia) e deu-se por concluída 1 mês depois da infestação. Durante este período as plantas regaram-se de acordo com as necessidades observadas visualmente.

Para as plantas provenientes de sementes imediatamente infestadas, após terem sido semeadas em substrato, a avaliação dos resultados realizou-se contando o número de plantas que conseguiram germinar e desenvolver-se. Para as plantas infestadas 10 dias depois de semeadas, a avaliação da severidade dos sintomas na parte aérea e radicular realizou-se utilizando a escala referida em 4.2.1.4. depois de retirar as plantas dos vasos e lavá-las cuidadosamente com água corrente.

Tentou-se o reisolamento de *P. cinnamomi*, para comprovar se as plantas estavam ou não infectadas. Para tal seguiu-se o procedimento descrito em 4.2.1.5.

Os valores obtidos na avaliação da sintomatologia das plantas analisaram-se estatisticamente segundo o referido em 4.2.1.6.

Resultados

O efeito da infestação com *P. cinnamomi*, imediatamente após a sementeira, na germinação de sementes de *L. albus* e *L. angustifolius* apresenta-se na Tabela 4.8.

Verifica-se que *P. cinnamomi* afecta severamente a germinação das sementes destas duas espécies de *Lupinus*. De facto, nenhuma semente de *L. albus* infestada conseguiu germinar e desenvolver-se normalmente, enquanto que 100% das sementes testemunhas conseguiram dar origem a plantas que se desenvolveram bem. Pelo contrário, 50% das sementes de *L. angustifolius* infestadas conseguiram germinar e desenvolverem-se normalmente, enquanto que somente 83,3% das sementes testemunhas germinaram e tiveram bom desenvolvimento.

Tabela 4.8 - Efeito da infestação com *Phytophthora cinnamomi* na germinação de sementes de *Lupinus albus* e *L. angustifolius*

Espécie	Sementes	Sementes infestadas (%)	Sementes testemunhas (%) ⁶
<i>L. albus</i>	Não germinaram	50,0	0
	Germinaram e morreram	50,0	0
	Germinaram e desenvolveram bem	0	100
<i>L. angustifolius</i>	Não germinaram	33,3	16,7
	Germinaram e morreram	16,7	0
	Germinaram e desenvolveram bem	50,0	83,3

Em relação às plantas infestadas 10 dias após a sementeira, os sintomas no final da experiência consistiram em clorose, murchidão e necrose das folhas, redução de crescimento e finalmente morte. Os valores médios da severidade de sintomas, assim como a comparação de médias correspondentes às diferentes espécies de *Lupinus* apresentam-se na Tabela 4.9. As análises de variância e as comparações de médias encontram-se no Anexo V: D.

Tabela 4.9 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de *Lupinus albus* e *L. angustifolius* desenvolvendo-se numa mistura de areia, limo e turfa

Planta	Inóculo	Severidade média de sintomas ¹	
		Parte aérea ²	Parte radicular
<i>L. albus</i>	Infestadas	4,0	4,0 a
	Testemunhas	2,4	2,4 c
<i>L. angustifolius</i>	Infestadas	3,0	3,6 ab
	Testemunhas	2,8	2,8 bc

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie, 1985).

A análise global da variância para a severidade de sintomas na parte radicular mostrou diferenças significativas entre plantas infestadas e testemunhas. As duas espécies de *Lupinus* spp. infestadas apresentaram severidade de sintomas significativamente mais elevada do que as respectivas testemunhas.

Os sintomas observados na parte aérea tiveram, em geral correspondência com a sintomatologia nas raízes, para as duas espécies de *Lupinus*.

Reisolou-se *P. cinnamomi* de raízes finas de plantas provenientes de sementes infestadas com percentagens superiores a 20%. Das raízes das plantas procedentes de sementes não infestadas (testemunhas), o patogénio não foi reisolado.

O substrato usado nesta experiência não se mostrou muito adequado para o desenvolvimento das plantas, visto que as testemunhas revelaram sintomas de deficiente desenvolvimento.

Devido à melhor germinação e desenvolvimento de *L. albus* e à sua maior susceptibilidade à infecção por *P. cinnamomi*, de que resultou uma mais rápida manifestação de sintomas, nas experiências seguintes utilizou-se esta espécie. Por outro lado, a manifestação de sintomas nas plantas desenvolvidas neste substrato, somente se conseguiu ao fim de 1 mês. Pretendeu-se verificar se em cultura hidropónica este período poderia ser ainda encurtado.

4.2.4.2. Avaliação da susceptibilidade à infecção de *Lupinus albus* desenvolvendo-se em cultura hidropónica (Experiência 4.G)

Doze sementes pré-germinadas de *L. albus*, obtidas como descrito na *Experiência 4.F*, foram transferidas para caixas de plástico (21x15x10 cm) com vermiculite húmida. Ao fim de 1 semana as plantas tinham atingido tamanho suficiente para serem utilizadas em cultura hidropónica e foram retiradas da vermiculite, lavando as suas raízes cuidadosamente com água corrente. Seguidamente as plantas colocaram-se em recipientes de plástico de 500 ml, com solução nutritiva ½ de Hoagland (Hoagland e Arnon 1950) e cuja composição se indica no Anexo V: E. Os recipientes envolveram-se com papel de alumínio para evitar a passagem da luz e taparam-se com discos de esferovite que, além de evitarem a passagem da luz, mantiveram as plantas em posição vertical. Em cada disco de esferovite introduziu-se uma agulha de injeção, ligada a um tubo de borracha conectado a uma bomba de ar, para permitir a arejamento das raízes (Figura 4.4). Cada recipiente continha três plantas.

Uma semana depois das plântulas terem sido colocadas a crescer na solução nutritiva procedeu-se à sua infestação com uma suspensão de uma mistura de zoósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ em extracto de solo.

Para a produção de zoósporos transferiram-se para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, 10 discos de micélio de 2 cm de diâmetro dos isolamentos crescidos durante 4 dias em meio de cultura CA, no escuro a 22°C. Em seguida, verteu-se extracto de solo para as placas, até que o líquido circundasse a margem dos discos. O extracto de solo preparou-se como indicado em 3.2.3. As placas foram incubadas à luz durante 72 h a 25°C. Transcorrido este tempo, as placas foram

submetidas a um golpe de frio durante 20 min, colocando-as no frigorífico a 4-5°C, para favorecer a formação de zoósporos. Ao fim deste período as placas voltaram a incubar-se à temperatura de 25°C até ao aparecimento dos zoósporos, o que ocorreu ao fim de 2-3 h.

Uma vez confirmado ao microscópio óptico invertido que havia zoósporos em abundância, verteu-se o extracto de solo contido nas placas de Petri para um copo de precipitação. Recolheu-se uma amostra de aproximadamente 2 ml, a qual se agitava, para provocar o enquistamento dos zoósporos. Ao microscópio óptico, procedeu-se à contagem dos zoósporos numa câmara de Neubauer, a fim de se calcular a sua concentração na suspensão.

Para a infestação verteram-se 100 ml da suspensão de zoósporos em cada um dos recipientes onde se encontravam as plântulas de *L. albus*. A concentração de zoósporos do inóculo foi de 160.000 zoósporos/ml. Às plantas testemunhas adicionaram-se 100 ml de extracto de solo sem zoósporos.

Prepararam-se três recipientes de 500 ml com três plantas cada um que foram infestadas e outros três com plantas testemunhas. A unidade experimental foi o recipiente com três plantas.



Figura 4.4 - *Lupinus albus* em cultura hidropónica.

A experiência decorreu numa câmara de crescimento em condições controladas de luz e temperatura (temperatura média de 22°C e 14 h luz/dia). Sempre que foi necessário adicionou-se solução nutritiva aos recipientes para repor o volume inicial.

A experiência deu-se por concluída 45 dias depois da infestação, quando as raízes das plantas infestadas finalmente apresentaram sintomas. Nessa altura procedeu-se à avaliação da severidade dos sintomas, tanto na parte aérea como na parte radicular, utilizando a escala descrita em 4.2.1.4. Como em cada recipiente havia três plantas, o valor de severidade de sintomas de cada repetição foi a média da severidade de sintomas nas três plantas.

Tal como nas experiências anteriores, depois da avaliação de sintomas, procedeu-se à tentativa de reisolamento de *P. cinnamomi* a partir das raízes das plantas.

Resultados

Ao fim de 1 mês e meio de infestação das plantas de *L. albus*, tanto as plantas testemunhas, como as infestadas apresentaram uma ligeira clorose que se atribuiu às condições em que cresceram. No entanto, nas plantas infestadas houve sintomas da infecção nas raízes. Estas apresentaram, em relação às testemunhas, uma quantidade ligeiramente menor de raízes, que exibiam uma cor mais escura e os tecidos da zona terminal danificados. As plantas testemunhas apresentaram as raízes completamente sãs.

Os valores médios da severidade de sintomas das plantas de *Lupinus* infestadas e não infestadas aparecem na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de *Lupinus albus* desenvolvendo-se em cultura hidropónica

	Severidade de sintomas ¹	
	Folhas	Raiz
Infestadas	1,2	1,2
Testemunhas	1,2	0,0

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado.

No final da experiência o reisolamento de *P. cinnamomi* a partir de raízes das plantas infestadas foi de 83,3%. Das raízes das plantas testemunhas não se reisolou o patogénio.

Como a manifestação de sintomas nas raízes das plantas infestadas em cultura hidropónica não foi muito evidente no mês e meio em que o ensaio decorreu, repetiu-se a experiência utilizando como substrato a vermiculite.

4.2.4.3. Avaliação da susceptibilidade à infecção de *Lupinus albus* desenvolvendo-se em vermiculite (*Experiência 4.H*)

As plantas para esta experiência obtiveram-se de forma idêntica à utilizada na experiência anterior. Neste caso, as plantas foram transplantadas para recipientes de 500 ml com vermiculite humedecida com água. Para cada recipiente transferiram-se três plantas de *L. albus*.

As plantas foram infestadas no dia seguinte à transplantação. Tal como para a *Experiência 4.G*, o inóculo utilizado foi uma suspensão de uma mistura de zoósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ em extracto de solo, neste caso, com uma concentração de 6.500 zoósporos/ml. A preparação do inóculo e a infestação das plantas realizaram-se da forma referida em 4.2.4.2.

Prepararam-se três recipientes com plantas infestadas e outros três com plantas testemunhas. A unidade experimental foi um recipiente com três plantas.

A experiência decorreu numa câmara de crescimento em condições controladas de luz e temperatura (22°C de temperatura média e 12 h luz/dia).

Durante o tempo que decorreu a experiência todas as plantas foram regadas semanalmente, com 50 ml de solução nutritiva ½ de Hoagland (Anexo V: E) e cerca de 70 ml de água destilada.

A experiência deu-se por terminada 15 dias depois da infestação, quando as plantas infestadas apresentaram sintomas de infecção na parte aérea. Nessa altura, as plantas retiraram-se dos recipientes e lavaram-se cuidadosamente as raízes com água corrente. Seguidamente procedeu-se à avaliação da severidade de sintomas, tanto na parte aérea, como na parte radicular. Tal como no ensaio anterior (*Experiência 4.G*) cada repetição foi constituída pela média da severidade de sintomas nas três plantas de cada recipiente. Da mesma maneira procedeu-se ao reisolamento de *P. cinnamomi* a partir das raízes das plantas.

Resultados

Nas plantas infestadas os sintomas, quer na parte aérea quer nas raízes, foram muito severos. Conforme se verifica na Figura 4.5 havia uma clorose generalizada nas folhas e uma redução do sistema radicular em que as raízes se apresentaram muito necrosadas. Pelo contrário, as plantas testemunhas apresentaram um desenvolvimento normal. Os valores médios da severidade de sintomas das plantas de *Lupinus* infestadas e não infestadas apresentam-se na Tabela 4.11.

No final da experiência o reisolamento de *P. cinnamomi* foi de 100% para as plantas infestadas, e de 0% para as plantas testemunhas.

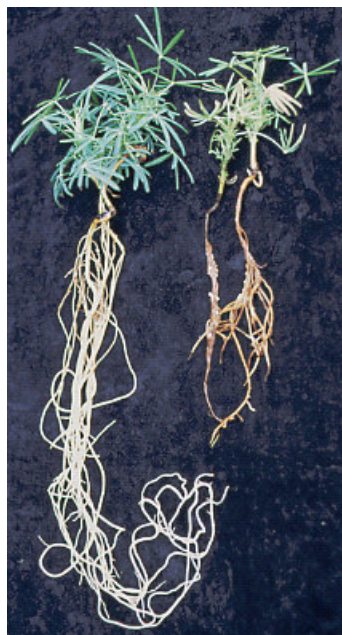


Figura 4.5 - Sintomatologia nas plantas de *Lupinus albus* que se desenvolveram em vermiculite (à esquerda plantas testemunhas e à direita plantas infestadas com *Phytophthora cinnamomi*).

Tabela 4.11 - Valores médios da severidade de sintomas em plantas de *Lupinus albus* desenvolvendo-se em vermiculite

	Severidade de sintomas ¹	
	Parte aérea	Parte radicular
Infestadas	3,6	3,8
Testemunhas	0,1	0,0

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado.

As experiências com *L. albus*, mostraram que a utilização de vermiculite permitiu reproduzir os sintomas da doença, num período relativamente curto, além de este substrato poder ser utilizado com pequenos recipientes, reduzindo o espaço ocupado pelo ensaio. Por conseguinte, na experiência seguinte utilizou-se este método para estudar do efeito da concentração de inóculo na severidade de sintomas.

4.2.5. Influência da concentração de inóculo na severidade de sintomas em *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* (Experiência 4.I)

Utilizaram-se sobreiros e azinheiras com 18 meses de idade, obtidos na Universidade de Córdoba a partir de bolotas fornecidas por uma empresa de sementes. As plantas foram retiradas dos tabuleiros com alvéolos, onde cresceram, e as suas raízes lavadas cuidadosamente com água corrente, para remover toda a terra aderente. Cada planta foi depois transferida para um recipiente de 1000 ml de capacidade com vermiculite humedecida com água e de seguida regada com 50 ml de solução nutritiva ½ de Hoagland (Anexo V: E). As plantas foram colocadas numa câmara de crescimento com luz e temperatura controladas (22°C de temperatura média e 12 h luz/dia) (Figura 4.6), onde recuperaram da transplantação durante 1 semana. Ao fim deste período procedeu-se à infestação das plantas vertendo em cada recipiente 100 ml de uma suspensão, com uma mistura de zoósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₉₅ em extracto de solo. Para a obtenção de zoósporos seguiu-se o procedimento descrito em 4.2.4.2.

Utilizaram-se as seguintes concentrações de zoósporos: 6.500, 13.000, 32.500 e 162.500 zoósporos/ml.



Figura 4.6 - Aspecto geral das plantas na câmara de crescimento (azinheiras na parte superior; sobreiros na parte inferior).

Prepararam-se três repetições por espécie de planta e concentração de zoósporos. Às plantas testemunhas foi adicionado o mesmo volume de extracto de solo livre do patogénio. A unidade experimental foi o recipiente com uma planta.

Durante o período em que decorreu a experiência foram aplicados semanalmente, a cada planta, 50 ml de solução nutritiva ½ de Hoagland (Anexo V: E) e 150 ml de água destilada.

A experiência deu-se por terminada 6 semanas após a infestação, quando as plantas infestadas com as várias concentrações de inóculo, apresentaram sintomas da doença nas folhas. Nessa altura retiraram-se as plantas dos recipientes, lavaram-se as raízes com água corrente e avaliou-se a severidade de sintomas, tanto na parte aérea como na radicular, utilizando a escala descrita em 4.2.1.4.

Da mesma maneira que nas experiências anteriores, procedeu-se ao reisolamento do patogénio a partir das raízes das plantas infestadas e testemunhas. A análise estatística dos dados realizou-se como referido em 4.2.1.6.

Resultados

Os sintomas da doença nas plantas infestadas consistiram na clorose e perda de viço das folhas, além de uma desfoliação mais ou menos intensa. A parte radicular apresentou-se com um número reduzido de raízes absorventes, que na maioria dos casos estavam mortas, necroses mais ou menos extensas nas raízes e ausência, ou reduzido número de raízes novas. A parte aérea das plantas testemunhas apresentou-se com folhas verdes, embora às vezes com uma ligeira clorose. O sistema radicular destas plantas tinha muitas raízes absorventes e muitas raízes novas de cor clara (Figura 4.7). Os valores da severidade de sintomas e a comparação de médias apresentam-se na Tabela 4.12. As análises de variância e comparações de médias expõem-se no Anexo V: F.

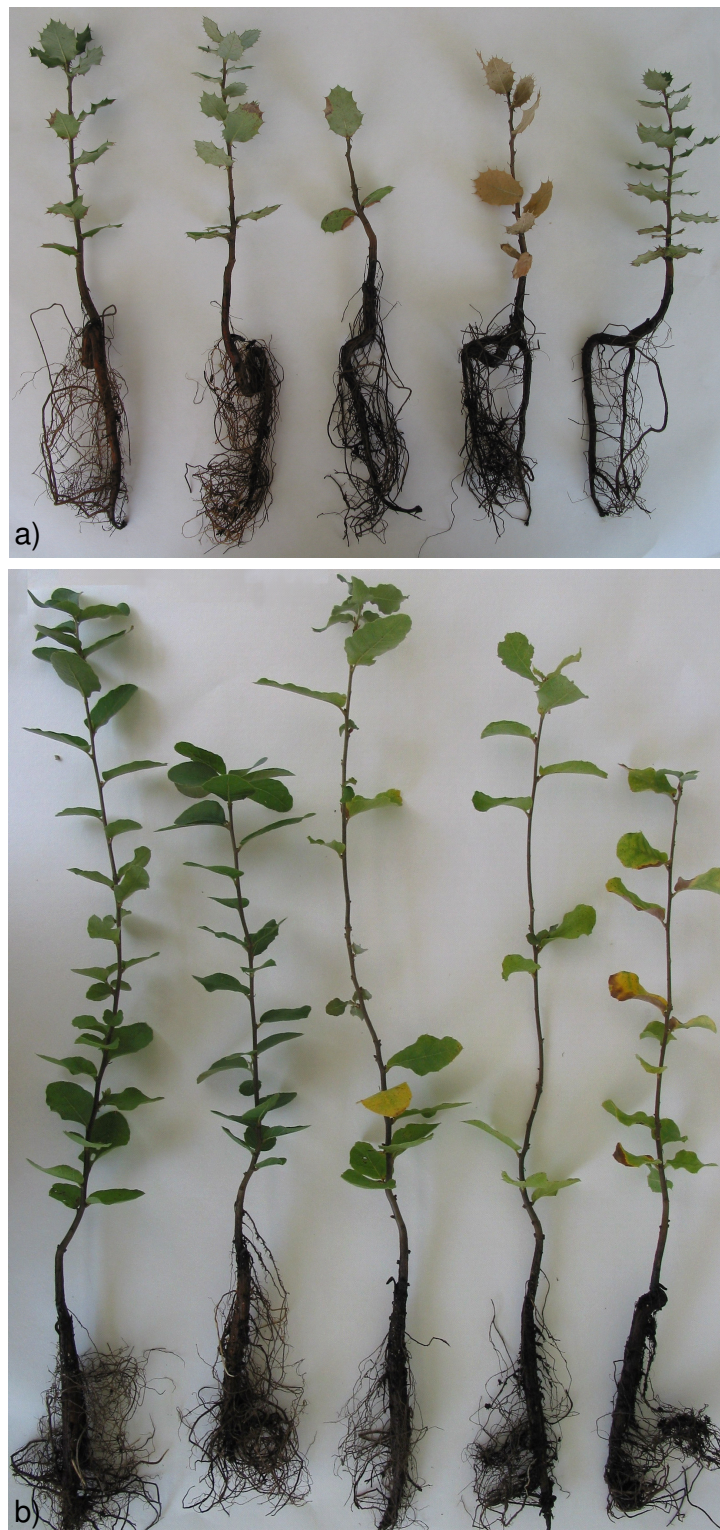


Figura 4.7 - Sintomas nas plantas infestadas com diferentes concentrações de zoósporos: a) azinheiras; b) sobreiros (da esquerda para a direita, concentração de zoósporos = 0; 6.500; 13.000; 32.500 e 162.500 zoósporos / ml).

Tabela 4.12 - Efeito da concentração de zoósporos de *Phytophthora cinnamomi* na manifestação de sintomas em plantas jovens de sobreiro e azinheira, desenvolvendo-se em vermiculite

Concentração de inóculo (Zoósporos / ml)	Severidade média de sintomas ¹			
	Parte aérea		Parte radicular	
	Sobreiro	Azinheira ²	Sobreiro	Azinheira
0	0,1 d	2,1	0,7 c	0,8 d
6.500	0,4 cd	2,0	1,9 b	1,9 c
13.000	1,7 bc	1,7	2,0 b	3,0 ab
32.500	2,4 ab	3,8	2,4 b	3,6 a
162.500	3,2 a	3,1	3,2 a	2,4 bc

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância da severidade de sintomas nas raízes mostrou diferenças significativas entre plantas infestadas e testemunhas, além da interacção planta-concentração de inóculo. Por outro lado, não se verificaram diferenças entre espécies de plantas.

Relativamente às plantas infestadas, a comparação de médias da severidade indicou que a concentração de inóculo mais baixa (6.500 zoósporos/ml) induziu uma severidade de sintomas significativamente menor do que as infestadas com as restantes concentrações de zoósporos.

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea mostrou diferenças significativas entre espécies de plantas e concentrações de inóculo. Assim, as comparações de médias indicaram que as azinheiras apresentaram uma severidade de sintomas mais elevada do que os sobreiros. Também a severidade média de sintomas das plantas infestadas com concentrações de zoósporos mais elevadas (32.500 e 162.500 zoósporos/ml) foi superior à das plantas infestadas com as concentrações de zoósporos mais baixas (6.500 e 16.250 zoósporos/ml), que não diferiram das testemunhas.

Na Figura 4.8 pode-se apreciar a variação da severidade de sintomas nas raízes em função da concentração de zoósporos para cada espécie de planta. Nos sobreiros a severidade de sintomas aumentou com o incremento da concentração de zoósporos, mas nas azinheiras a severidade de sintomas alcançou um máximo com 32.500 zoósporos/ml, diminuindo depois com o aumento da concentração de zoósporos.

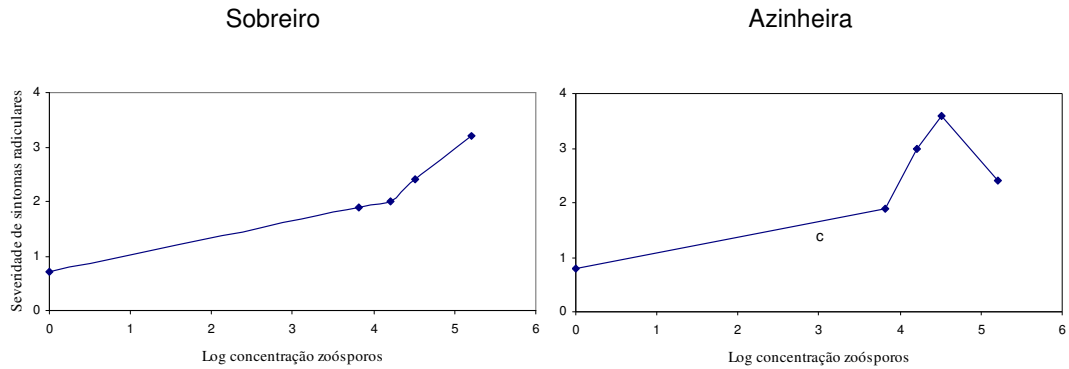


Figura 4.8 - Influência da concentração de zoósporos na severidade de sintomas nas raízes de plantas de sobreiro e azinheira com 18 meses.

Reisolou-se *P. cinnamomi* a partir de raízes das plantas infestadas com as concentrações mais elevadas de zoósporos (16.250, 32.500 e 162.500 zoósporos/ml) em percentagens que variaram entre 20,8 e 62,5%. Das plantas infestadas com a concentração de zoósporos mais baixa (6.500 zoósporos/ml) e das plantas testemunhas, não foi possível o reisolamento do patógeno.

4.3. DISCUSSÃO

Os sintomas da doença foram reproduzidos em plantas de sobreiro e azinheira, nas condições ensaiadas, utilizando diferentes métodos de infestação e distintos isolamentos de *P. cinnamomi*. Este resultado é uma nova contribuição para a demonstração de que este fungo é patogénico para sobreiros e azinheiras corroborando trabalhos anteriores realizados em Portugal e Espanha (Brasier *et al.* 1993a, 1993b; Brasier 1996; Tuset *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 2000a, 2002b; Moreira-Marcelino 2001; Rodríguez-Molina *et al.* 2002; Moreira 2003). Todas as plantas infestadas com o patógeno mostraram uma severidade de sintomas nas raízes significativamente mais elevada que a sintomatologia nas raízes das plantas testemunhas.

Os dois métodos de infestação utilizados, tanto com inóculo sólido como com inóculo líquido (4.2.1.), mostraram-se igualmente eficazes, não se tendo verificado diferenças significativas de severidade de sintomas nas raízes infestadas com qualquer dos métodos. Embora Dhingra e Sinclair (1995) considerem mais eficazes os métodos de infestação de raízes em que o inóculo é suspenso num meio nutritivo, os resultados obtidos demonstraram que o inóculo em suspensão aquosa sem nutrientes, foi tão eficaz como o inóculo constituído por uma mistura de grãos de aveia e

vermiculite enriquecida com extracto de cenoura, colonizada com *P. cinnamomi* (meio VAV8 modificado). Isto indica uma grande capacidade infecciosa deste patógeno nas condições de encharcamento em que decorreu a experiência. Com base nestes resultados passou a usar-se como inóculo a suspensão aquosa de micélio e clamidósporos em posteriores infestações de plantas, por ser o método menos laborioso quanto à sua preparação e de mais fácil utilização, à semelhança do utilizado por Sánchez *et al.* (2000a, 2002b, 2003a, 2005).

Uma vez encontrado um método de infestação de plantas expedito, a forma de avaliar a severidade de sintomas das plantas infestadas era uma questão importante a esclarecer. Nas experiências realizadas com este objectivo, verificou-se que o método semi-quantitativo da avaliação visual foi o que melhor expressou a severidade nas raízes. Pelo contrário, nenhum dos parâmetros utilizados conseguiu traduzir quantitativamente essa severidade, pelas razões já referidas nos resultados da *Experiência 4.B*, *Experiência 4.C* e *Experiência 4.D*. De facto, o método de avaliação visual de sintomas resultou mais eficaz porque permitiu examinar a funcionalidade das raízes, que não era possível ser detectada com os métodos quantitativos experimentados. Também Jung *et al.* (2001) verificaram que a estimativa visual da percentagem de raízes afectadas, indicava uma melhor avaliação do estado geral do sistema radicular, do que utilizando os parâmetros morfométricos.

No que se refere à variação da biomassa, as diferenças entre plantas infectadas e não infectadas, não foram detectadas. Isto aconteceu porque no curto período em que as experiências decorreram, as raízes embora mortas, ainda se encontravam presas à raiz principal, contribuindo por isso para o peso da planta. Com o tempo, essas raízes irão sendo decompostas e o peso do sistema radicular tenderá eventualmente a diminuir.

Bonilla (2002) avaliou a sintomatologia de azinheiras infestadas com *P. cinnamomi* utilizando o peso seco e verificou que quando utilizou plântulas de bolotas recém germinadas, o peso das que foram infestadas foi significativamente menor que o das testemunhas. Pelo contrário, quando infestou plantas já com alguns meses de idade, não se verificaram diferenças significativas de peso. Segundo este autor, as plantas infestadas, embora apresentassem raízes mortas, não pesaram menos que as testemunhas, uma vez que não houve tempo das raízes mortas se decompor e das testemunhas aumentarem a sua biomassa, devido ao curto período de duração do ensaio.

Segundo Weste (1983) a sobrevivência de uma planta infectada dependerá da sua capacidade para repor as raízes mortas. Também se constatou este facto no decurso deste estudo, quando em alguns casos, as plantas infectadas emitiram mais raízes novas do que as testemunhas.

A inadequação da utilização do peso da planta como parâmetro de avaliação da severidade de sintomas também se aplica, pelas mesmas razões, às variações da altura da planta e do diâmetro do caule. Quanto ao teor de clorofila como parâmetro de avaliação da severidade requer outras

condições que não foram previstas, para ser aferido, uma vez que será necessário um número suficiente de folhas durante todo o decurso da experiência. Assim, este parâmetro deverá ser medido com uma periodicidade a determinar, logo após a infestação das plantas.

Embora a bibliografia relativamente às doenças radiculares refira diferentes métodos quantitativos para a avaliação da severidade de sintomas (Zentmyer 1981; Moreira-Marcelino 2001; Tuset *et al.* 2001), recentemente, vários autores têm vindo a optar por métodos semi-quantitativos, pelas razões referidas (Sánchez *et al.* 2000a, 2000b, 2003a, 2005; Jung *et al.* 2001; Robin *et al.* 2001; Aline Greslebin do *Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico* - Argentina, comunicação pessoal).

Relativamente ao tipo de substrato, os resultados mostraram que a severidade foi mais acentuada quando se usou a mistura de areia, limo e turfa (solo limoso) do que quando se utilizou solo argiloso. Resultado diferente observou Moreira-Marcelino (2001) em que sobreiros e azinheiras que cresceram no solo de textura mais argilosa apresentaram sintomatologia mais severa. Também Stern *et al.* (1977a) observaram que solos argilosos conduziram a um grau de infecção mais elevado do que solos arenosos. Segundo Weste (1983) este facto deve-se à textura e estrutura dos solos argilosos que permitem uma maior retenção de água, favorecendo desta forma a actividade de *P. cinnamomi*.

A diferença de resultados pode ser explicada pelo facto de se terem utilizado substratos esterilizados, ao contrário daqueles autores, uma vez que a temperatura a que foram sujeitos terá possivelmente alterado as suas características.

Kannwischer e Mitchell (1981) referem que em estudos de epidemiologia de doenças causadas por patógenos de solo, devem ser usados solos que permaneceram sem culturas durante várias décadas, para uma melhor simulação das interacções biológicas que ocorrem na natureza.

Quanto à avaliação de virulência dos isolamentos dos diferentes grupos morfológicos, constatou-se não existirem diferenças significativas entre isolamentos de cada um dos grupos, em relação à capacidade para induzir sintomas nas raízes. Os isolamentos utilizados induziram sintomas igualmente severos nas raízes de sobreiros e azinheiras submetidas a condições de contínua saturação hídrica do solo.

As raízes das plantas testemunhas também apresentaram sintomas, embora ligeiros, atribuíveis às condições de encharcamento, visto que destas raízes nunca se reisolou *P. cinnamomi* ou outros patógenos.

Na parte aérea, os sintomas foram igualmente severos, não se verificando no entanto, diferenças significativas entre plantas infestadas e testemunhas, embora estas apresentassem uma severidade

ligeiramente mais baixa. Para esta sintomatologia terão contribuído, as condições drásticas de encharcamento a que as plantas foram submetidas.

O facto de não se terem observado diferenças significativas de severidade de sintomas na parte aérea, entre as plantas infestadas e testemunhas em algumas das experiências, pode ser devido à acção conjunta de três circunstâncias: as espécies de plantas utilizadas serem de crescimento lento; o ensaio ser de curta duração; os sistemas radiculares, embora danificados, ainda apresentarem no final das experiências, raízes funcionais que permitiram às plantas absorver os nutrientes para o desenvolvimento da parte aérea. Sobre esta última razão Erwin e Ribeiro (1996) referem que os sintomas na parte aérea de plantas lenhosas só se manifestam quando a parte radicular está severamente afectada.

Neste estudo o isolamento de *P. drechsleri* utilizado mostrou-se tão virulento como os de *P. cinnamomi*. *Phytophthora drechsleri* já tinha sido referida como a causa da morte de azinheiras em viveiro e a sua patogenicidade comprovada em plantas de sobreiro e azinheira (Sánchez *et al.* 2005). Estes autores verificaram que, embora *P. drechsleri* se mostrasse sempre patogénico, a severidade de sintomas nas raízes de sobreiros e azinheiras variou, dependendo da origem do isolamento. Contudo, neste trabalho, estas diferenças de virulência não se puderam observar, uma vez que se utilizou um único isolamento de *P. drechsleri*.

Entre isolamentos de *P. cinnamomi*, foi no entanto possível observar diferenças de virulência. Em condições de encharcamento contínuo o isolamento procedente de sobreiro mostrou-se mais virulento em raízes de sobreiros do que o isolamento procedente da azinheira, mas nas raízes de azinheiras os dois isolamentos mostraram-se igualmente agressivos (4.2.1.). No entanto, quando as condições de encharcamento não se verificaram, os isolamentos procedentes de azinheira e de sobreiro são igualmente virulentos, como se verificará no Capítulo 5 (5.2.2.).

Também, em estudos sobre patogenicidade em *Castanea sativa*, *Eucalyptus gunnii*, *Pinus pinaster*, *Q. palustris*, *Q. rubra* (Robin e Desprez-Loustau 1998), *E. smithii* (Linde *et al.* 1999), *Q. faginea*, *Q. petraea* e *Q. pyrenaica* (Tuset *et al.* 2001), *Q. ilex* e *Q. suber* (Tuset *et al.* 2001; Rodríguez-Molina *et al.* 2002) e plantas clonais de *E. marginata* (Hüberli *et al.* 2002), foram observadas diferenças de virulência entre diferentes isolamentos de *P. cinnamomi*.

Diferenças de virulência entre isolamentos procedentes de hospedeiros diferentes não são generalizáveis, uma vez que na *Experiência 4.E* (4.2.3.), tal não se verificou. Porém, só a continuação de estudos sobre variabilidade de virulência de isolamentos poderá esclarecer se as diferenças entre isolamentos de *P. cinnamomi* têm importância do ponto de vista fitopatológico.

Quanto aos substratos utilizados, os resultados indicaram que a vermiculite revelou-se o melhor. Não só permitiu um adequado desenvolvimento das plantas em recipientes de pequenas dimensões, como a manifestação de sintomas da doença num curto período. Este resultado, vem confirmar as vantagens da utilização deste substrato inerte, em estudos de laboratório, por evitar interferências nas relações entre o patogénio e as raízes, que outros substratos não conseguem.

Relativamente à influência da quantidade de inóculo na severidade de sintomas, os resultados mostram em geral que, tanto para os sobreiros, como para as azinheiras, a severidade nas raízes vai sendo mais severa à medida que a concentração de zoósporos aumenta. Vários autores também referem que o aumento da concentração de zoósporos de espécies de patogénios da família Pythiaceae é directamente proporcional à severidade de sintomas (Lipps e Bruehl 1980; Mitchell *et al.* 1978; Raftoyannis e Dick 2002).

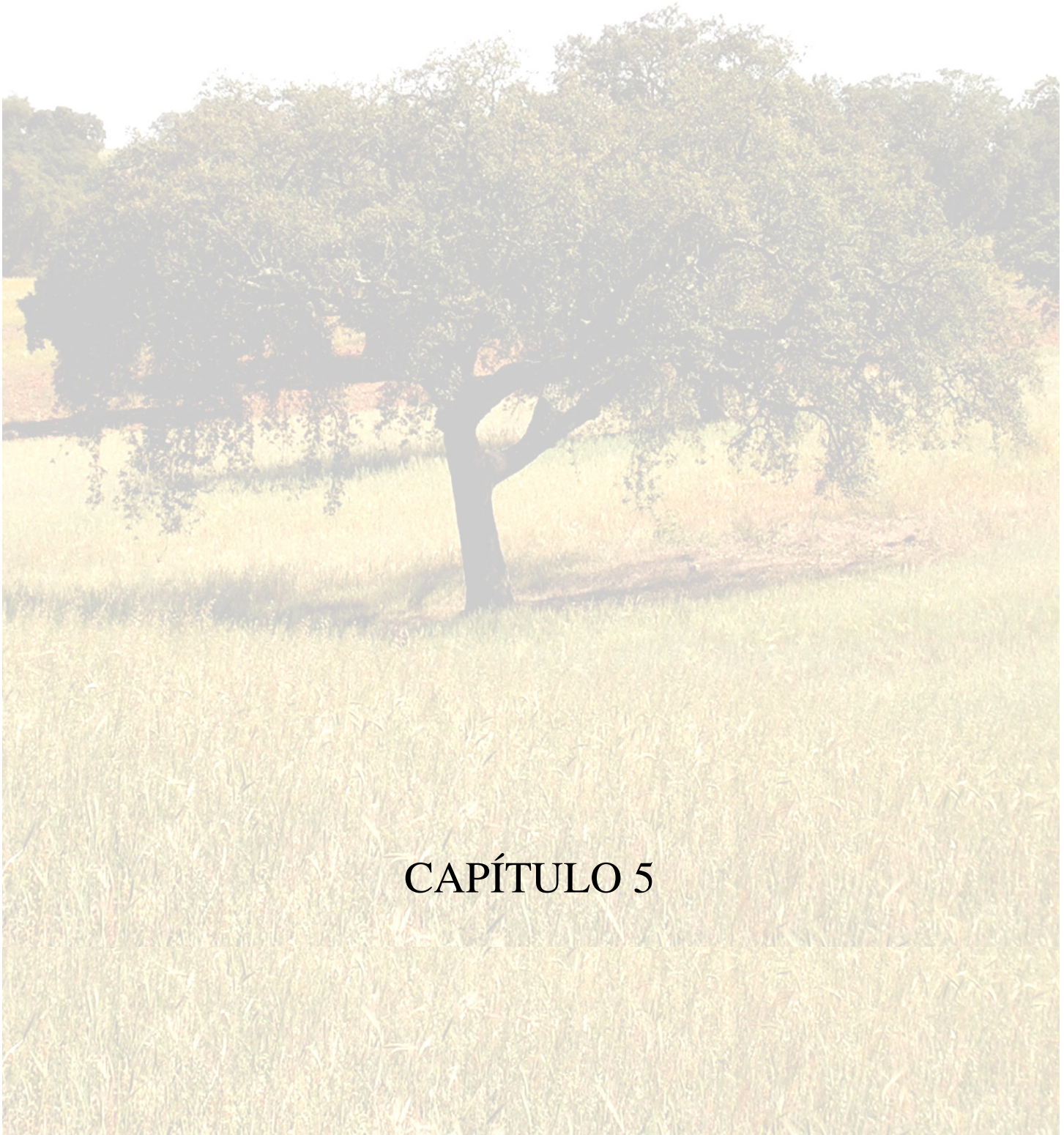
Por outro lado, os resultados mostram que, enquanto nos sobreiros, a severidade foi sempre aumentando com a concentração de zoósporos, nas azinheiras esse aumento verificou-se só até à concentração de 32.500 zoósporos/ml, a partir da qual, começou a decrescer. Resultado semelhante obteve Bonilla (2002) que também encontrou uma relação positiva entre a concentração de zoósporos e a sintomatologia na parte radicular de azinheiras infestadas com *P. cinnamomi*, mas a partir de determinada concentração de zoósporos, o aumento de concentração não correspondia a uma maior severidade nas raízes. Este autor também observou essa relação para a parte aérea das azinheiras.

O decréscimo da severidade de sintomas na azinheira, poderá ser devido ao facto de os zoósporos serem atraídos quimiosstaticamente, acumulando-se especialmente na zona de alongação das raízes ou nos pontos onde emergem as raízes laterais, como vários autores sugerem para outras espécies (Hinch e Weste 1979; Erwin e Ribeiro 1996; Hardham 2001). Segundo Raftoyannis e Dick (2002) a zona apical em plantas jovens é de dimensões reduzidas, pelo que fica completamente preenchida a partir de concentrações superiores a 10^4 zoósporos/ml. Estes autores apontam ainda outros factores que provocam uma redução da severidade de sintomas, tais como os que reduzem a disseminação do inóculo, a duração da mobilidade e/ou sobrevivência dos zoósporos. Como exemplo destes factores refere-se entre outros, o teor de água, a concentração de zoósporos e a microflora, respectivamente.

As diferenças de severidade de sintomas observadas em sobreiros e azinheiras, às várias concentrações de zoósporos, poderão ser atribuídas à diferente atracção do patogénio ao estímulo químico provocado por cada uma destas espécies. Vários autores referem este efeito de atracção, que diferentes hospedeiros, de espécies do mesmo género, exercem sobre o patogénio. Tuset *et al.* (2001) tendo infestado cinco espécies do género *Quercus*, com crescentes concentrações de

zoósporos, observaram que *Q. rotundifolia* foi a espécie que se mostrou mais afectada. Enquanto que a infestação desta espécie com 10.000 zoósporos/ml, ao fim de 50 dias, foi suficiente para causar infecções radiculares, *Q. pyrenaica* necessitou de uma concentração 5 vezes superior (50.000 zoósporos/ml) e *Q. suber*, *Q. faginea* e *Q. petraea* de uma concentração 10 vezes mais elevada (100.000 zoósporos/ml).

Os resultados nas experiências realizadas não indicaram claramente que os sintomas apresentados pelas raízes das azinheiras sejam mais severos do que os exibidos pelos sobreiros. Existem no entanto, vários trabalhos que referem a azinheira como mais susceptível do que o sobreiro (Moreira-Marcelino 2001; Robin *et al.* 2001; Tuset *et al.* 2001; Pires 2005).



CAPÍTULO 5

CAPITULO 5

EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS NA SEVERIDADE DE SINTOMAS CAUSADOS POR *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

5.1. INTRODUÇÃO

Uma doença manifesta-se quando, no mesmo local e ao mesmo tempo, se conjugam um hospedeiro susceptível, um patogénio e condições ambientais favoráveis à interacção de hospedeiro e patogénio. Isto explica o facto de, por vezes, um patogénio estar presente numa comunidade de plantas e não causar doença por se verificar um equilíbrio ecológico entre o patogénio e as espécies de hospedeiros presentes. Contudo, noutra local pode causar doença e morte de plantas da mesma espécie (Weste 1983). A expressão da doença provocada por *P. cinnamomi* varia de local para local porque a actividade do patogénio é influenciada pela temperatura, disponibilidade de água, nutrientes e tipo de solo (Weste e Marks 1987; Marks e Smith 1991; Erwin e Ribeiro 1996).

As doenças causadas por patogénios da família Pythiaceae ocorrem em geral com condições desfavoráveis para outros patogénios e para o hospedeiro (Hendrix e Campbell 1973).

Segundo Ribeiro (1983) a temperatura é um parâmetro crítico para a produção de propágulos infecciosos e para a infecção e, embora muitas espécies patogénicas desta família, se desenvolvam bem numa ampla gama de temperaturas, geralmente a temperatura óptima situa-se num intervalo muito restrito.

A temperatura do substrato afecta a velocidade do desenvolvimento da doença, a severidade de sintomas causada por *P. cinnamomi* (Zentmyer 1980), bem como a susceptibilidade do hospedeiro (Grant e Byrt 1984; Hüberli *et al.* 2002). Em geral, os sintomas nas raízes aumentam com temperaturas próximas de 30°C e não se manifestam com temperatura muito baixas ou muito altas (Dhingra e Sinclair 1985).

O aumento da temperatura que se vem verificando a nível mundial, tem sido responsabilizado, por vários autores, pelo aparecimento de surtos de doenças em zonas onde até então não havia registos da sua ocorrência. Brasier e Scott (1994) referem que o aumento da temperatura incide directamente na actividade dos agentes que causam pragas e doenças, além da sua acção indirecta, no caso das doenças, na relação hospedeiro-patogénio.

Marçais *et al.* (1993) fazem referência ao facto do aquecimento do clima poder aumentar a actividade de *P. cinnamomi*, onde a doença já exista. Brasier e Scott (1994) referem também que o gradual aumento de temperatura pode aumentar a acção de *P. cinnamomi* em muitas áreas que antes não eram próprias para esta espécie.

Fernández-Cancio (2000) refere que as alterações climáticas que estão a acontecer, estão relacionadas com a morte de *Quercus* spp. e que esta perturbação climática que afectou Espanha durante todo o século XX, foi especialmente acentuada no início dos anos 80 desse século, altura a partir da qual o declínio de *Quercus* tem vindo a ser mais referenciado. Este autor cita que num estudo realizado no *Parque de los Alcornocales* na província de Cádiz em Espanha se verificou um aumento da temperatura média anual, máxima e mínima de 3°C desde 1985.

O autor citado refere que, embora se verifiquem situações de diminuição de precipitação, a quantidade de água mantém-se ainda com valores aceitáveis para os sobreiros, no entanto, a temperatura aumentou consideravelmente. Para este autor a combinação simultânea de ambas as tendências climáticas causa um *stress* considerável nas árvores, que por si só pode ser mortal ou pode aumentar a acção de outros agentes, por exemplo os bióticos.

O efeito da temperatura na interacção hospedeiro-patogénio em plantas de sobreiro e azinheira infestadas com *P. cinnamomi* não foi ainda avaliado. Por isso não se sabe se a infecção será também tão severa num cenário de aumento de temperatura global do planeta.

Também o teor de água no solo afecta directa ou indirectamente a severidade da doença causada por *P. cinnamomi*. Um teor de água elevado favorece a colonização dos tecidos do hospedeiro por *P. cinnamomi* (Marks e Smith 1991), podendo ser a extensão da infecção reduzida em hospedeiros sujeitos a défice hídrico (Tippett *et al.* 1987; Weste e Marks 1987). Sabe-se que o encharcamento aumenta a produção de zoósporos de *P. cinnamomi* e a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por este patogénio (Shearer e Tippett 1989; Erwin e Ribeiro 1996). Vários autores mostraram que a infecção de raízes de vários hospedeiros, por outras espécies de *Phytophthora*, também é agravada quando o solo se encontra saturado por longos períodos (Duniway 1979, 1983; Wilcox e Mircetich 1979; Sánchez *et al.* 2000a, 2002b, 2005). Burgess *et al.* (1999) observaram que a mortalidade de árvores jovens de *E. marginata* é mais elevada em locais sujeitos a encharcamento e que neste caso as plantas com hipoxia radicular têm mais dificuldade em reconhecer o patogénio e induzir uma rápida resposta à infecção. Verifica-se assim que a alteração do estado fisiológico do hospedeiro pode diminuir a resistência das plantas ao ataque por espécies de *Phytophthora* (Duniway 1983).

O teor de água no solo e a sua permeabilidade são os factores que mais influenciam o desenvolvimento da infecção de *P. cinnamomi* no abacateiro (Stern *et al.* 1977b). A frequência e a duração das regas determina o grau de progressão da infecção causada por espécies do género *Phytophthora*, como é o caso do abacateiro (Zentmyer e Richards 1952), do tomateiro (Ristaino *et*

al. 1988) e de plantas de azinheira em viveiro (Sánchez *et al.* 2005). Estudos com plantas de *Q. rubra* infectadas com *P. cinnamomi*, mostraram que a severidade da doença da tinta era mais elevada, especialmente quando se verificaram períodos de seca seguidos de períodos de chuva (Marçais *et al.* 1993).

O estudo de factores climáticos na doença do declínio causada por *P. cinnamomi* permite conhecer o efeito destes no desenvolvimento da doença e também prever o comportamento das plantas jovens após instalação em áreas infestadas sujeitas a reflorestação.

Neste capítulo o objectivo foi estudar em plantas jovens de sobreiro e azinheira: a) o efeito da temperatura no processo de infecção e na severidade de sintomas da doença em condições hídricas adequadas para a infecção; b) a evolução da infecção causada por *P. cinnamomi* em plantas submetidas a dois regimes hídricos.

5.2. EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS

5.2.1. Influência da temperatura na severidade de sintomas em azinheiras (*Experiência 5.A*)

As azinheiras utilizadas nesta experiência com 18 meses de idade foram obtidas na Universidade de Córdoba. As plantas transferiram-se para recipientes de 1000 ml de capacidade com vermiculite, seguindo o procedimento referido na *Experiência 4.I*. Por cada temperatura ensaiada utilizaram-se doze plantas que foram colocadas em incubadoras ajustadas a 10, 15, 20, 25 e 30°C e com 12 h luz/dia (Figura 5.1).

Ao fim de 1 semana, seis plantas, de cada temperatura, foram infestadas com 100 ml de uma suspensão de uma mistura de zoósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₉₅ em extracto de solo e, as restantes seis foram usadas como testemunhas. Para a obtenção de zoósporos seguiu-se o procedimento descrito em 4.2.4.2. A concentração de inóculo utilizada foi de 32.500 zoósporos/ml por ser a que na *Experiência 4.I* induziu uma maior severidade de sintomas nas azinheiras. Às plantas testemunhas foi adicionado o mesmo volume de extracto de solo livre de zoósporos. A unidade experimental foi uma planta por recipiente.

Devido ao reduzido espaço das incubadoras, os recipientes com as plantas testemunhas foram colocados numa posição ligeiramente superior aos das plantas infestadas, para prevenir que,

durante a rega, salpicos de água dos recipientes com plantas infestadas atingissem as plantas testemunhas.



Figura 5.1 - Plantas em vermiculite dentro da incubadora.

Durante o período em que decorreu a experiência as necessidades em nutrientes foram satisfeitas, aplicando semanalmente a todas as plantas 50 ml de solução nutritiva $\frac{1}{2}$ de Hoagland (Anexo V: E.). As plantas foram regadas com água destilada, duas vezes por semana, conforme as necessidades. O volume de água aplicado variou entre 100 e 300 ml, conforme a temperatura.

A experiência terminou 6 semanas depois da infestação, quando a maior parte das plantas infestadas às várias temperaturas apresentaram sintomas na parte aérea.

Uma vez terminada a experiência, seguiram-se os procedimentos referidos para as experiências do Capítulo 5, para a avaliação da severidade dos sintomas nas partes aérea e radicular, reisolamento do patogénio a partir das raízes e análise estatística dos resultados.

Resultados

As azinheiras infestadas apresentaram em todas as temperaturas os sintomas referidos no Capítulo 4 para as plantas infectadas com *P. cinnamomi* (4.2.1.7.). As testemunhas mostraram um crescimento considerado normal para as condições em que se desenvolviam.

Na Tabela 5.1 podem-se apreciar os valores da severidade de sintomas na parte aérea e radicular e as respectivas comparações de médias. As análises de variância e as comparações de médias indicam-se no Anexo VI: A.

Tabela 5.1 - Efeito da temperatura no processo de infecção e na severidade de sintomas em plantas jovens de azinheira

Temperatura (°C)	Inóculo	Severidade média de sintomas ¹	
		Parte aérea	Parte radicular
10	Infestadas	2,9 ab	2,3 bc
	Testemunhas	3,1 a	1,2 d
15	Infestadas	1,4 cd	2,5 b
	Testemunhas	1,1 d	1,5 d
20	Infestadas	2,9 ab	2,9 ab
	Testemunhas	2,8 abc	1,5 d
25	Infestadas	2,8 abc	3,2 a
	Testemunhas	1,5 bcd	1,8 cd
30	Infestadas	2,0 abcd	3,1 a
	Testemunhas	1,6 abcd	1,5 d

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância para a avaliação visual da severidade de sintomas para a parte radicular das azinheiras, não revelou diferenças significativas entre as plantas às diferentes temperaturas. Em cada temperatura as plantas infestadas apresentaram uma severidade de sintomas nas raízes significativamente mais elevada que a exibida pelas plantas testemunhas. Pelo contrário, tal não se verificou em relação à severidade de sintomas manifestada na parte aérea, em que as infestadas não diferiam das testemunhas. A moderada severidade observada nas raízes terá permitido a existência de raízes funcionais suficientes para as plantas infestadas apresentarem sintomas ligeiros semelhantes aos das testemunhas.

No final da experiência conseguiu-se reisolar *P. cinnamomi* a partir de raízes das plantas infestadas em todas as temperaturas, com percentagens de isolamento que variaram entre 11,1 e 13,9%. O patogénio não foi reisolado de nenhuma das testemunhas.

Esta experiência foi também realizada com sobreiros. Contudo, os resultados obtidos não foram conclusivos, uma vez que a severidade média de sintomas nas folhas e nas raízes, não diferiu entre plantas testemunhas e plantas infestadas nas várias temperaturas. Este resultado poderá explicar-se pelo facto de, durante a preparação da experiência, o manuseamento dos sobreiros ter sido realizado quando a temperatura ambiente era muito elevada. Uma segunda tentativa deu idênticos resultados. A imposição dos prazos para conclusão do trabalho impediu a repetição desta experiência na época em que havia decorrido a experiência com azinheiras.

5.2.2. Influência do teor de água no solo na severidade de sintomas em *Quercus suber* e *Q. rotundifolia* (Experiência 5.B)

Resultados de experiências anteriores já haviam demonstrado que o encharcamento contínuo (4.2.1.; 4.2.3), ou por períodos curtos (4.2.2.), favorecia o desenvolvimento da infecção por *P. cinnamomi*. Contudo, ainda não se tinha apreciado as diferenças de severidade de sintomas entre plantas sujeitas a encharcamento contínuo e rega normal.

Nesta experiência utilizaram-se sobreiros e azinheiras com 18 meses de idade procedentes de um viveiro comercial. Para a infestação das plantas usaram-se dois isolamentos de *P. cinnamomi*. Um terço das plantas foram infestadas com o isolamento PA₁₂, o outro terço com o PE₅₅ e as restantes foram utilizadas como testemunhas. A preparação do inóculo, o método de infestação e o substrato utilizado foram os referidos em 4.2.1.2. Durante a primeira semana, as plantas foram colocadas em tabuleiros e mantidas numa câmara de crescimento nas condições referidas na *Experiência 4.A* em 4.2.1.3. Findo este período, as plantas infestadas e testemunhas, foram submetidas a dois regimes hídricos:

- a) Saturação constante – Metade dos vasos de plantas infestadas e testemunhas foram parcialmente inundados. Durante todo o tempo em que decorreu a experiência, os vasos permaneceram imersos com o nível de água 2-3 cm abaixo da superfície do substrato, adicionando periodicamente a água perdida por evapotranspiração.
- b) Rega normal – A outra metade das plantas foi regada segundo as necessidades, uma ou duas vezes por semana.

O delineamento experimental foi de seis repetições por espécie de planta, isolamento e regime hídrico, e suas correspondentes testemunhas. A unidade experimental foi um vaso com uma planta. Todas as plantas permaneceram na câmara de crescimento com 14 horas de luz/dia e temperatura média entre 20 e 24°C e 49-87% de humidade relativa.

Para as plantas submetidas a saturação constante a experiência deu-se por concluída 1 mês depois da submersão dos vasos, quando a sintomatologia na parte aérea já era severa. Para as plantas com rega normal, a experiência terminou ao fim de 6 meses após a sua infestação, altura em que por imposição de prazos teve que se dar por terminada a experiência. Nos últimos 2 meses estas plantas permaneceram numa estufa com uma temperatura média entre 6,3 e 24,9°C.

Quando a experiência se deu por concluída para cada um dos regimes hídricos, avaliou-se a severidade de sintomas na parte aérea e na raiz e tentou-se o reisolamento do patógeno usado na infestação das plantas, a partir das suas raízes, tal como na *Experiência 5.A*.

A análise estatística dos resultados realizou-se de forma idêntica à das experiências anteriores, analisando os resultados dos dois regimes hídricos separadamente.

Resultados

Os sintomas apresentados pelas plantas infestadas, submetidas a saturação constante, tanto na parte aérea, como na parte radicular, eram em geral severos e foram semelhantes aos das plantas infestadas, referidos noutras experiências. As testemunhas, submetidas ao mesmo regime hídrico, apresentaram somente uma ligeira clorose nas folhas e sistema radicular considerado com um desenvolvimento normal para as condições em que as plantas cresciam.

Todas as plantas submetidas a rega normal, apresentaram um bom desenvolvimento da parte aérea, independentemente de terem sido infestadas ou tratarem-se de testemunhas. No entanto, o sistema radicular das plantas infestadas estava severamente afectado e apresentou os sintomas característicos das plantas infectadas com *P. cinnamomi*. Pelo contrário, as raízes das testemunhas estavam bastante desenvolvidas e não apresentaram sintomas de doença.

Os valores médios da severidade de sintomas, assim como as comparações de médias correspondentes aos dois regimes hídricos apresentam-se na Tabela 5.2. As análises de variância e comparações de médias desta experiência encontram-se no Anexo VI: B.

Tabela 5.2 - Valores médios da severidade de sintomas em sobreiros e azinheiras submetidos a saturação constante e a rega normal

Isolamento	Saturação constante ^{1,2}		Rega normal ^{1,3}	
	Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea ⁴	Parte radicular
PA ₁₂	3,1 a	3,3 a	1,6	3,4 a
PE ₅₅	2,3 a	2,2 b	1,5	3,2 a
Test. ⁵	0,7 b	0,5 c	0,8	1,3 b

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Plantas avaliadas depois de 1 mês de saturação constante; ³ Plantas avaliadas depois de 6 meses do início da experiência; ⁴ Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; ⁵ Testemunha; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

Para as plantas submetidas a saturação constante a análise global de variância para a avaliação visual dos sintomas, tanto para as raízes, como para parte aérea, não indicou diferenças significativas entre sobreiros e azinheiras. Igualmente, tanto para a parte radicular como para a parte aérea, a análise mostrou que as plantas infestadas apresentaram sintomas significativamente mais severos do que as plantas testemunhas. Em relação à parte radicular foi ainda possível apreciar diferenças entre os dois isolamentos, tendo o PA₁₂ causado sintomas mais severos do que o PE₅₅.

Em relação às plantas submetidas a rega normal, a análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular indicou diferenças significativas entre sobreiros e azinheiras e entre plantas testemunhas e infestadas. A severidade de sintomas apresentada pelas azinheiras foi mais severa do que a dos sobreiros. Do mesmo modo que no regime de saturação constante, as plantas infestadas apresentaram-se claramente mais afectadas do que as plantas testemunhas, não se evidenciando porém diferenças significativas entre os dois isolamentos. Quanto à severidade de sintomas na parte aérea, a análise de variância não evidenciou nenhuma diferença significativa entre as variáveis.

Depois de 6 meses do início da experiência os sintomas nas raízes ainda não se tinham repercutido na parte aérea, possivelmente porque, durante grande parte do decurso da experiência, as plantas tiveram sempre a capacidade de ir repondo as raízes que iam morrendo devido à doença.

No final da experiência reisolou-se *P. cinnamomi* das plantas infestadas, em percentagens superiores a 93,3% nas plantas submetidas a saturação hídrica e a 12,5% nas plantas submetidas a rega normal. Em nenhum caso se reisolou o patogénio das plantas testemunhas.

5.3. DISCUSSÃO

No que se refere à temperatura os resultados mostraram que este factor não foi limitativo do processo infeccioso e da manifestação de sintomas causado por *P. cinnamomi*, uma vez que o sistema radicular das azinheiras infestadas estava muito afectado, a todas as temperaturas ensaiadas, mesmo o das plantas que se desenvolviam a 10°C. No entanto, não se verificou qualquer relação entre temperatura e severidade da doença nas raízes. O sistema radicular das testemunhas apresentou um desenvolvimento normal, independentemente da temperatura.

Estes resultados são diversos dos apresentados por outros autores que convergem no sentido de considerarem a temperatura determinante da actividade patogénica de *P. cinnamomi*. Zentmyer (1981) verificou que a infecção de abacateiros por *P. cinnamomi* estava relacionada com a temperatura do solo, existindo uma correlação positiva entre a redução do peso da raiz a diferentes temperaturas e o desenvolvimento do patogénio. Trabalhos realizados com *Eucalyptus* spp. mostraram que a temperaturas mais altas, a extensão das lesões nas raízes causadas por *P. cinnamomi* é maior (Grant e Byrt 1984; Shearer *et al.* 1987; Hüberli *et al.* 2002). Estes últimos autores verificaram que a severidade de sintomas aumentou significativamente de 20 para 25°C.

Robin *et al.* (1994) verificaram que a temperatura é o factor determinante nas florestas de *Q. rubra* em França. Estes autores observaram uma correlação positiva entre a temperatura e o desenvolvimento de lesões causadas por *P. cinnamomi* no tronco das árvores. Assim, nos meses de Inverno, quando a temperatura era menor que 10°C não observaram lesões, mas em Junho, quando a temperatura já era alta, verificaram um maior desenvolvimento de lesões. Isto deve-se, segundo estes autores, à maior susceptibilidade deste hospedeiro à infecção por *P. cinnamomi* na época em que o crescimento de *Q. rubra* é mais activo.

Também Moreira-Marcelino (2001) refere que sobreiros em que a infecção com *P. cinnamomi* decorreu a temperaturas mais elevadas, mostraram uma maior severidade de sintomas, do que quando a infecção teve lugar a temperaturas mais baixas.

Estas divergências de resultados poder-se-á atribuir por um lado, ao facto de se tratar de distintos hospedeiros desenvolvendo-se em diferentes condições edáficas e por outro, à elevada susceptibilidade da azinheira à infecção por *P. cinnamomi*. A conjugação destes factores poderá ter

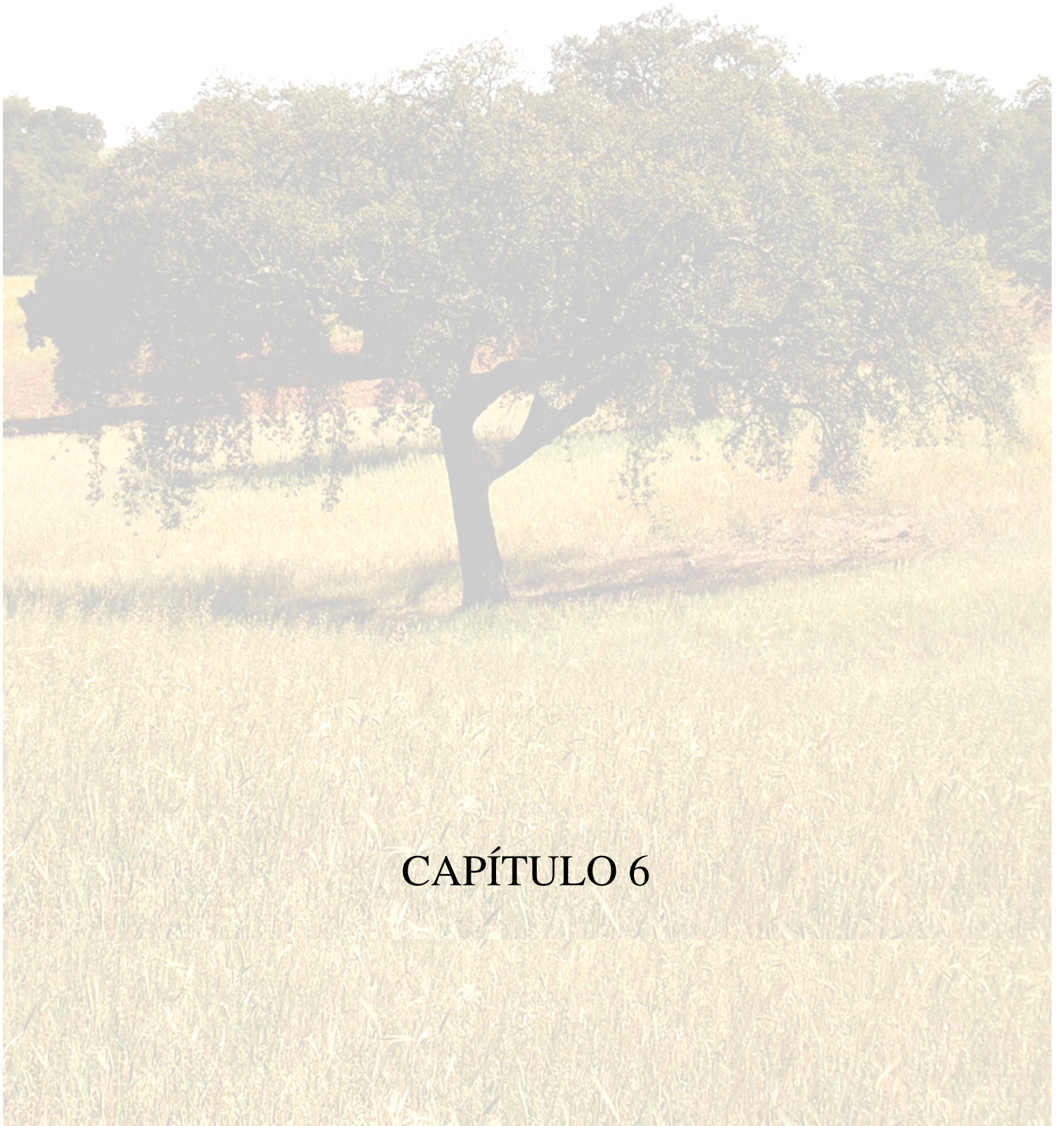
contribuído para o diferente comportamento da azinheira que, mesmo às temperaturas menos favoráveis à actividade de *P. cinnamomi*, apresentou o sistema radicular tão afectado como às temperaturas que a bibliografia refere serem mais favoráveis.

No que diz respeito à influência do teor de água do solo, os resultados confirmaram que o desenvolvimento da doença em plantas sujeitas a encharcamento, é mais rápido do que em plantas submetidas a rega normal. Não obstante, o desenvolvimento mais lento da sintomatologia, o sistema radicular das plantas submetidas a este regime hídrico, apresentou-se severamente danificado. Em condições controladas, também Tuset *et al.* (1996) concluíram que o encharcamento periódico do solo aumenta a infecção das raízes por *P. cinnamomi*.

A existência simultânea do encharcamento e do patogénio provocou um efeito sinérgico no desenvolvimento da doença, uma vez que as testemunhas não mostraram sintomas de deficiente desenvolvimento ao fim de 1 mês de encharcamento, enquanto que as plantas infestadas estavam severamente afectadas.

Períodos prolongados de seca severa intervalados por períodos curtos de chuvas intensas, são frequentes no Sul de Portugal e Espanha. Segundo Brasier (1996) e Fernández-Cancio (2000) a tendência para um aumento destas condições extremas tem vindo a acentuar-se. Assim, o aumento da frequência de chuvas intensas, poderá resultar num agravamento da severidade das infecções causadas por *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras, no caso dos solos não permitirem uma adequada drenagem.

Estes resultados levam a admitir que num cenário de alteração de condições climáticas globais, a doença do declínio de sobreiros e azinheiras causada por *P. cinnamomi* na Península Ibérica, será mais favorecida pela quantidade de água disponível no solo do que pelo aumento da temperatura.



CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6

CONTROLO QUÍMICO DO DECLÍNIO

6.1. INTRODUÇÃO

O controlo químico dos patogénios de plantas do género *Phytophthora* é uma prática comum na agricultura (Guest *et al.* 1995; Erwin e Ribeiro 1996). Uma vasta gama de compostos está disponível comercialmente, com substâncias activas, formulações e tipos de aplicação próprios para cada espécie. Doses de substância activa, tempo de aplicação, fitotoxicidade, potencial risco de resistência do patogénio ao produto, são considerações a ter em conta quando se planeia uma aplicação química. Nos ecossistemas naturais o controlo químico é mais problemático. No entanto, este controlo é por vezes uma importante ferramenta para situações específicas, por exemplo, erradicar um patogénio de um foco limitado ou proteger espécies ameaçadas (Hardy *et al.* 2001).

O controlo de uma doença policíclica, como a que causa *P. cinnamomi* em *Quercus* spp. em Portugal e Espanha, só é eficaz se a taxa de incremento da doença mantiver valores reduzidos ou mesmo nulos. O controlo químico da doença depende do modo de acção do produto a nível fisiológico, numa ou mais fases do ciclo de vida deste patogénio. Qualquer substância química que actue, quer durante a fase de produção dos esporângios, quer durante os primeiros estádios da infecção no hospedeiro, deverá reduzir a capacidade de *P. cinnamomi* causar doença (Matheron e Porchas 2000).

Nos anos 70 do século XX desenvolveram-se novas classes de fungicidas capazes de controlar Oomicetes (Cohen e Coffey 1986), o que veio permitir uma maior eficácia no controlo químico destes patogénios. Desses fungicidas, alguns apresentam propriedades extremamente úteis contra várias espécies de *Phytophthora*: o metalaxil da classe das fenilamidas e especialmente o fosetil de alumínio e o fosfito de potássio, da classe dos fosfonatos (Schwinn 1983; Coffey 1991). Estes fungicidas são sistémicos e têm a vantagem de poder controlar a doença depois da infecção ocorrer (Erwin e Ribeiro 1996).

A utilização do metalaxil é um avanço no controlo das doenças causadas por espécies de *Phytophthora*, por causa de ser solúvel em água, eficaz a baixas concentrações (<1 ppm), transportado no xilema e persistir no solo por períodos relativamente longos (Coffey 1991; Erwin

e Ribeiro 1996). É aplicado no solo tanto em solução, como em granulado, em muitas culturas hortícolas, frutícolas e ornamentais (Erwin e Ribeiro 1996).

Apesar das vantagens do metalaxil, o desenvolvimento de resistência ao fungicida em várias espécies de *Phytophthora* é um importante problema que limita a sua aplicação, como por exemplo no controlo do míldio da batateira causado por *P. infestans* (Erwin e Ribeiro 1996; Mukalazi *et al.* 2001).

O modo de acção do metalaxil é específico, inibindo a síntese do RNA ribossómico (rRNA) das espécies de *Phytophthora* e é provavelmente regulado por um único gene (Erwin e Ribeiro 1996). Davidse (1987) citado por Erwin e Ribeiro (1996), explica que a inibição do rRNA em última análise conduz à inibição do crescimento de *Phytophthora* porque priva a célula de ribossomas que regulam a síntese proteica. Consequentemente, o metalaxil não inibe a germinação dos esporângios ou dos zoósporos enquistados, ao contrário do efeito inibidor que causa no crescimento do micélio, porque estes esporos têm aparentemente suficientes ribossomas para formar o tubo germinativo. Contudo, quando o tubo germinativo desses esporos penetra nos tecidos, o metalaxil entretanto absorvido pela planta, causa mal formação e paragem de crescimento do micélio.

O estudo da população de *P. nicotianae* de citrinos na Florida, revelou que uma alta percentagem de isolamentos permaneceu resistente ao metalaxil, mesmo depois de 2,5 anos sem tratamento dos pomares com o fungicida (Timmer *et al.* 1998). Segundo estes autores os isolamentos resistentes toleram concentrações elevadas de metalaxil, verificando-se que por vezes estes isolamentos crescem inclusivamente melhor na presença desta substância (100 µg/l).

No trabalho realizado por Benson e Grand (2000) todos os isolamentos de *P. cinnamomi* isolados da conífera *Abies fraseri* (Pursh.) Poir. tratadas com metalaxil, foram sensíveis a concentrações de 1 ou 1,25 µg de metalaxil /ml. Estes autores concluíram que o patogénio não desenvolve resistência ao fungicida quando é usado duas ou três vezes por ano. No entanto, advertem que embora o metalaxil seja uma ferramenta útil no controlo de *P. cinnamomi*, só deverá ser usado nas quantidades recomendadas para assegurar que o patogénio permaneça sensível ao produto. Também se recomenda a utilização conjunta do metalaxil com um fungicida com modo de acção diferente, como um protector, para impedir a germinação dos esporos (Erwin e Ribeiro 1996).

Os fosfonatos são sais ou ésteres do ácido fosfónico (H₃PO₃), vulgarmente referidos como fosfitos, quando usados para controlar *Phytophthora* spp. não incluindo os compostos com um grupo orgânico ligado ao ião fósforo (Hardy *et al.* 2001). Os fosfitos são translocados quer pelo xilema, quer pelo floema (Ouimette e Coffey 1989; Coffey 1991; Erwin e Ribeiro 1996; Aberton *et al.* 1999). No floema são translocados com os fotoassimilados (Jackson *et al.* 2000).

O fosetil de alumínio (fosfonato tris-O-etil de alumínio) é um fungicida da classe dos fosfonatos amplamente usado no controlo de espécies de Peronospolares que causam doenças quer na parte aérea, quer na parte radicular (Matheron e Matejka 1988; Ouimette e Coffey 1989). O aparecimento desta substância é considerado um marco no controlo de doenças causadas por espécies de *Phytophthora* não obstante a sua fraca actividade no controlo de *P. infestans* e de *P. sojae* (Erwin e Ribeiro 1996).

Por causa da sua mobilidade no floema, o fosetil, pode ser aplicado quer nas folhas quer por injeção no tronco, para controlo de muitas espécies de *Phytophthora* que causam doenças radiculares, nomeadamente em citrinos e abacateiros (Farid *et al.* 1981; Schwinn 1983; Coffey *et al.* 1984; Coffey e Joseph 1985).

Este fungicida tem uma acção directa sobre espécies de *Phytophthora* (Fenn e Coffey 1989). Na planta é metabolizado na forma de ácido fosfónico (Cohen e Coffey 1986). Uma vez no interior da planta é muito estável (Ouimette e Coffey 1989) e aparentemente não é rapidamente oxidado em fosfato (HPO_4^{-2}), o que possivelmente explica a excepcional duração do efeito no controlo de doenças causadas por *Phytophthora* spp. (Rohrbach e Schenk 1985).

A infecção de raízes de abacateiro causada por isolamentos de *P. cinnamomi* resistentes ao metalaxil foi geralmente controlada por fosetil de alumínio, embora esta substância fosse fitotóxica quando aplicada ao solo em concentrações elevadas (Timmer *et al.* 1998).

Os resultados de estudos realizados em abacateiro, revelaram que a combinação de práticas culturais, como podas severas, com o uso de metalaxil e fosetil de alumínio foram promissores (Coffey *et al.* 1984). Inicialmente o metalaxil produziu uma recuperação mais rápida, enquanto a aplicação foliar de fosetil foi menos eficaz. Contudo, no ano seguinte, o metalaxil revelou-se menos eficaz em controlar *P. cinnamomi* e o vigor da árvore declinou significativamente. Este estudo concluiu que o controlo mais eficaz da infecção em abacateiros adultos foi conseguido com aplicações foliares de fosetil de alumínio.

Mais recentemente, o fosfito de potássio tem vindo a ser largamente usado no controlo de várias espécies de *Phytophthora* para proteger ecossistemas naturais raros, especialmente plantas da floresta de *Eucalyptus marginata* e *Banksia* spp. na parte Ocidental da Austrália (Hardy 1999; Fairbanks *et al.* 2001; Hardy *et al.* 2001; Smith 2001; Shearer *et al.* 2004).

Os fosfitos apresentam um modo de acção complexo, actuando tanto directamente, inibindo o crescimento do patogénio, como indirectamente, estimulando a defesa do hospedeiro (Smillie *et al.* 1989; Jackson *et al.* 2000). Estes autores referem que quando a concentração de fosfito nas raízes é elevada, o fosfito actua directamente sobre o patogénio, inibindo o seu crescimento antes

que a associação com o hospedeiro se estabeleça e, quando a concentração é baixa, estimula as defesas da planta. Neste caso a estrutura da parede celular do patógeno é alterada, resultando na libertação de elicinas e na indução de mecanismos de defesa na planta (Perez *et al.* 1995; Daniel *et al.* 2005). O grau com que este mecanismo é mantido depende da tolerância do patógeno ao fosfito e da resistência do hospedeiro.

A concentração do fosfito nos tecidos da planta está relacionada com a taxa de aplicação (Smillie *et al.* 1989), sendo mais alta nas partes que estão em crescimento activo (Hardy 1999).

O fosfito é eficaz no controlo da doença depois de *P. cinnamomi* se ter estabelecido, pois diminui a sua capacidade de infectar (Erwin e Ribeiro 1996). No entanto, este controlo implica a repetição do tratamento mais do que uma vez (Hardy 1999).

Aberton *et al.* (1999) verificaram que o fosfito de potássio na concentração de 6 g de substância activa / l, controlou a progressão da doença em plantas de *Xanthorrhoea australis* que apresentavam sintomas ligeiros, mas as plantas com sintomas mais severos morriam, independentemente do tratamento.

Diferentes métodos de aplicação de fosfito têm sido estudados na Austrália para proteger plantas ameaçadas por *P. cinnamomi*: pulverizações foliares e injeções no tronco (Hardy *et al.* 2001; Smith 2001; Shearer *et al.* 2004).

No caso do fosfito ser usado em pulverizações, é aplicado com um adjuvante para aumentar a aderência do produto às folhas (Fairbanks *et al.* 1999; Hardy *et al.* 2001). Estudos realizados em comunidades naturais na parte Ocidental da Austrália, referem que o fosfito aplicado em pulverização foliar (5 g/l) pode controlar *P. cinnamomi* pelo menos durante 6 meses (Hardy 1999).

As injeções no tronco permitem a introdução de uma maior quantidade de produto na planta e eficácia durante um maior intervalo de tempo, quando comparado com as pulverizações (Hardy *et al.* 2001). Shearer *et al.* (2004) referem a redução da extensão da doença, após a injeção de fosfito em *Banksia* spp. e a continuação do seu efeito por mais de 5 anos, mesmo depois da ocorrência de um incêndio. Segundo estes autores, esse efeito terá ficado a dever-se à permanência do produto nas raízes de *Banksia* spp.

O fosfito aplicado por injeções no tronco também tem sido utilizado experimentalmente para controlar o declínio provocado por *P. cinnamomi* em povoamentos de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* na Península Ibérica (Fernandez-Escobar *et al.* 1994; 1999; Romero *et al.* 2004). O tratamento com injeções de fosfito de potássio no tronco em azinheiras e sobreiros na província de Huelva - Espanha, mostrou que ao longo do período de avaliação (Abril 2001 - Janeiro 2004) as árvores testemunhas pioraram o seu aspecto geral, acontecendo mesmo em alguns casos a sua morte

(Romero *et al.* 2004). As árvores tratadas exibiram, nuns casos uma paragem na evolução dos sintomas e noutros, uma redução (*Ibidem*).

Na Serra do Caldeirão, em Portugal, estudos que decorrem no âmbito de um projecto LEADER+ entre a Associação de Produtores da Serra do Caldeirão, Câmara Municipal de Loulé, Direcção Regional de Agricultura do Algarve e Universidade do Algarve, sobre o tratamento de sobreiros afectados com *P. cinnamomi* com injeções de fosfito de potássio no tronco, mostraram uma paragem na evolução dos sintomas na parte aérea das árvores, 12 meses após o tratamento (*Experiência 6.1*).

O fosfito de potássio quando aplicado ao solo, também se mostrou eficaz para reduzir significativamente a incidência e a severidade de sintomas causados por *P. cinnamomi* em plantas jovens de *Pinus radiata* (Ali *et al.* 1999).

Experiências realizadas com *Eucalyptus* spp. parecem indicar que o fosfito usado nas doses recomendadas não tem efeito nas ectomicorrizas das comunidades naturais de plantas na Austrália (Hardy, 1999; Hardy *et al.* 2001).

Embora o fosfito reduza ou previna a morte de plantas em comunidades naturais, não evita a dispersão do inóculo para áreas não infestadas (Hardy *et al.* 2001). *Phytophthora cinnamomi* continua a produzir zoósporos viáveis em plantas tratadas com fosfito (Wilkinson *et al.* 2001b).

A época de aplicação influencia muito o efeito do fosfito nas plantas. Fairbanks *et al.* (1999) sugerem que a pulverização do produto antes e durante a época de floração deve ser evitada. Também não deve ser aplicado no período de repouso vegetativo, ou quando as plantas estão em *stress* por falta de água, porque nestas condições a eficácia de captação do produto é reduzida (Hardy 1999).

Embora o fosfito tenha sido referido como apresentando baixa fitotoxicidade, vários estudos mencionam efeitos tóxicos em muitas plantas pertencentes a uma ampla gama de espécies, géneros e famílias (Hardy 1999; Fairbanks *et al.* 2001; Hardham 2005), especialmente plantas da flora nativa Australiana, mesmo quando aplicado na dose recomendada (Hardy *et al.* 2001). Estes efeitos incluem clorose, necrose foliar, desfoliação, anomalias e redução de crescimento, redução da viabilidade do pólen e do crescimento do tubo polínico, redução da germinação das sementes ou mesmo morte da planta (Fairbanks *et al.* 2001; Hardy *et al.* 2001).

Existe uma grande variabilidade na captação do fosfito pelas plantas, por isso os sintomas de fitotoxicidade variam muito entre espécies e plantas da mesma espécie (Hardy 1999; Fairbanks *et al.* 1999; Hardy *et al.* 2001). Para minimizar a fitotoxicidade, a dose de fosfito é aplicada em duas pulverizações (Hardy *et al.* 2001).

Parece não haver correlação entre a sensibilidade de *P. cinnamomi* ao fosfito manifestada *in vitro* e *in vivo*. Vários autores referem a existência de isolamentos, que em cultura se mostraram sensíveis ao fosfito, mas quando infectaram plantas revelaram-se tolerantes. Pelo contrário, outros isolamentos em cultura, manifestaram tolerância *in vitro* e quando em planta mostraram-se sensíveis (*Ibidem*; Wilkinson *et al.* 2001a).

Segundo estes autores, a aplicação regular de fosfito pode provocar um aumento da resistência de *P. cinnamomi* a este produto. No entanto, também referem a existência de isolamentos de *P. cinnamomi* resistentes ao fosfito obtidos de plantas que nunca tinham sido expostas a este produto. Os mesmos autores admitem que os isolamentos mais tolerantes ao fosfito são mais patogénicos que os menos tolerantes.

É normalmente na forma de fosfato (H_2PO_4^-) que o fósforo é transportado para as células das plantas (McDonald *et al.* 2001). Os fosfatos formam-se quando o ácido fosfónico se neutraliza com uma base e forma um sal. Os fosfatos são muito estáveis e devem ser administrados em grandes quantidades para obter um bom resultado.

Embora o fosfato de potássio e o ácido fosfórico sejam geralmente utilizados como fontes de fósforo, pretendeu-se saber se além da sua qualidade como fertilizante, também teriam capacidade para controlar a infecção por *P. cinnamomi*.

Embora na bibliografia seja referido o controlo de *P. cinnamomi* pelos fungicidas metalaxil e fosfonatos em muitas espécies de plantas, a informação sobre a sua eficácia no controlo do declínio de *Q. suber* e *Q. rotundifolia* é ainda escassa. Assim, os objectivos das experiências neste capítulo foram: a) determinar e comprovar a actividade fungicida e/ou fungistática *in vitro* do metalaxil, fosetil de alumínio e fosfito de potássio; b) estudar, em condições controladas, o efeito da aplicação destas substâncias e de fosfito de magnésio e ácido fosfórico, em plantas jovens de sobreiro e azinheira infestadas com *P. cinnamomi*; c) determinar o melhor método de aplicação destas substâncias em plantas de sobreiros; d) ver o efeito da aplicação de substâncias químicas por injeções ao tronco, em sobreiros adultos.

6.2. EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* (Experiência 6.A)

As substâncias utilizadas elegeram-se entre as citadas na bibliografia como possuidoras de efeito fungitóxico e/ou fungistático sobre espécies de *Phytophthora* (Cohen e Coffey 1986; Erwin e Ribeiro 1996). Seleccionaram-se sempre produtos comerciais nas formulações disponíveis no mercado (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Formulação dos produtos ensaiados e concentração de substância activa

Substância química	Formulação ^a	Concentração de substância activa ^b
Fosetil - Al	WP	80 %
Fosfato di-hidrogénio de potássio ^c	SL	98 %
Fosfito de magnésio ^c	SL	10 %
Fosfito de potássio	SL	45 - 50 %
Metalaxil	GR	5 %
Metalaxil	WP	25 %
Pentóxido de fósforo ^c	SL	54 %

^a WP - Pó molhável; SL - Concentrado solúvel; GR - Granulado; ^b p/p - Relação peso/peso; ^c Não utilizado no ensaio *in vitro*.

Com base na bibliografia e nos resultados obtidos por Cuesta (1999), as doses de substância activa utilizadas neste ensaio foram: 100 ppm de fosetil-Al; 100 ppm de fosfito de potássio e 1 ppm de metalaxil nas suas duas formulações: granulado e pó molhável.

Para a incorporação das substâncias no meio de cultura, colocaram-se balões Erlenmeyer com o meio acabado de esterilizar num banho termostático a 45°C, de modo a mantê-lo em estado líquido, permitindo a dissolução da substância química sem perigo de se degradar por acção do calor. Uma vez adicionado a cada balão a quantidade correspondente de substância, a solução homogeneizou-se com um agitador magnético, após o que se verteu em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, à razão de 20 ml por placa.

Quando o meio solidificou, inocularam-se as placas de Petri com discos de agar de 5 mm de diâmetro, retirados da margem de colónias dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ (ver 3.2.2.). Para as testemunhas procedeu-se de forma igual mas no meio sem substâncias químicas. As placas com os isolamentos selaram-se com parafilme, agruparam-se segundo a substância e envolveram-se em papel de alumínio para evitar o possível efeito nas restantes placas de uma eventual volatilização de

alguma das substâncias. Foram incubadas a 22°C no escuro durante 6 dias, tempo suficiente para que o micélio nas placas testemunhas atingisse a margem da placa.

O crescimento das colónias determinou-se medindo diariamente os seus diâmetros, maior e menor. A estes valores subtraiu-se o diâmetro do disco de agar.

O delineamento experimental consistiu em seis repetições por isolamento e por substância. A unidade experimental foi a placa de Petri.

Aos dados obtidos aplicou-se a análise de variância, do programa *Statistix* (Analytical Software 2000). Os valores médios do diâmetro da colónia compararam-se entre si e com as testemunhas mediante o teste LSD (mínima diferença significativa) de Fisher, para $P < 0,05$ (Steel e Torrie 1985). Com os valores médios dos diâmetros das colónias calculou-se a Inibição Relativa de Crescimento (IRC) para cada substância testada, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IRC}_{\text{substância}} = \frac{\varnothing_{\text{testemunha}} - \varnothing_{\text{substância}}}{\varnothing_{\text{testemunha}}} \times 100$$

em que $\varnothing_{\text{testemunha}}$ indica o diâmetro médio da colónia na placa com meio sem fungicidas e $\varnothing_{\text{substância}}$ o diâmetro médio da colónia que cresce numa placa com uma determinada substância química.

Resultados

Na Figura 6.1 apresenta-se a variação do diâmetro da colónia ao longo de 5 dias de crescimento, onde se podem apreciar as diferentes sensibilidades dos isolamentos às substâncias testadas.

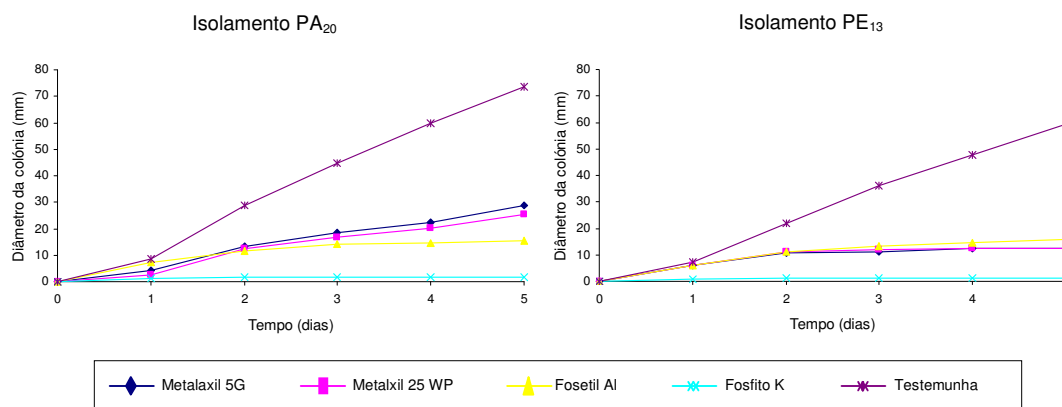


Figura 6.1 - Diâmetro da colónia dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ ao longo de 5 dias de crescimento em meio de cultura Corn Meal Agar (CMA) com várias substâncias químicas.

Os valores médios do diâmetro das colónias e de IRC, assim como as respectivas comparações de médias para cada um dos isolamentos apresentam-se na Tabela 6.2. As análises de variância e comparações de médias indicam-se no Anexo VII.

Tabela 6.2 - Efeito de substâncias químicas no crescimento das colónias de PA₂₀ e PE₁₃

Substância química	PA ₂₀		PE ₁₃	
	Diâmetro da colónia ¹ (mm)	IRC ² (%)	Diâmetro da colónia ¹ (mm)	IRC ² (%)
Fosetil - Al	15,4 d	79,4 b	16,1 b	73,5 c
Fosfito de potássio	1,8 e	97,7 a	1,1 d	98,2 a
Metalaxil GR	28,8 b	61,6 d	12,6 c	79,3 b
Metalaxil WP	25,5 c	65,9 c	12,6 c	79,3 b
Testemunhas	73,6 a	—	59,5 a	—

¹ Os valores correspondem à média de seis repetições. As colónias cresceram em meio de cultura CMA com cada uma das substâncias. O diâmetro das colónias mediu-se aos 5 dias de incubação a 22 °C no escuro; ² Inibição Relativa de Crescimento, calculada como a percentagem de redução do diâmetro da colónia em relação às testemunhas; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global da variância para o diâmetro da colónia mostrou diferenças significativas entre os isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ para as diferentes substâncias ensaiadas, assim como para a interação entre isolamento e substância química. O isolamento PA₂₀ apresentou um crescimento micelial maior que o isolamento PE₁₃. Todas as substâncias químicas utilizadas produziram uma

significativa redução do diâmetro da colónia em relação às testemunhas, sendo o fosfito de potássio aquele que causou maior redução.

A análise de variância para IRC também mostrou diferenças significativas entre isolamentos e substâncias químicas. Assim, o isolamento PE₁₃ resultou ser o mais sensível às substâncias, apresentando uma maior redução do crescimento da colónia, relativamente à da testemunha. Por outro lado, o fosfito de potássio foi o que inibiu mais o crescimento das colónias de ambos os isolamentos.

Todas as substâncias ensaiadas foram eficazes na inibição do crescimento, causando reduções entre 61,6 e 97,7% para o isolamento PA₂₀ e entre 73,5 e 98,2% para PE₁₃.

6.3. ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS *IN VIVO*

6.3.1. Controlo de *Phytophthora cinnamomi* em *Lupinus albus* (Experiência 6.B)

Para estudar de forma rápida o efeito de diferentes doses de substância química, no controlo da infecção por *P. cinnamomi*, utilizaram-se plantas de *L. albus*. As plantas obtiveram-se da forma descrita em 4.2.4.2. e posteriormente transplantadas para recipientes de 500 ml com vermiculite húmida à razão de três plantas por recipiente, tal como referido em 4.2.4.3.

Prepararam-se três recipientes por substância ensaiada, dose aplicada e dois tipos de testemunhas, infestadas e não infestadas com *P. cinnamomi*. A unidade experimental foi um recipiente com três plantas.

Todas as plantas foram colocadas numa câmara de crescimento, com temperatura entre 20 e 22°C e 12 h luz/dia, onde se restabelecerem da transplantação durante 1 semana. Após este período fez-se a aplicação das substâncias químicas.

A Tabela 6.3 indica as substâncias químicas e respectivas doses aplicadas por tratamento. Para a sua aplicação seguiram-se as recomendações dos fabricantes e as indicadas no *Vademécum de Productos Fitosanitarios* (Liñán 2000).

Tabela 6.3 - Substâncias químicas e doses aplicadas em plantas de *Lupinus albus* desenvolvendo-se em vermiculite

Substância química ^a	Dose ^b
Fosetil – Al 80%	0,25 g/l
	0,025 g/l
Fosfito de potássio 45%	0,3 ml/l
	0,03 ml/l
Metalaxil GR 5%	0,1 g/l
	0,01 g/l
Metalaxil WP 25%	0,1 g/l
	0,01 g/l

^a p/p - Relação peso/peso; ^b A dose indicada corresponde ao produto comercial.

As doses correspondentes ao metalaxil WP, fosetil de alumínio e fosfito de potássio, foram aplicadas a cada recipiente dissolvidas em 50 ml de água destilada. A dose de metalaxil GR por se apresentar na forma de grânulos, aplicou-se directamente, adicionando de seguida 50 ml de água.

Todas as plantas foram infestadas no dia seguinte à aplicação das substâncias químicas. Utilizou-se como inóculo uma suspensão de uma mistura de zoósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ em extracto de solo à concentração de 6.500 zoósporos/ml. A preparação do inóculo e a infestação das plantas realizou-se da forma descrita em 4.2.4.2.

Durante o período em que decorreu a experiência, aplicou-se semanalmente a cada recipiente 50 ml de solução nutritiva ½ de Hoagland (Anexo V: E) e 70 ml de água destilada.

A experiência deu-se por terminada 15 dias depois da infestação das plantas, quando as testemunhas infestadas apresentaram sintomas nas folhas. Uma vez terminada a experiência, avaliou-se a severidade dos sintomas seguindo-se os procedimentos já referidos para as experiências dos capítulos 4 e 5. Neste caso, cada valor de severidade, corresponde ao valor médio da severidade das três plantas de cada recipiente. Depois da avaliação da severidade dos sintomas procedeu-se ao reisolamento do patogénio a partir das raízes e à análise dos resultados.

No caso das plantas tratadas, realizaram-se até três tentativas de reisolamento de *P. cinnamomi*, se a primeira e a segunda fossem negativas.

Resultados

Os sintomas na parte aérea das testemunhas infestadas consistiram em murchidão, clorose e necrose das folhas e um sistema radicular pouco desenvolvido com muitas raízes necrosadas e/ou podres. As plantas testemunhas não infestadas apresentaram um bom estado de desenvolvimento com um sistema radicular abundante e muitas raízes novas de cor branca.

As plantas tratadas com substâncias químicas apresentaram, consoante o tratamento, uma maior ou menor severidade de sintomas na parte aérea e sistemas radiculares mais ou menos desenvolvidos com raízes necrosadas e algumas raízes novas.

Os valores médios da severidade de sintomas na parte aérea e radicular das plantas, assim como a comparação de médias, apresentam-se na Tabela 6.4. As análises de variância e comparações de médias indicam-se no Anexo VIII: A.

Tabela 6.4 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em *Lupinus albus* desenvolvendo-se em vermiculite

Substância química	Dose ¹	Severidade média de sintomas ²	
		Parte aérea	Parte radicular
Fosetil - Al	0,25 g/l	2,6 b	2,7 b
	0,025 g/l	0,6 cd	0,8 c
Fosfito de potássio	0,3 ml/l	3,0 ab	3,7 a
	0,03 ml/l	1,1 c	0,4 cd
Metalaxil GR	0,1 g/l	0,0 d	0,0 d
	0,01 g/l	0,1 d	0,0 d
Metalaxil WP	0,1 g/l	0,8 cd	0,6 cd
	0,01 g/l	0,0 d	0,0 d
Testemunhas (infestadas)	—	3,6 a	3,8 a
Testemunhas (não infestadas)	—	0,1 d	0,0 d

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

As análises de variância para a avaliação de sintomas tanto da parte aérea, como das raízes, mostraram diferenças entre tratamentos. As respectivas comparações de médias indicaram que a todas as plantas tratadas com as várias substâncias químicas apresentaram severidade de sintomas significativamente mais baixa do que testemunhas infestadas, com excepção das tratadas com a dose mais elevada de fosfito de potássio (0,3 ml/l), o que terá sido devido à sensibilidade de

L. albus a esta dose. Também indicaram que a severidade de sintomas nas raízes das plantas tratadas com as duas doses de metalaxil GR e de metalaxil WP e com a dose mais baixa de fosfito de potássio foi similar à das plantas testemunhas não infestadas, o que indica eficácia destas substâncias e das doses usadas no controlo da doença.

No final da experiência foi possível 100% de reisolamento de *P. cinnamomi* a partir das raízes das testemunhas infestadas. Pelo contrário, não se conseguiu isolar das testemunhas não infestadas, nem das plantas submetidas a qualquer dos tratamentos.

Estes resultados indicam que metalaxil GR, metalaxil WP e fosfito de potássio foram eficazes no controlo dos sintomas da doença em *L. albus*.

6.3.2. Controlo de *Phytophthora cinnamomi* em sobreiros e azinheiras (Experiência 6.C)

Nesta experiência com sobreiros e azinheiras repetiram-se os mesmos tratamentos da experiência anterior.

As plantas com cerca de 18 meses de idade, obtidas na Universidade de Córdoba, foram colocadas em recipientes de 1000 ml com vermiculite, seguindo-se o procedimento descrito em 4.2.4.3.

Prepararam-se três repetições por espécie de planta, substância ensaiada, dose aplicada e dois tipos de testemunhas, infestadas e não infestadas com *P. cinnamomi*. A unidade experimental foi um recipiente com uma planta.

Os procedimentos utilizados para a infestação das plantas e aplicação das substâncias foram idênticos aos da *Experiência 6.B* excepto que os sobreiros e azinheiras foram infestados com uma concentração dupla (13.000 zoósporos/ml), por se tratar de plantas lenhosas, com um sistema radicular mais vigoroso. Às plantas foram adicionados semanalmente 50 ml de solução nutritiva ½ de Hoagland e 150 ml de água destilada.

Esta experiência decorreu durante 6 semanas.

Resultados

A severidade dos sintomas na parte aérea das plantas foi em geral baixa para todos os tratamentos. Os sintomas nas raízes também não foram severos.

As plantas tratadas apresentaram um sistema radicular mais ou menos desenvolvido, com raízes necrosadas mas também raízes novas, dependendo do tratamento. A Tabela 6.5 apresenta os valores médios da severidade de sintomas na parte aérea e radicular dessas plantas e comparação

das suas médias. As análises de variância e comparações de médias encontram-se no Anexo VIII: B.

Tabela 6.5 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com 13.000 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite

Substância química	Dose ¹	Severidade média de sintomas ²	
		Parte aérea ³	Parte radicular
Fosetil - Al	0,25 g/l	0,4	1,7 bcd
	0,025 g/l	1,1	2,2 ab
Fosfito de potássio	0,3 ml/l	0,9	1,5 bcd
	0,03 ml/l	1,1	2,5 a
Metalaxil GR	0,1 g/l	0,3	1,0 de
	0,01 g/l	0,5	1,1 de
Metalaxil WP	0,1 g/l	0,9	2,2 ab
	0,01 g/l	0,3	1,3 cd
Testemunhas (infestadas)	—	0,6	2,0 abc
Testemunhas (não infestadas)	—	0,2	0,5 e

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ³ Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular das plantas indicou diferenças significativas entre plantas testemunhas infestadas e não infestadas, entre espécies de plantas e entre tratamentos. Assim, a comparação de médias indicou para a azinheira uma severidade de sintomas radiculares mais elevada do que para o sobreiro. A comparação de médias em função do tratamento revelou que os tratamentos mais eficazes, foram com metalaxil GR nas duas doses testadas. Estes tratamentos foram os únicos que permitiram controlar a doença, pois os sintomas manifestados por estas plantas foram semelhantes aos das testemunhas não infestadas. Os restantes tratamentos não foram eficazes, uma vez que a severidade de sintomas nas raízes não diferiu significativamente das testemunhas infestadas.

A análise de variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea das plantas não mostrou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, nem entre sobreiros e azinheiras. A severidade de sintomas na parte aérea não teve correspondência à observada nas raízes. A ligeira severidade de sintomas que o sistema radicular das plantas tratadas apresentava, permitiu que a existência de um grande número de raízes sãs garantissem o bom desenvolvimento vegetativo da parte aérea, no período em que a experiência decorreu.

Reisolou-se *P. cinnamomi* a partir das raízes das testemunhas infestadas, tanto dos sobreiros (5,6%) como das azinheiras (20,8%). Também se reisolou de azinheiras tratadas com fosetil-Al nas duas concentrações ensaiadas (20,8 - 37,5%) e de sobreiros tratados com 0,03 ml/l de fosfito de potássio (41,7%). Das raízes das restantes plantas tratadas e das plantas testemunhas não infestadas, não se reisolou *P. cinnamomi*.

Para determinar se a ineficácia de controlo das substâncias ensaiadas foi devida às quantidades utilizadas, repetiu-se a experiência aumentando as doses de cada uma as substâncias.

6.3.3. Controlo de *Phytophthora cinnamomi* em sobreiros e azinheiras infestados com uma concentração 2,5 x (Experiência 6.D)

Esta experiência foi semelhante à experiência anterior, com a excepção das plantas terem infestadas com 32.500 zoósporos/ml, por entretanto se ter demonstrado que esta foi a concentração que induziu sintomas mais evidentes nas raízes (Experiência 4.I).

Prepararam-se seis repetições por espécie de planta, substância química, dose e testemunhas infestadas e não infestadas. A unidade experimental foi uma planta por recipiente. As substâncias ensaiadas e as doses aplicadas em cada tratamento indicam-se na Tabela 6.6.

O ensaio deu-se por concluído 4 semanas depois da infestação das plantas.

Tabela 6.6 - Substâncias químicas e doses aplicadas em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com 32.500 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite

Substância química ^a	Dose ^b
Fosetil - Al 80%	1 g/l
	0,5 g/l
Fosfito de potássio 45%	1 ml/l
	0,5 ml/l
Metalaxil GR 5%	1 g/l
	0,1 g/l
	0,01 g/l
Metalaxil WP 25%	1 g/l
	0,1 g/l

^ap/p - Relação peso/peso; ^bA dose indicada corresponde ao produto comercial.

Resultados

A severidade de sintomas das plantas, tanto nas folhas como nas raízes, foi semelhante à observada na experiência anterior, mesmo com uma concentração de zoósporos superior. Os valores médios da severidade de sintomas e as comparações de médias apresentam-se na Tabela 6.7. As análises de variância e comparações de médias apresentam-se no Anexo VIII: C.

Tabela 6.7 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro e azinheira, infestadas com uma concentração de 32.500 zoósporos/ml, desenvolvendo-se em vermiculite

Substância química	Dose ¹	Severidade média de sintomas ²	
		Parte aérea ³	Parte radicular
Fosetil - Al	0,5 g/l	1,1	2,4 ab
	1 g/l	1,2	2,5 a
Fosfito de potássio	0,5 ml/l	0,9	1,9 c
	1 ml/l	0,7	2,1 abc
Metalaxil GR	0,01 g/l	1,0	2,0 bc
	0,1 g/l	1,0	1,8 cd
	1 g/l	1,1	2,5 a
Metalaxil WP	0,1 g/l	1,0	2,1 abc
	1 g/l	0,7	2,2 abc
Testemunhas (infestadas)	—	1,5	2,4 ab
Testemunhas (não infestadas)	—	0,0	1,3 d

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ³ Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas nas raízes revelou diferenças significativas em função dos tratamentos e da interacção planta-tratamento, mas não entre sobreiros e azinheiras. A comparação de médias em função do tratamento indicou que as testemunhas não infestadas apresentaram severidade mais baixa do que a apresentada pelas testemunhas infestadas. As substâncias que resultaram mais eficazes foram o metalaxil GR (0,1 g) e o fosfito de potássio (0,5 ml), dado que reduziram significativamente a severidade de sintomas radiculares em relação às testemunhas infestadas. No entanto, o tratamento com metalaxil GR foi o melhor, uma vez que controlou a doença a tal ponto que os sintomas manifestados foram semelhantes aos das testemunhas não infestadas. A ineficácia verificada com a dose mais baixa de metalaxil (0,01g/l) em relação à experiência anterior, pode explicar-se por se ter utilizado uma concentração maior de zoósporos na infestação das plantas. Em contrapartida, para a ineficácia da dose 10 vezes superior (1 g/l) não se encontrou explicação.

No caso dos sintomas na parte aérea a análise da variância revelou diferenças significativas entre as espécies de plantas mas não entre os tratamentos, apesar de as plantas testemunhas não infestadas não mostrarem sintomas. A comparação de médias mostrou que a azinheira apresentou uma severidade de sintomas na parte aérea mais elevada que o sobreiro, embora os sistemas radiculares de ambas as espécies apresentassem uma severidade semelhante.

Uma vez mais se verificou que a severidade de sintomas nas raízes não se reflectiu na parte aérea, pelo facto do sistema radicular apresentar raízes funcionais em número suficiente para satisfazer as necessidades da planta.

Foi possível reisolar *P. cinnamomi* a partir de raízes de sobreiros e azinheiras testemunhas infestadas, e de raízes tratadas com a dose mais alta de fosfito de potássio (1 ml/l). Não se reisolou *P. cinnamomi* das testemunhas não infestadas, assim como das plantas submetidas aos restantes tratamentos.

A utilização de vermiculite nas experiências anteriores teve como finalidade eliminar possíveis interferências na acção das substâncias que ocorreriam no caso de se utilizar terra como substrato. Nas experiências seguintes usou-se uma mistura de areia, limo e turfa.

6.3.4. Controlo de *Phytophthora cinnamomi* em sobreiros e azinheiras submetidos a encharcamento contínuo (Experiência 6.E)

Utilizaram-se sobreiros e azinheiras com 12 meses de idade procedentes de um viveiro comercial. O inóculo utilizado para a infestação das plantas consistiu numa mistura de micélio e clamidósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₁₃ em suspensão aquosa. O processo seguido para a preparação do inóculo e infestação das plantas foi o descrito em 4.2.1.2.

Prepararam-se seis repetições por espécie de planta, substância ensaiada, testemunhas infestadas e não infestadas. A unidade experimental foi o vaso com uma planta.

As plantas foram colocadas numa câmara de crescimento com temperatura entre 22 e 25°C e 14 h de luz/dia durante uma semana, onde se regaram e pulverizaram para se restabelecerem da transplantação. Depois, transferiram-se para uma estufa onde decorreu a experiência.

As plantas foram tratadas com as mesmas substâncias químicas utilizadas nas experiências anteriores, usando as doses recomendadas pelos fabricantes (Tabela 6.8).

A aplicação de metalaxil WP, fosetil de alumínio e fosfito de potássio realizou-se adicionando às plantas 200 ml de solução com a substância na dose requerida, em dois momentos (100 + 100 ml), para permitir a sua completa absorção pelo substrato. O metalaxil GR aplicou-se directamente nos

vasos, adicionando em seguida 200 ml de água destilada em dois momentos diferentes (100 + 100 ml). Às plantas testemunhas, foram igualmente aplicados os mesmos volumes de água destilada.

Tabela 6.8 - Substâncias químicas e doses aplicadas às plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento contínuo

Substância química ^a	Dose ^b
Fosetil - Al 80%	2,5 g/l
Fosfito de potássio 45%	3 ml/l
Metalaxil GR 5%	1 g/l
Metalaxil WP 25%	1 g/l

^a p/p - Relação peso/peso; ^b A dose indicada corresponde ao produto comercial.

No dia seguinte à aplicação das substâncias químicas submeteram-se os vasos a encharcamento contínuo, procedendo como referido em 4.2.1.3.

A experiência deu-se por terminada ao fim de 6 semanas, quando as testemunhas infestadas mostraram sintomas da doença na parte aérea.

A temperatura média na estufa, durante o tempo da experiência, variou entre 11,4 e 26,2°C.

No final da experiência seguiram-se os procedimentos referidos nas experiências anteriores sobre controlo, quanto à avaliação de sintomas, reisolamento de *P. cinnamomi* e análise dos resultados.

Resultados

As plantas testemunhas infestadas evidenciaram os sintomas característicos da doença do declínio, nomeadamente clorose, desfoliação, necrose das folhas e sistema radicular danificado. As testemunhas não infestadas exibiram um bom desenvolvimento vegetativo, ainda que as raízes estivessem ligeiramente afectadas, como resultado do encharcamento a que foram sujeitas.

As plantas tratadas apresentaram, maior ou menor severidade de sintomas nas folhas e sistemas radiculares mais ou menos destruídos, com algumas raízes novas de cor clara, conforme o tratamento a que foram sujeitas. A Tabela 6.9 apresenta os valores médios da severidade de sintomas na parte aérea e radicular dos sobreiros e azinheiras e respectiva comparação de médias. As análises de variância e comparações de médias expõem-se no Anexo VIII: D.

Tabela 6.9 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento contínuo

Substância química	Dose ¹	Severidade média de sintomas ²	
		Parte aérea	Parte radicular
Fosetil - Al	2,5 g/l	1,7 b	1,9 cd
Fosfito de potássio	3,0 ml/l	2,4 ab	2,4 bc
Metalaxil GR	1,0 g/l	1,6 b	1,9 cd
Metalaxil WP	1,0 g/l	3,0 a	3,1 a
Testemunhas (infestadas)	—	1,8 b	2,5 ab
Testemunhas (não infestadas)	—	0,4 c	1,5 d

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

Tal como na experiência anterior a análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular revelou diferenças significativas em função dos tratamentos mas não entre sobreiros e azinheiras. A comparação de médias indicou que as testemunhas infestadas apresentaram severidade de sintomas mais elevada do que a apresentada pelas testemunhas não infestadas. As plantas tratadas com metalaxil GR e fosetil-Al mostraram uma severidade de sintomas nas raízes, que não diferiu da manifestada pelas testemunhas não infestadas, o que demonstra a sua capacidade para controlar a infecção nas raízes.

Em relação aos sintomas da parte aérea, a análise global de variância mostrou diferenças significativas entre os vários tratamentos e entre sobreiros e azinheiras. As respectivas comparações de médias mostraram que a sintomatologia na parte aérea exibida pelas testemunhas infestadas foi também mais elevada que a apresentada pelas testemunhas não infestadas. Ao contrário do que se verificou com as raízes, a parte aérea da azinheira mostrou-se mais afectada do que a do sobreiro.

Foi possível reisolar *P. cinnamomi* em percentagens sempre superiores a 29,2% para os sobreiros e 50% para as azinheiras. O patogénio reisolou-se a partir de raízes das testemunhas infestadas e, ao contrário do verificado nas experiências anteriores, também de raízes das plantas submetidas a todos os tratamentos. Não foi reisolado das raízes das testemunhas não infestadas.

Com base nos resultados pretendeu-se saber qual a influência das substâncias químicas ensaiadas e o efeito de outras doses no controlo de *P. cinnamomi* em plantas de sobreiros e azinheiras, quando submetidas a períodos mais curtos de encharcamento.

6.3.5. Controlo de *Phytophthora cinnamomi* em sobreiros e azinheiras submetidos a encharcamento 2 dias sucessivos por semana (*Experiência 6.F*)

O procedimento seguido na preparação desta experiência foi o referido para a *Experiência 6.E*.

As plantas utilizadas nesta experiência procederam de um viveiro comercial e tinham cerca de 12 meses de idade. O inóculo consistiu numa mistura de micélio e clamidósporos dos isolamentos PA₂₀ e PE₉₅ em suspensão aquosa. Prepararam-se seis repetições por espécie de planta, substância ensaiada, dose aplicada, testemunhas infestadas e não infestadas. A unidade experimental foi o vaso com uma planta.

Foram utilizadas as mesmas substâncias químicas usadas nas experiências anteriores com a exceção do metalaxil WP 25% por não se ter revelado eficaz no controlo de *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras. As doses e as substâncias ensaiadas indicam-se na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 - Substâncias químicas e doses aplicadas às plantas jovens de sobreiro e azinheira submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana

Substância química ^a	Dose ^b
Fosetil-Al 80%	5 g/l ^c
	0,5 g/l
	0,1 g/l
	0,01 g/l ^d
Fosfito de potássio 45%	1 ml/l
	0,5 ml/l
	0,1 ml/l
Metalaxil GR 5%	0,1 g/l
	0,01 g/l
	0,005 g/l

^a p/p - Relação peso/peso; ^b A dose indicada corresponde ao produto comercial; ^c Dose aplicada a azinheiras; ^d Dose aplicada aos sobreiros.

Tal com na experiência anterior as plantas foram mantidas durante 1 semana numa câmara de crescimento e depois transferidas para uma estufa.

As plantas foram tratadas com as substâncias químicas, conforme referido na experiência anterior e no dia seguinte submetidas a encharcamento durante 48h. O encharcamento repetiu-se

semanalmente durante os 3 meses em que a experiência decorreu. A temperatura média na estufa variou entre 9,9 e 31,7°C.

Resultados

De uma maneira geral a severidade de sintomas na parte aérea das plantas, após 3 meses de duração da experiência, foi menor do que a verificada na experiência anterior, que decorreu em metade do tempo. Mais uma vez se verificou que os sintomas da parte aérea não reflectiram os sintomas observados nas raízes, que de uma maneira geral foram severos, tanto das testemunhas infestadas, como das plantas tratadas. Na Tabela 6.11 indicam-se os dados da severidade média de sintomas na parte aérea e radicular, assim como as respectivas comparações de médias. As análises de variância e comparações de médias referentes a esta experiência encontram-se no Anexo VIII: E.

Tabela 6.11 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiros e azinheiras submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana

Substância química	Dose ¹		Severidade média de sintomas ²	
	Sobreiro	Azinheira	Parte aérea	Parte radicular
Fosetil - Al	0,5 g/l	5 g/l	0,9 bc	3,0 a
	0,1 g/l	0,5 g/l	1,7 a	3,1 a
	0,01 g/l	0,1 g/l	1,0 bc	3,2 a
Fosfito de potássio	1 ml/l	1 ml/l	0,8 bc	2,9 a
	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,7 c	3,0 a
	0,1 ml/l	0,1 ml/l	0,9 bc	3,0 a
Metalaxil GR	0,1 g/l	0,1 g/l	0,8 c	2,5 b
	0,01 g/l	0,01 g/l	0,9 bc	2,5 b
	0,005 g/l	0,005 g/l	1,3 ab	2,9 a
Testemunhas (infestadas)	—	—	0,8 bc	3,2 a
Testemunhas (não infestadas)	—	—	0,5 c	1,3 c

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

A análise de variância para a avaliação visual de sintomas nas raízes mostrou diferenças significativas entre espécies de plantas e entre os diferentes tratamentos. A comparação de médias indicou que as azinheiras foram mais susceptíveis que os sobreiros, apresentando severidade média de sintomas significativamente superior. Uma vez mais, as testemunhas infestadas apresentaram severidade de sintomas mais elevada do que a apresentada pelas testemunhas não infestadas.

O metalaxil GR nas duas doses mais elevadas foi o que se revelou mais eficaz no controlo da doença, ainda que as raízes das plantas apresentassem sintomas significativamente superiores aos das testemunhas não infestadas.

Em relação aos sintomas na parte aérea, a análise de variância indicou diferenças significativas entre os tratamentos, no entanto, as testemunhas não infestadas não diferiram das infestadas. Todas as plantas, incluindo as testemunhas infestadas, apresentaram em geral uma severidade de sintomas muito ligeira. Tal como se tem vindo a verificar em experiências anteriores, os sintomas na parte aérea, não tiveram correspondência com os severos sintomas observados nas raízes, pois o sistema radicular apresentava ainda raízes que permitiram o desenvolvimento da planta.

No fim da experiência, conseguiu-se o reisolamento de *P. cinnamomi* a partir de raízes, em todos os tratamentos, excepto das testemunhas, não infestadas. A percentagem de reisolamento foi sempre superior para a azinheira (83,3-100%), enquanto que para o sobreiro esta percentagem variou entre 29,2 e 70,8%.

6.3.6. Efeito da aplicação de sais potássicos de fosfitos e de fosfatos no controlo de *Phytophthora cinnamomi* (Experiência 6.G)

Esta experiência foi realizada no âmbito de um projecto de investigação efectuado em colaboração com o *Departamento de Ingeniería Forestal* da Universidade de Córdoba.

Utilizaram-se sobreiros e azinheiras com 6 meses de idade obtidas na Universidade de Córdoba. As plantas transferiram-se dos tabuleiros com alvéolos onde se encontravam, para vasos ligeiramente mais altos que os utilizados nas experiências anteriores (13 x 13 x 25,5 cm) com substrato constituído por uma mistura de areia, limo e turfa (1:1:1 em volume). O inóculo consistiu numa suspensão aquosa de micélio e clamidósporos do isolamento PE₉₀. Este isolamento foi obtido da rizosfera de uma azinheira situada na zona de Montoro, Córdoba, em Dezembro de 2000. Os processos de preparação do inóculo e infestação das plantas foram os descritos em 4.2.1.2.

Prepararam-se 40 repetições por espécie de planta, substância ensaiada, dose aplicada, testemunhas infestadas e não infestadas, repartidas em 10 blocos de 4 plantas. Os blocos foram distribuídos nas bancadas de forma a eliminar o efeito de lugar. A unidade experimental foi o vaso com uma planta. As plantas foram colocadas numa estufa onde recuperaram da transplantação durante 1 semana. Findo este período, foram submetidas a um plano de tratamentos durante 2 meses e meio. Este plano consistiu na aplicação quinzenal de 50 ml de solução de substância activa, num total de seis aplicações por planta (Tabela 6.12). Às plantas testemunhas foi também adicionado quinzenalmente igual volume de água destilada.

Tabela 6.12 - Substâncias químicas e doses aplicadas quinzenalmente a plantas jovens de sobreiro e azinheira, durante 2 meses e meio

Substância química	Dose
Fosfato di-hidrogénio de potássio 98%	10 mg/l ^a
	20 mg/l ^a
Fosfito de potássio 50 % p/p ^b	1,6 ml/l

^a Concentração de fósforo; ^b p/p - Relação peso/peso.

As plantas regaram-se diariamente pelo sistema gota a gota. A temperatura média durante o tempo em que a experiência decorreu variou entre 10 e 31°C.

Ao fim de 6 meses deu-se por concluída a experiência para metade das plantas (20 plantas de cada espécie/tratamento). Procedeu-se à avaliação da severidade de sintomas e ao reisolamento de *P. cinnamomi* deste primeiro lote de plantas, seguindo os procedimentos adoptados nas experiências anteriores.

Das restantes plantas, metade (10 plantas de cada espécie/tratamento) foi pulverizada com uma solução de fosfito de potássio (concentração 3 ml de substância activa/l solução) e a outra metade usou-se como controlo. A pulverização realizou-se com um pulverizador eléctrico (Figura 6.2).

As plantas foram pulverizadas até ficarem completamente molhadas, mas não excessivamente, para evitar que a solução com a substância escorresse para o substrato. Foram depois deixadas a secar e novamente pulverizadas. A pulverização repetiu-se 3 meses depois.

Para o segundo lote de plantas, a experiência deu-se por concluída ao fim de 12 meses. À semelhança das plantas do primeiro lote, procedeu-se à avaliação da severidade de sintomas das plantas e ao reisolamento de *P. cinnamomi*.



Figura 6.2 - Pulverização de sobreiros e azinheiras com fosfito de potássio.

Uma avaria no sistema de rega provocou a morte de algumas plantas. Por este motivo, na análise estatística, não foi possível dispor da totalidade dos dados, não se podendo realizar a análise global de variância. Realizaram-se no entanto, análises de variância e comparação de médias individualizadas por tratamento.

Resultados

Os sintomas que os sobreiros e azinheiras manifestaram no final da experiência foram semelhantes aos ocorridos nas experiências anteriores e podem-se observar na Figura 6.3. À semelhança do que se observou nessas experiências, a severidade de sintomas na parte aérea das plantas foi mais baixa do que a manifestada nas raízes.

Na Tabela 6.13 apresenta-se a severidade média dos sintomas na parte aérea e radicular das plantas e respectivas comparações de médias, ao fim de 6 e 12 meses. As análises de variância e comparações de médias encontram-se no Anexo VIII: F.



Figura 6.3 – Sintomatologia das plantas ao fim de 1 ano do início da experiência. Plantas de sobreiro e azinheira previamente tratadas com sais potássicos de fosfitos e de fosfatos e posteriormente pulverizadas com fosfito de potássio (da esquerda para a direita: testemunha infestada; planta tratada com 1,6 ml/l de fosfito de potássio; 20 mg/l de fosfato di-hidrogénio de potássio; 10 mg/l fosfato di-hidrogénio de potássio; testemunha não infestada).

Tabela 6.13 - Efeito de substâncias químicas no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro e azinheira tratadas com sais potássicos de fosfitos e de fosfatos

Substância química	Severidade de sintomas ¹			
	6 meses		12 meses	
	Parte aérea	Parte radicular	Parte aérea ²	Parte radicular
Fosfato di-hidrogénio de potássio 10 mg/l	0,7 b	1,8 b	1,1	2,3 bcd
Fosfato di-hidrogénio de potássio 20 mg/l	1,1 a	1,7 bc	1,3	2,5 abc
Fosfito de potássio	0,4 c	1,4 c	1,4	2,0 d
Testemunhas (infestadas)	0,8 b	2,8 a	1,3	2,8 a
Testemunhas (não infestadas)	0,4 c	0,8 d	1,4	1,5 e
Fosfato di-hidrogénio de potássio 10 mg/l + Fosfito K ³	—	—	0,8	2,1 cd
Fosfato di-hidrogénio de potássio 20 mg/l + Fosfito K ³	—	—	1,3	2,7 ab
Fosfito de potássio + Fosfito K ³	—	—	1,6	2,4 abc
Testemunhas (infestadas) + Fosfito K ³	—	—	1,2	2,4 abc
Testemunhas (não infestadas) + Fosfito K ³	—	—	1,2	1,5 e

¹ A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; ² Os valores médios não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD de Fisher para P = 0,05; ³ Tratamentos realizados 6 meses depois do início da experiência; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

Depois de 6 meses de transcorrida a experiência, a análise de variância para a avaliação visual da sintomatologia nas raízes mostrou diferenças entre espécies de plantas e entre diferentes tratamentos. A azinheira apresentou severidade de sintomas mais elevada que o sobreiro. Em relação às plantas tratadas, todas apresentaram uma severidade de sintomas radiculares significativamente menor que as testemunhas infestadas. Assim, todos os tratamentos se mostraram eficazes para o tratamento da doença, embora a severidade de sintomas das raízes das plantas tratadas tenha sido sempre superior à das raízes das testemunhas não infestadas. O tratamento com fosfito de potássio foi o que resultou ser mais eficaz, uma vez que a severidade de sintomas nas raízes foi a que mais se aproximou da apresentada pelas testemunhas não infestadas.

Quanto à severidade de sintomas exibida pela parte aérea das plantas, a análise de variância também mostrou diferenças significativas entre diferentes tratamentos mas não entre sobreiros e azinheiras. O tratamento com fosfito de potássio foi também o que resultou ser mais eficaz, pois permitiu que as plantas exibissem uma sintomatologia semelhante à das testemunhas não infestadas.

Ao contrário do que se verificou nas experiências anteriores, o tratamento que foi mais eficaz na redução da severidade de sintomas nas raízes das plantas, foi também o mais eficaz na redução da severidade na parte aérea.

Ao fim de 12 meses do início da experiência a análise de variância da severidade de sintomas nas raízes também mostrou diferenças significativas entre espécies de planta e tratamentos. Tal como se verificou ao fim de 6 meses, as azinheiras apresentaram severidade mais severa do que os sobreiros. Não se registaram diferenças entre testemunhas infestadas, nem entre testemunhas não infestadas, pulverizadas ou não com fosfito. De uma maneira geral, a pulverização com fosfito de potássio não reduziu a severidade de sintomas em relação às plantas não pulverizadas, uma vez que a severidade de sintomas das plantas pulverizadas foi semelhante à exibida pelas correspondentes testemunhas infestadas.

O tratamento inicial com fosfito de potássio continuou a ser o mais eficaz no controlo da severidade de sintomas nas raízes, que foi significativamente mais baixa que a manifestada pelas testemunhas infestadas, tanto as pulverizadas, como as não pulverizadas.

O tratamento inicial com 10 mg/l de fosfato di-hidrogénio de potássio também diminuiu significativamente a severidade de sintomas nas raízes em relação às testemunhas infestadas, não pulverizadas.

A análise de variância da severidade de sintomas na parte aérea não revelou diferenças significativas entre os vários tratamentos ao fim de 12 meses, embora os sobreiros apresentassem severidade de sintomas mais severa do que as azinheiras. Uma vez mais, os sintomas nas raízes não

se reflectiram na parte aérea, por o sistema radicular não se encontrar ainda muito danificado e dispor de raízes suficientes para garantir as necessidades das plantas.

A análise da severidade de sintomas nas plantas ao fim de 12 meses, poderá ter sido condicionada pela morte de algumas plantas por falta de água, devido ao mau funcionamento do sistema de rega no tratamento com 10 mg/l de Fosfato di-hidrogénio de potássio e em algumas testemunhas. Por este facto, estes resultados não são conclusivos.

Depois de 6 meses de início da experiência *P. cinnamomi* reisolou-se em todos os tratamentos, excepto nas testemunhas não infestadas e nos sobreiros tratados com 20 mg/l de fosfato di-hidrogénio de potássio. As percentagens de reisolamento variaram entre 1,7 e 5,6 para os sobreiros e 14,1 e 27,8% para as azinheiras.

Ao fim de 12 meses, somente foi possível reisolar o patogénio a partir de sobreiros e azinheiras testemunhas infestadas, não pulverizadas e pulverizadas com fosfito de potássio e de azinheiras tratadas e pulverizadas com fosfito de potássio em percentagens de 19,4 % para sobreiros e de 1,5 a 22,2% para azinheiras.

6.3.7. Efeito de dois métodos de aplicação de substâncias químicas no controlo de *Phytophthora cinnamomi* em sobreiros submetidos a encharcamento 2 dias sucessivos por semana (Experiência 6.H)

Nas experiências anteriores as substâncias químicas foram sempre aplicadas directamente no solo. Nesta experiência, além de equiparar o efeito de três substâncias químicas, dois fosfitos e um ácido, pretendeu-se comparar o método de aplicação no solo com o de pulverização.

Os sobreiros utilizados nesta experiência adquiriram-se num viveiro comercial e tinham 6 meses de idade. As plantas foram transferidas dos tabuleiros com alvéolos onde cresciam, para vasos iguais aos utilizados na experiência anterior. Usou-se como substrato uma mistura de areia, e turfa (1:1 em volume), igualmente complementado com nutrientes, como referido em 4.2.1.1. Os isolamentos utilizados para a infestação das plantas foram PA₁₂ e PA₂₀, com os quais se preparou uma única suspensão de micélio e clamidósporos. Os procedimentos seguidos para a preparação do inóculo e a infestação de plantas foram os referidos em 4.2.1.2.

Realizaram-se dez repetições por variável experimental (substância química, tipo de aplicação e dose aplicada), testemunhas infestadas e não infestadas. Os vasos foram colocados em caixas (40 x 30 x 24 cm) previamente lavadas com lixívia a 10%. As plantas repartiram-se por dois blocos de cinco plantas, distribuídos ao acaso pelas bancadas da estufa, para eliminar o efeito de lugar. A unidade experimental foi o vaso com uma planta.

Depois das plantas permanecerem 1 semana na estufa, realizou-se o tratamento, que consistiu na aplicação de 50 ml da solução de cada substância activa a metade dos vasos e na pulverização das plantas da outra metade, de acordo com as doses indicadas na Tabela 6.14. A aplicação por pulverização processou-se de forma semelhante à referida na experiência anterior. O tratamento repetiu-se mensalmente durante o tempo que decorreu a experiência, realizando-se sempre no dia anterior ao encharcamento, que decorreu durante dois dias sucessivos por semana (Figura 6.4).

Tabela 6.14 - Substâncias químicas, tipo de aplicação e doses aplicadas mensalmente a plantas jovens de sobreiro, durante 3 meses

Substância química ^a	Tipo de Aplicação	Dose ^b
Fosfito de magnésio 10% MgO	Rega	2,5 ml/l 1,25 ml/l
	Pulverização	100 ml/l 50 ml/l
Fosfito de potássio 50 % K ₂ HPO ₃	Rega	1,67 ml/l 0,83 ml/l
	Pulverização	3 ml/l 1,5 ml/l
Pentóxido de fósforo 54% P ₂ O ₅	Rega	468,9 µl/l 234,5 µl/l
	Pulverização	2 ml/l 1 ml/l

^ap/p - Relação peso/peso; ^b A dose indicada corresponde ao produto comercial.

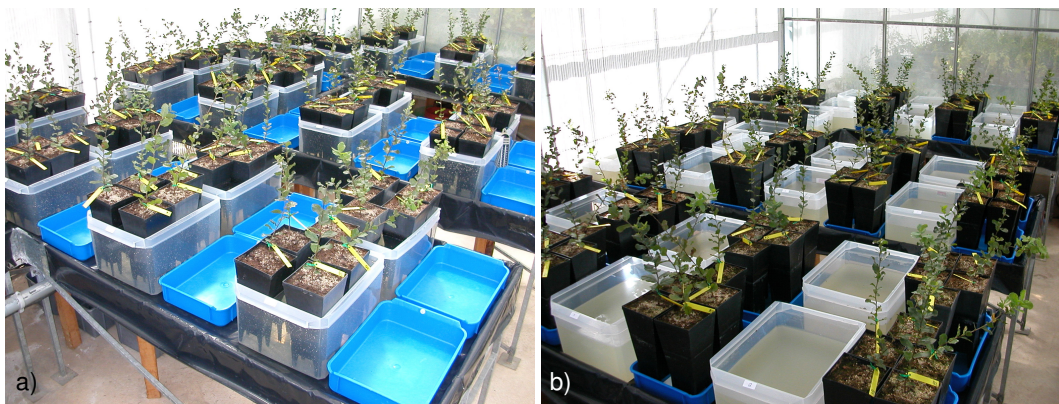


Figura 6.4 - Aspecto geral das plantas na estufa. a) Plantas submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana; b) As mesmas plantas fora de água.

A experiência decorreu durante 3 meses numa estufa, onde a temperatura média variou entre 14 e 29°C. Ao fim deste período as testemunhas infestadas mostraram sintomas da doença.

O processo seguido para a avaliação de sintomas na parte aérea e radicular, reisolamento de *P. cinnamomi* e análise estatística dos resultados foi idêntico ao seguido nas experiências anteriores.

Resultados

A sintomatologia observada nas testemunhas infestadas foi a característica das plantas infectadas com *P. cinnamomi*. As testemunhas não infestadas mostraram um bom desenvolvimento, tanto na parte aérea como na parte radicular. As plantas tratadas apresentaram um desenvolvimento maior ou menor, consoante o tratamento. Na Figura 6.5 pode apreciar-se a sintomatologia dos sobreiros tratados com as várias substâncias e testemunhas.

A Tabela 6.15 apresenta os valores médios da severidade de sintomas na parte aérea e radicular das plantas e respectivas comparações de médias. As análises de variância e comparações de médias encontram-se no Anexo VIII: G.

Tabela 6.15 - Efeito de substâncias químicas e tipo de aplicação no controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de sobreiro submetidas a encharcamento 2 dias sucessivos por semana

Substância química	Tipo de aplicação	Dose ¹	Severidade média de sintomas ²	
			Aéreos	Radiculares
Fosfito de magnésio	Rega	2,5 ml/l	1,3 ef	3,1 ab
		1,25 ml/l	1,1 fg	3,1 ab
	Pulverização	100 ml/l	3,0 a	3,1 ab
		50 ml/l	2,6 ab	3,1 ab
Fosfito de potássio	Rega	1,67 ml/l	1,7 cdef	2,9 bc
		0,83 ml/l	2,8 ab	3,4 a
	Pulverização	3 ml/l	2,4 abc	3,2 ab
		1,5 ml/l	2,3 abcd	3,4 a
Pentóxido de fósforo	Rega	468,9 µl/l	3,0 a	3,3 ab
		234,5 µl/l	2,6 ab	3,3 ab
	Pulverização	2 ml/l	2,8 a	3,2 ab
		1 ml/l	1,6 def	2,5 c
Testemunhas infestadas		—	2,4 abcd	3,2 ab
Testemunhas não infestadas		—	0,6 g	1,1 d

¹ A dose indicada corresponde ao produto comercial; ² A escala utilizada para avaliar a severidade de sintomas foi: 0 = sem sintomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99, 4 = 100% de tecido afectado; Em cada coluna os valores seguidos de uma letra comum não mostraram diferenças significativas segundo o teste LSD (Diferença Mínima Significativa) de Fisher para P = 0,05 (Steel e Torrie 1985).

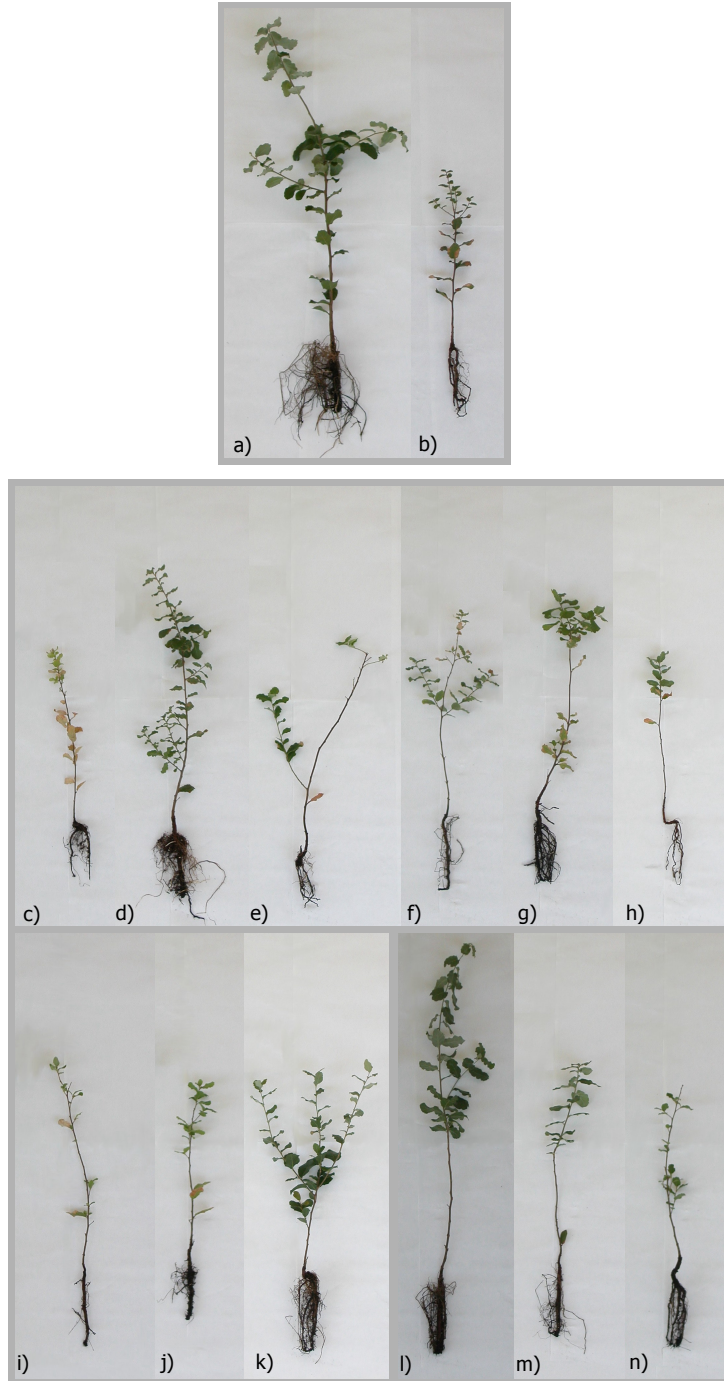


Figura 6.5 - Sintomatologia dos sobreiros tratados por dois métodos de aplicação de substâncias químicas para controlo da infecção por *Phytophthora cinnamomi*. a) Testemunha não infestada; b) testemunha infestada); Plantas na parte superior tratadas por pulverização (c – h); Plantas na parte inferior tratadas com solução aplicada ao solo (i – n); c) e i) tratadas com ácido fosfórico, dose alta; d) e j) com ácido fosfórico, dose baixa; e) e k) com fosfito de magnésio, dose alta; f) e l) com fosfito de magnésio, dose baixa; g) e m) com fosfito de potássio, dose alta; h) e n) com fosfito de potássio, dose baixa.

A análise de variância para a avaliação visual dos sintomas nas raízes mostrou diferenças significativas entre os vários tratamentos. O tratamento de pulverização com a dose mais baixa de pentóxido de fósforo (1 ml/l) foi o único que se mostrou eficaz na redução da severidade de sintomas radiculares da doença. A severidade apresentada por estas plantas, foi no entanto, significativamente mais elevada do que a apresentada pelas testemunhas não infestadas. Todos os restantes tratamentos não tiveram nenhum efeito na redução da sintomatologia da doença nas raízes.

A análise global de variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea também mostrou diferenças significativas entre os vários tratamentos. Neste caso, as plantas tratadas com fosfito de magnésio, nas duas doses aplicadas ao solo, foram as que apresentaram uma severidade de sintomas significativamente mais baixa que a apresentada pelas testemunhas infestadas. Os sobreiros tratados com a dose mais baixa de fosfito de magnésio (1,25 ml/l) foram os que exibiram os sintomas mais ligeiros, semelhantes aos das testemunhas não infestadas. Estes resultados foram inesperados, na medida em que a grande maioria das raízes destas plantas encontravam-se mortas no final da experiência.

A severidade de sintomas na parte aérea das plantas não foi tão severa como a exibida pelas raízes. Tal como já aconteceu em experiências anteriores, a sintomatologia nas raízes não se reflectiu na parte aérea, pelas razões já explicadas anteriormente, quando os sistemas radiculares ainda apresentavam raízes funcionais.

No final da experiência foi possível o reisolamento de *P. cinnamomi*, a partir das raízes das plantas de todos os tratamentos e das testemunhas infestadas, com percentagens que variaram entre 66,7 e 100%. Não se reisolou das testemunhas não infestadas.

6.3.8. Efeito da aplicação de substâncias químicas por injeção no tronco em sobreiros adultos (Experiência 6.I)

Foram utilizadas as substâncias químicas referidas na *Experiência 6.H*. As injeções foram gentilmente preparadas e cedidas pela LLT Agro, Nutrição Vegetal Lda. de Ponte de Sor.

Os sobreiros situam-se na Serra do Caldeirão, próximo de Barranco do Velho, numa zona onde anteriormente se tinha detectado *P. cinnamomi*. São todas árvores adultas que já haviam sido descortçadas pelo menos uma vez.

As árvores foram aleatoriamente marcadas e tratadas com as injeções. Para a aplicação das injeções utilizou-se um berbequim que furava o tronco até ao lenho, a uma altura de 1-1,5 m.

Neste orifício introduziu-se um tubo de plástico de 8 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro. A este tubo foi adaptada uma embalagem, onde se encontravam sob pressão, 225 ml de uma solução de substância química (injecção). A pressão na embalagem permitia a introdução da solução no tronco. Por cada árvore aplicaram-se duas injecções com a mesma substância química (Figura 6.6). Trataram-se 10 sobreiros por substância química (ácido fosfórico, fosfito de potássio e fosfito de magnésio). Marcaram-se também 10 sobreiros que se usaram como testemunhas. No momento da aplicação das injecções, avaliou-se o grau de desfoliação que as árvores apresentavam, atribuindo-lhes uma classe, segundo a escala com seis valores (0-5) proposta por Ferreti (1994) e referida em 2.1. Novas avaliações foram realizadas 6 e 12 meses após a aplicação das injecções.



Figura 6.6 - Sobreiro adulto tratado com duas injecções. (As setas indicam as injecções).

Resultados

Na Figura 6.6 pode-se apreciar a evolução do índice de desfoliação médio dos sobreiros tratados com injeções no tronco, no início da experiência (Primavera 2006), ao fim de 6 meses (Outubro 2006) e 12 meses (Primavera 2007). Este índice de desfoliação é a média ponderada do número de sobreiros em cada classe de desfoliação, tratados com a mesma substância química.

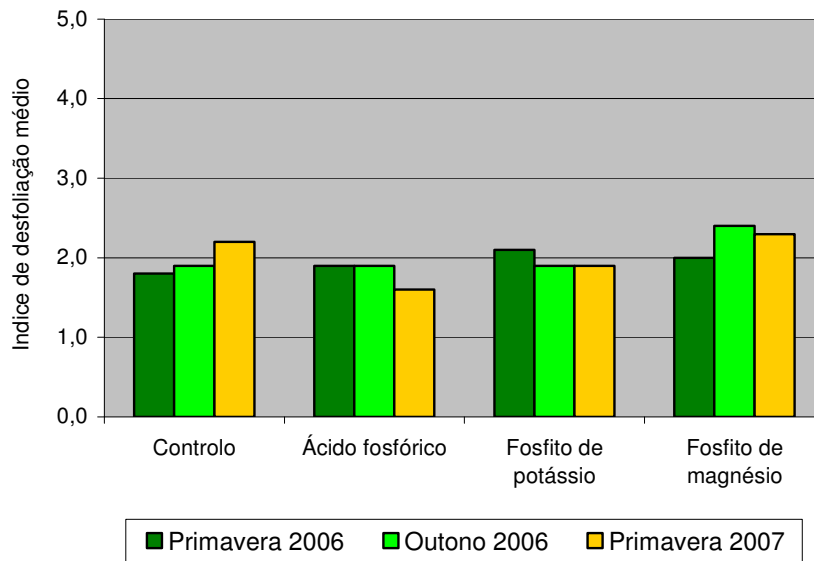


Figura 6.6 - Índice de desfoliação médio dos sobreiros tratados com injeções no tronco. (O índice de desfoliação é dado pela média ponderada do número de sobreiros, em cada classe de desfoliação, tratados com a mesma substância química).

A análise de variância do índice de desfoliação médio dos sobreiros não mostrou diferenças significativas entre tratamentos, nem entre épocas de avaliação (Anexo VIII: H). Na Figura 6.6 pode-se detectar uma ligeira tendência na redução da severidade da doença nas árvores tratadas com pentóxido de fósforo (ácido fosfórico) ao fim de 12 meses. Por outro lado, as árvores tratadas com fosfito de potássio apresentavam já uma ligeira redução da severidade da doença ao fim de 6 meses, porém esta redução não se acentuou com o decorrer da experiência, verificando-se antes uma paragem no desenvolvimento da doença.

Pelo contrário, as árvores tratadas com fosfito de magnésio apresentaram um agravamento da doença ao fim de 12 meses, à semelhança do que aconteceu com as testemunhas.

Aguardam-se novas avaliações do grau de desfoliação das árvores para verificar se as tendências observadas se mantêm.

6.4. DISCUSSÃO

As experiências *in vitro* mostraram que todas as substâncias utilizadas (fosetil de alumínio, fosfito de potássio e metalaxil) inibiram o crescimento micelial dos dois isolamentos de *P. cinnamomi*. As concentrações utilizadas produziram reduções de crescimento micelial superiores a 61% no isolamento de sobreiro (PA₂₀) e a 73% no isolamento de azinheira (PE₁₃).

O fosetil de alumínio tem sido referido como tendo um fraco efeito inibidor do crescimento micelial *in vitro* de algumas espécies de *Phytophthora* (Erwin e Ribeiro 1996). Contudo, os resultados deste estudo mostraram que a concentração utilizada desta substância (100 ppm) produziu inibições superiores a 70% em ambos os isolamentos de *P. cinnamomi*, havendo no entanto uma maior inibição do isolamento procedente de sobreiro.

O efeito inibidor do fosfito de potássio já tinha sido referido para várias espécies de *Phytophthora*, existindo contudo uma grande variabilidade na sensibilidade ao fosfito entre isolamentos de espécies de *Phytophthora* e isolamentos da mesma espécie (Coffey e Brower 1984; Fenn e Coffey 1984; Coffey e Joseph 1985; Ouimette e Coffey 1989; Aberton *et al.* 1999; Wilkinson *et al.* 2001a). Neste estudo, o fosfito de potássio produziu uma inibição quase total do crescimento das colónias dos dois isolamentos.

Quanto ao metalaxil verificou-se que foi mais eficaz na redução do crescimento micelial do isolamento procedente de azinheira do que do isolamento proveniente de sobreiro. Inibições mais acentuadas que as obtidas neste estudo, foram observadas com a mesma concentração de metalaxil em isolamentos de *P. cinnamomi* procedentes de *Abies fraseri* (Benson e Grand 2000).

Num estudo em que se utilizaram as mesmas substâncias químicas e doses (Cuesta 1999; Sánchez *et al.* 2003a), verificaram-se menores inibições de crescimento de *P. megasperma* e de *Phytophthora* sp. do que as obtidas para *P. cinnamomi*.

A sensibilidade de isolamentos de espécies de *Phytophthora* às substâncias químicas verificada *in vitro* não significa que exista uma relação directa com a sensibilidade *in planta*. De facto, Wilkinson *et al.* (2001a) questionaram se os métodos *in vitro* são apropriados para determinar a sensibilidade *in planta*. Estudos sobre a sensibilidade de *P. cinnamomi* ao fosfito de potássio indicam que o fosfito afecta esta espécie, induzindo a produção em excesso de elicinas ou inibindo a produção de supressores, o que aumenta a capacidade da planta para reconhecer o patogénio e conduz a uma mais rápida resposta de defesa do hospedeiro (Grant *et al.* 1990; Saindrenan *et al.* 1990).

Para *L. albus* todas as substâncias químicas aplicadas foram eficazes para impedir a manifestação de sintomas, embora isto não se tivesse verificado com algumas das doses ensaiadas. Quanto aos sobreiros e azinheiras, a eficácia de controlo das substâncias químicas diferiu consoante as condições em que as plantas se desenvolveram.

A bibliografia refere excelentes resultados da utilização de fosetil de alumínio no controlo de doenças causadas por *Phytophthora* spp. (Schwinn 1983; Erwin e Ribeiro 1996). Outros trabalhos referidos por estes últimos autores, mencionam uma grande variabilidade de eficácia desta substância.

Neste estudo o fosetil de alumínio só se mostrou eficaz quando utilizado em condições severas de encharcamento contínuo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Coffey *et al.* (1984) em abacateiros que se desenvolveram em condições muito propícias à infecção. No entanto, nestas condições, o fosetil de alumínio não se mostrou eficaz no controlo da infecção por *P. megasperma* em oliveiras jovens infectadas (Cuesta 1999; Sánchez *et al.* 2003a).

Quanto aos fosfitos, os resultados também mostraram variabilidade de eficácia no controlo da infecção, quando incorporado no substrato, consoante as condições em que as plantas se desenvolveram.

Nas experiências em que se utilizou vermiculite o fosfito de potássio mostrou-se eficaz na redução da severidade de sintomas. Porém, nas experiências em que se utilizou a mistura de areia, limo e turfa, só foi eficaz nas plantas sujeitas a rega gota a gota, ao fim de 6 e 12 meses. Em condições severas de encharcamento, altamente favoráveis à actividade de *P. cinnamomi*, o fosfito de potássio não se mostrou eficaz, mesmo com a dose mais elevada que se utilizou.

No que se refere à aplicação desta substância por pulverização, os resultados não se mostraram encorajadores. Pelo contrário, quando aplicado por injeção no tronco de sobreiros adultos, o fosfito de potássio revelou-se eficaz, impedindo a evolução de sintomas na parte aérea dos sobreiros tratados.

Esta variabilidade de eficácia não se observou na região Ocidental da Austrália, onde o fosfito de potássio tem vindo a ser utilizado com sucesso nas florestas de *Eucalyptus marginata* desta região, aplicado tanto por pulverização, como por injeções no tronco de árvores e arbustos. (Jackson *et al.* 2000; Hardy *et al.* 2001). Também na região de Huelva em Espanha, Romero *et al.* (2004) verificaram uma paragem na evolução dos sintomas na parte aérea de sobreiros e azinheiras, quando tratados com fosfito de potássio injectado no tronco.

Relativamente à adição de fosfito de magnésio no solo, os resultados foram aparentemente contraditórios quanto aos sintomas apresentados pelas plantas na parte aérea e nas raízes. Na verdade, enquanto que a maior parte das raízes estava morta, a parte aérea apresentava sintomas

muito ligeiros, não reflectindo a severidade que o sistema radicular evidenciava. Esta diferença poderá explicar-se pelo facto de a taxa de destruição das raízes ter sido mais lenta do que a verificada nos tratamentos com as outras substâncias. Isto terá permitido à planta dispor de raízes funcionais suficientes para suprir as suas necessidades, durante a maior parte do tempo em que a experiência decorreu. De facto, no final da experiência o sistema radicular das plantas tratadas com fosfito de magnésio ainda apresentava muitas raízes, embora mortas. Pelo contrário, tanto o sistema radicular das testemunhas infestadas como o das plantas dos outros tratamentos, já não tinham praticamente raízes, que foram morrendo e decompondo-se ao longo da experiência.

O fosfito de magnésio quando se aplicou por pulverização não teve nenhum efeito no controlo da infecção, uma vez que no final da experiência as plantas exibiram sintomas tão severos quanto os das testemunhas infestadas. O mesmo se verificou quando esta substância foi aplicada por injeção no tronco de sobreiros.

Os fosfitos têm vindo a ser estudados como possíveis substitutos dos fosfatos, como fonte de fósforo para as plantas, com o benefício adicional de terem efeito fungicida no controlo de Oomicetes (Förster *et al.* 1998). Contudo, McDonald *et al.* (2001) questionam a utilização de fosfitos como fertilizante, nomeadamente em solos deficientes em fósforo, quando referem o efeito prejudicial da aplicação de fosfito a plantas jovens de *Brassica nigra* que se desenvolviam em meio de agar, com deficiência de fósforo. Este efeito já tinha sido referido por Förster *et al.* (1998) ao observarem o desenvolvimento de sintomas de deficiência de fósforo e redução significativa de crescimento em plantas de tomate e pimento tratadas com fosfito e desenvolvendo-se em cultura hidropónica, quando comparado com plantas desenvolvendo-se sem deficiência de fósforo. McDonald *et al.* (2001) cita um estudo em que se refere que o fosfito obstrui a resposta morfológica e molecular normalmente observada em tomate com deficiência de fósforo e é muito fitotóxico quando este elemento está ausente do meio de cultura.

Uma vez que o fosfato de potássio e o ácido fosfórico são habitualmente usados como fertilizantes, põe-se a questão de saber se o mecanismo envolvido no processo de defesa da infecção está relacionado com alguma deficiência de fósforo.

O tratamento com fosfato de potássio foi eficaz no controlo da infecção por *P. cinnamomi* nas plantas de sobreiro e azinheira ao fim de 6 e 12 meses de tratamento.

Embora o fosfato seja um fertilizante que estimula a regeneração do sistema radicular, as plantas tratadas com fosfato de potássio não apresentaram maior quantidade de raízes do que as testemunhas infestadas. No entanto, as poucas raízes que ainda exibiam, estavam sãs.

Também, ensaios realizados por Cuesta (1999) com oliveiras infectadas por *P. megasperma*, mostraram que o fosfato de potássio se revelou eficaz no controlo da infecção.

A aplicação por pulverização de ácido fosfórico revelou-se eficaz no controlo da infecção por *P. cinnamomi*. As plantas tratadas com este produto apresentaram um sistema radicular relativamente bem desenvolvido e com uma quantidade apreciável de raízes funcionais, possivelmente devido ao efeito fertilizante deste produto. Esta eficácia também se observou quando se aplicou por injeção no tronco. No entanto, quando a aplicação deste produto foi realizada directamente no substrato, não foi observado nenhum efeito na redução da severidade de sintomas, possivelmente devido à precipitação do fósforo.

Tal como observado na experiência *in vitro* sobre o efeito de substâncias químicas no crescimento de *P. cinnamomi*, o metalaxil revelou-se eficaz no controlo da infecção *in planta*. Esta sensibilidade ao metalaxil foi também observada por Lazorovits e Ward (1982).

Nas experiências com sobreiros e azinheiras o metalaxil, foi a substância química, que em todas as situações experimentadas, com diferentes substratos e regimes hídricos, se mostrou mais eficaz no controlo da infecção por *P. cinnamomi*.

Coffey *et al.* (1984) também verificaram que o metalaxil conseguiu controlar a infecção por *P. cinnamomi* em abacateiros. Em oliveiras infectadas com *P. megasperma* a aplicação de metalaxil foi igualmente o que resultou ser mais eficaz (Cuesta 1999; Sánchez *et al.* 2003a).

Todas as substâncias químicas utilizadas neste trabalho tiveram essencialmente um efeito fungistático, uma vez que, em muitas experiências, foi possível reisolar o patógeno utilizado como inóculo.

Os resultados do tratamento químico obtidos revelam uma grande variabilidade, que também é referida na bibliografia (Erwin e Ribeiro 1996). Nestes ensaios verificou-se que as substâncias químicas utilizadas foram capazes de controlar a infecção por *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras, em algumas situações. Contudo, a sua aplicação trás alguns inconvenientes que a bibliografia tem vindo a referir.

O fosfito de potássio, amplamente referido para o controlo da infecção por *P. cinnamomi* nas florestas na zona Ocidental da Austrália, tem a capacidade de diminuir a produção de esporângios e zoósporos, contudo, não impede a sua formação. Os zoósporos produzidos nas plantas tratadas com fosfito, são viáveis e potencialmente podem infectar outras plantas (Wilkinson 2001b). Esta substância também reduz a germinação de clamidósporos e induz a sua dormência (McCarren 2006) mas não afecta a capacidade de se formarem, estimulando, inclusivamente a sua produção (Coffey e Joseph 1985; McCarren 2006). Estudos realizados por este último autor sugerem que com o decorrer do tempo, *P. cinnamomi* entra em *stress* na presença do fosfito e em resposta, produz esporos de resistência, aumentando a quantidade de inóculo. Consequentemente, em

plantas, antes tratadas com fosfito de potássio, será previsível o aparecimento da doença se as condições de temperatura e humidade forem favoráveis para o crescimento do patógeno.

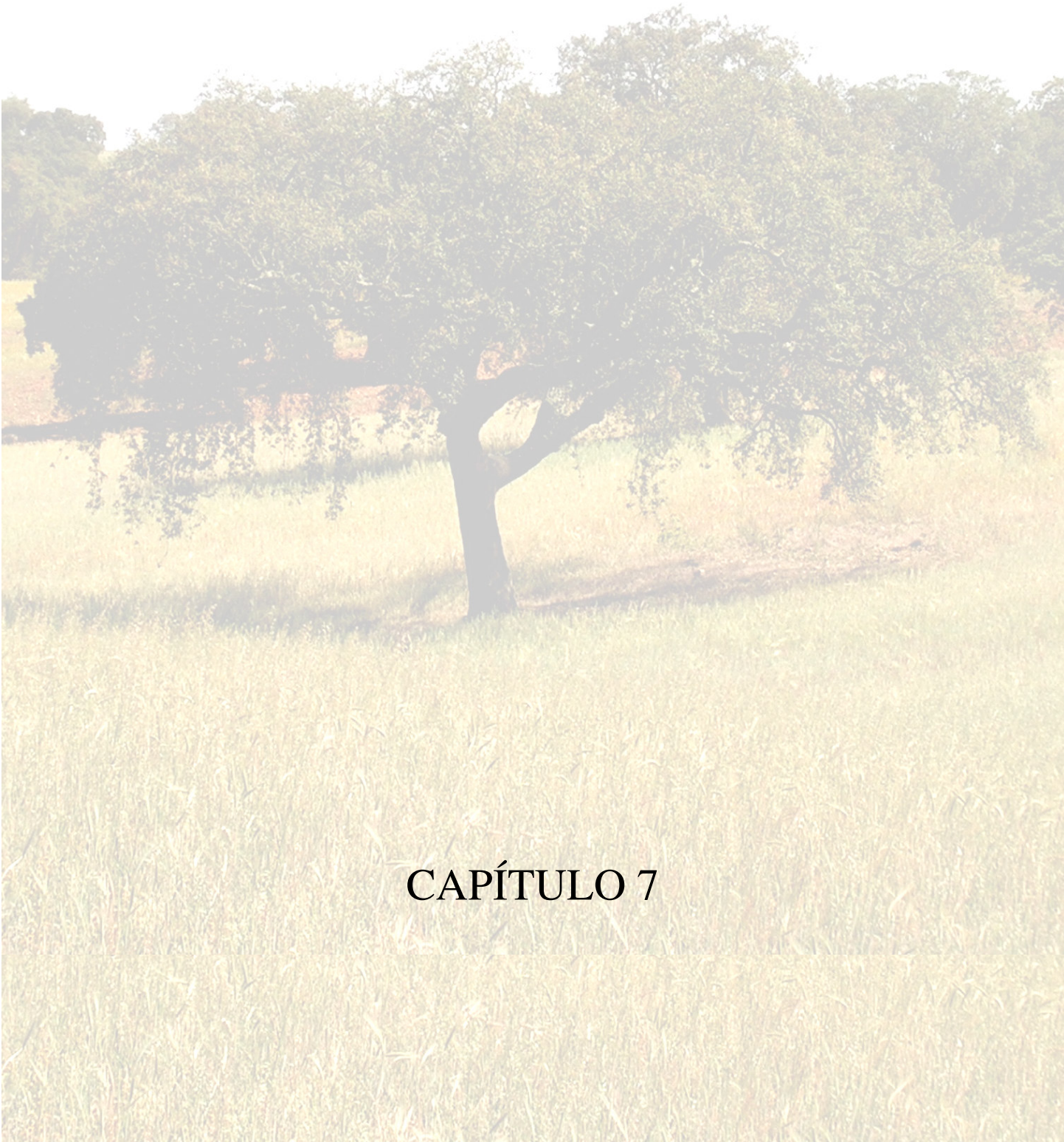
Embora o metalaxil tenha dado os melhores resultados no controlo da infecção em sobreiros e azinheiras, a sua utilização também trás algumas desvantagens. A mais significativa é a sua incapacidade para eliminar os propágulos de *Phytophthora*, uma vez que somente possui acção fungistática (Erwin e Ribeiro 1996). Logo que o metalaxil é degradado, química ou biologicamente, os propágulos retomam a sua capacidade de germinar (Bailey e Coffey 1985).

Outra desvantagem do uso de metalaxil é o desenvolvimento da resistência das populações de *Phytophthora* após sucessivas aplicações. O metalaxil deverá ser utilizado criteriosamente tal como referido por Benson e Grand (2000), nomeadamente quanto às doses e frequência de aplicação recomendadas.

Apesar das desvantagens referidas, o uso do metalaxil e do fosfito de potássio poderá ser uma hipótese a considerar no controlo do declínio causado por *P. cinnamomi* em povoamentos de *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Também o uso de ácido fosfórico e de fosfatos em geral, deverá ser considerado, pela possível implicação do fósforo nos processos de defesa da planta.

Os resultados deixam perceber que existem factores que condicionam a eficácia destas substâncias, no controlo da doença, que não estão devidamente esclarecidos. Referem-se nomeadamente, doses, modo de aplicação, frequência e época de tratamentos.

Mais estudos serão necessários para explicar as causas da grande variabilidade observada e apreciar as potencialidades da utilização destas substâncias na estufa e no campo.



CAPÍTULO 7

CAPITULO 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho é uma contribuição para o conhecimento da distribuição de *P. cinnamomi* em áreas ocupadas por *Q. suber* e *Q. rotundifolia* em Portugal e na parte Ocidental de Andaluzia e dos factores que influenciam a infecção destas espécies por este patogénio. Avaliou-se a incidência e a severidade do declínio em sobreiros distribuídos de Norte a Sul de Portugal, estudou-se a patogenicidade de *P. cinnamomi* nestas espécies de *Quercus* e analisaram-se possibilidades de controlo químico.

Este estudo tem como principais conclusões as seguintes:

- 1 – Mais de 79% dos focos de declínio de sobreiros e azinheiras, amostrados em Portugal e na Andaluzia Ocidental, estavam infestados com *P. cinnamomi*.

Foi possível isolar o patogénio em todos os focos amostrados em Espanha. Em Portugal, 75% dos locais estavam infestados, sendo o Algarve a zona mais afectada com a totalidade dos locais infestados. Na zona de Trás-os-Montes e Alto Douro não foi possível detectar *P. cinnamomi*;

- 2 – Obtiverem-se elevadas percentagens de isolamento de *P. cinnamomi* a partir de amostras de raiz (80%) e de solo da rizosfera (68,9%). Contudo, não se observou nenhuma correlação significativa entre a percentagem de isolamento de *P. cinnamomi* e o índice médio de desfoliação das árvores amostradas;

- 3 – O presente estudo permitiu registar no campo, e pela primeira vez em Portugal, a progressão da incidência e da severidade da doença do declínio em sobreiros.

A incidência do declínio no início do estudo foi total em metade das parcelas e 5 anos depois, em todas as parcelas.

Quanto à severidade da doença expressa pelo índice de desfoliação médio dos sobreiros, verificou-se que foi sempre aumentando desde o início do estudo. No primeiro ano não foram detectadas mortes, no entanto, depois de 5 anos de avaliações, 12,9% das árvores estavam mortas (classe desfoliação = 4) e 28,5% apresentando uma acentuada desfoliação (classe de desfoliação = 3), ou seja, no final deste estudo 41,1% dos sobreiros encontravam-se mortos ou praticamente irrecuperáveis;

- 4 – Dos isolamentos obtidos nas prospeções realizadas em zonas de sobreiros e azinheiras em Portugal e Espanha, 92,9% eram de *P. cinnamomi* Rands e os restantes de *P. drechsleri* Tucker.

O estudo sobre a caracterização morfológica destes isolamentos, não permitiu definir grupos homogéneos, nem segundo a procedência geográfica nem segundo o hospedeiro.

O estudo do comportamento em cultura indicou uma grande diversidade dos isolamentos de *Phytophthora* spp. sugerindo uma adaptação às condições climatéricas predominantes na região. Assim, foi possível definir 3 grupos com base na taxa de crescimento máxima e nas temperaturas mínima e óptima. Os isolamentos identificados como *P. cinnamomi* distribuem-se por dois grupos: um, com isolamentos procedentes da zona Sul de Portugal e do Oeste da Andaluzia, com temperaturas óptimas de crescimento elevadas e mínimas baixas; outro grupo, constituindo por isolamentos procedentes da zona Centro de Portugal e do Sul de Andaluzia, com temperaturas óptimas menos elevadas e mínimas mais altas. Ao terceiro grupo pertencem os isolamentos de *P. drechsleri* com uma temperatura óptima elevada e mínima muito baixa.

Estes grupos coincidem com os sugeridos pela análise de resultados moleculares obtidos por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*);

- 5 – Os sintomas da doença foram reproduzidos em plantas jovens de sobreiro e azinheira, em diversas condições experimentais utilizando diferentes métodos de infestação e isolamentos de *Phytophthora* spp.

Relativamente aos métodos de infestação, os inóculos em vermiculite-aveia e em suspensão aquosa, foram igualmente eficazes quanto à indução dos sintomas nas raízes das plantas.

Em geral, o incremento da concentração de zoósporos induziu um aumento da severidade de sintomas nas raízes.

A temperatura não mostrou ser um factor limitativo do processo infeccioso e da manifestação de sintomas, em plantas jovens de azinheiras.

O desenvolvimento da doença foi mais rápido nas plantas submetidas a condições de contínua saturação hídrica do solo, do que a rega normal. Contudo, o sistema radicular das plantas sujeitas a ambos os regimes hídricos estavam severamente afectados.

Os isolamentos mostraram igual capacidade para induzir sintomas da doença nas raízes de plantas submetidas a condições de contínua saturação hídrica do solo. O isolamento de *P. drechsleri* mostrou-se tão virulento quanto os de *P. cinnamomi*;

- 6 – O método semi-quantitativo da avaliação visual de sintomas foi o que melhor expressou a severidade da doença, pois permitiu examinar a funcionalidade das raízes, que não era possível ser detectada com os métodos quantitativos ensaiados;

- 7 – A severidade de sintomas na parte aérea das plantas, não traduziu, na maior parte das vezes, a severidade detectada nas raízes. Isto pode ter sido devido ao facto de: as espécies de plantas utilizadas serem de crescimento lento; as experiências terem sido de curta duração; os sistemas radiculares, embora danificados, ainda apresentassem no final das experiências, raízes funcionais que permitiram às plantas manter o desenvolvimento da parte aérea.
Por estas razões, a expressão da severidade da doença em experiências com plantas jovens de sobreiro e azinheira é apreciada com mais rigor, pela avaliação da severidade de sintomas nas raízes;

- 8 – No estudo sobre o efeito de fosetil de alumínio, fosfito de potássio e metalaxil no crescimento *in vitro* dos isolamentos de *P. cinnamomi*, verificou-se que todos inibiram o crescimento, tendo sido o fosfito de potássio o que causou maiores inibições;

- 9 – A eficácia das substâncias químicas utilizadas no controlo da infecção por *P. cinnamomi* em sobreiros e azinheiras, diferiu consoante as condições em que as plantas se desenvolveram.
O fosetil de alumínio só se mostrou eficaz no controlo da doença quando utilizado em condições de contínua saturação hídrica do solo.
O fosfito de potássio foi eficaz quando as plantas se desenvolviam em vermiculite e na mistura de areia, limo e turfa submetidas a rega gota a gota. Quando aplicado por injeção no tronco de sobreiros adultos, também impediu a evolução de sintomas na parte aérea das árvores tratadas. A aplicação de fosfito de magnésio no solo provocou um ligeiro atraso na manifestação dos sintomas na parte aérea da planta.
Aplicações de fosfato de potássio e de ácido fosfórico também permitiram reduzir a severidade de sintomas causados por *P. cinnamomi*. O fosfato de potássio foi eficaz no controlo da infecção por este patógeno em plantas jovens de sobreiro e azinheira após 6 e 12 meses de tratamento. Por outro lado, a aplicação de ácido fosfórico por pulverização também se revelou eficaz, pois as plantas tratadas apresentaram um sistema radicular relativamente bem desenvolvido e com uma quantidade apreciável de raízes funcionais. Quando este produto foi aplicado por injeção no tronco, induziu uma ligeira redução da severidade de sintomas na copa das árvores ao fim de 12 meses de tratamento.
O metalaxil foi das substâncias ensaiadas, aquela que se mostrou mais eficaz, em todas as situações;

10 – As substâncias químicas ensaiadas comportaram-se principalmente como fungistáticas, uma vez que no final de muitas experiências foi possível reisolar o patogénio das raízes das plantas tratadas.

Mais estudos serão necessários para esclarecer aspectos relacionados com patogenicidade e controlo da infecção por *P. cinnamomi* em *Q. suber* e *Q. rotundifolia* na zona mediterrânea. De entre os vários aspectos, destacam-se:

- * Estudos relacionados com o registo da progressão da severidade da doença em sobreiros e azinheiras deverão prosseguir para uma melhor apreciação do problema do declínio, alargando o estudo a novas áreas;
- * Estudos sobre a quantificação de *P. cinnamomi* deverão realizar-se com vista a correlacionar o índice de infestação do solo com a desfoliação das árvores;
- * Prosseguir os estudos no sentido de confirmar se a variabilidade detectada pela técnica de AFLP em *P. cinnamomi* está relacionada com a zona geográfica de procedência dos isolamentos e determinar se esta variabilidade estará eventualmente relacionada com virulência dos isolamentos;
- * Determinar o papel desempenhado por *P. drechsleri* e *Py. spiculum* no declínio de *Q. suber* e *Q. rotundifolia*;
- * A influência da temperatura no processo de infecção e desenvolvimento de sintomas em sobreiros e azinheiras, deverá ser estudado em condições mais próximas da realidade, para uma melhor previsão da progressão do declínio num cenário de alteração climática;
- * Mais estudos serão necessários para avaliar o controlo químico do declínio em sobreiros e azinheiras. Doses, modos e épocas de aplicação de substâncias químicas deverão ser estudadas e testadas em campo.

Também deverão ser desenvolvidos estudos no sentido de conhecer o efeito dos fosfitos em árvores que crescem em solos com baixos teores de fósforo, como são por exemplo os solos da Serra do Caldeirão, em Portugal, dado que a bibliografia refere que a adição de fosfito a plantas

crescendo num meio com deficiência de fósforo, pode ter um efeito prejudicial no desenvolvimento das plantas (Förster *et al.* 1998; McDonald *et al.* 2001).

No que se refere a este último aspecto, há a considerar que o controlo químico da infecção causada por *P. cinnamomi* é uma questão polémica. No tratamento de grandes áreas naturais é necessário ponderar o aspecto ecológico e económico.

A complexidade do fenómeno do declínio faz com que não se possa encontrar uma solução simples, um tratamento único e eficaz que sirva para todas as situações e seja sempre aplicável. É necessário integrar práticas culturais e fitossanitárias para atenuar a incidência e severidade do declínio. Nesse sentido, a investigação será importante na procura e avaliação de novos métodos de controlo, para o desenvolvimento de uma silvicultura que minimize o impacto do declínio. Estes novos métodos devem integrar o uso de fungicidas com utilização de plantas resistentes, certificadas, selecção adequada dos locais para a sua instalação e boas práticas culturais. Estes métodos deverão ser principalmente, fáceis de aplicar, económicos e eficazes no controlo do declínio do sobreiro e da azinheira, árvores que tradicionalmente têm sido consideradas como pouco exigentes e que na Península Ibérica constituem comunidades de elevado valor ecológico, ambiental, social e económico.

Os agricultores / proprietários de sobreirais, montados ou *dehesas* na Península Ibérica, devem ser encorajados a adoptar estas medidas. O problema em muitas regiões é o abandono a que as propriedades foram sujeitas e, a menos que estes proprietários tenham uma prova da eficácia destes novos métodos de controlo, eles não estão dispostos a correr riscos financeiros. Kendrick (1988) refere que o controlo integral é uma aproximação ecológica para manter as plantas saudáveis e, não deixa de ser interessante constatar que as técnicas de controlo integrado são na sua maioria praticas tradicionais, desde há muito conhecidas e aplicadas pelos agricultores.

A large, spreading tree with dense green foliage stands in a field of tall, golden-brown grass. The tree is the central focus, with its branches extending across the middle of the frame. The background shows a line of trees under a bright, clear sky. The overall scene is peaceful and natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberton, M.J.; Wilson, B.A.; Cahill, D.M. (1999) The use of potassium phosphonate to control *Phytophthora cinnamomi* in native vegetation at Anglesea, Victoria. *Australasian Plant Pathology* **28**, 225-234.
- Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology*. Fourth edition. San Diego: Academic Press.
- Ali, Z.; Smith, I.; Guest, D.I. (1999) Effect of potassium phosphonate on root rot of *Pinus radiata* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* **28**, 120-125.
- Allué, J.L. (1995) El cambio climático y los montes españoles. *Cuadernos de la SECF* **2**, 35-74.
- Alves, A.; Correia, A.; Luque, J.; Phillips, A. (2004) *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* **96** (3), 598-613.
- Analytical Software (2000) *Statistix 7. User's Manual*. Tallahassee, FL.
- Ancelmi, N.; Mazzaglia, A.; Vannini, A. (2000) The role of endophytes in oak decline. In: *Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives*. (eds. A. Ragazzi; I. Dellavalle). Firenze: Accademia Italiana di Scienze Forestali, pp. 131-144.
- Anónimo (1992) *Determinação das causas da morte do sobreiro nos concelhos de Santiago do Cacém, Grândola e Sines. Relatório de síntese*. Lisboa: Estação Florestal Nacional, Direcção Geral das Florestas, Caixa de Crédito Agrícola Mútuo de Santiago do Cacém.
- Anónimo (1994) *Contribuição para o estudo das causas do declínio do sobreiro em S. Brás de Alportel / Contribuição para o estudo das causas do declínio do sobreiro em S. Marcos da Serra. Relatório final. Análise global dos projectos*. Faro: Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, Universidade do Algarve.
- Anónimo (1996) *Detection, distribution and control of Phytophthora cinnamomi, the causal agent of Quercus suber decline*. Nato Science for Stability Programme - Phase III. Ref.: NATO SCIENCE FOR STABILITY PO-CORK-OAK II PROJECT.
- Anónimo (2001a) *Inventário Florestal Nacional, 3ª Revisão (1995-1998)*. Lisboa: Direcção Geral das Florestas.
- Anónimo (2001b) *Sudden oak death. Exotic pest alert*. Annual Meeting Forest Pathology Group. Gregynog, United Kingdom. 3-5 September 2001. Forestry Commission: Gregynog, United Kingdom.
- Anónimo (2004) *Sudden oak death. Protecting America's Woodlands from Phytophthora ramorum*. USDA Forest Service. VA, USA: Arlington.
- Anónimo (2006) *Sistema de Gestão Florestal Sustentável. Sector suberícola da Serra do Caldeirão*. Barranco do Velho, Loulé: Associação de Produtores Florestais da Serra do Caldeirão, Associação de Industriais e Exportadores de Cortiça / Delegação Regional do Baixo Alentejo e Algarve.

- Aryantha, I.P.; Cross, R.; Guest D. (2000) Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. *Phytopathology* **90**, 775-782.
- Baeta-Neves, C.M. (1948) A “investigação científica” e os problemas da “protecção” do sobreiro no Ribatejo. *Boletim Junta Nacional da Cortiça* **116**, 386-389.
- Baeta-Neves, C.M. (1949) A seca dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias* **2168**, 730-734.
- Baeta-Neves, C.M. (1950) *Introdução à entomologia florestal portuguesa*. Lisboa: Livraria Sá da Costa.
- Baeta-Neves, C.M. (1954) A seca dos sobreiros no Vale do Tejo. *Gazeta das Aldeias* **2284**, 568-570.
- Bailey, A.M.; Coffey, M.D. (1985) Biodegradation of metalaxil in avocado soils. *Phytopathology* **75**, 135-137.
- Balci, Y.; Halmschlager, E. (2001) Occurrence of *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 68-77.
- Balci, Y.; Halmschlager, E. (2003) Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. *Forest Pathology* **33**, 157-174.
- Benson, D.M.; Grand, L.F. (2000) Incidence of *Phytophthora* root rot of fraser fir in North Carolina and sensitivity of isolates of *Phytophthora cinnamomi* to metalaxil. *Plant Disease* **84**, 661-664.
- Bergero, R.; Perotto, S.; Girlanda, M.; Vidano, G.; Luppi M. (2000) Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology* **9**, 1639-1649.
- Biosca, E.G.; González, R.; López-Lópes, M.J.; Soria, S.; Montón, C.; Pérez-Laorga, E.; López M.M. (2003) Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology* **93**, 485-492.
- Bluett, V.; Weste, G.; Cahill D. (2003) Distribution of disease caused by *Phytophthora cinnamomi* in Wilsons Promontory National Park and potential for further impact. *Australasian Plant Pathology* **32**, 479-491.
- Bonilla, V.M. (2002) Patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* sobre *Quercus ilex* en cultivo hidropónico. Proyecto fin de carrera. Córdoba: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba.
- Bowers, J.H.; Mitchell D.J. (1991) Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. *Phytopathology* **81**, 178-184.
- Branquinho-d'Oliveira, A. (1931) Apontamentos para o estudo de duas doenças do sobreiro. *Revista Agronómica* **XIX**, 7-24.
- Brasier, C.M. (1978) Stimulation of oospore formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma* and its ecological implications. *Annals of Applied Biology* **89**, 135-139.

- Brasier, C.M. (1993) *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor in European oak decline. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992 (eds. N. Luisi; P. Lerario; A. Vannini). Bari: Tipolitografia-Putignano, pp. 49-57.
- Brasier, C.M. (1996) *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales des Sciences Forestieres* **53**, 347-358.
- Brasier, C.M.; Griffin, M.J. (1979) The taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* **72**, 111-143.
- Brasier, C.M.; Jung, T. (2001) Progress in understanding *Phytophthora* diseases of trees in Europe. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 4-18.
- Brasier, C.M.; Scott, J.K. (1994) European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin* **24**, 221-232.
- Brasier, C.M.; Moreira, A.C.; Ferraz, J.F.P.; Kirk, S. (1993a) High mortality of cork oak in Portugal associated with *Phytophthora cinnamomi*. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992 (eds. N. Luisi; P. Lerario; A. Vannini). Bari: Tipolitografia-Putignano, pp. 461-462.
- Brasier, C.M.; Robredo, F.; Ferraz, J.F.P. (1993b) Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology* **42**, 140-145.
- Brito-de-Carvalho, J.H. (1992) *O Sequeiro Algarvio. Actualidades e perspectivas*. Faro: Associação In-Loco.
- Brito-de-Carvalho, J.H. (1993) "Stress" do sobreiro e da azinheira ou a doença de Lopes Pimentel? Faro: CIDER, Centros de Investigação de Desenvolvimento e Economia Regional, Universidade do Algarve.
- Brito-de-Carvalho, J.H. (1994) *Sistemas agroflorestais da serra*. Silves, 5 de Maio. Manuscrito.
- Browne, G.T.; Mircetich, S.M. (1988) Effects of flood duration on the development of *Phytophthora* root and crown rots of apple. *Phytopathology* **78**, 846-851.
- Burgess, T.; McComb, J.A.; Colquhoun, I.; Hardy G.E.St J. (1999) Increased susceptibility of *Eucalyptus marginata* to stem infection by *Phytophthora cinnamomi* resulting from root hypoxia. *Plant Pathology* **48**, 797-806.
- Cadahia, J.M.; Cobos, J.M.; Soria, S.; Clauser, F.; Gellini, R.; Grossini, P.; Ferreira, M.C. (1991) *Observação de danos em espécies florestais mediterrâneas*. Lisboa: Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Secretaria-Geral Técnica e Comissão das Comunidades Europeias.
- Caetano, P.C.L. (1994) *O declínio do sobreiro no concelho de S. Brás de Alportel. Contribuição para o estudo da influencia de factores edafo-climáticos na incidência e severidade do declínio em zonas de umbria*. Relatório de estágio do curso de licenciatura em Engenharia Hortofrutícola. Faro: Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, Universidade do Algarve.

- Caetano, P.; Sánchez, J.E.; Sánchez, M.E.; Trapero, A. (2003) *Podredumbre radical de la encina y alcornoque*. Fichas divulgativas. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Caetano, P.; Sánchez, J.; Sánchez, E.; Trapero, A. (2004) *Phytophthora* spp. em sobreiros e azinheiras no sul da Península Ibérica. In: *Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*. Faro, 4 a 6 de Fevereiro 2004, pp. 127-131.
- Caetano, P.; Ávila, A.; Sánchez, M.E.; Trapero A.; Coelho, A.C. (2006) Molecular characterization of *Phytophthora cinnamomi* populations causing root rot on Mediterranean *Quercus* species. In: *Proceedings 12th Mediterranean Phytopathological Congress*. Rhodes Island, Greece 10-15 June 2006, pp. 297-299.
- Câmara-Pestana, J. (1898) Nova doença dos sobreiros. *Archivo Rural* **36**, 297-298.
- Câmara-Pestana, J. (1899) Nova doença dos sobreiros. *Archivo Rural* **3**, 46-48.
- Carlile, M.J. (1983) Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 95-107.
- Ceballos, L.; Ruiz-de-la-Torre, J. (1979) *Árboles y arbustos*. Madrid: ETSIM-Fundación Conde del Valle Salazar.
- Cela, P.G.; Gamarra, R.G.; Viñas, J.I.G. (1998) *Árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Ediciones Jaguar.
- Cobos, J.M.; Montoya, R.; Tuset, J.J. (1993) New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992 (eds. N. Luisi; P. Lerario; A. Vannini). Bari: Tipolitografia-Putignano, pp. 163-169.
- Coelho, A.C. (2003) *Estudo da biodiversidade molecular de Quercus suber e caracterização de genes envolvidos na resposta de defesa à infecção por Phytophthora cinnamomi*. Dissertação para prestação de provas de Doutoramento. Faro: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve.
- Coelho, A.C.; Lima, M.B.; Neves, D.; Cravador, A. (2006a) Genetic diversity of two evergreen oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP markers. *Silvae Genetica* **55**, 105-118.
- Coelho, A.C.; Horta, M.; Neves, D.; Cravador, A. (2006b) Involvement of cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**, 62-72.
- Coelho, L.; Chellemi, D.O.; Mitchell, D.J. (1999) Efficacy of solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. in North Florida. *Plant Disease* **83**, 293-299.
- Coffey, M.D. (1987) *Phytophthora* root rot in avocado: an integral approach to control in California. *Plant Disease* **70**, 1046-1052.
- Coffey, M.D. (1991) Strategies for the integrated control of soilborne *Phytophthora* species. In: *Phytophthora* (eds. J.A. Lucas; R.C. Shattock; D.S. Shaw; L.R. Cooke). Cambridge: The British Mycological Society, Cambridge University Press, pp. 383-398.

- Coffey, M.D.; Bower, L.A. (1984) *In vitro* variability among isolates of eight *Phytophthora* species in response to phosphorus acid. *Phytopathology* **74**, 738-742.
- Coffey, M.D.; Joseph, M.C. (1985) Effects of phosphorus acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology* **75**, 1042-1046.
- Coffey, M.D.; Ohr, H.D.; Campbell, S.D.; Guillemet, F.B. (1984) Chemical control of *Phytophthora cinnamomi* on avocado rootstocks. *Plant Disease* **68**, 956-958.
- Cohen, Y.; Coffey, M.D. (1986) Systemic fungicides and the control of Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 311-338.
- Colquhoun, I.J. (1999) Managing the risks of *Phytophthora* root and collar rot during bauxite mining in the jarrah forest of Western Australia. In: *Phytophthora diseases of forest trees*. IUFRO Working Party 7.02.09. First International Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems. Grants Pass, Oregon, USA, August 30 - September 3 1999. USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University, pp. 75-76.
- Correia, S.A.P. (1994) *O declínio do sobreiro no concelho de S. Brás de Alportel. Contribuição para o estudo da influência de factores edafo-climáticos na incidência e severidade do declínio em zonas de soalheira*. Relatório de estágio do curso de licenciatura em Engenharia Hortofrutícola. Faro: Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, Universidade do Algarve.
- Crandall, B.S. (1950) The distribution and significance of chestnut root rot *Phytophthoras*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. *Plant Disease Reporter* **34**, 194-196.
- Crandall, B.S.; Gravatt, G.F.; Ryan, M.M. (1945) Root disease of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **35**, 162-180.
- Cuesta, F. J. (1999) *Evaluación de métodos de control de la podredumbre radical de olivos jóvenes causada por Phytophthora megasperma Drechs.* Trabajo de investigación fin de carrera. Sevilla: Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Diputación Provincial de Sevilla.
- Daniel, R.; Wilson, B.A.; Cahill, D.M. (2005) Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* **34**, 541-548.
- Davison, E.M.; Shearer, B.L. (1989) *Phytophthora* spp in indigenous forests in Australia. *New Journal of Forestry Science* **19**, 277-289.
- Davison, E.M.; Tay, F.C.S. (2005) How many soil samples are needed to show that *Phytophthora* is absent from sites in the south-west of Western Australia? *Australasian Plant Pathology* **34**, 293-297.
- Deacon, J.W.; Donaldson, S.P. (1993) Molecular recognition in the homing response of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora*. *Mycological Research* **97**, 1153-1171.
- Delatour, C. (1983) Les dépérissements de chênes en Europe. *Biologie et Forêt* **35**, 265-282.
- Dick, M.W. (2002) *Straminiphila*, a new kingdom name for 'Oomycete' fungi. *Mycological Research* **106**, 1122.

- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. (1995) *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Dobrowolski, M.P.; Tommerup, I.C.; Blakeman, H.D. (2002) Non-mendelian inheritance revealed in a genetic analysis of sexual progeny of *Phytophthora cinnamomi* with microsatellite markers. *Fungal Genetics and Biology* **35**, 197-212.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. (1980) *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press.
- Drew, M.C.; Lynch, J.M. (1980) Soil anaerobiosis, microorganisms, and root function. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 37-66.
- D'Souza, N.K.; Colquhoun, I.J.; Shearer, B.L.; Hardy, G.E.StJ. (2004) The potential of five Western Australian native *Acacia* species for biological control of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* **52**, 267-279.
- Duniway, J.M. (1979) Water relations of water molds. *Annual Review of Phytopathology* **17**, 431-460.
- Duniway, J.M. (1983) Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, pp. 175-187.
- Eckert, J.W.; Tsau, P.H. (1962) A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. *Phytopathology* **52**, 771-777.
- El-Badri, N.; Abadie, M. (2000) Observations sur la dynamique du développement du *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. sur le chêne-liège, *Quercus suber* L., au Maroc. *Cryptogamie Mycologie* **21**, 235-248.
- Ellis, M.A.; Ferree, D.C.; Madden, L.V. (1986) Evaluation of metalaxyl and captafol soil drenches, composted hardwood bark soil amendments and graft union placement on the control of apple collar rot. *Plant Disease* **70**, 24-26.
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. (1996) *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Eye, L.L.; Sneh, B.; Lockwood, J.L. (1978) Inoculation of soybean seedlings with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* for pathogenicity and race determination. *Phytopathology* **68**, 1769-1773.
- Fairbanks, M.M.; Hardy, G.E.StJ.; McComb, J.A. (2001) The effect of phosphite on meiosis and sexual reproduction. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept.-5th Oct 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 167-172.
- Farih, A.; Menge, J.A.; Tsau, P.H.; Ohr, H.D. (1981). Metalaxyl and fosite aluminium for control of *Phytophthora* gummosis and root rot on citrus. *Plant Disease* **65**, 654-657.
- Fenn, M.E.; Coffey M.D. (1984) Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* **74**, 606-611.

- Fenn, M.E.; Coffey M.D. (1989) Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. *Phytopathology* **79**, 76-82.
- Fernández, J.; Montero, G. (1993) Prospección de secas en *Quercus* de Extremadura y la Mancha. *Montes* **32**, 32-37.
- Fernández-Cancio, A. (2000) *Impacto del cambio climático en las Secas del Parque Natural de los Alcornocales, análisis del último milenio*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaría (INIA).
- Fernández-Escobar, R.; Barranco, D.; Benlloch, M.; Alegria J.J. (1994) Control of *Phytophthora* root rot of avocado using prepared injection capsules of potassium phosphite. *Advances in Horticultural Science* **8**, 157-158.
- Fernández-Escobar, R.; Gallego, F.J.; Benlloch, M.; Membrillo, J.; Infante, J.; Pérez-de-Algaba, A. (1999) Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal material. *European Journal of Forest Pathology* **29**, 29-38.
- Ferraz, J.F.P. (1985a) Doenças radiculares causadas por fungos. I - Uma perspectiva ecológica. In: *Curso de aperfeiçoamento de patologia das plantas tropicais e subtropicais*. Oeiras, 14-31 Out. 1985. Grupo de trabalho de patologia vegetal da Sociedade Portuguesa de Fitiatria e Fitofarmacologia.
- Ferraz, J.F.P. (1985b) Doenças radiculares causadas por fungos. II - Tipos de doença e seu controlo. In: *Curso de aperfeiçoamento de patologia das plantas tropicais e subtropicais*. Oeiras, 14-31 Out. 1985. Grupo de trabalho de patologia vegetal da Sociedade Portuguesa de Fitiatria e Fitofarmacologia.
- Ferraz, J.F.P. (1990) Importância e dinâmica do inóculo potencial dos fungos fitopatogénicos do solo. *Summa Phytopathologica* **16**, 197-213.
- Ferraz, J.F.P. (2006) A doença do declínio da azinheira e do sobreiro, vista pelos agricultores. Comentários a propósito de uma reportagem publicada no jornal "Público" de 28 de Março de 2005. In: *O Porco da Raça Alentejana e o Declínio do Sobreiro e da Azinheira*. Primeiras Jornadas Técnicas da Feira de Garvão. Lisboa: Edições Colibri, pp. 54-76.
- Ferreti, M. (ed.) (1994) *Especies forestales mediterráneas. Guía para la evaluación de copas*. Bruselas: Comisión de las Comunidades Europeas.
- Finlay, A.R.; McCracken, A.R. (1991) Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*. In: *Phytophthora* (eds. J.A. Lucas; R.C. Shattock; D.S. Shaw; L.R. Cooke). Cambridge: The British Mycological Society, Cambridge University Press, pp. 383-398.
- Förster, H.; Adaskaveg, J.E. Kim, D.H.; Stanghellini, M.E. (1998) Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Disease* **82**, 1165-1170.
- Fraedrich, S.W.; Tainter, F.H.; Miller, A.E. (1989) Zoospore inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* and the infection of lateral root tips of shortleaf and loblolly pine. *Phytopathology* **79**, 1109-1113.
- Fry, W.E. (1982) *Principles of disease management*. New York: Academic Press.

- Gallego, F.J.; Pérez-de-Algaba, A.; Fernández-Escobar, R. (1999) Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology* **29**, 17-27.
- Garbelotto, M.; Svihra, P.; Rizzo, D.M. (2001) Sudden oak death syndrome fells three oak species. *California Agriculture* **55**, 9-13.
- García-Cebrián, F.; Martín-Bernal, E.; Gil-Pelegrián, E. (1996) Primeras observaciones sobre el fenómeno de la “seca” de las encinas en Aragón. In: *XIII Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines*. Murcia: Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Dirección General del Medio Natural, Sección de Espacios Naturales, pp. 136-147.
- García-Rollan, M. (1981) *Claves de la Flora de España, I*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Garret, S.D. (1970) *Pathogenic root-infecting fungi*. Cambridge University Press.
- Gees, R.; Coffey, M.D. (1989) Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potencial biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **79**, 1079-1084.
- Gil, L. (2005) *Cortiça da produção à aplicação*. Seixal, Portugal: Câmara Municipal do Seixal / Ecomuseu Municipal do Seixal.
- Goheen, D.J.; Marshall, K. (2001) Monitoring effectiveness of roadside sanitation treatments to decrease likelihood of spread of *Phytophthora lateralis* in Southwest Oregon, USA. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 222-225.
- Graf, P.; Basri, E.; Bakri, M. (1993) Cork oak decline in Morocco. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992 (eds. N. Luisi; P. Lerario; A. Vannini). Bari: Tipolitografia-Putignano, pp. 13-18.
- Grant, B.R.; Byrt, P.N. (1984) Root temperature effects on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in the roots of *Eucalyptus marginata* and *E. calophylla*. *Phytopathology* **74**, 179-184.
- Grant, B.R.; Dunstan, R.H.; Griffith, J.M.; Niere, J.O.; Smillie, R.H. (1990) The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. *Australasian Plant Pathology* **19**, 115-119.
- Grete, L. (1961) La maladie de l'encre du chataignier. II. Les agents pathogènes *Phytophthora cambivora* et *P. cinnamomi*. *Annales Epiphytic* **12**, 25-59.
- Griffiths, J.M.; Davis, A.; Grant, B.R. (1992) Target sites of fungicides to control oomycetes. In: *Target sites of fungicides action* (ed. W. Köler). Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 69-100.
- Guest, D.I.; Pegg, K.G.; Whiley, A.W. (1995) Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates. *Horticultural Review* **17**, 299-330.
- Haasis, F.A.; Nelson, R.R.; Marx, D.H. (1964) Morphological and physiological characteristics of mating types of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **54**, 1146-1151.

- Hansen, E.M. (1999) Disease and diversity in forest ecosystems. *Australasian Plant Pathology* **28**, 313-319.
- Hardham, A.R. (2001) The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology* **30**, 91-98.
- Hardham, A.R. (2005) Pathogen profile *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 289-604.
- Hardham, A.R.; Gubler, F. (1990) Polarity of attachment of zoospores of a root pathogen and pre-alignment of the emerging germ tube. *Cell Biology International* **14**, 947-956.
- Hardy, G.E.StJ. (1999) Phosphite and its potential to control *Phytophthora cinnamomi* in natural plant communities and adjacent rehabilitated minesites in Western Australia. In: *Phytophthora diseases of forest trees*. IUFRO Working Party 7.02.09. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems. Grants Pass, Oregon, USA, August 30 - September 3 1999. USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University, pp. 82-86.
- Hardy, G.E.StJ.; Barrett, S.; Shearer, B. L. (2001) The future of phosphite as a fungicide to control the soil borne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* **30**, 133-139.
- Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C.; Pegler, D.M. (1995) *Dictionary of the fungi*. Wallingford: Oxon CAB International.
- Hendrix, F.F.; Campbell, W.A. (1973) Pythiums as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **11**, 77-98.
- Hermoso, R.M; Sánchez, E.; Trapero, A. (2001) Bioensayo para la detección de *Phytophthora cinnamomi* en el suelo de rodales afectados por la Seca de los *Quercus*. In: *III Congreso Forestal Español. Mesa 6 Protección y restauración del medio natural*. Granada, 25-28 septiembre, pp. 72-77.
- Hinch, J.; Weste, G. (1979) Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* zoospores on roots of Australian forest species. *Australian Journal of Botany* **27**, 679-691.
- Ho, H.H. (2002) *Phytophthora cinnamomi* var. *Robiniae* var. *nova* on black locust in Jiangsu province of China. *Mycotaxon* **LXXXII**, 391-396.
- Ho, H.H.; Zentmyer, G.A. (1977) Infection of avocado and other species of *Persea* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **67**, 1085-1089.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950) The water culture methods for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular* **347**, 1-32.
- Houston, D.R. (1992) A host-stress-saprogen model for forest dieback-decline diseases. In: *Tree disease concepts* (eds. P.D. Manion; D. Lachance). Londres: Prentice-Hall Ed, pp. 3-25.
- Hüberli, D.; Tommerup, I.C.; Calver, M.C.; Colquhoun, I.J.; Hardy, G.E.StJ. (2002) Temperature and inoculation method influence disease phenotypes and mortality of *Eucalyptus marginata* clonal lines inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* **31**, 107-118.

- Hwang, S.C.; Ko, W.H. (1978) Biology of chlamidospores, sporangia and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology* **68**, 726-731.
- Jackson, T.J.; Burgess, T.; Colquhoun, I.; Hardy, G.E.StJ. (2000) Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* **49**, 147-154.
- Jeffers, N.S.; Martin, J.B. (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* **70**, 1038-1043.
- Jiménez, J.J.M.; Sánchez, M.E.; Trapero, A. (2005) El chancro carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidade de *Biscogniauxia mediterranea*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **31**, 563-575.
- Jönsson, U.; Lundberg, L.; Sonesson, K.; Jung, T. (2003) First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. *Forest Pathology* **33**, 175-179.
- Jung, T.; Blaschke, M. (2004) *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* **53**, 197-208.
- Jung, T.; Blaschke, H.; Neumann, P. (1996) Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* **26**, 253-272.
- Jung, T.; Cooke, D.E.L.; Blaschke, H.; Duncan, J.M.; Oßwald, W. (1999) *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research* **103**, 785-789.
- Jung, T.; Blaschke, H.; Oßwald, W. (2000) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* **49**, 706-718.
- Jung, T.; Blaschke, H.; Oßwald, W. (2001) Effect of environmental constraints on *Phytophthora* - mediated oak decline in Central Europe. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 89-98.
- Jung, T.; Hansen, E.M.; Winton, L.; Oßwald, W.; Delatour, C. (2002) Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research* **106**, 397-411.
- Jung, T.; Hudler, G.; Jensen-Tracy, S.L.; Griffiths, H.M.; Fleischmann, F.; Oßwald, W. (2005) Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and USA. *Mycologist* **19**, 159-166.
- Kannwischer, M.E.; Mitchell, D.J. (1981) Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. *Phytopathology* **71**, 69-73.
- Kaosiri, T.; Zentmyer, G.A.; Erwin, D.C. (1978) Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. *Canadian Journal of Botany* **56**, 1730-1738.
- Kendrick, Jr.J.B. (1988) A viewpoint on integrated pest management. *Plant Disease* **72**, 647.
- Kennedy, J.; Weste, G. (1986) Vegetation changes associated with invasion by *Phytophthora cinnamomi* on monitored sites in the Grampians, Western Victoria. *Australian Journal of Botany* **34**, 251-279.

- Lazorovits, G.; Ward, E.W.B. (1982) Relationship between localized glyceollin accumulation and metalaxyl treatment in the control of *Phytophthora* rot in soybean hypocotyls. *Phytopathology* **72**, 1217-1221.
- Lebreton, P.; Barbéro, M.; Quézel, P. (2001) Contribution morphométrique et biochimique à la structuration et à la systématique du complexe spécifique chêne vert *Quercus ilex* L. *Acta Botanica Gallica* **148(4)**, 289-317.
- Liñán, C. de (2000) *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. 16ª Edición corregida y puesta en día. Madrid: Ediciones Agrotecnica S.S.L.
- Linde, C.; Kemp, G.H.J.; Wingfield, M.J. (1999) Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 231-239.
- Lipps, P.E.; Bruehl, G.W. (1980) Infectivity of *Pythium* spp. zoospores in snow rot of wheat. *Phytopathology* **70**, 723-726.
- Lopes-Pimentel, A.A. (1945) Novas observações sobre a morfologia, biologia e fisiologia de dois fungos do género *Phytophthora* de Bary, parasitas do castanheiro. *Agronomia lusitana* **7**, 337-351.
- Lopes-Pimentel, A.A. (1946) O sobreiro também é parasitado pela *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., agente da “doença da tinta” do castanheiro. Lisboa. *Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas* **13**, 45-49.
- Lopes-Pimentel, A.A. (1947) A *Phytophthora cinnamomi* (Rands) um outro agente extremamente virulento da “doença da tinta” do castanheiro. *Agronomia lusitana* **9**, 181-191.
- Lopes-Pimentel, A.A. (1953) *Uma ameaça para os montados nacionais*. *Estudos e Informação*. Lisboa: Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Ministério da Economia.
- López, M.M.; Garcia-Morató, M.; Roselló, M.; Morente, C.; Orellana, N.; Ferrer, A.; López, F.; Soria, S.; López-López, M.J. (1996) Primera identificación en España de *Erwinia chrysanthemi* en patata, *Erwinia quercina* en encina y rebollo, *Erwinia rubifaciens* en nogal y *Rhodococcus fascinas* en coliflor. In: *VIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Programa y resúmenes*. Córdoba, 23-27 de Septiembre. Córdoba: Caja Sur Publicaciones, p. 122.
- López-Herrera, C.J.; Pérez-Jiménez, R.M. (1995) Morphology of *Phytophthora cinnamomi* isolates from avocado orchards in the costal area of southern Spain. *Journal of Phytopathology* **143**, 735-737.
- López-Herrera, C.J.; Perez-Jimenez, R.M.; Basallote-Ureba, M.J.; Bonilla, T.Z.; Melero-Vara, J.M. (1997) Effect of soil solarization on the control of *Phytophthora* root rot in avocado. *Plant Pathology* **46**, 329-340.
- Lorio, P.L.Jr. (1966) *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium* species associated with loblolly pine decline in Luisiana. *Plant Disease Reporter* **50**, 596-597.
- Luisi, N., Lerario, P.; Vannini, A. (eds.) (1993) *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992. Bari: Tipolitografia-Putignano.
- Luque, J.; Girbal, J. (1989) Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *European Journal of Forest Pathology* **19**, 7-13.

- Luque, J.; Parladé, J.; Pera, J. (2000) Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* **30**, 247-263.
- Malajczuk, N. (1983) Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 197-218.
- Manion, P.D. (1991) *Tree disease concepts*. Londres: Prentice-Hall Ed.
- Manion, P.D.; Lachance, D. (1992) *Forest decline concepts*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.
- Marçais, B.; Dupuis, F.; Desprez-Loustau, M.L. (1993) Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra*) to *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Forest Pathology* **23**, 295-305.
- Marks, G.C.; Smith, I.W. (1991) The cinnamon fungus in Victorian Forests. *Lands and Forests Bulletin* **31**, 1-33.
- Marks, G.C.; Tippett, J.T. (1978) Symptom development and disease escape in *Eucalyptus obliqua* growing in soil infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Forest Research* **8**, 47-56.
- Martins, A.; Lousada, B.; Branco, I.; Caetano, P. Factores edafo-ambientais associados ao declínio de *Quercus suber* em Portugal tentativa de identificação e dificuldades encontradas. *Silva Lusitana* (in press).
- Marx, D.H. (1973) Growth of ectomycorrhizal shortleaf pine seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **63**, 18-23.
- Matheron, E.; Matejka, J.C. (1988) Persistence of systemic activity for fungicides applied to citrus trunks to control *Phytophthora gummosis*. *Plant Disease* **72**, 170-174.
- Matheron, E.; Porchas, M. (2000) Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetil-Al, and metalaxil on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Disease* **84**, 454-458.
- May-de-Mio, L.L.; Ghini, R.; Kimati, H. (2002) Solarização para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 254-258.
- McCarren, K. (2006) *Saprophytic ability and the contribution of clamidospores and oospores to the survival of Phytophthora cinnamomi*. PhD thesis. Perth: Western Australia School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University.
- McDonald, A.E.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. (2001) Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition* **24(10)**, 1505-1519.
- McGovern, R.J.; McSorley, R.; Urs, R.R. (2000) Reduction of *Phytophthora* blight of Madagascar periwinkle in Florida by soil solarization in autumn. *Plant Disease* **84**, 185-191.
- McIntyre, J.L.; Taylor, G.S. (1976) Screening tobacco seedlings for resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* **66**, 70-73.

- McLaughlin, D.; Gizyn, W.; McLlveen, W.; Kinch, C. (1992) A quantitative tree crow rating system for deciduous forest health surveys: some results for Ontario. In: *Tree disease concepts* (eds. P.D. Manion; D. Lachance). Londres: Prentice-Hall Ed, pp. 137-154.
- Milholland, R.D.; Cline, W.O.; Daykin, M.E. (1989) Criteria for identifying pathogenic races of *Phytophthora fragariae* on selected strawberry genotypes. *Phytopathology* **79**, 535-538.
- Mitchell, D.J.; Kannwischer, M.E.; Moore, E.S. (1978) Relationship of numbers of zoospores of *Phytophthora cryptogea* to infection and mortality of watercress. *Phytopathology* **68**, 1446-1448.
- Moniz, M.F.; Tomaz, I.L.; Cabral, M.T.; Basto, M.S. (1996) Avaliação da patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi* Rands em sobreiro (*Quercus suber* L.). *Silva Lusitana* **4**, 79-88.
- Monteiro, J.A.C. (1958) *Ecologia do sobreiro. Estudos e divulgação técnica*. Direcção-Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas.
- Montoya-Oliver, J.M. (1988) *Los alcornocales*. 2ª Ed. Serie Manuales Técnicos S.E.A. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Montoya-Oliver, J.M. (1994) ¿Qué es la “seca de los *Quercus*? In: *Actas de la X Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines*. Madrid, pp.1-4.
- Morehart, A.L. (1994) The occurrence of *Calcarisporium parasiticum* on isolates of *Botryosphaeria quercum* from oak trees in Delaware. *Plant Disease* **78**, 101.
- Moreira, A.C. (2003) Distribution of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Integrated Protection in Oak Forests IOBC/wprs Bulletin* **25**, 41-48.
- Moreira, A.C.; Martins, M.S. (2005) Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Forest Pathology* **35**, 145-162.
- Moreira, A.C.; Caetano, P.; Correia, S.; Brasier, C.M.; Ferraz, J.F.P. (1993) *Phytophthora cinnamomi* associated with cork oak decline in southern Portugal. In: *6th International Congress of Plant Pathology. Abstracts*. Montréal, Canada. July 28 - August 6, p. 123.
- Moreira, A.C.; Caetano, P.; Aleixo, F.; Ferraz, J.F.P. (1996) Le dépérissement des forêts de *Quercus suber* au Portugal, associé au champignon *Phytophthora cinnamomi*. *Actes du Colloque National sur le dépérissement des Forêts au Maroc*. Rabat, Maroc. 28-29 Février.
- Moreira, A.C.; Ferraz, J.F.P.; Clegg, J.M. (1997) Susceptibility of *Quercus suber* and *Q. rotundifolia* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. In: *Proceedings 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Montpellier-Le Corum, France, June 1st - 5th, pp. 427-431.
- Moreira, A.C.; Horta, M.G.; Coelho, A.C.; Neves, D.; Cravador, A. (1999) Application of highly specific and sensitive molecular method to identify *Phytophthora cinnamomi* in cork oak roots and forest soils. In: *Phytophthora diseases of forest trees*. IUFRO Working Party 7.02.09. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems. Grants Pass, Oregon, USA, August 30 - September 3 1999. USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University, pp. 127-131.
- Moreira-Marcelino, A.C. (2001) *Aspectos da interacção entre Phytophthora cinnamomi e a doença do declínio em Quercus suber e Q. rotundifolia*. Dissertação para prestação de provas de Doutoramento. Faro: Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias, Universidade do Algarve.

- Moris, B.M.; Gow, N.A.R. (1993) Mechanism of electro taxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* **83**, 877-882.
- Moro, R. (1995) *Guía de los árboles de España*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Mukalazi, J.; Adipala, E.; Sengooba, T.; Hakiza, J.J.; Olanya, M.; Kidanemariam, H.M. (2001) Metalaxil resistance, mating type and pathogenicity of *Phytophthora infestans* in Uganda. *Crop Protection* **20**, 379-388.
- Muñoz, M.; Rupérez, A. (1987) La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **13**, 203-212.
- Muñoz-López, C.; Soriano-Martín, C.; Cobos-Suárez, P.; Martínez-Savedra, G.; Soldevilla-Puga, C. (1995) Estudio de la incidencia de la microflora patógena sobre las masas forestales del Parque Natural “Los Alcornocales”, Cádiz. In: *XII Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines*, Girona 14-16 noviembre 1995. Girona Generalitat de Catalunya, Direcció General de Producció i Indústries Agroalimentàries, pp. 102-132.
- Natividade, J.V. (1950) *Subericultura*. Lisboa: Estação de Experimentação Florestal do Sobreiro. Estação Agronómica Nacional. (Reimpressão do Ministério de Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral das Florestas. Imprensa Nacional Casa da Moeda. 1990).
- Navarro, R.M.C.; Fernández, P.R. (2000) *El síndrome de la seca del encinar. Propuesta de solución para el valle de los Pedroches*. Pozoblanco, Córdoba: Fundación Ricardo Delgado Vizcaíno.
- Navarro, R.M.; Fernández, P.; Navarro, J.M. (2000) *Evaluación de daños producidos por la seca de especies del género Quercus sp. en Andalucía*. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Navarro, R.M.; Fernández, P.; Ruiz, J.M. (2004) *Manual de campo para el establecimiento e evaluación de los puntos de la red Andaluza de seguimiento de daños sobre ecosistemas forestales*. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Nechwatal, J.; Schlenzig, A.; Jung, T.; Cooke, D.E.L.; Duncan, J.M.; Osswald, W.F. (2001) A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *Forest Pathology* **31**, 85-97.
- Neves, D. (2007) *In vitro* activity of plant crude extracts and *in situ* protective effect of *Phlomis purpurea* against *Phytophthora cinnamomi*. MSc Thesis. Institute of Bioscience and technology, Cranfield University.
- Newhook, F.J.; Podger, F.D. (1972) The role of *Phytophthora cinnamomi* in Australian and New Zealand forests. *Annual Review of Phytopathology* **10**, 299-326.
- Oak, S.W.; Starkey, D.A.; Dabney, J.M. (1988) Oak decline alters habitat in southern upland forests. *Proceedings Annual Conference SEAFWA* **42**, 491-501.
- Oh, E.; Hansen, E.M. (2004) Mechanisms of resistance in Port-Orford Cedar to *Phytophthora lateralis*. In: *Phytophthora in forests and natural ecosystems. Abstracts of Posters and Talks*. 3rd Workshop of IUFRO Working Party 7.02.09. Freising, Germany, 11th – 17th Sept. 2004, p. 15.

- Oleksyn, J.; Przbyl, K. (1987) Oak decline in the Soviet Union - Scale and hypotheses. *European Journal of Forest Pathology* **17**, 321-336.
- Ouimette, D.G.; Coffey, M.D. (1989) Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species. *Phytopathology* **79**, 761-767.
- Paul, B.; Bala, K.; Lassaad, B.; Calmin, G.; Sánchez-Hernández, E.; Lefort, F. (2006) A new species of *Pythium* with ornamented oogonia morphology, taxonomy, ITS region of its rDNA, and its comparison with related species. *FEMS Microbiological Letter* **254**, 317-323.
- Perez, V.; Mamdouh, A.M.; Huet, J.C.; Pernollet, J.C.; Bompeix, G. (1995) Enhanced secretion of elicitors by *Phytophthora* fungi exposed to phosphonate. *Cryptogamie Mycologia* **16**, 191-194.
- Peters, D.; Weste, G. (1997) The impact of *Phytophthora cinnamomi* on six rare native trees and shrub species in the Brisbane Ranges, Victoria. *Australian Journal of Botany* **45**, 975-995.
- Phillips, D.H.; Burdekin, D.A. (1992) *Diseases of forest and ornamental trees*. (2nd edition). London: The MacMillan Press.
- Phillips, A.; Alves, A.; Correia, A.; Luque, J. (2005) Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* **97**(2), 513-529.
- Pires, N. (2005) *Primeiras fases de infecção de raízes de Quercus suber L. (sobreiro) e Quercus ilex spp. rotundifolia (Lam.) o. Schawartz (azinheira) por Phytophthora cinnamomi*. Relatório de estágio do curso de licenciatura em Engenharia Biotecnológica. Faro: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve.
- Porras, C.; Martínez, R.; Fernández, A. (1997) *Sistemas agrarios tradicionales de dehesa en las comarcas de La Sierra y Los Andévalos de la provincia de Huelva*. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.
- Raftoyannis, Y.; Dick, M.W. (2002) Effects of inoculum density, plant age and temperature on disease severity caused by Pythiaceus fungi on several plants. *Phytoparasitica* **30**, 67-76.
- Ragazzi, A.; Fedi, I.D.; Mesturino, L. (1989) The oak decline a new problem in Italy. *European Journal of Forest Pathology* **19**, 105-110.
- Ragazzi, A.; Moricca, S.; Dellavalle, I. (1997) Vegetative compatibility and pathogenicity of *Diplodia mutila* isolates on oak. *European Journal of Forest Pathology* **27**, 391-396.
- Ragazzi, A.; Moricca, S.; Dellavalle, I.; Turco, E. (2000) *Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives*. Firenze, Italy: Accademia Italiana di Scienze Forestali.
- Ribeiro O.K. (1978) A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz: J. Cramer.
- Ribeiro, O.K. (1983) Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 55-70.
- Ribeiro, O.K.; Linderman, R.G. (1991) Chemical and biological control of *Phytophthora* species in woody plants. In: *Phytophthora* (eds. J.A. Lucas; R.C. Shattock; D.S. Shaw; L.R. Cooke). Cambridge British Mycological Society, Cambridge University Press, pp. 399-410.

- Ristaino, J.B.; Duniway, J.M.; Marois, J.J. (1988) Influence of frequency and duration of furrow irrigation on the development of *Phytophthora* root rot and yield in processing tomatoes. *Phytopathology* **78**, 1701-1706.
- 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.
- Roberts, D.A.; Boothroyd, C.W. (1984) *Fundamentals of plant pathology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Robin, C.; Desprez-Loustau, M.L. (1998) Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 465-475.
- Robin, C.; Dupuis, F.; Desprez-Loustau, M.L. (1994) Seasonal changes in Northern red oak susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease* **78**, 369-374.
- Robin, C.; Desprez-Loustau, M.L.; Capron, G.; Delatour, C. (1998) First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Annales des Sciences Forestières* **55**, 869-883.
- Robin, C.; Capron, G.; Desprez-Loustau, M.L. (2001) Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathology* **50**, 708-716.
- Rodríguez, M.; Sánchez, M.E.; Trapero, A. (2004) Desarrollo de un método eficaz para la cuantificación de *Phytophthora cinnamomi* en muestras de suelo. In: *XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, Lloret del Mar, Girona. 26 de Septiembre - 1 de Octubre 2004, pp. 210.
- Rodríguez-Molina, M.C.; Torres-Vila, L.M.; Blanco-Santos, A.; Palo-Núñez, E.J.; Torres-Álvarez, E. (2002) Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology* **32**, 365-372.
- Rodríguez-Molina, M.C.; Blanco-Santos, A.; Palo-Núñez, E.J.; Torres-Vila, L.M.; Torres-Álvarez, E.; Suárez-de-la-Cámara, M.A. (2005) Seasonal and spatial mortality patterns of holm oak seedlings in a reforested soil infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology* **35**, 411-422.
- Rodríguez-Telo, A. (1994) *La muerte de plántulas causadas por Pythium spp. y Phytophthora megasperma en Andalucía etiología y control*. Tesis Doctoral. Córdoba: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba.
- Rohrbach, K.G.; Schenk, S. (1985) Control of pineapple heart rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with metalaxil, fosetil Al, and phosphorous acid. *Plant Disease* **69**, 320-323.
- Romanyk, N.; Cadahía, D. (ed.) (1992) *Plagas de insectos en las masas forestales españolas*. Madrid: Publicaciones del Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente.
- Romero, M.A.; Sánchez, J.E.; Fernández, R.; Trapero, A. (2004) Control químico de la podredumbre radical de los *Quercus*. In: *XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*, Lloret del Mar, Girona. 26 de Septiembre - 1 de Octubre 2004, pp. 312.

- Romero, M.A.; Sánchez, J.E.; Jiménez, J.J.; Belbahri, L.; Trapero, A.; Lefort, F.; Sánchez, M.E. (2007) New *Pythium* taxa causing root rot in Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology* **155**, 289-295.
- Ross, E.W.; Marx, D.H. (1972) Susceptibility of sand pine to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **62**, 1197-1200.
- Royle, D.J.; Hickman, C.J. (1964) Observations on *Phytophthora cinnamomi*. *Canadian Journal of Botany* **42**, 311-318.
- Rupérez, A. (1957) *La encina y sus tratamientos*. Madrid: Ediciones Selvícolas.
- Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Bompeix, G. (1990) Effects of phosphonate on the elicitor activity of cultures filtrates of *Phytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculata*. *Plant Science* **67**, 245-251.
- Samuel, R.; Bachmair, A.; Jobst, J.; Ehrendorfer, F. (1998) ITS sequences from nuclear rDNA suggest unexpected phylogenetic relationships between Euro-Mediterranean, East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (*Fagaceae*). *Plant Systematics and Evolution* **211**, 129-139.
- Sánchez, M.E.; Ruiz, A.; Pérez-de-Algaba, A.; Blanco, M.A.; Trapero, A. (1998a) Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *European Journal of Forest Pathology* **104**, 347-357.
- Sánchez, M.E.; Pérez, A.; Blanco, M.A.; Trapero, A. (1998b) La “seca” de olivos jóvenes I Sintomatología e incidencia de los agentes asociados. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **24**, 581-602.
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Ferraz, J.F.P.; Trapero, A. (2000a) El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **26**, 447-464.
- Sánchez, M.E.; Navarro, R.M.; Trapero, A.; Fernández, P. (2000b) La “seca” de encinas y alcornoques una visión histórica. *Montes* **62**, 29-39.
- Sánchez, M.E.; Navarro, R.M.; Fernández, P.; Trapero, A. (2000c) Hongos fitopatógenos asociados a la Seca de los *Quercus* en Andalucía. In: *X Congreso Sociedad Española de Fitopatología. Programa y resúmenes*, Valencia, 3-6 Octubre 2000, p. 75.
- Sánchez, M.E.; Muñoz, M.; Brasier, C.M.; Trapero A. (2001) Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant Disease* **85**, 411-416.
- Sánchez, M.E., Andicoberry, S.; Trapero, A. (2002a) *Phytophthora* root rot of Aleppo pine seedlings in a forest nursery in Spain. *Plant Disease* **86**, 563.
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Ferraz, J.F.P.; Trapero, A. (2002b) Etiology of *Quercus ilex* decline in southwestern Spain. *Forest Pathology* **32(1)**, 5-18.
- Sánchez, M.E.; Gutiérrez, J.; Trapero, A. (2002c) *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathology* **51**, 364-372.
- Sánchez, M.E.; Cuesta, F.J.; Trapero, A. (2003a) Evaluación de métodos de control químico contra la podredumbre radical del olivo causada por *Phytophthora megasperma*. *Phytoma* **145**, 34-45.

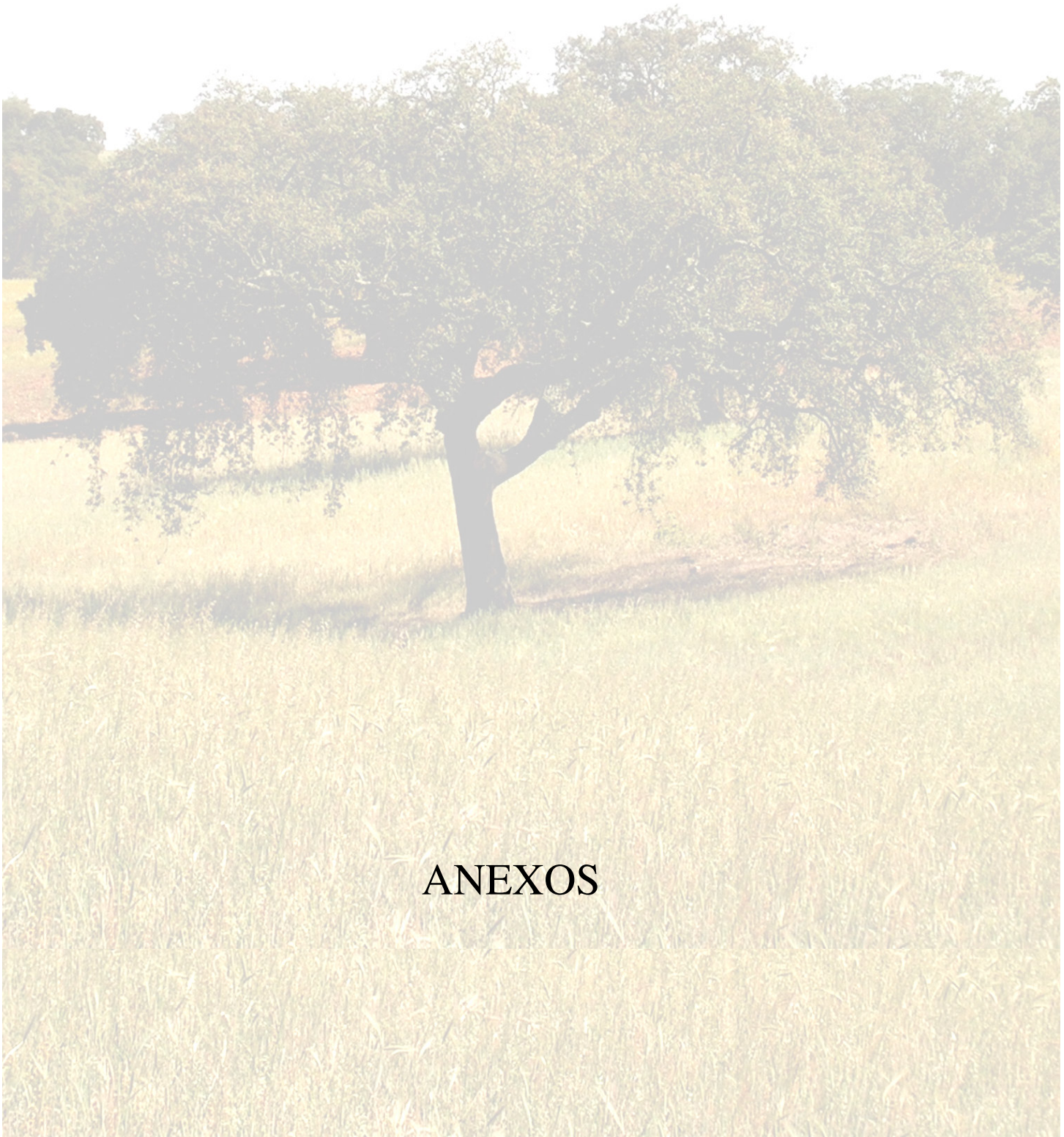
- Sánchez, M.E.; Sánchez, J.E.; Navarro, R.M.; Fernández, P.; Trapero, A. (2003b) Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **29**, 87-108.
- Sánchez, M.E.; Venegas, J.; Romero, M.A.; Phillips, A.J.L.; Trapero, A. (2003c) *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* **87**, 1515-1521.
- Sánchez, J.E.; Romero, M.A.; Sánchez, M.E.; Trapero, A. (2004) *Red Andaluza de Seguimiento de Daños sobre Ecosistemas Forestales*. Documento II Análisis Fitopatológico de Muestras (2004). Sevilla: Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Sánchez, M.E.; Andicoberry, S.; Trapero, A. (2005) Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathology* **35**, 115-125.
- Sánchez-Gutiérrez, F.J.; Cabello-Medina, J. (1993) Influence of abiotic factors on oak decline evolution in “Los Alcornocales” Natural Park, Andalucía (Spain). In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of the International Congress*. Selva di Fasano, Italy, 13-18 September 1992 (eds. N. Luisi; P. Lerario; A. Vannini). Bari: Tipolitografia-Putignano, pp. 523-524.
- Schwinn, F.J. (1983) New developments in chemical control of *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 327-334.
- Shea, S.R.; Broadbent, P. (1983) Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 335-350.
- Shearer, B.L. (2001) The contribution of research in the Forest Department of Western Australia and the Department of Conservation and Land Management to the fight against *Phytophthora* species in native vegetation of south-western Australia over the last two decades. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 235-242.
- Shearer, B.L.; Dillon, M. (1996) Susceptibility of plant species in *Banksia* woodlands on the Swan Coastal Plain, Western Australia, to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* **44**, 433-445.
- Shearer, B.L.; Tippett, J.T. (1989) *Jarrah Dieback. The dynamics and management of Phytophthora cinnamomi in the jarrah (Eucalyptus marginata) forest of south-western Australia*. Australia Department of Conservation and Land Management. Research Bulletin **3**.
- Shearer, B.L.; Shea, S.R.; Deegan, P.M. (1987) Temperature-growth relationships of *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. *Phytopathology* **77**, 661-665.
- Shearer, B.L.; Crane, E.C.; Fairman, R.G. (2004) Phosphite reduces disease extension of a *Phytophthora cinnamomi* front in *Banksia* woodland, even after fire. *Australasian Plant Pathology* **33**, 249-254.

- Shepherd, C.J.; Pratt, B.H. (1974) Temperature-growth relations and genetic diversity of A2 mating-type isolates of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Australian Journal of Botany* **22**, 231-249.
- Sillero, M.L. (1999) *Estudio del decaimiento del encinar en el monte publico "Dehesa de Pedroche" (Córdoba) Propuesta de actuación*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. Córdoba: ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- Silva-Tavares, J. (1927) A doença dos castanheiros. *Brotéria* número especial sobre agricultura, 15-17. Caminha.
- Smillie, R.H. ; Grant, B.R.; Guest, D. (1989) The mode of action of phosphite evidence for both direct and indirect modes of action on tree *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* **79**, 921-926.
- Smith, R.S. (2001) Aerial application of phosphite to protect endangered Western Australian flora. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia, 30th Sept. - 5th Oct. 2001 (eds. J. McComb; G. Hardy; I. Tommerup). Murdoch University: Western Australia Centre for *Phytophthora* Research and Management, pp. 194-196.
- Sinclair, W.A; Lyon, H.H.; Johnson, W.T. (1987) *Diseases of trees and shrubs*. London: Cornell University Press.
- Soria, S.; López, M.M.; López-López, J.M. (1997) Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la "Seca de la encina". *Ecología* **11**, 295-301.
- Stamps, D.J.; Waterhouse, G.M.; Newhook, F.J.; Hall, G.S. (1990) Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers* **162**. Kew, UK: CAB International Mycological Institute.
- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. (1985) *Bioestadística principios y procedimientos*. Bogotá, Colombia: McGraw-Hill.
- Stern, R.E.; Zentmyer, G.A.; Kaufmann, M.R. (1977a) The influence of matric potential, soil texture, and soil amendment on root disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **67**, 1495-1500.
- Stern, R.E.; Zentmyer, G.A.; Kaufmann, M.R. (1977b) The effect of matric and osmotic potential of soil on *Phytophthora* root disease of *Persea indica*. *Phytopathology* **67**, 1491-1494.
- Streito, J-C.; Legrand, Ph.; Tabary, F.; Jarnouen-de-Villartay, G. (2002) *Phytophthora* disease of alder (*Alnus glutinosa*) in France. Investigations between 1995 and 1999. *Forest Pathology* **32**, 179-191.
- Tainter, F.H.; O'Brien, J.G.; Hernández, A.; Orozco, F.; Rebolledo, O. (2000) *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Disease* **84**, 394-398.
- Tapias, R.; Moreira, A.C.; Cravador, A.; Fernández, M.; Alcuña, M.M.; Séanz, A.; Domingos, A.C.; Melo, E. (2005) Variability of tolerance/resistance of *Quercus suber* L. seedlings to *Phytophthora cinnamomi* Rands. Survival and growth evaluation. In: *New challenges for the integration of cork oak forests and products. Abstracts Book. Suberwood* (2005). Universidad de Huelva, Spain, pp. 102-103.

- Tapias, R.; Fernández, M.; Moreira, A.C.; Sánchez, E.; Cravador, A. (2006) Posibilidad de la variabilidad genética de encinas y alcornoques en la conservación y recuperación de bosques amenazados por la “seca”. *Boletín informativo CIDEU* **1**, 45-51.
- Tattar, T.A. (1989) *Diseases of shade trees*. California: Academic Press.
- Tenorio, M.C.; Juarista, C.M.; Ollero, H.S. (eds.) (2001) Los Bosques Ibéricos. Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta.
- Thomas, F.M.; Blank, R.; Hartmann, G. (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *Forest Pathology* **32**, 277-307.
- Timmer, L.W.; Graham, J.H.; Zitko, S.E. (1998) Metalaxil-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*. Occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Disease* **82**, 254-261.
- Tippett, J.T.; Crombie, D.S.; Hill, T.C. (1987) Effect on phloem water relations on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in *Eucalyptus marginata*. *Phytopathology* **77**, 246-250.
- Tommerup, I.C.; Dobrowolski, M.P.; Hüberli, D.; O'Brien, P.A.; Hardy, G.E.St.J.; Shearer, B.L. (1999) Risks and threats due to genetic variations in *Phytophthora cinnamomi* for disease management in natural vegetation ecosystems. In: *Phytophthora diseases of forest trees*. IUFRO Working Party 7.02.09. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems. Grants Pass, Oregon, USA, August 30 - September 3 1999. USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University, pp. 55-63.
- Torres-Álvarez, E.; Rodríguez-Molina, M.C.; Torres-Vila, L.M.; Suárez-de-la-Cámara, M.A. (2006) ¿Qué papel juega el hongo *Phytophthora cinnamomi* en el desarrollo de la regeneración natural y las repoblaciones de encina e alcornoque? *Boletín Informativo CIDEU* **1**, 53-63.
- Torres-Juan, J. (1985) El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. y su comportamiento en los encinares y alcornocales. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **11**, 185-191.
- Trapero, A.; Jiménez, R.M. (1985) Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology* **75**, 1146-1151.
- Trapero, A.; Kaiser, W.J.; Ingram, D.M. (1990) Control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Disease* **74**, 563-569.
- Trapero, A.; Sánchez, M.E.; Pérez-de-Algaba, A.; Romero, M.A.; Navarro, N.; Varo, R.; Gutiérrez, J. (2000) Enfermedades de especies forestales en Andalucía. *Agricultura* **821**, 822-824.
- Tsao, P.H. (1983) Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 219-236.
- Tsao, P.H. (1990) Why many *Phytophthora* root and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *EPPO Bulletin* **20**, 11-17.
- Tuset, J.J.; Hinarejos, C.; Mira, J.L.; Cobos, J.M. (1996) Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **22**, 491-499.

- Tuset, J.J.; Hinarejos, C.; Mira, J.L.; Cobos, J.M. (1997) Síntomas de estrés hídrico y de “Seca” en encinas (*Quercus ilex* Subs. *ballota*) inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* en una dehesa del centro de España. In: *Actas del II Congreso Forestal Español. Mesa Temática V Protección de los sistemas forestales y conservación de la biodiversidad*. Pamplona, pp. 473-478.
- Tuset, J.J.; Cots, F.; Hinarejos, C.; Mira, J.L. (2001) Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la “seca” en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* **27**, 103-115.
- Tutin, T.G. (1993) *Flora Europea, 1*. Cambridge University Press.
- Tyler, B.M. (2002) Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 137-167.
- Tyler, B.M.; Wu, M-H.; Wang, J-M.; Cheung, W.W.S.; Moris, P.F. (1996) Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2811-2817.
- Vannini, A.; Valentini, R.; Luisi, N. (1996) Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Annales des Sciences Forestières* **53**, 753-760.
- Veríssimo-d’Almeida, J. (1898) Àcerca dos montados de sobre. *Agricultura Contemporânea* **8**, 375-381.
- Vettraiño, A.M.; Natili, G.; Anselmi, N.; Vannini, A. (2001) Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology* **50**, 90-96.
- Vettraiño, A.M.; Barzanti, G.P.; Bianco, M.C.; Ragazzi, A.; Capretti, P.; Paoletti, E.; Luisi, N.; Anselmi, N.; Vannini, A. (2002) Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathology* **32**, 19-28.
- Vettraiño, A.M.; Morel, O.; Perlerou, C.; Robin, C.; Diamandis, S.; Vannini, A. (2005) Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with ink disease and crown decline. *European Journal of Plant Pathology* **111**, 169-180.
- von Arx, J.A. (1987) *Plant Pathogenic Fungi*. Berlin: J. Cramer.
- Wargo, P.M. (1996) Consequences of environmental stress on oak predisposition to pathogens. *Annales des Sciences Forestières* **53**, 359-368.
- Waterhouse, G.M. (1963) Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew: *CMI Mycological Papers* **92**.
- Weste, G. (1980) Vegetation changes as a result of invasion of forest on Krasnozern by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* **28**, 139-150.
- Weste, G. (1983) Population dynamics and survival of *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 237-257.
- Weste, G. (2003) The dieback cycle in Victorian forests: a 30th - year study of changes caused by *Phytophthora cinnamomi* in Victorian open forests, woodland and heathlands. *Australasian Plant Pathology* **32**, 247-256.

- Weste, G.; Marks, G.C. (1987) The biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian forests. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 207-229.
- Weste, G.; Walchhuetter, T.; Walshe, T. (1999) Regeneration of *Xanthorrhoea australis* following epidemic disease due to *Phytophthora cinnamomi* in the Brisbane Ranges, Victoria. *Australasian Plant Pathology* **28**, 162-169.
- Weste, G.; Brown, K.; Kennedy, J.; Walshe, T. (2002) *Phytophthora cinnamomi* - a 24th - year study of vegetation change in forest and woodlands of the Grampians, Western Victoria. *Australian Journal of Botany* **50**, 247-274.
- Wilcox, W.F.; Mircetich, S.M. (1979) The influence of different levels of soil moisture on *Phytophthora* root rot and crown rot of mahaleb cherry rootstock. *Phytopathology* **69**, 1049.
- Wilcox, W.F.; Mircetich, S.M. (1985) Pathogenicity and relative virulence of seven *Phytophthora* spp. on Mahaleb and Mazzard cherry. *Phytopathology* **75**, 221-226.
- Wilkinson, C.J.; Shearer, B.L.; Jackson, T.J.; Hardy G.E.StJ. (2001a) Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphate *in vitro*. *Plant Pathology* **50**, 83-89.
- Wilkinson, C.J.; Holmes, J.M.; Dell, B.; Tynan, K.M.; McComb, J.A.; Shearer, B.L.; Colquhoun, I.J.; Hardy, G.E.StJ. (2001b) Effect of phosphate on *in planta* zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* **50**, 587-593.
- Wilson, B.A.; Aberton, J.; Cahill, D.M. (2000) Relationships between site factors and distribution of *Phytophthora cinnamomi* in the Eastern Otway Ranges, Victoria. *Australian Journal of Botany* **48**, 247-260.
- www.defra.gov.uk/planth/pramorom4.htm [acedido em Agosto, 2006].
- www.7decopas.com.ar/corcho2.htm [acedido em Janeiro, 2007].
- Zentmyer, G A. (1952) A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **42**, 24.
- Zentmyer, G.A. (1979) Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a substance in avocado roots. *Phytopathology* **69**, 1129-1131.
- Zentmyer, G.A. (1980) *Phytophthora cinnamomi and the disease it causes. Monograph 10*. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.
- Zentmyer, G.A. (1981) The effect of temperature on growth and pathogenesis of *Phytophthora cinnamomi* and on growth of its avocado host. *Phytopathology* **71**, 925-928.
- Zentmyer, G.A. (1983) The world of *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds. D.C. Erwin; S. Bartnicki-Garcia; P.H. Tsao). St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp. 1-7.
- Zentmyer, G.A.; Richards, S.J. (1952) Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* to avocado trees, and the effect of irrigation on disease development. *Phytopathology* **42**, 35-37.



ANEXOS

ANEXO I - DISTRIBUIÇÃO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI***1. Correlação entre a percentagem de isolamento de *Phytophthora cinnamomi* em solo e raiz em todos os locais amostrados em Portugal e Andaluzia Ocidental, o índice de desfoliação das árvores e a percentagem de humidade do solo (P = 0,05)**

```
CORRELATIONS (PEARSON)

      SOLO      RAIZ      H.SOLO
RAIZ   0.1990
P-VALUE 0.0054

H.SOLO   0.0521   0.1947
         0.4708   0.0065

ID      -0.1788  -0.1118  -0.1019
         0.0126   0.1208   0.1572

CASES INCLUDED 194  MISSING CASES 34
```


ANEXO II - PROGRESSÃO DO DECLÍNIO DE *QUERCUS SUBER* EM PORTUGAL

1. Análise da variância da classe de desfoliação das árvores nos 5 anos de estudo

ONE-WAY AOV FOR ID BY ANO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	239.631	59.9078	94.87	0.0006
WITHIN	1589	1003.45	0.63150		
TOTAL	1593	1243.08			

BARTLETT'S TEST OF	CHI-SQ	DF	P
EQUAL VARIANCES	5.74	4	0.2191

COCHRAN'S Q	P
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.2188 1.3024

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	P
EFFECTIVE CELL SIZE	0.18603 318.6

ANO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
1998	1.3862	290	0.7270
1999	1.8313	326	0.8297
2000	2.0951	326	0.8001
2001	2.3926	326	0.7995
2002	2.4693	326	0.8061
TOTAL	2.0496	1594	0.7947

CASES INCLUDED 1594 MISSING CASES 36

1.1. Comparação de médias da classe de desfoliação em função do ano (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF ID BY ANO

ANO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
2002	2.4693	I
2001	2.3926	I
2000	2.0951	.. I
1999	1.8313 I
1998	1.3862 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.961 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

2. Correlação da classe de desfoliação das árvores nos 5 anos de estudo

CORRELATIONS (PEARSON)

	1998	1999	2000	2001
1999	0.5462			
P-VALUE	0.0000			
2000	0.4124	0.7690		
	0.0000	0.0000		
2001	0.2777	0.5850	0.7606	
	0.0000	0.0000	0.0000	
2002	0.1456	0.4715	0.6376	0.8087
	0.0131	0.0000	0.0000	0.0000

CASES INCLUDED 290 MISSING CASES 36

3. Análise de variância do índice de desfoliação médio da parcela e a exposição da parcela

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR ID

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
ANO (A)	4	8.49900	2.12475	19.18	0.0000
EXPOSIÇÃO (B)	2	1.13633	0.56817	5.13	0.0100
A*B	8	0.43700	0.05462	0.49	0.8545
REP (C)					
A*B*C	44	4.87500	0.11080		
TOTAL	58	14.9473			

CASES INCLUDED 59 MISSING CASES 1

CAUTION: The sums of squares, mean squares, and F-tests are approximate for analyses with missing values. See the manual for details and instructions for constructing exact F-tests.

3.1. Comparação de médias do índice de desfoliação médio da parcela em função do ano (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF ID BY ANO

ANO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
2002	2.4667	I
2001	2.3917	I
2000	2.0833	.. I
1999	1.8333	.. I
1998	1.4417 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.015 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.2739
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1359

ERROR TERM USED: ANO*EXPOSIÇÃO*REP, 44 DF

3.2. Comparação de médias do índice de desfoliação médio da parcela em função da exposição da parcela (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF ID BY EXPOSIÇÃO

EXPOSIÇÃO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Plano	2.1800	I
Norte	2.0950	I
Sul	1.8550	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.015 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.2121
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1053

ERROR TERM USED: ANO*EXPOSIÇÃO*REP, 44 DF

Tabela AII.2. Correlação entre o isolamento de *Phytophthora cinnamomi*, parâmetros de solo e variáveis meteorológicas

*	PCRAI Z	PCSOLO O	IDMED	HSOLO	TERFIN	AREIA	LIMO	ARGIL A	M.O.	NTOT	P ₂ O ₅	K ₂ O	PH	SBTRO C	ATRC	LITOL G	EXPOS Ç	TPMAX	TPMED	TPMIN	
PCSOLO	0,4503																				
P-VALUE	0,0239																				
IDMED	-0,1569	-0,4491																			
HSOLO	0,4539	0,0243																			
	-0,2471	-0,1839	0,2480																		
	0,2336	0,3788	0,2320																		
TERFIN	0,1018	0,0382	-0,2155	0,0025																	
	0,6284	0,8560	0,3009	0,9905																	
AREIA	-0,4264	-0,3657	-0,1360	-0,3384	-0,0320																
	0,0336	0,0723	0,5170	0,0980	0,8794																
LIMO	0,3928	0,4096	-0,0775	0,3496	0,1094	-0,9045															
	0,0521	0,0420	0,1227	0,0867	0,6027	0,0000															
ARGILA	0,4335	0,3179	0,1916	0,4047	0,2194	-0,9226	0,8521														
	0,0304	0,1214	0,3590	0,0448	0,2921	0,0000	0,0000														
M.O.	0,1139	0,1199	0,4986	0,4568	0,0880	-0,6118	0,5298	0,7194													
	0,5878	0,5680	0,0112	0,0217	0,6756	0,0012	0,0065	0,0001													
NTOT	-0,2371	-0,1471	-0,0447	0,0306	-0,2030	0,3905	-0,2816	-0,4171	0,0888												
	0,2538	0,4830	0,8318	0,8846	0,3305	0,0536	0,1726	0,0380	0,6729												
P ₂ O ₅	-0,1845	-0,1835	-0,2799	-0,2318	0,4039	0,6582	-0,5762	-0,4216	0,4298												
	0,3772	0,3800	0,1753	0,2649	0,0452	0,0003	0,0026	0,0028	0,0358	0,0320											
K ₂ O	0,2063	0,1019	0,4320	0,2901	0,7159	0,0000	0,0000	0,0036	0,0974	0,9957	0,0041										
	0,0267	0,1267	-0,4316	0,1169	0,0434	-0,0025	0,3790	0,0541	0,0168	0,3514	-0,0411	0,4566									
PH	0,8993	0,5462	0,0312	0,5780	0,8370	0,9906	0,0617	0,7975	0,9366	0,0849	0,8454	0,0218									
SBTROCA	-0,0349	0,0647	-0,2090	-0,0041	-0,4960	-0,0778	0,2425	-0,0572	-0,0234	0,2394	-0,4353	0,5063	0,6624								
	0,8686	0,7586	0,3161	0,9846	0,0117	0,7118	0,2427	0,7858	0,9117	0,2490	0,0296	0,0098	0,0003								
ATROCA	0,4059	0,1497	0,2499	0,2455	0,1425	-0,5388	0,3127	0,6481	0,4168	-0,2957	-0,1925	-0,0205	-0,4471	-0,5364							
	0,0441	0,4752	0,2283	0,2369	0,4968	0,0055	0,1280	0,0005	0,0382	0,1512	0,3566	0,9225	0,0250	0,0057							
LITOLOG	-0,2352	-0,2470	-0,2549	-0,3431	0,5598	0,7230	-0,6902	-0,6259	-0,5292	0,1302	0,8751	-0,6543	-0,1954	-0,4715	-0,2766						
	0,2577	0,2340	0,2188	0,0931	0,0036	0,0000	0,0001	0,0008	0,0065	0,5349	0,0000	0,0004	0,3492	0,0173	0,1807						
EXPOSIC	-0,0283	0,0204	-0,1830	-0,3501	-0,2629	0,0588	-0,1399	-0,3002	-0,5011	-0,1994	-0,0224	-0,3150	0,2192	0,2924	0,1745	0,7786					
	0,8931	0,9228	0,3812	0,0862	0,2042	0,7802	0,5047	0,1448	0,0034	0,0107	0,3394	0,9152	0,1251	0,2924	0,1745	0,7786					
TPMAX	0,1766	-0,1029	-0,0415	-0,5143	0,1364	0,1004	-0,0851	-0,0118	-0,1592	-0,1624	0,0159	-0,1256	0,0679	0,0102	0,0134	0,1173	0,0251				
	0,3985	0,6245	0,8440	0,0085	0,5155	0,6331	0,6858	0,9555	0,4473	0,4379	0,9397	0,5497	0,7471	0,9613	0,9492	0,5767	0,9053				
TPMED	0,2264	0,0706	0,2185	-0,2375	0,1335	-0,4080	0,3537	0,5019	0,3276	-0,5322	-0,3762	0,0663	-0,1497	-0,1916	0,3317	-0,2808	-0,0094	0,5038			
	0,2764	0,7375	0,2941	0,2530	0,5246	0,0429	0,0828	0,0106	0,1099	0,0062	0,0638	0,7530	0,4751	0,3588	0,1052	0,1739	0,9646	0,1012			
TPMIN	0,3167	0,3938	0,3090	0,0444	0,0900	-0,6867	0,5838	0,7326	0,5612	-0,6427	-0,5624	0,2476	-0,2576	-0,2401	0,4429	-0,4920	-0,0002	0,0865	0,7668		
	0,1229	0,0514	0,1329	0,8331	0,6688	0,0002	0,0022	0,0000	0,0035	0,0005	0,0034	0,2328	0,2138	0,2477	0,0266	0,0125	0,9991	0,6809	0,0000		
PRECIPIME	-0,3714	-0,3052	0,3091	0,5015	-0,0236	0,3278	-0,2706	-0,2364	0,0485	0,2049	0,1815	-0,3395	-0,0105	-0,1208	-0,0990	0,1559	-0,1736	-0,4775	-0,4758	-0,2950	
	0,0676	0,1379	0,1327	0,0106	0,9109	0,1097	0,1908	0,2552	0,8180	0,3259	0,3852	0,0968	0,9604	0,5653	0,6379	0,4568	0,4065	0,0162	0,1523		

* PCRAIZ - Percentagem de *Phytophthora cinnamomi* isolada a partir de raiz; PCSOLO - Percentagem de *Phytophthora cinnamomi* isolada a partir de solo; IDMED - Índice medo de desfoliação; HSO LO - Humidade do solo; TERFIN - Terra fina; M.O. - Matéria orgânica; NTOT - Azoto total; SBTROCA - Soma de bases de troca; ATROCA - Acidez de troca; ATROCA - Acidez de troca; LITOLOG - Litológia; EXPOSIC - Exposição; TPMAX - Temperatura máxima mensal; TP MED - Temperatura média mensal; TPMIN - Temperatura mínima mensal; PRECIPIME - precipitação média mensal.

ANEXO III - ANÁLISE DE VARIÂNCIA E COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DAS DIMENSÕES DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DOS ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA*

1. Análise global da variância para o diâmetro dos clamidósporos

ONE-WAY AOV FOR DIÂMETRO BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	1983.00	991.500	245.58	0.0000
WITHIN	107	432.000	4.03738		
TOTAL	109	2415.00			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	0.51	2	0.7739
COCHRAN'S Q		0.3699	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		1.2732	

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 27.8515
EFFECTIVE CELL SIZE 35.5

ISOLAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PE16	27.750	30	2.0075
PE52	27.500	30	1.8570
PE12	36.150	50	2.0953
TOTAL	31.500	110	2.0093

CASES INCLUDED 110 MISSING CASES 0

1.1. Comparação de médias do diâmetro dos clamidósporos (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF DIÂMETRO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE12	36.150	I
PE16	27.750	.. I
PE52	27.500	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.982 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

2. Análise global da variância para o comprimento dos esporângios

ONE-WAY AOV FOR COMPRIMENTO BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	38	54671.3	1438.72	41.57	0.0000
WITHIN	1131	39139.7	34.6063		
TOTAL	1169	93811.0			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	304.74	38	0.0000
COCHRAN'S Q		0.0718	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		17.734	

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 46.8037
EFFECTIVE CELL SIZE 30.0

2.1. Comparação de médias do comprimento dos esporângios (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF COMPRIMENTO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA40	60.500	I
PA25	58.167	II
PE58	56.583	.II
PA20	55.625	.III
PA43	55.417	.IIII
PE95	55.167	..III
PA44	54.917	..IIII
PA30	54.417	..IIII
PA35	53.167	...IIII
PE97	52.583IIII
PE59	52.042IIII
PA7	51.958IIII
PE11	51.167IIII
PE13	50.625IIII
PA42	50.250IIII
PE60	50.083IIII
PA3	49.333II
PA21	48.750I
PE8	48.750I
PA41	48.583I
PA6	48.200I
PA31	44.917I
PA11	43.200II
PA37	42.500III
PA13	42.467III
PA12	42.400III
PA19	41.667III
PE96	41.500III
PE56	41.400III
PA33	40.917III
PE61	40.875III
PE10	40.583III
PA8	40.317III
PA1	40.125II
PE62	39.833II
PE54	39.400I
PA14	38.800I
PE55	35.533I
PE12	32.083I

THERE ARE 16 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.962	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	2.9802		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.5189		

3. Análise global da variância para a largura dos esporângios

ONE-WAY AOV FOR LARGURA BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	38	20709.3	544.981	40.45	0.0000
WITHIN	1131	15237.2	13.4723		
TOTAL	1169	35946.4			

BARTLETT'S TEST OF	CHI-SQ	DF	P
EQUAL VARIANCES	184.23	38	0.0000

COCHRAN'S Q	0.0828
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	11.701

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	17.7170
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

3.1. Comparação de médias da largura dos esporângios (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF LARGURA BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA25	41.333	I
PA40	39.333	.I
PE95	38.250	.II
PA35	37.500	.II
PA30	37.417	.I
PA20	37.208	.II
PE97	37.167	.II
PA43	37.083	.III
PA7	35.458	.III
PE58	35.292	.III
PA42	34.750	.III
PA44	34.667	.III
PE59	34.625	.III
PE11	34.292	.III
PA41	34.000	.III
PE60	33.583	.III
PA3	33.133	.III
PA6	33.000	.III
PA31	32.833	.III
PE13	32.583	.III
PA21	32.208	.II
PE8	32.208	.II
PA37	31.583	.II
PA19	30.292	.II
PE56	30.133	.III
PE96	29.958	.III
PA1	29.708	.III
PA33	29.583	.III
PA13	29.200	.III
PA11	28.667	.III
PE62	28.542	.III
PA8	28.325	.III
PA12	28.200	.III
PE54	28.133	.III
PE61	27.958	.III
PA14	27.667	.II
PE55	26.933	.II
PE10	25.792	.I
PE12	21.042	.I

THERE ARE 21 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.962	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.8595		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.9477		

4. Análise global da variância para a relação Comprimento/Largura (C/L) dos esporângios

ONE-WAY AOV FOR C/L BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	38	5.61977	0.14789	8.22	0.0006
WITHIN	1131	20.3364	0.01798		
TOTAL	1169	25.9562			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	174.87	38	0.0000

COCHRAN'S Q	0.0632
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	7.7447

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.00433
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

4.1. Comparação de médias da relação C/L (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF C/L BY ISOLAMENTO

IOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE58	1.6046	I
PA44	1.5930	II
PE10	1.5812	III
PE13	1.5589	IIII
PA40	1.5372	IIIII
PE12	1.5343	.IIII
PA21	1.5207	..IIII
PE8	1.5193	..IIII
PA11	1.5161	..IIII
PA12	1.5060	...IIII
PE59	1.5041	...IIII
PA20	1.4999	...IIIII
PA43	1.4989	...IIIII
PE60	1.4974	...IIIII
PE11	1.4974	...IIIII
PA3	1.4941	...IIIIII
PA7	1.4711	...IIIIII
PE61	1.4656IIIIII
PA6	1.4629IIIIII
PA13	1.4616IIIIII
PA30	1.4594IIIIII
PA42	1.4540IIIIII
PE95	1.4450IIIIII
PA8	1.4341IIIIII
PA41	1.4267IIIIII
PA35	1.4207IIIIII
PE97	1.4195IIIIII
PA14	1.4052IIIIII
PE62	1.4047IIIIII
PA25	1.4042IIIIII
PE54	1.4028IIIIII
PE96	1.3898IIIIII
PA19	1.3834IIIIII
PA33	1.3833IIIIII
PE56	1.3808IIIIII
PA31	1.3692IIIII
PA1	1.3560IIII
PA37	1.3487IIII
PE55	1.3220II

THERE ARE 17 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.962	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.0679		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0346		

5. Análise global da variância para o tamanho do poro

ONE-WAY AOV FOR PORO BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	23	1240.95	53.9542	30.76	0.0000
WITHIN	696	1220.83	1.75406		
TOTAL	719	2461.77			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	81.98	23	0.0000

COCHRAN'S Q	DF	P
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	7.9136	0.1094

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	1.74001
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

5.1. Comparação de médias do tamanho do poro (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF PORO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA40	13.083	I
PA25	12.583	I I
PA35	12.250	.. I I
PE95	12.000	.. I I I
PE97	11.583 I I I
PA43	11.417 I I
PA42	11.000 I I
PA30	10.917 I I
PA6	10.700 I I
PA44	10.667 I I
PA37	10.083 I I
PA31	9.9167 I I
PA3	9.9000 I I
PE96	9.8750 I I
PA11	9.7333 I I I
PA41	9.5000 I I I I
PA12	9.4667 I I I I
PA13	9.3333 I I I
PA33	9.0833 I I I
PA8	9.0167 I I
PE55	8.8333 I I
PE54	8.6333 I
PA14	8.5667 I
PE56	8.4333 I

THERE ARE 12 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.963	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6714		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3420		

6. Análise global da variância para o diâmetro do oósporo

ONE-WAY AOV FOR OOSPORO BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	1613.54	201.693	23.20	0.0000
WITHIN	261	2269.50	8.69540		
TOTAL	269	3883.04			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	12.53	8	0.1289

COCHRAN'S Q	0.1930
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	2.6926

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	6.43324
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

ISOLAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PA7	38.000	30	2.4069
PE8	40.900	30	2.9983
PE11	41.333	30	2.6952
PE58	41.333	30	2.6436
PA3	34.667	30	2.3684
PA13	41.000	30	3.8863
PA14	41.533	30	3.0027
PE55	38.933	30	3.4334
PE56	35.867	30	2.7759
TOTAL	39.285	270	2.9488

CASES INCLUDED 270 MISSING CASES 0

6.1. Comparação de médias do diâmetro do oósporo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF OOSPORO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA14	41.533	I
PE11	41.333	I
PE58	41.333	I
PA13	41.000	I
PE8	40.900	I
PE55	38.933	.. I
PA7	38.000	.. I
PE56	35.867 I
PA3	34.667 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.969	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.4992		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.7614		

7. Análise global da variância para o comprimento do anterídio

ONE-WAY AOV FOR ANTERIDO BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	701.600	87.7000	14.66	0.0000
WITHIN	261	1561.87	5.98416		
TOTAL	269	2263.47			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	7.99	8	0.4348

COCHRAN'S Q	0.1452
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	2.1920

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	2.72386
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

ISOLAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PA7	16.333	30	2.4682
PE8	14.200	30	2.7965
PE11	14.067	30	2.0667
PE58	13.933	30	2.7029
PA3	18.267	30	2.5042
PA13	16.600	30	2.1751
PA14	16.133	30	2.7258
PE55	16.333	30	2.5235
PE56	18.533	30	1.8889
TOTAL	16.044	270	2.4463

CASES INCLUDED 270 MISSING CASES 0

7.1. Comparação de médias do comprimento do anterídio (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF ANTERIDO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE56	18.533	I
PA3	18.267	I
PA13	16.600	.. I
PA7	16.333	.. I
PE55	16.333	.. I
PA14	16.133	.. I
PE8	14.200 I
PE11	14.067 I
PE58	13.933 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.969	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.2437		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.6316		

8. Análise global da variância para a espessura da parede do oósporo

ONE-WAY AOV FOR PAREDE BY ISOLAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	50.2519	6.28148	10.67	0.0000
WITHIN	261	153.633	0.58863		
TOTAL	269	203.885			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	43.22	8	0.0000

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.2102	5.1270

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.18976
EFFECTIVE CELL SIZE	30.0

ISOLAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PA7	4.3333	30	0.5467
PE8	4.4667	30	0.8996
PE11	4.1000	30	0.5477
PE58	3.9333	30	0.7397
PA3	3.1667	30	0.5307
PA13	4.2667	30	1.0483
PA14	4.7000	30	1.0554
PE55	4.3000	30	0.7944
PE56	3.7000	30	0.4661
TOTAL	4.1074	270	0.7672

CASES INCLUDED 270 MISSING CASES 0

8.1. Comparação de médias da espessura da parede do oósporo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF PAREDE BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA14	4.7000	I
PE8	4.4667	I I
PA7	4.3333	I I
PE55	4.3000	.. I I
PA13	4.2667	.. I I
PE11	4.1000	.. I I
PE58	3.9333 I I
PE56	3.7000 I
PA3	3.1667 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.969	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.3901		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1981		

ANEXO IV - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TAXA DE CRESCIMENTO (mm/dia) DOS ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA* SPP. DESENVOLVIDOS EM MEIO DE CULTURA CA E CMA A VÁRIAS TEMPERATURAS

1. Análise global de variância

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR TASAMAX

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REPETIÇÃO (A)	2	5.26805	2.63403	6.58	0.1319
MEIO (B)	1	51.2586	51.2586	128.12	0.0077
A*B	2	0.80018	0.40009		
ISOLAMENTO (C)	41	75.3587	1.83802	95.41	0.0000
TEMPERATURA (D)	6	923.612	153.935	7990.67	0.0000
C*D	246	51.3250	0.20864	10.83	0.0000
B*C	41	13.6079	0.33190	17.23	0.0013
B*D	6	24.9971	4.16619	216.26	0.0000
B*C*D	246	6.54353	0.02660	1.38	0.0004
A*B*C*D	1172	22.5779	0.01926		
TOTAL	1763	1175.35			

1.2. Comparação de médias da taxa de crescimento em função dos meios de cultura (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY MEIO

MEIO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
CA	1.2828	I
CMA	0.9419	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	4.303	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.1296		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0301		

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*MEIO, 2 DF

1.3. Comparação de médias da taxa de crescimento dos diferentes isolamentos (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE52	1.8703	I
PE12	1.7643	.I
PE16	1.7312	.I
PA7	1.3157	..I
PA3	1.2283	...I
PA19	1.2160	...I
PA20	1.2017	...II
PA35	1.1445II
PA42	1.1348II
PE61	1.1284III
PA1	1.1268III
PE95	1.1256III
PE62	1.1184IIII
PE54	1.0991IIII
PE56	1.0934IIII
PA41	1.0900IIII
PA31	1.0851IIII
PA6	1.0736IIII
PA37	1.0690IIII
PE55	1.0682IIII
PA33	1.0631IIII
PE8	1.0539IIII
PE11	1.0489IIII
PA25	1.0450IIII
PE13	1.0372IIII
PA14	1.0371IIII
PA30	1.0312IIII
PE59	1.0269IIII
PE96	1.0216IIII
PE10	1.0173IIII
PE60	1.0158IIII
PA40	1.0120IIII
PA8	1.0107IIII
PA21	1.0046IIII
PE58	1.0026IIII
PA13	0.9902IIII
PA11	0.9886IIII
PA12	0.9836III
PA32	0.9768II
PE97	0.9336II
PA43	0.8897II
PA44	0.8442I

THERE ARE 25 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.962 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.0594
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0303

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*MEIO*ISOLAMENTO*TEMPERATURA, 1172 DF

1.4. Comparação de médias da taxa de crescimento em função da temperatura (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY TEMPERATURA

TEMPERATURA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
30	2.0814	I
25	1.9317	.. I
20	1.5809 I
15	1.1519 I
35	0.5082 I
10	0.4020 I
5	0.1305 I

ALL 7 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.962 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.0243
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0124

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*MEIO*ISOLAMENTO*TEMPERATURA, 1172 DF

2. Análise de variância da taxa de crescimento (mm/dia) dos isolamentos de *Phytophthora* spp. desenvolvidos em meio de cultura CMA a várias temperaturas

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REPETIÇÃO (A)	2	1.05027	0.52513	10.33	0.0025
TEMPERATURA (B)	6	323.329	53.8881	1060.20	0.0000
A*B	12	0.60994	0.05083		
AIS (C)	41	64.4307	1.57148	169.57	0.0000
B*C	246	25.7958	0.10486	11.32	0.0000
A*B*C	574	5.31939	0.00927		
TOTAL	881	420.535			

2.1. Comparação de médias da taxa de crescimento em meio CMA em função da temperatura (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY TEMPERATURA

TEMPERATURA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
30	1.7259	I
25	1.6403	.. I
20	1.3469 I
15	0.9864 I
35	0.4369 I
10	0.3392 I
5	0.1176 I

ALL 7 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.179 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.0619
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0284

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*TEMPERATURA, 12 DF

2.2. Comparação de médias da taxa de crescimento dos diferentes isolamentos em meio CMA (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE52	1.9515	I
PE16	1.8051	.I
PE12	1.7653	.I
PA7	1.1260	.I
PA3	1.0680	.II
PE61	1.0595	.I
PE62	1.0528	.I
PA42	1.0221	.II
PA35	0.9771	.II
PA33	0.9613	.II
PE96	0.9574	.II
PE95	0.9566	.II
PA30	0.9481	.II
PA41	0.9411	.II
PA37	0.9368	.II
PA20	0.9287	.III
PA25	0.9249	.III
PA31	0.9215	.III
PA19	0.9143	.II
PA1	0.8744	.II
PA6	0.8744	.II
PE8	0.8534	.II
PA32	0.8514	.II
PA40	0.8510	.II
PE11	0.8399	.III
PE13	0.8375	.III
PE55	0.8209	.III
PE58	0.8198	.III
PE10	0.8151	.III
PE54	0.8103	.III
PE59	0.7996	.III
PE60	0.7962	.III
PE56	0.7863	.III
PA8	0.7814	.III
PA11	0.7810	.III
PA21	0.7746	.III
PA14	0.7521	.III
PE97	0.7484	.II
PA12	0.7455	.II
PA13	0.7424	.II
PA43	0.7133	.II
PA44	0.6726	.I

THERE ARE 17 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.964	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.0584		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0297		

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*TEMPERATURA*AISOLAMENTO, 574 DF

3. Análise de variância da taxa de crescimento (mm/dia) dos isolamentos de *Phytophthora* spp. desenvolvidos em meio de cultura CA a várias temperaturas

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR TASAMAX

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REPETIÇÃO (A)	2	5.01796	2.50898	33.11	0.0000
TEMPERATURA (B)	6	625.281	104.213	1375.14	0.0000
A*B	12	0.90941	0.07578		
AIS (C)	41	24.5358	0.59843	21.82	0.0000
B*C	246	32.0727	0.13038	4.75	0.0000
A*B*C	574	15.7391	0.02742		
TOTAL	881	703.556			

3.1. Comparação de médias da taxa de crescimento em meio CA em função da temperatura (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY TEMPERATURA

TEMPERATURA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
30	2.4369	I
25	2.2231	.. I
20	1.8148 I
15	1.3173 I
35	0.5794 I
10	0.4648 I
5	0.1434 I

ALL 7 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.179	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.0756		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0347		

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*TEMPERATURA, 12 DF

3.2. Comparação de médias da taxa de crescimento dos diferentes isolamentos em meio CA (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF TASAMAX BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE52	1.7892	I
PE12	1.7634	I
PE16	1.6573	.I
PA19	1.5177	..I
PA7	1.5054	..I
PA20	1.4746	..II
PE56	1.4004	...II
PA3	1.3885	...III
PE54	1.3879	...III
PA1	1.3791	...III
PA14	1.3220	...III
PE55	1.3155	...IIII
PA35	1.3119	...IIII
PE95	1.2947	...IIII
PA6	1.2729	...IIII
PE11	1.2579	...IIIII
PE8	1.2544	...IIIII
PE59	1.2541	...IIIII
PA31	1.2486	...IIIII
PA42	1.2475	...IIIII
PA8	1.2401	...IIIII
PA41	1.2389	...IIIII
PA13	1.2381	...IIIII
PE13	1.2369	...IIIII
PE60	1.2353	...IIIII
PA21	1.2347	...IIIII
PA12	1.2218	...IIIII
PE10	1.2194	...IIIII
PA37	1.2013	...IIIII
PE61	1.1974	...IIIII
PA11	1.1962	...IIIII
PE58	1.1854	...IIIII
PE62	1.1840	...IIIII
PA40	1.1730	...IIIII
PA25	1.1652	...IIIII
PA33	1.1650	...IIIII
PE97	1.1188	...III
PA30	1.1144	...IIIII
PA32	1.1021	...IIIII
PE96	1.0859	...IIIII
PA43	1.0660	...II
PA44	1.0159I

THERE ARE 15 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	1.964	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.1004		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.0511		

ERROR TERM USED: REPETIÇÃO*TEMPERATURA*ISOLAMENTO, 574 DF

4. Modelos de regressão

Meio CMA

Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25 e 30 °C

Isolamentos - 28 (Grupo 1): PA₁, PA₃, PA₆, PA₇, PA₈, PA₁₁, PA₁₂, PA₁₃, PA₁₄, PA₁₉, PA₂₀, PA₂₁, PA₄₃, PA₄, PE₈₄, PE₁₀, PE₁₁, PE₁₃, PE₅₄, PE₅₅, PE₅₆, PE₅₈, PE₅₉, PE₆₀, PE₆₁, PE₆₂, PE₉₅ e PE₉₇

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3
3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	5047.1	0.0000	0.0000	18502.1	INTERCEPT ONLY
2	140.8	0.8843	0.8845	2136.63	A
2	595.5	0.8022	0.8026	3652.59	B
2	1171.8	0.6981	0.6987	5574.32	C
3	2.6	0.9094	0.9098	1669.11	B C
3	44.3	0.9019	0.9023	1808.03	A C
3	61.1	0.8988	0.8992	1864.10	A B
4	4.0	0.9094	0.9099	1667.14	A B C

CASES INCLUDED 504 MISSING CASES 0

Meio CMA

Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25 e 30°C

Isolamentos - 10 (Grupo 2): PA₂₅, PA₃₀, PA₃₁, PA₃₂, PA₃₃, PA₃₅, PA₃₇, PA₄₀, PA₄₁ e PA₄₂

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3
3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	4030.8	0.0000	0.0000	8684.98	INTERCEPT ONLY
2	376.4	0.8680	0.8688	1139.84	A
2	880.8	0.7475	0.7489	2180.80	B
2	1427.7	0.6168	0.6190	3309.26	C
3	19.5	0.9535	0.9540	399.270	B C
3	110.6	0.9316	0.9324	587.362	A C
3	155.2	0.9209	0.9218	679.397	A B
4	4.0	0.9575	0.9582	363.181	A B C

CASES INCLUDED 180 MISSING CASES 0

Meio CMA

Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25, 30 e 35 °C

Isolamentos - 3 (Grupo 3): PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3
3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	1216.3	0.0000	0.0000	3983.91	INTERCEPT ONLY
2	168.6	0.8189	0.8218	709.888	A
2	358.2	0.6680	0.6734	1301.34	B
2	539.7	0.5236	0.5313	1867.42	C
3	3.2	0.9513	0.9528	187.858	B C
3	30.0	0.9296	0.9319	271.420	A C
3	48.5	0.9147	0.9174	328.980	A B
4	4.0	0.9515	0.9538	184.020	A B C

CASES INCLUDED 63 MISSING CASES 0

Meio CA**Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25 e 30 °C****Isolamentos - 28 (Grupo 1): PA₁, PA₃, PA₆, PA₇, PA₈, PA₁₁, PA₁₂, PA₁₃, PA₁₄, PA₁₉, PA₂₀, PA₂₁, PA₄₃, PA₄, PE₈₄, PE₁₀, PE₁₁, PE₁₃, PE₅₄, PE₅₅, PE₅₆, PE₅₈, PE₅₉, PE₆₀, PE₆₁, PE₆₂, PE₉₅ e PE₉₇**

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3

3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	6849.9	0.0000	0.0000	40287.0	INTERCEPT ONLY
2	108.2	0.9171	0.9173	3332.75	A
2	645.7	0.8439	0.8442	6278.19	B
2	1373.2	0.7447	0.7452	10264.6	C
3	2.2	0.9317	0.9320	2741.10	B C
3	35.1	0.9272	0.9275	2921.50	A C
3	48.1	0.9254	0.9257	2992.57	A B
4	4.0	0.9316	0.9320	2739.91	A B C

CASES INCLUDED 504 MISSING CASES 0

Meio CA**Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25 e 30°C****Isolamentos - 10 (Grupo 2): PA₂₅, PA₃₀, PA₃₁, PA₃₂, PA₃₃, PA₃₅, PA₃₇, PA₄₀, PA₄₁ e PA₄₂**

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3

3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	3102.8	0.0000	0.0000	14679.5	INTERCEPT ONLY
2	203.8	0.8836	0.8842	1699.26	A
2	557.9	0.7750	0.7763	3283.80	B
2	959.0	0.6521	0.6540	5078.48	C
3	7.9	0.9439	0.9445	813.993	B C
3	59.4	0.9280	0.9288	1044.50	A C
3	83.5	0.9206	0.9215	1152.01	A B
4	4.0	0.9454	0.9464	787.487	A B C

CASES INCLUDED 180 MISSING CASES 0

Em meio CA**Temperaturas: 5, 10, 15, 20 25, 30 e 35 °C****Isolamentos - 3 (Grupo 3): PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂**

BEST SUBSET REGRESSION MODELS FOR TASAMM

UNFORCED INDEPENDENT VARIABLES: (A) TEMP (B) TEMP2 (C) TEMP3

3 "BEST" MODELS FROM EACH SUBSET SIZE LISTED.

P	CP	ADJUSTED R SQUARE	R SQUARE	RESID SS	MODEL VARIABLES
1	698.4	0.0000	0.0000	4017.46	INTERCEPT ONLY
2	114.3	0.7680	0.7718	916.857	A
2	227.5	0.6166	0.6228	1515.46	B
2	333.4	0.4749	0.4833	2075.73	C
3	3.4	0.9178	0.9205	319.389	B C
3	21.8	0.8927	0.8962	417.007	A C
3	34.5	0.8755	0.8795	484.057	A B
4	4.0	0.9184	0.9223	312.119	A B C

CASES INCLUDED 63 MISSING CASES 0

5. Regressão linear da taxa de crescimento sobre a temperatura em meio de cultura CMA

Ajuste geral para 28 isolamentos (Global 1)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	-0.17918	0.04354	-4.12	0.0000	20.9
TEMP2	0.07133	0.00424	16.82	0.0000	253.9
TEMP3	-0.00158	9.815E-05	-16.10	0.0000	132.0

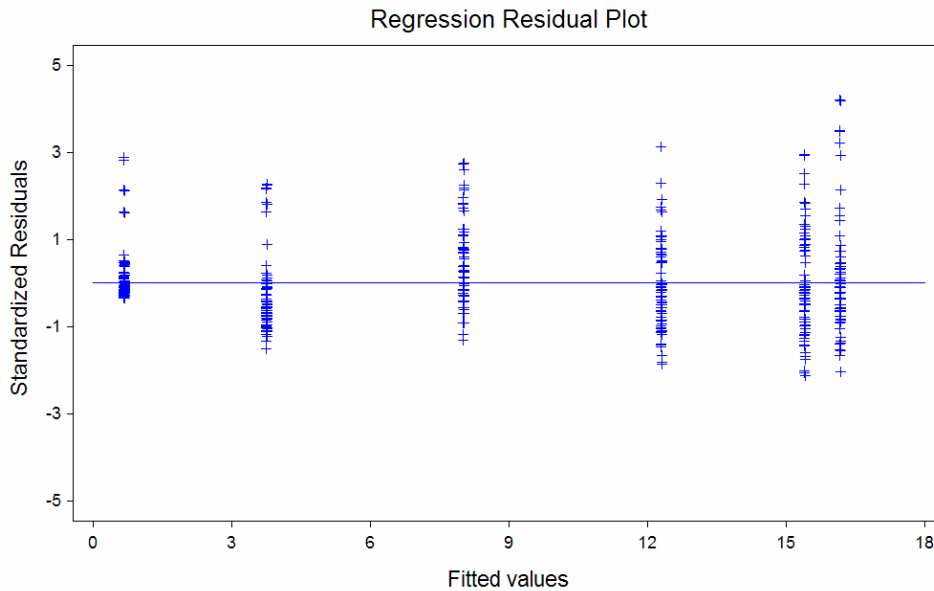
R-SQUARED 0.9735 RESID. MEAN SQUARE (MSE) 3.32837
 ADJUSTED R-SQUARED 0.9734 STANDARD DEVIATION 1.82438

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	61309.0	20436.3	6140.03	0.0000
RESIDUAL	501	1667.52	3.32837		
TOTAL	504	62976.5			

CASES INCLUDED 504 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + ct$ onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a , b e c são os coeficientes de regressão.

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



Ajuste geral para 10 isolamentos (Global 2)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	-0.59265	0.05756	-10.30	0.0000	20.9
TEMP2	0.12502	0.00561	22.30	0.0000	253.9
TEMP3	-0.00289	1.298E-04	-22.28	0.0000	132.0

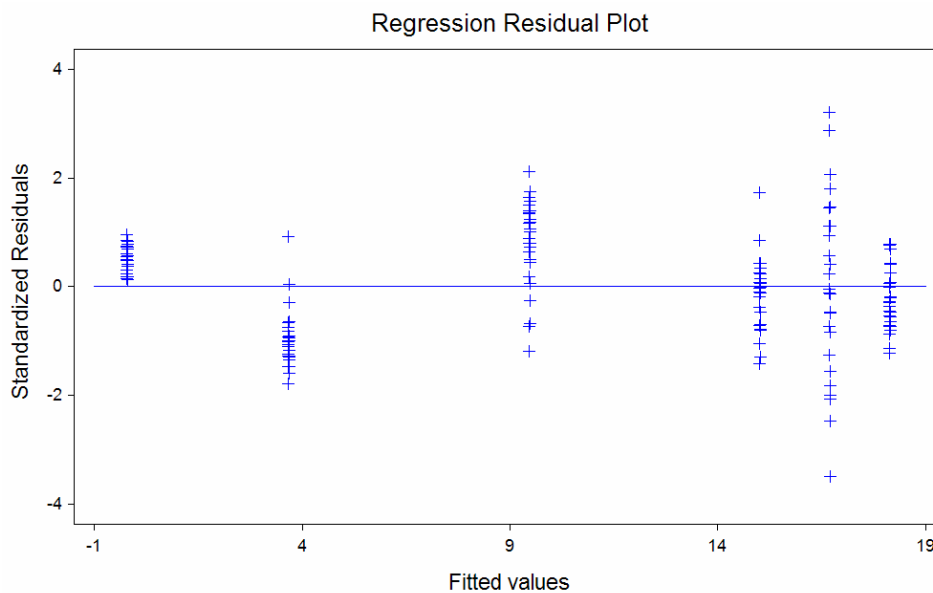
R-SQUARED	0.9871	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	2.07759
ADJUSTED R-SQUARED	0.9869	STANDARD DEVIATION	1.44139

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	28139.0	9379.66	4514.68	0.0000
RESIDUAL	177	367.734	2.07759		
TOTAL	180	28506.7			

CASES INCLUDED 180 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + ct$ onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a , b e c são os coeficientes de regressão.

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



Ajuste geral para os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ (Global 3)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	0.63873	0.10971	5.82	0.0000	21.3
TEMP2	0.04877	0.00921	5.30	0.0000	251.0
TEMP3	-0.00135	1.840E-04	-7.32	0.0000	129.4

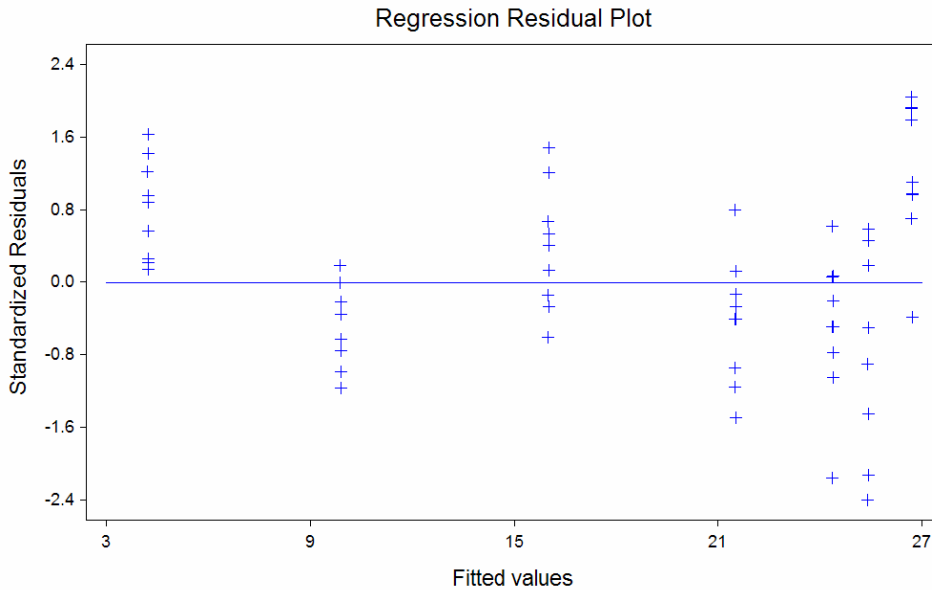
R-SQUARED	0.9915	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	3.56713
ADJUSTED R-SQUARED	0.9911	STANDARD DEVIATION	1.88869

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	25113.9	8371.30	2346.79	0.0000
RESIDUAL	60	214.028	3.56713		
TOTAL	63	25327.9			

CASES INCLUDED 63 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + c$, onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a, b e c são os coeficientes de regressão.

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



6. Regressão linear da taxa de crescimento sobre a temperatura em meio de cultura CA

Ajuste geral para 28 isolamentos (Global 1)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	-0.15988	0.05590	-2.86	0.0044	20.9
TEMP2	0.09296	0.00545	17.07	0.0000	253.9
TEMP3	-0.00200	1.260E-04	-15.91	0.0000	132.0

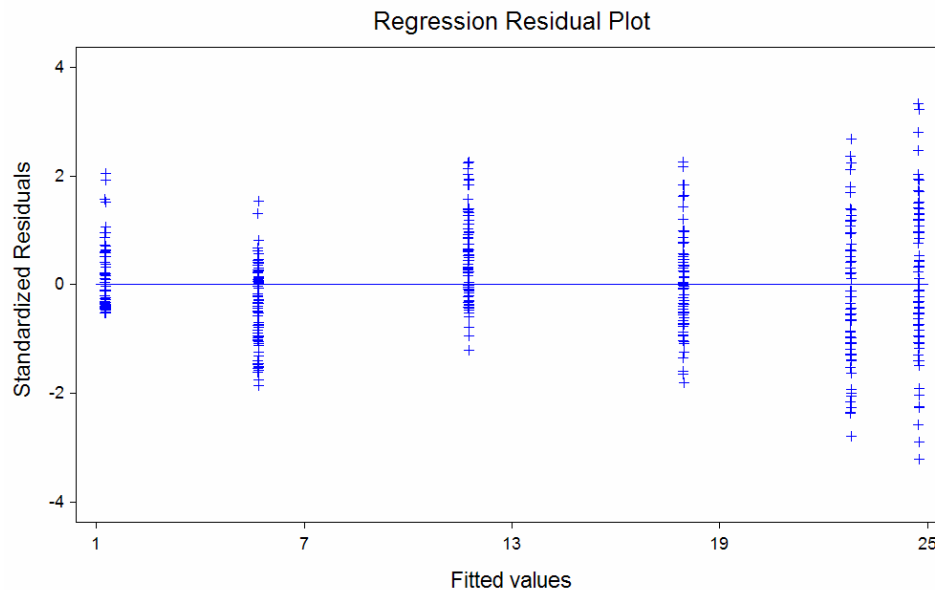
R-SQUARED	0.9803	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	5.48665
ADJUSTED R-SQUARED	0.9802	STANDARD DEVIATION	2.34236

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	136598	45532.8	8298.83	0.0000
RESIDUAL	501	2748.81	5.48665		
TOTAL	504	139347			

CASES INCLUDED 504 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + ct$ onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a , b e c são os coeficientes de regressão

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



Ajuste geral para 10 isolamentos (Global 2)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	-0.68682	0.08425	-8.15	0.0000	20.9
TEMP2	0.14872	0.00821	18.12	0.0000	253.9
TEMP3	-0.00337	1.899E-04	-17.75	0.0000	132.0

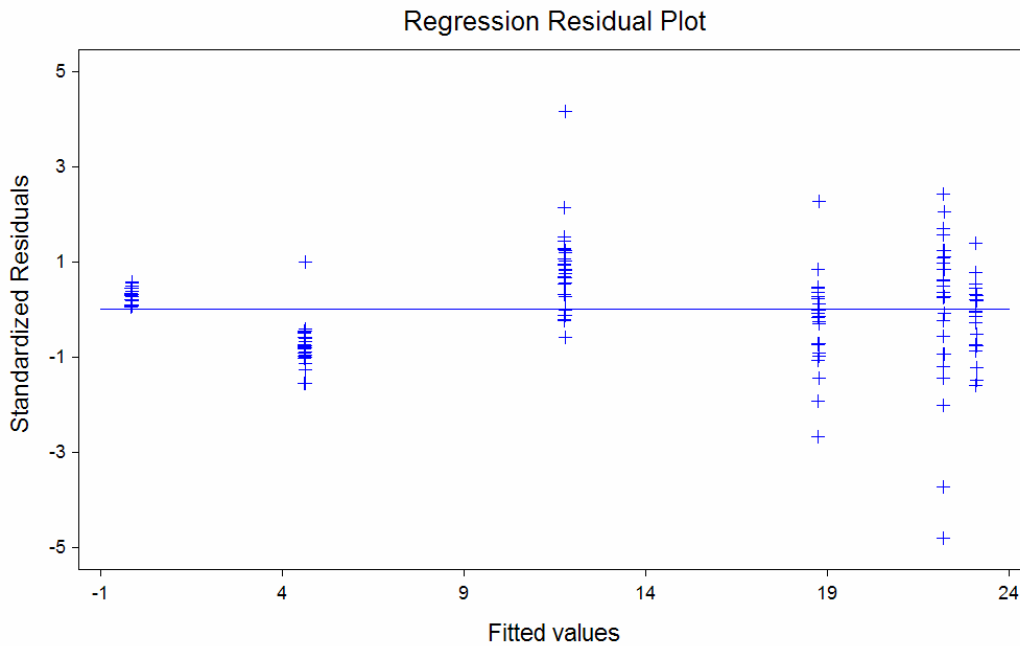
R-SQUARED	0.9832	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	4.45105
ADJUSTED R-SQUARED	0.9830	STANDARD DEVIATION	2.10975

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	46232.8	15410.9	3462.31	0.0000
RESIDUAL	177	787.836	4.45105		
TOTAL	180	47020.6			

CASES INCLUDED 180 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + ct$ onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a , b e c são os coeficientes de regressão.

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



Ajuste geral para os isolamentos PE₁₂, PE₁₆ e PE₅₂ (Global 3)

UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF TASAMM

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEMP	0.42944	0.13795	3.11	0.0028	21.3
TEMP2	0.06202	0.01158	5.36	0.0000	251.0
TEMP3	-0.00159	2.313E-04	-6.89	0.0000	129.4

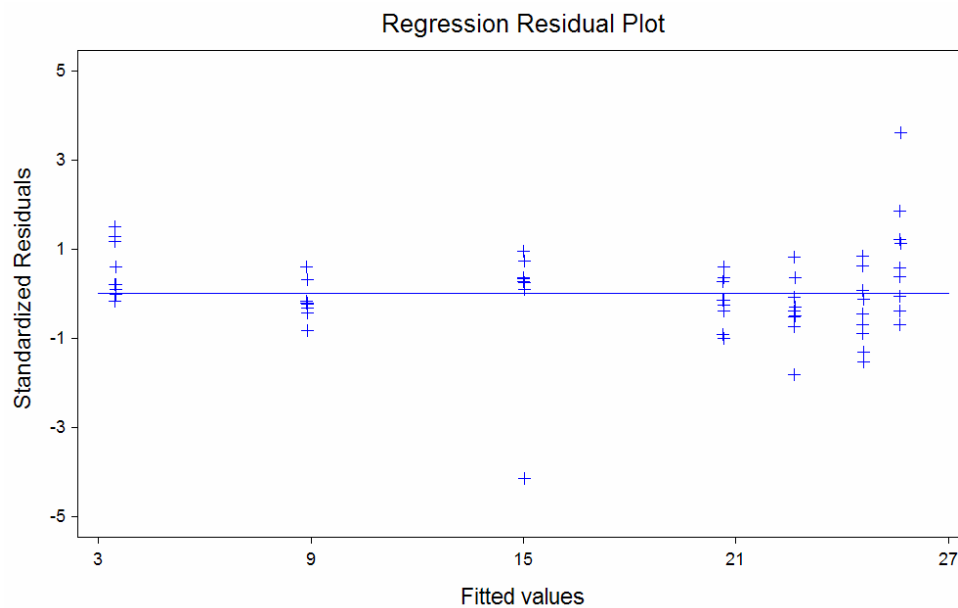
R-SQUARED	0.9853	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	5.64016
ADJUSTED R-SQUARED	0.9846	STANDARD DEVIATION	2.37490

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	22678.5	7559.50	1340.30	0.0000
RESIDUAL	60	338.410	5.64016		
TOTAL	63	23016.9			

CASES INCLUDED 63 MISSING CASES 0

A transformação realizada foi $y = at^3 + bt^2 + ct$ onde y representa a taxa de crescimento máximo diário, t é a temperatura de crescimento, a , b e c são os coeficientes de regressão.

Distribuição dos resíduos estandardizados sobre os valores ajustados



ANEXO V - PATOGENICIDADE DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

A. EFEITO DO MÉTODO DE INFESTAÇÃO EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

A.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea para o isolamento

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	13.1756	13.1756	7.15	0.0133
ISOLAMENTO (B)	2	23.7636	11.8818	6.45	0.0057
REP (C)	5	2.05278	0.41056	0.22	0.9491
A*B	2	15.5053	7.75264	4.21	0.0271
A*C	5	4.14444	0.82889	0.45	0.8091
B*C	10	7.55972	0.75597	0.41	0.9282
A*B*C	10	9.68472	0.96847	0.53	0.8551
RESIDUAL	24	44.2200	1.84250		
TOTAL	59	120.106			

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 12

A.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	3.3139	I
Azinheira	2.4583	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.064 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.6603
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3199

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do isolamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA	3.3958	I
PE	3.1792	I
TESTEMUNHA	2.0833	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.064 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8087
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3918

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular para o isolamento

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.28125	0.28125	0.67	0.4222
ISOLA (B)	2	59.6319	29.8160	70.67	0.0000
REP (C)	5	2.72569	0.54514	1.29	0.3001
A*B	2	6.43750	3.21875	7.63	0.0027
A*C	5	0.94792	0.18958	0.45	0.8095
B*C	10	3.28472	0.32847	0.78	0.6483
A*B*C	10	2.89583	0.28958	0.69	0.7268
RESIDUAL	24	10.1250	0.42188		
TOTAL	59	86.3299			

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 12

A.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do isolamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA	3.7917	I
PE	3.3125	.. I
TESTEMUNHA	1.6667 I

ALL 3 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.064	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.3870		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1875		

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.3. Análise de variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea para o método de infestação

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	13.1756	13.1756	9.97	0.0043
METINFES (B)	2	39.7678	19.8839	15.04	0.0001
REP (C)	5	2.05278	0.41056	0.31	0.9017
A*B	2	10.2178	5.10889	3.87	0.0351
A*C	5	4.14444	0.82889	0.63	0.6807
B*C	10	11.2056	1.12056	0.85	0.5902
A*B*C	10	7.82222	0.78222	0.59	0.8047
RESIDUAL	24	31.7200	1.32167		
TOTAL	59	120.106			

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 12

A.3.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	3.3139	I
Azinhaira	2.4583	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.064	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5593		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2710		

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.3.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do método de infestação (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY METINFES

METINFES	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Líquido	3.8750	I
Sólido	2.7000	.. I
Testemunha	2.0833	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.064	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6849		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3319		

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.4. Análise de variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular para o método de infestação

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.28125	0.28125	0.41	0.5269
METINFES (B)	2	57.2986	28.6493	41.99	0.0000
REP (C)	5	2.72569	0.54514	0.80	0.5613
A*B	2	2.77083	1.38542	2.03	0.1532
A*C	5	0.94792	0.18958	0.28	0.9207
B*C	10	1.36806	0.13681	0.20	0.9942
A*B*C	10	4.56250	0.45625	0.67	0.7417
RESIDUAL	24	16.3750	0.68229		
TOTAL	59	86.3299			

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 12

A.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do método de infestação (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY METINFES

METINFES	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Líquido	3.6458	I
Sólido	3.4583	I
Testemunha	1.6667	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.064	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.4921		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2384		

ERROR TERM USED: RESIDUAL, 24 DF

A.5. Análise individual da avaliação visual dos sintomas na parte aérea em função do tratamento

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	58.1760	6.46400	8.57	0.0000
WITHIN	50	37.7333	0.75467		
TOTAL	59	95.9093			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO; VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.95156
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobTestemu	3.0000	6	0.6325
SobLiqPA	4.0000	6	0.0000
SobSolPA	3.9167	6	0.2041
SobLiqPE	3.7500	6	0.4183
SobSolPE	2.2167	6	1.9803
AziTestemu	1.1667	6	0.7528
AziLiqPA	4.0000	6	0.0000
AziSolPA	1.6667	6	1.5055
AziLiqPE	3.7500	6	0.4183
AziSolPE	3.0000	6	0.0000
TOTAL	3.0467	60	0.8687

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

A.5.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobLiqPA	4.0000	I
AziLiqPA	4.0000	I
SobSolPA	3.9167	I
SobLiqPE	3.7500	I
AziLiqPE	3.7500	I
SobTestemu	3.0000	I I
AziSolPE	3.0000	I I
SobSolPE	2.2167	.. I I
AziSolPA	1.6667 I I
AziTestemu	1.1667 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.009 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.0074
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.5016

A.6. Análise individual da avaliação visual dos sintomas na parte radicular em função do tratamento

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	44.3708	4.93009	14.90	0.0000
WITHIN	50	16.5417	0.33083		
TOTAL	59	60.9125			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO; VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.76654
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobTestemu	2.0000	6	0.0000
SobLiqPA	4.0000	6	0.0000
SobSolPA	4.0000	6	0.0000
SobLiqPE	3.2500	6	0.4183
SobSolPE	2.6667	6	1.5055
AziTestemu	1.3333	6	0.5164
AziLiqPA	3.8333	6	0.2582
AziSolPA	3.3333	6	0.4082
AziLiqPE	3.5000	6	0.5477
AziSolPE	3.8333	6	0.2582
TOTAL	3.1750	60	0.5752

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

A.6.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobLiqPA	4.0000	I
SobSolPA	4.0000	I
AziLiqPA	3.8333	I I
AziSolPE	3.8333	I I
AziLiqPE	3.5000	I I
AziSolPA	3.3333	I I I
SobLiqPE	3.2500	.. I I
SobSolPE	2.6667	... I I
SobTestemu	2.0000 I I
AziTestemu	1.3333 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.009	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6670		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3321		

B. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DE SINTOMAS E INFLUÊNCIA DO TIPO DE SUBSTRATO NA INFECÇÃO DE SOBREIROS E AZINHEIRAS POR *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

B.1. Infestação de plantas sem remoção da terra das raízes, em abrigo

B.1.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	8.75014	8.75014	28.63	0.0003
SUBSTRATO (B)	1	2.84014	2.84014	9.29	0.0123
INÓCULO (C)	2	6.65583	3.32792	10.89	0.0031
REPETIÇÃO (D)	5	2.08958	0.41792	1.37	0.3143
A*B	1	0.74014	0.74014	2.42	0.1507
A*C	2	3.79528	1.89764	6.21	0.0177
A*D	5	5.18069	1.03614	3.39	0.0475
B*C	2	3.14361	1.57181	5.14	0.0291
B*D	5	5.65736	1.13147	3.70	0.0371
C*D	10	2.21583	0.22158	0.72	0.6897
A*B*C	2	3.75194	1.87597	6.14	0.0182
A*B*D	5	5.12403	1.02481	3.35	0.0489
A*C*D	10	4.12639	0.41264	1.35	0.3220
B*C*D	10	3.22139	0.32214	1.05	0.4677
A*B*C*D	10	3.05639	0.30564		
TOTAL	71	60.3488			

B.1.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	1.7194	I
Azinheira	1.0222	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.2903		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1303		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tipo de substrato (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY SUBSTRATO

SUBSTRATO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Argiloso	1.5694	I
Limoso	1.1722	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.2903		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1303		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.1.3. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	1.7000	I
PE13	1.4458	I
Testemunha	0.9667	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.3556
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1596

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.2. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	29.6771	2.69792	5.28	0.0000
WITHIN	60	30.6717	0.51119		
TOTAL	71	60.3487			

BARTLETT'S TEST OF CHI-SQ DF P
 EQUAL VARIANCES 17.06 11 0.1060

COCHRAN'S Q 0.1372
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 56.111

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.36445
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	1.4167	6	0.9174
SobslimPE	1.3833	6	0.9065
SobslimTEM	2.0667	6	0.8664
SobsargPA	2.0833	6	0.6646
SobsargPE	2.2833	6	0.7885
SobsargTES	1.0833	6	0.4916
AzislimPA	1.2000	6	0.7616
AzislimPE	0.9167	6	0.4916
AzislimTES	0.0500	6	0.1225
AzisargPA	2.1000	6	0.8556
AzisargPE	1.2000	6	0.7616
AzisargTES	0.6667	6	0.5164
TOTAL	1.3708	72	0.7150

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

B.1.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tipo de tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobsargPE	2.2833	I
AzisargPA	2.1000	I I
SobsargPA	2.0833	I I
SobslimTEM	2.0667	I I
SobslimPA	1.4167	.. I I
SobslimPE	1.3833	.. I I
AzislimPA	1.2000 I
AzisargPE	1.2000 I
SobsargTES	1.0833 I
AzislimPE	0.9167 I
AzisargTES	0.6667 I I
AzislimTES	0.0500 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.000 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8257
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4128

B.1.3. Análise global da variância para a valiação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	2.03347	2.03347	4.24	0.0666
SUBSTRATO (B)	1	0.95681	0.95681	1.99	0.1883
INÓCULO (C)	2	28.2678	14.1339	29.45	0.0001
REPETIÇÃO	5	3.11403	0.62281	1.30	0.3385
A*B	1	0.28125	0.28125	0.59	0.4617
A*C	2	1.48111	0.74056	1.54	0.2606
A*D	5	2.96736	0.59347	1.24	0.3613
B*C	2	1.61778	0.80889	1.69	0.2340
B*D	5	1.73736	0.34747	0.72	0.6208
C*D	10	1.83222	0.18322	0.38	0.9277
A*B*C	2	2.06333	1.03167	2.15	0.1673
A*B*D	5	2.44292	0.48858	1.02	0.4563
A*C*D	10	5.27556	0.52756	1.10	0.4421
B*C*D	10	2.59556	0.25956	0.54	0.8267
A*B*C*D	10	4.80000	0.48000		
TOTAL	71	61.4665			

B.1.3.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	2.6958	I
PE13	2.3542	I
Testemunha	1.2292	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.4456
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2000

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.4. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	36.7015	3.33650	8.08	0.0000
WITHIN	60	24.7650	0.41275		
TOTAL	71	61.4665			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES
 CHI-SQ 10.50 DF 11 P 0.4864

COCHRAN'S Q 0.1699
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 18.431

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.48729
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	2.3667	6	0.6377
SobslimPE	2.1000	6	0.4147
SobslimTEM	1.7833	6	0.7494
SobsargPA	3.1500	6	0.5718
SobsargPE	2.7500	6	0.5244
SobsargTES	1.4167	6	0.9174
AzislímPA	2.8167	6	0.2137
AzislímPE	2.0000	6	0.7071
AzislímTES	0.8000	6	0.5441
AzisargPA	2.4500	6	0.6892
AzisargPE	2.5667	6	0.7815
AzisargTES	0.9167	6	0.6646
TOTAL	2.0931	72	0.6425

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

B.1.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobsargPA	3.1500	I
AzislimPA	2.8167	I I
SobsargPE	2.7500	I I
AzisargPE	2.5667	I I I
AzisargPA	2.4500	I I I I
SobslimPA	2.3667	.. I I I
SobslimPE	2.1000	.. I I I I
AzinslimPE	2.0000 I I I
SobslimTEM	1.7833 I I
SobsargTES	1.4167 I I
AzisargTES	0.9167 I
AzislimTES	0.8000 I

THERE ARE 6 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.000 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.7420
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3709

B.1.5. Análise global da variância para a variação do peso da planta

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOPESO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	24083.7	24083.7	11.34	0.0071
SUBSTRATO (B)	1	1770.23	1770.23	0.83	0.3827
INÓCULO (C)	2	1216.93	608.466	0.29	0.7568
REPETIÇÃO (D)	5	5379.82	1075.96	0.51	0.7654
A*B	1	2621.71	2621.71	1.23	0.2925
A*C	2	3294.39	1647.19	0.78	0.4862
A*D	5	9146.87	1829.37	0.86	0.5385
B*C	2	4025.73	2012.87	0.95	0.4198
B*D	5	3570.40	714.080	0.34	0.8796
C*D	10	26584.0	2658.40	1.25	0.3646
A*B*C	2	12268.0	6133.98	2.89	0.1023
A*B*D	5	7013.87	1402.77	0.66	0.6614
A*C*D	10	16163.3	1616.33	0.76	0.6628
B*C*D	10	12079.8	1207.98	0.57	0.8063
A*B*C*D	10	21233.4	2123.34		
TOTAL	71	150452			

B.1.5.1. Comparação de médias da variação do peso da planta em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	-12.613	I
Azinheira	-49.191	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 24.200
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 10.861

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.6. Análise de variância em função do tratamento para a variação do peso da planta

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	49280.6	4480.06	2.66	0.0077
WITHIN	60	101171	1686.19		
TOTAL	71	150452			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
35.16	11	0.0002

COCHRAN'S Q 0.3011
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 40.815

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 465.644
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	-19.694	6	24.040
SobslimPE	7.0971	6	41.447
SobslimTEM	-58.219	6	39.540
SobsargPA	15.249	6	67.127
SobsargPE	-23.076	6	56.983
SobsargTES	2.9675	6	78.051
AzislimPA	-38.917	6	24.589
AzislimPE	-60.311	6	14.085
AzislimTES	-45.118	6	12.217
AzisargPA	-64.181	6	16.581
AzisargPE	-40.787	6	27.612
AzisargTES	-45.833	6	23.248
TOTAL	-30.902	72	41.063

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

B.1.6.1. Comparação de médias da variação do peso da planta em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobsargPA	15.249	I
SobslimPE	7.0971	I I
SobsargTES	2.9675	I I I
SobslimPA	-19.694	I I I I
SobsargPE	-23.076	I I I I
AzislimPA	-38.917	.. I I I
AzisargPE	-40.787 I I
AzislimTES	-45.118 I
AzisargTES	-45.833 I
SobslimTEM	-58.219 I
AzislimPE	-60.311 I
AzisargPA	-64.181 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.000 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 47.423
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 23.708

B.1.7. Análise de variância em função do tratamento para a variação da clorofila

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOCOLOROFILA BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	40647.9	4516.43	14.42	0.0000
WITHIN	29	9084.33	313.253		
TOTAL	38	49732.2			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	15.50	7	0.0301

COCHRAN'S Q 0.4273
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 22.097

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1102.63
 EFFECTIVE CELL SIZE 3.8

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SoblinoPE13	-11.774	6	9.1857
SoblinoTest	-13.548	4	6.8268
SobargiPE13	-12.457	6	20.455
SobargiTest	-1.7978	6	6.9163
AzilimoPA20	49.597	1	M
AzilimoPE13	51.725	4	22.501
AzilimoTest	63.413	3	12.556
AziargiPA20	60.670	5	32.091
AziargiPE13	42.500	1	M
AzinargTest	43.788	3	10.907
TOTAL	18.297	39	17.699

CASES INCLUDED 39 MISSING CASES 33

B.1.7.1. Comparação de médias da variação da clorofila em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOCOLOROFILA BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AzilimoTest	63.413	I
AziargiPA20	60.670	I
AzilimoPE13	51.725	I
AzilimoPA20	49.597	I
AzinargTest	43.788	I
AziargiPE13	42.500	I
SobargiTest	-1.7978	.. I
SoblimoPE13	-11.774	.. I
SobargiPE13	-12.457	.. I
SoblimoTest	-13.548	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.045 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

B.1.8. Análise global da variância para a variação de altura das plantas

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOALTURA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	4247.31	4247.31	15.44	0.0028
SUELO (B)	1	386.282	386.282	1.40	0.2635
INOCULO (C)	2	3709.95	1854.98	6.74	0.0140
REP (D)	5	786.463	157.293	0.57	0.7209
A*B	1	108.475	108.475	0.39	0.5441
A*C	2	2050.28	1025.14	3.73	0.0618
A*D	5	279.213	55.8426	0.20	0.9538
B*C	2	750.636	375.318	1.36	0.2993
B*D	5	1253.80	250.759	0.91	0.5110
C*D	10	775.056	77.5056	0.28	0.9710
A*B*C	2	453.509	226.755	0.82	0.4663
A*B*D	5	1679.10	335.821	1.22	0.3675
A*C*D	10	2978.97	297.897	1.08	0.4513
B*C*D	10	2324.04	232.404	0.84	0.6027
A*B*C*D	10	2751.48	275.148		
TOTAL	71	24534.6			

B.1.8.1. Comparação de médias da variação de altura das plantas em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOALTURA BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Encina	27.575	I
Alcornoque	12.214	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 8.7114
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 3.9097

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INOCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.8.2. Comparação de médias da variação de altura das plantas em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOALTURA BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testigo	26.953	I
PE13	22.684	I
PA20	10.047	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 10.669
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.7884

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INOCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.1.9. Análise de variância em função do tratamento para a variação da altura da planta

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOALTURA BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	11706.5	1064.22	4.98	0.0000
WITHIN	60	12828.1	213.802		
TOTAL	71	24534.6			

BARTLETT'S TEST OF	CHI-SQ	DF	P
EQUAL VARIANCES	23.40	11	0.0155

COCHRAN'S Q	P
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.3100 37.603

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 141.737
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	11.947	6	9.8177
SobslimPE	23.264	6	7.7066
SobslimTEM	12.063	6	12.473
SobsargPA	5.3570	6	4.5989
SobsargPE	7.6929	6	8.8244
SobsargTES	12.962	6	11.348
AzislímPA	6.0289	6	7.3543
AzislímPE	35.439	6	17.174
AzislímTES	44.525	6	17.374
AzisargPA	16.856	6	17.767
AzisargPE	24.342	6	28.201
AzisargTES	38.263	6	16.268
TOTAL	19.895	72	14.622

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

B.1.9.1. Comparação de médias da variação de altura das plantas em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOALTURA BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AzislímTES	44.525	I
AzisargTES	38.263	I I
AzislímPE	35.439	I I
AzisargPE	24.342	.. I I
SobslímPE	23.264	.. I I
AzisargPA	16.856 I I
SobsargTES	12.962 I I
SobslímTEM	12.063 I I
SobslímPA	11.947 I I
SobsargPE	7.6929 I I
AzislímPA	6.0289 I
SobsargPA	5.3570 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.000	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	16.887		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	8.4420		

B.1.10. Análise global da variância em função da variação do diâmetro do caule das plantas

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOODIAMETRO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1807.96	1807.96	7.33	0.0220
SUELO (B)	1	101.493	101.493	0.41	0.5357
INOCULO (C)	2	637.777	318.889	1.29	0.3168
REP (D)	5	1357.29	271.458	1.10	0.4179
A*B	1	274.205	274.205	1.11	0.3166
A*C	2	1362.67	681.335	2.76	0.1110
A*D	5	1090.05	218.009	0.88	0.5262
B*C	2	2490.03	1245.01	5.05	0.0305
B*D	5	1476.62	295.325	1.20	0.3769
C*D	10	1726.70	172.670	0.70	0.7085
A*B*C	2	1893.02	946.508	3.84	0.0580
A*B*D	5	892.067	178.413	0.72	0.6213
A*C*D	10	2196.23	219.623	0.89	0.5712
B*C*D	10	2442.47	244.247	0.99	0.5062
A*B*C*D	10	2467.39	246.739		
TOTAL	71	22216.0			

B.1.10.1. Comparação de médias da variação do diâmetro do caule das plantas em função da espécie da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃODIAMETRO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Encina	14.816	I
Alcornoque	4.7939	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	8.2495		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	3.7024		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUELO*INOCULO*REP, 10 DF

B.1.11. Análise de variância em função do tratamento para a variação do diâmetro do caule da planta

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃODIAMETRO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	8567.15	778.832	3.42	0.0010
WITHIN	60	13648.8	227.480		
TOTAL	71	22216.0			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	96.85	11	0.0000

COCHRAN'S Q	0.7608
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	771.71

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	91.8919
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	3.5335	6	5.1572
SobslimPE	1.3205	6	2.3793
SobslimTEM	7.2351	6	8.3346
SobsargPA	2.4846	6	4.2376
SobsargPE	1.8735	6	1.6405
SobsargTES	12.316	6	13.538
AzislimPA	8.9301	6	7.2606
AzislimPE	41.482	6	45.571
AzislimTES	3.4523	6	2.3284
AzisargPA	7.8993	6	7.8667
AzisargPE	6.1283	6	5.1868
AzisargTES	21.004	6	14.158
TOTAL	9.8050	72	15.082

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

B.1.11.1. Comparação de médias da variação do diâmetro do caule das plantas em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃODIAMETRO BY TRATAMIENO

TRATAMIENO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AzislimPE	41.482	I
AzisargTES	21.004	.. I
SobsargTES	12.316	.. I I
AzislimPA	8.9301	.. I I
AzisargPA	7.8993	.. I I
SobslimTEM	7.2351	.. I I
AzisargPE	6.1283	.. I I
SobslimPA	3.5335 I
AzislimTES	3.4523 I
SobsargPA	2.4846 I
SobsargPE	1.8735 I
SobslimPE	1.3205 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.000	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	17.418		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	8.7079		

B.2. Infestação de plantas com remoção da terra das raízes, em abrigo

B.2.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	22.9633	22.9633	20.78	0.0061
SUBSTRATO (B)	1	12.8133	12.8133	11.60	0.0191
INÓCULO (C)	1	11.2133	11.2133	10.15	0.0244
REPETIÇÃO (D)	5	6.33667	1.26733	1.15	0.4420
A*B	1	1.40083	1.40083	1.27	0.3113
A*C	1	0.14083	0.14083	0.13	0.7356
A*D	5	5.12417	1.02483	0.93	0.5319
B*C	1	1.68750	1.68750	1.53	0.2714
B*D	5	1.95417	0.39083	0.35	0.8607
C*D	5	3.49417	0.69883	0.63	0.6863
A*B*C	1	2.25333	2.25333	2.04	0.2126
A*B*D	5	4.10667	0.82133	0.74	0.6236
A*C*D	5	0.97667	0.19533	0.18	0.9599
B*C*D	5	6.05000	1.21000	1.10	0.4615
A*B*C*D	5	5.52417	1.10483		
TOTAL	47	86.0392			

B.2.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinhaira	3.5125	I
Sobreiro	2.1292	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7800		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3034		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tipo de substrato (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY SUBSTRATO

SUBSTRATO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Limoso	3.3375	I
Argiloso	2.3042	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7800		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3034		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.1.3. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	3.3042	I
Testemunha	2.3375	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7800		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3034		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	9.01333	9.01333	18.94	0.0073
SUBSTRATO (B)	1	8.84083	8.84083	18.57	0.0076
INÓCULO (C)	1	13.2300	13.2300	27.79	0.0033
REPETIÇÃO (D)	5	3.32750	0.66550	1.40	0.3610
A*B	1	0.04083	0.04083	0.09	0.7814
A*C	1	5.33333	5.33333	11.20	0.0204
A*D	5	2.07417	0.41483	0.87	0.5581
B*C	1	0.24083	0.24083	0.51	0.5087
B*D	5	1.83667	0.36733	0.77	0.6085
C*D	5	2.44750	0.48950	1.03	0.4881
A*B*C	1	0.36750	0.36750	0.77	0.4198
A*B*D	5	2.90667	0.58133	1.22	0.4159
A*C*D	5	1.59417	0.31883	0.67	0.6646
B*C*D	5	1.87667	0.37533	0.79	0.5997
A*B*C*D	5	2.38000	0.47600		
TOTAL	47	55.5100			

B.2.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinhaira	3.2583	I
Sobreiro	2.3917	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5120		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1992		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tipo de substrato (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY SUBSTRATO

SUBSTRATO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Limoso	3.2542	I
Argiloso	2.3958	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5120		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1992		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.2.3. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	3.3500	I
Testemunha	2.3000	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5120		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1992		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.3. Análise global da variância para a variação do peso da planta

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOPESO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	570.719	570.719	5.24	0.0707
SUELO (B)	1	716.446	716.446	6.58	0.0503
INOCULO (C)	1	1093.69	1093.69	10.04	0.0248
REP (D)	5	1159.03	231.807	2.13	0.2133
A*B	1	782.084	782.084	7.18	0.0438
A*C	1	938.136	938.136	8.61	0.0324
A*D	5	1233.79	246.757	2.27	0.1951
B*C	1	1050.59	1050.59	9.65	0.0267
B*D	5	727.531	145.506	1.34	0.3791
C*D	5	1509.60	301.919	2.77	0.1437
A*B*C	1	805.527	805.527	7.40	0.0418
A*B*D	5	1151.95	230.389	2.12	0.2152
A*C*D	5	547.562	109.512	1.01	0.4976
B*C*D	5	1599.71	319.942	2.94	0.1310
A*B*C*D	5	544.499	108.900		
TOTAL	47	14430.9			

B.2.3.1. Comparação de médias da severidade da variação do peso em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	-18.201	I
PA20	-27.747	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	7.7438		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	3.0125		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.4. Análise global da variância para a variação da altura da planta

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOALTURA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	419.023	419.023	11.92	0.0182
SUELO (B)	1	16.9694	16.9694	0.48	0.5181
INOCULO (C)	1	102.132	102.132	2.91	0.1490
REP (D)	5	240.106	48.0212	1.37	0.3702
A*B	1	16.9694	16.9694	0.48	0.5181
A*C	1	102.132	102.132	2.91	0.1490
A*D	5	240.106	48.0212	1.37	0.3702
B*C	1	1.75945	1.75945	0.05	0.8318
B*D	5	171.550	34.3101	0.98	0.5103
C*D	5	43.2245	8.64491	0.25	0.9251
A*B*C	1	1.75945	1.75945	0.05	0.8318
A*B*D	5	171.550	34.3101	0.98	0.5103
A*C*D	5	43.2245	8.64491	0.25	0.9251
B*C*D	5	175.754	35.1509	1.00	0.5000
A*B*C*D	5	175.754	35.1509		
TOTAL	47	1922.02			

B.2.4.1. Comparação de médias da severidade da variação da altura em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOALTURA BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	5.9092	I
Azinheira	0.0000	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	4.3996		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.7115		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.5. Análise global da variância para a variação do diâmetro do caule da planta

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃODIAMETRO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	3.17389	3.17389	6.78	0.0480
SUELO (B)	1	0.18022	0.18022	0.38	0.5621
INOCULO (C)	1	3.17389	3.17389	6.78	0.0480
REP (D)	5	2.17502	0.43500	0.93	0.5311
A*B	1	0.18022	0.18022	0.38	0.5621
A*C	1	3.17389	3.17389	6.78	0.0480
A*D	5	2.17502	0.43500	0.93	0.5311
B*C	1	0.18022	0.18022	0.38	0.5621
B*D	5	2.34064	0.46813	1.00	0.5000
C*D	5	2.17502	0.43500	0.93	0.5311
A*B*C	1	0.18022	0.18022	0.38	0.5621
A*B*D	5	2.34064	0.46813	1.00	0.5000
A*C*D	5	2.17502	0.43500	0.93	0.5311
B*C*D	5	2.34064	0.46813	1.00	0.5000
A*B*C*D	5	2.34064	0.46813		
TOTAL	47	28.3052			

B.2.5.1. Comparação de médias da variação do diâmetro do caule em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃODIAMETRO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	0.5143	I
Azinheira	0.0000	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5077		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1975		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INOCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.5.2. Comparação de médias da variação do diâmetro do caule em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃODIAMETRO BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	0.5143	I
PA20	0.0000	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.571	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5077		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1975		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INOCULO*REPETIÇÃO, 5 DF

B.2.6. Análise individual da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	18.2979	6.09931	7.76	0.0012
WITHIN	20	15.7117	0.78558		
TOTAL	23	34.0096			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	3.76	3	0.2889

COCHRAN'S Q	0.4376
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	5.6897

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.88562
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
Sobs11m PA	3.3833	6	0.4916
Sobs11mTES	2.2500	6	1.1726
SobsargPA	1.9500	6	1.0173
Sobsar1TES	0.9333	6	0.7005
TOTAL	2.1292	24	0.8863

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.6.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobslimPA	3.3833	I
SobslimTES	2.2500	.. I
SobsargPA	1.9500	.. I I
Sobsar1TES	0.9333 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.0674
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.5117

B.2.7. Análise individual da variância em função do tratamento para avaliação visual de sintomas na parte aérea da azinheira

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	11.2112	3.73708	4.19	0.0188
WITHIN	20	17.8550	0.89275		
TOTAL	23	29.0662			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO; VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.47406
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
AzislimPA	3.8833	6	0.1941
AzislimTES	3.8333	6	0.4082
AzisargPA	4.0000	6	0.0000
AzisargTES	2.3333	6	1.8348
TOTAL	3.5125	24	0.9449

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.7.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAM

TRATAM	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AzisargPA	4.0000	I
AzislimPA	3.8833	I
AzislimTES	3.8333	I
AzisargTES	2.3333	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.1379
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.5455

B.2.8. Análise individual da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	21.5283	7.17611	16.40	0.0000
WITHIN	20	8.75000	0.43750		
TOTAL	23	30.2783			

BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
13.62	3	0.0035

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
20.125	0.7667

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	1.12310
	6.0

TRATAM	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	3.6667	6	0.2875
SobslimTES	1.9167	6	1.1583
SobsargPA	2.8333	6	0.2582
Sobsar1TES	1.1500	6	0.5089
TOTAL	2.3917	24	0.6614

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.8.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobslimPA	3.6667	I
SobsargPA	2.8333	.. I
SobslimTES	1.9167 I
Sobsar1TES	1.1500 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE

CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	STANDARD ERROR FOR COMPARISON	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
0.7966	0.3819			

B.2.9. Análise individual da variância em função do tratamento para avaliação visual de sintomas na parte radicular da azinheira

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	6.52500	2.17500	4.49	0.0145
WITHIN	20	9.69333	0.48467		
TOTAL	23	16.2183			

BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
18.79	3	0.0003

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
52.742	0.8434

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	0.28172
	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
AzislimPA	3.7500	6	0.1761
AzislimTES	3.6833	6	0.3710
AzisargPA	3.1500	6	0.3674
AzisargTES	2.4500	6	1.2787
TOTAL	3.2583	24	0.6962

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.9.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AzislimPA	3.7500	I
AzislimTES	3.6833	I
AzisargPA	3.1500	I I
AzisargTES	2.4500	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8384
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4019

B.2.10. Análise individual da variância para a variação do peso do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	5374.64	1791.55	6.66	0.0027
WITHIN	20	5378.69	268.934		
TOTAL	23	10753.3			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	8.24	3	0.0413
COCHRAN'S Q			0.6215
LARGEST VAR / SMALLEST VAR			17.074

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 253.769
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	-29.595	6	14.218
SobslimTES	6.3435	6	25.856
SobsargPA	-27.845	6	6.2576
SobsarlTES	-27.006	6	12.879
TOTAL	-19.526	24	16.399

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.10.1. Comparação de médias da variação do peso do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobslimTES	6.3435	I
SobsarlTES	-27.006	.. I
SobsargPA	-27.845	.. I
SobslimPA	-29.595	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 19.750
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 9.4681

B.2.11. Análise individual da variância para a variação do peso da azinheira

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	11.8250	3.94166	0.03	0.9943
WITHIN	20	3094.97	154.749		
TOTAL	23	3106.80			

BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
4.61	3	0.2027

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
5.9293	0.5760

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	-25.1345
	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
AzislimPA	-27.529	6	18.882
AzislimTES	-25.661	6	10.989
AzisargPA	-26.020	6	9.0322
AzisargTES	-26.478	6	7.7543
TOTAL	-26.422	24	12.440

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.12. Análise individual da variância para a variação da altura do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOALTURA BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	241.723	80.5742	1.28	0.3091
WITHIN	20	1261.27	63.0635		
TOTAL	23	1502.99			

BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
7.35	3	0.0615

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
14.009	0.3974

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	2.91844
	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	1.4198	6	2.6751
SobslimTES	8.0203	6	10.012
SobsargPA	4.5639	6	6.6935
SobsarlTES	9.6328	6	10.002
TOTAL	5.9092	24	7.9413

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.2.13. Análise individual da variância para a variação do diâmetro do caule do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃODIAMETRO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	7.06866	2.35622	2.61	0.0799
WITHIN	20	18.0626	0.90313		
TOTAL	23	25.1313			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	0.24218
	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobslimPA	0.0000	6	0.0000
SobslimTES	0.7835	6	1.2435
SobsargPA	0.0000	6	0.0000
SobsarlTES	1.2737	6	1.4375
TOTAL	0.5143	24	0.9503

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

B.3. Infestação de plantas com remoção da terra das raízes, em estufa

B.3.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas da parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	22.4450	22.4450	15.74	0.0027
SUBSTRATO (B)	1	13.1756	13.1756	9.24	0.0125
INÓCULO (C)	2	21.0369	10.5185	7.38	0.0108
REPETIÇÃO (D)	5	10.2161	2.04322	1.43	0.2932
A*B	1	0.16056	0.16056	0.11	0.7441
A*C	2	3.26083	1.63042	1.14	0.3571
A*D	5	1.78333	0.35667	0.25	0.9303
B*C	2	2.07528	1.03764	0.73	0.5069
B*D	5	8.04944	1.60989	1.13	0.4052
C*D	10	8.09806	0.80981	0.57	0.8070
A*B*C	2	1.17361	0.58681	0.41	0.6733
A*B*D	5	10.3878	2.07756	1.46	0.2859
A*C*D	10	15.2608	1.52608	1.07	0.4583
B*C*D	10	12.8897	1.28897	0.90	0.5618
A*B*C*D	10	14.2581	1.42581		
TOTAL	71	144.271			

B.3.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	2.3472	I
Sobreiro	1.2306	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6271		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2814		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tipo de substrato (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY SUBSTRATO

SUBSTRATO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Limoso	2.2167	I
Argiloso	1.3611	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6271		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2814		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.1.3. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	2.3750	I
PE13	1.9208	I
Testemunha	1.0708	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7680		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3447		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	19.7401	19.7401	30.98	0.0002
SUBSTRATO (B)	1	5.28125	5.28125	8.29	0.0164
INÓCULO (C)	2	25.9275	12.9638	20.35	0.0003
REPETIÇÃO (D)	5	2.57958	0.51592	0.81	0.5684
A*B	1	0.74014	0.74014	1.16	0.3064
A*C	2	2.39361	1.19681	1.88	0.2030
A*D	5	4.80736	0.96147	1.51	0.2707
B*C	2	4.04083	2.02042	3.17	0.0858
B*D	5	3.03292	0.60658	0.95	0.4895
C*D	10	3.40417	0.34042	0.53	0.8312
A*B*C	2	0.39361	0.19681	0.31	0.7410
A*B*D	5	1.38736	0.27747	0.44	0.8142
A*C*D	10	13.6714	1.36714	2.15	0.1222
B*C*D	10	5.27750	0.52775	0.83	0.6142
A*B*C*D	10	6.37139	0.63714		
TOTAL	71	99.0488			

B.3.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinhaira	2.8944	I
Sobreiro	1.8472	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.4192		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1881		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tipo de substrato (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY SUBSTRATO

SUBSTRATO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Limoso	2.6417	I
Argiloso	2.1000	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.4192		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1881		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.2.3. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA20	2.9083	I
PE13	2.6708	I
Testemunha	1.5333	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5134		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2304		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.3. Análise global da variância para a variação do peso da planta

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR VARIAÇÃOPESO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	9186.26	9186.26	41.47	0.0001
SUBSTRATO (B)	1	964.443	964.443	4.35	0.0635
INÓCULO (C)	2	13218.6	6609.30	29.84	0.0001
REPETIÇÃO (D)	5	1401.50	280.299	1.27	0.3503
A*B	1	234.562	234.562	1.06	0.3277
A*C	2	338.895	169.447	0.76	0.4908
A*D	5	3545.82	709.165	3.20	0.0554
B*C	2	823.846	411.923	1.86	0.2058
B*D	5	1469.24	293.849	1.33	0.3282
C*D	10	2841.74	284.174	1.28	0.3506
A*B*C	2	173.594	86.7972	0.39	0.6858
A*B*D	5	1457.73	291.545	1.32	0.3319
A*C*D	10	5466.25	546.625	2.47	0.0852
B*C*D	10	3844.71	384.471	1.74	0.1990
A*B*C*D	10	2215.20	221.520		
TOTAL	71	47182.4			

B.3.3.1. Comparação de médias da variação do peso da planta em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	8.8233	I
Azinhreira	-13.768	..I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 7.8165
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 3.5081

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.3.2. Comparação de médias da variação do peso da planta em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY INOCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	16.215	I
PA20	-8.1440	.. I
PE13	-15.488	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 9.5732
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.2965

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTRATO*INÓCULO*REPETIÇÃO, 10 DF

B.3.4. Análise individual de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	10.4647	2.09294	1.68	0.1690
WITHIN	30	37.2917	1.24306		
TOTAL	35	47.7564			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	7.59	5	0.1805

COCHRAN'S Q 0.3065
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 11.060

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.14165
 EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP	STD DEV
LimosoPA20	2.1833	6		1.5118
LimosoPE13	1.5667	6		1.1361
LimosoTestum	1.0833	6		0.7333
ArgilosoPA20	1.2500	6		1.0252
ArgilosoPE13	0.7667	6		1.4445
ArgilosoTestem	0.5333	6		0.4546
TOTAL	1.2306	36		1.1149

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.5. Análise individual de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea da azinheira

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	30.4181	6.08361	4.18	0.0053
WITHIN	30	43.6517	1.45506		
TOTAL	35	74.0697			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	19.35	5	0.0017

COCHRAN'S Q	P
	0.3093

LARGEST VAR / SMALLEST VAR 112.50

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.77143
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
LimosoPA20	3.9000	6	0.1549
LimosoPE13	2.8500	6	1.0330
LimosoTestum	1.7167	6	1.5355
ArgilosoPA20	2.1667	6	1.4720
ArgilosoPE13	2.5000	6	1.6432
ArgilosoTestem	0.9500	6	0.6442
TOTAL	2.3472	36	1.2063

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.5.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
LimosoPA20	3.9000	I
LimosoPE13	2.8500	I I
ArgilosoPE13	2.5000	I I I
ArgilosoPA20	2.1667	.. I I
LimosoTestum	1.7167	.. I I I
ArgilosoTestem	0.9500 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	REJECTION LEVEL
2.042	0.050

CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	STANDARD ERROR FOR COMPARISON
1.4223	0.6964

B.3.6. Análise individual de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	12.8314	2.56628	4.24	0.0049
WITHIN	30	18.1583	0.60528		
TOTAL	35	30.9897			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	12.39	5	0.0298

COCHRAN'S Q	P
	0.2952

LARGEST VAR / SMALLEST VAR 39.704

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.32683
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
LimosoPA20	2.8000	6	0.9920
LimosoPE13	1.6500	6	0.8118
LimosoTestum	1.6000	6	1.0354
ArgilosoPA20	2.0000	6	0.5621
ArgilosoPE13	2.1833	6	0.7574
ArgilosoTestem	0.8500	6	0.1643
TOTAL	1.8472	36	0.7780

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.6.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
LimosoPA20	2.8000	I
ArgilosoPE13	2.1833	I I
ArgilosoPA20	2.0000	I I
LimosoPE13	1.6500	.. I I
LimosoTestum	1.6000	.. I I
ArgilosoTestem	0.8500 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.042	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.9173		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4492		

B.3.7. Análise individual de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular da azinheira

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	25.9456	5.18911	6.96	0.0002
WITHIN	30	22.3733	0.74578		
TOTAL	35	48.3189			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	17.75	5	0.0033

COCHRAN'S Q	0.3132
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	93.444

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.74056
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
LimosoPA20	3.9500	6	0.1225
LimosoPE13	3.5667	6	0.4590
LimosoTestum	2.2833	6	0.9908
ArgilosoPA20	2.8833	6	1.1839
ArgilosoPE13	3.2833	6	0.9174
ArgilosoTestem	1.4000	6	1.0119
TOTAL	2.8944	36	0.8636

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.7.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
LimosoPA20	3.9500	I
LimosoPE13	3.5667	I I
ArgilosoPE13	3.2833	I I I
ArgilosoPA20	2.8833	.. I I
LimosoTestum	2.2833 I I
ArgilosoTestem	1.4000 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.042	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.0183		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4986		

B.3.8. Análise individual de variância para a variação do peso do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	9381.05	1876.21	3.63	0.0109
WITHIN	30	15487.0	516.233		
TOTAL	35	24868.0			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	20.18	5	0.0012

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR
0.6130	63.650

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 226.663
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
LimosoPA20	3.5124	6	22.580
LimosoPE13	5.2958	6	11.000
LimosoTestum	34.056	6	43.573
ArgilosoPA20	-2.9525	6	5.4616
ArgilosoPE13	-12.680	6	14.795
ArgilosoTestem	25.708	6	17.866
TOTAL	8.8233	36	22.721

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.8.1. Comparação de médias da variação do peso do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
LimosoTestum	34.056	I
ArgilosoTestem	25.708	I I
LimosoPE13	5.2958	. . I I
LimosoPA20	3.5124	. . I I
ArgilosoPA20	-2.9525 I
ArgilosoPE13	-12.680 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	STANDARD ERROR FOR COMPARISON	REJECTION LEVEL
2.042	26.790	13.118	0.050

B.3.9. Análise individual de variância para a variação do peso da azinheira

ONE-WAY AOV FOR VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	6372.89	1274.58	5.66	0.0009
WITHIN	30	6755.20	225.173		
TOTAL	35	13128.1			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	12.13	5	0.0331

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR
0.4732	17.096

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 174.901
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
LimosoPA20	-14.668	6	6.1152
LimosoPE13	-19.791	6	11.357
LimosoTestum	-1.2788	6	15.612
ArgilosoPA20	-18.468	6	7.1112
ArgilosoPE13	-34.775	6	15.844
ArgilosoTestem	6.3744	6	25.285
TOTAL	-13.768	36	15.006

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.3.9.1. Comparação de médias da variação do peso da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF VARIAÇÃOPESO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
ArgilosoTestem	6.3744	I
LimosoTestum	-1.2788	I I
LimosoPA20	-14.668	.. I I I
ArgilosoPA20	-18.468	.. I I I I
LimosoPE13	-19.791 I I I
ArgilosoPE13	-34.775 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.042	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	17.693		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	8.6636		

C. PATOGENICIDADE DE ISOLAMENTOS DE DIFERENTES GRUPOS MORFOLÓGICOS EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

C.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	10.9227	10.9227	12.15	0.0023
INOCULO (B)	4	8.89067	2.22267	2.47	0.0774
REP (C)	5	5.00333	1.00067	1.11	0.3847
A*B	4	6.99067	1.74767	1.94	0.1422
A*C	5	9.74333	1.94867	2.17	0.0987
B*C	20	17.4933	0.87467	0.97	0.5238
A*B*C	20	17.9733	0.89867		
TOTAL	59	77.0173			

C.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	3.0200	I
Azinheira	2.1667	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5106		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2448		

ERROR TERM USED: PLANTA*INÓCULO*REPETIÇÃO, 20 DF

C.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.01350	0.01350	0.02	0.8789
INOCULO (B)	4	28.0010	7.00025	12.35	0.0000
REP (C)	5	2.71350	0.54270	0.96	0.4669
A*B	4	0.14567	0.03642	0.06	0.9918
A*C	5	1.24550	0.24910	0.44	0.8158
B*C	20	8.20900	0.41045	0.72	0.7618
A*B*C	20	11.3403	0.56702		
TOTAL	59	51.6685			

C.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA1	3.3000	I
PE12	3.2750	I
PE10	3.2417	I
PE61	3.1667	I
Testemunha	1.5417	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.6413		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3074		

ERROR TERM USED: PLANTA*INÓCULO*REPETIÇÃO, 20 DF

C.3. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	26.8040	2.97822	2.97	0.0066
WITHIN	50	50.2133	1.00427		
TOTAL	59	77.0173			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	19.09	9	0.0244

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.1823	33.285

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.32899
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobPA1	2.5667	6	1.2437
SobPE10	3.4500	6	0.2345
SobPE12	3.4333	6	0.4676
SobPE61	3.0833	6	0.5811
SobTES	2.5667	6	1.3530
AziPA1	2.8333	6	1.2111
AziPE10	2.9500	6	0.6285
AziPE12	1.7000	6	1.0392
AziPE61	1.9167	6	1.2007
AziTES	1.4333	6	1.2925
TOTAL	2.5933	60	1.0021

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

C.3.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
SobPE10	3.4500	I
SobPE12	3.4333	I
SobPE61	3.0833	I
AziPE10	2.9500	I I
AziPA1	2.8333	I I I
SobPA1	2.5667	I I I I
SobTES	2.5667	I I I I
AziPE61	1.9167	.. I I I
AziPE12	1.7000	... I I
AziTES	1.4333 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.009	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.1621		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.5786		

C.4. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	28.1602	3.12891	6.65	0.0000
WITHIN	50	23.5083	0.47017		
TOTAL	59	51.6685			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	12.51	9	0.1861

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.3052	11.698

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.44312
EFFECTIVE CELL SIZE	6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobPA1	3.2333	6	0.3882
SobPE10	3.2667	6	0.7737
SobPE12	3.2000	6	0.6325
SobPE61	3.2167	6	0.8864
SobTES	1.5333	6	0.3502
AziPA1	3.3667	6	0.4502
AziPE10	3.2167	6	0.6145
AziPE12	3.3500	6	0.4970
AziPE61	3.1167	6	0.6178
AziTES	1.5500	6	1.1979
TOTAL	2.9050	60	0.6857

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

C.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AziPA1	3.3667	I
AziPE12	3.3500	I
SobPE10	3.2667	I
SobPA1	3.2333	I
SobPE61	3.2167	I
AziPE10	3.2167	I
SobPE12	3.2000	I
AziPE61	3.1167	I
AziTES	1.5500	.. I
SobTES	1.5333	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.009	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7952		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3959		

D. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE ESPÉCIES DE *LUPINUS CRESCENDO* NUMA MISTURA DE AREIA, LIMO E TURFA

D.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.45375	0.45375	0.53	0.4825
INOCULO (B)	1	5.13375	5.13375	6.02	0.0340
REP (C)	5	11.2538	2.25075	2.64	0.0899
A*B	1	3.15375	3.15375	3.70	0.0834
A*C	5	3.79375	0.75875	0.89	0.5228
A*B*C	10	8.52750	0.85275		
TOTAL	23	32.3163			

D.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	3.5000	I
Testemunha	2.5750	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8400
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3770

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

D.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.00667	0.00667	0.01	0.9312
INOCULO (B)	1	9.12667	9.12667	10.72	0.0084
REP (C)	5	7.54000	1.50800	1.77	0.2065
A*B	1	0.96000	0.96000	1.13	0.3133
A*C	5	1.89333	0.37867	0.44	0.8079
A*B*C	10	8.51333	0.85133		
TOTAL	23	28.0400			

D.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	3.8167	I
Testemunha	2.5833	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8393
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3767

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

D.3. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	8.74125	2.91375	2.47	0.0913
WITHIN	20	23.5750	1.17875		
TOTAL	23	32.3162			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.28917
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
albusInfes	4.0000	6	0.0000
albusNInfe	2.3500	6	1.3035
angusInfes	3.0000	6	1.1118
angusNInfe	2.8000	6	1.3342
TOTAL	3.0375	24	1.0857

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

D.4. Análise de variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	10.0933	3.36444	3.75	0.0276
WITHIN	20	17.9467	0.89733		
TOTAL	23	28.0400			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.41119
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
albusInfes	4.0000	6	0.0000
albusTest	2.3667	6	1.2738
angusInfes	3.6333	6	0.4320
angusTest	2.8000	6	1.3342
TOTAL	3.2000	24	0.9473

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

D.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
albusInfes	4.0000	I
angusInfes	3.6333	I I
angusTest	2.8000	.. I I
albusTest	2.3667 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.1408
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.5469

E. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA ½ DE HOAGLAND

(Hoagland e Arnon 1950)

Macronutrientes	Concentração (mM)	Micronutrientes	Concentração (µM)
Ca(NO ₃) ₂	2,5	KCl	25
KNO ₃	2,5	BO ₃ H ₃	12,5
MgSO ₄	1	Fe-EDDHA	10
KPO ₄ H ₂	0,5	MnSO ₄ .H ₂ O	1
		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1
		CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,5
		(NH ₄)MO ₇ O ₂₄	0,18

O pH da solução nutritiva ½ de Hoagland utilizada esteve sempre entre 5.0 e 5.7.

F. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

F.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	6.81633	6.81633	9.40	0.0154
CONCENTRAÇÃO (B)	4	24.3987	6.09967	8.41	0.0058
REPETIÇÃO (C)	2	3.12867	1.56433	2.16	0.1780
A*B	4	5.83867	1.45967	2.01	0.1854
A*C	2	1.82067	0.91033	1.26	0.3355
B*C	8	4.75133	0.59392	0.82	0.6076
A*B*C	8	5.79933	0.72492		
TOTAL	29	52.5537			

F.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	2.5333	I
Sobreiro	1.5800	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.306	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7169		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3109		

ERROR TERM USED: PLANTA*CONCENTRAÇÃO*REPETIÇÃO, 8 DF

F.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da concentração de inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY CONCENTRAÇÃO

CONCENTRAÇÃO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
32.500	3.1333	I
162.500	3.1333	I
16.250	1.7000	.. I
6.500	1.2167	.. I
Testemunha	1.1000	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.306	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.1336		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4916		

ERROR TERM USED: PLANTA*CONCENTRAÇÃO*REPETIÇÃO, 8 DF

F.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.64533	0.64533	4.27	0.0725
CONCENTRAÇÃO (B)	4	19.6513	4.91283	32.54	0.0001
REPETIÇÃO (C)	2	0.22067	0.11033	0.73	0.5111
A*B	4	4.27800	1.06950	7.08	0.0097
A*C	2	0.36867	0.18433	1.22	0.3446
B*C	8	1.52267	0.19033	1.26	0.3756
A*B*C	8	1.20800	0.15100		
TOTAL	29	27.8947			

F.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da concentração de inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY CONCENTRAÇÃO

CONCENTRAÇÃO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
32.500	3.0167	I
162.500	2.8333	I
16.250	2.5333	I
6.500	1.9000	.. I
Testemunha	0.7833 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.306 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.5174
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2244

ERROR TERM USED: PLANTA*CONCENTRAÇÃO*REPETIÇÃO, 8 DF

F.3. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	20.6440	5.16100	9.05	0.0023
WITHIN	10	5.70000	0.57000		
TOTAL	14	26.3440			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	10.09	4	0.0389

COCHRAN'S Q 0.7942
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 75.444

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1.53033
 EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobTestmun	0.1000	3	0.1732
Sob 6.500	0.4333	3	0.5132
Sob 16.250	1.7333	3	1.5044
Sob 32.500	2.4333	3	0.5132
Sob162.500	3.2000	3	0.1732
TOTAL	1.5800	15	0.7550

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

F.3.1. Comparação de médias da severidade de sintomas parte aérea do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sob162.500	3.2000	I
Sob 32.500	2.4333	I I
Sob 16.250	1.7333	.. I I
Sob 6.500	0.4333 I I
SobTestmun	0.1000 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.3735
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.6164

F.4. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular do sobreiro

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	10.0733	2.51833	15.74	0.0003
WITHIN	10	1.60000	0.16000		
TOTAL	14	11.6733			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	3.75	4	0.4406

COCHRAN'S Q	0.5375
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	14.333

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.78611
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
SobTestmun	0.7333	3	0.2517
Sob 6.500	1.9000	3	0.1732
Sob 16.250	2.0333	3	0.4619
Sob 32.500	2.4000	3	0.6557
Sob162.500	3.2667	3	0.2517
TOTAL	2.0667	15	0.4000

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

F.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular do sobreiro em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sob162.500	3.2667	I
Sob 32.500	2.4000	.. I
Sob 16.250	2.0333	.. I
Sob 6.500	1.9000	.. I
SobTestmun	0.7333 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7277		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3266		

F.5. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea da azinheira

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	9.59333	2.39833	2.45	0.1145
WITHIN	10	9.80000	0.98000		
TOTAL	14	19.3933			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	4.80	4	0.3079

COCHRAN'S Q	0.5898
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	34.680

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.47278
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
AziTestemu	2.1000	3	0.8544
Azi 6.500	2.0000	3	1.7000
Azi 16.250	1.6667	3	0.5774
Azi 32.500	3.8333	3	0.2887
Azi162.500	3.0667	3	0.9292
TOTAL	2.5333	15	0.9899

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

F.6. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular da azinheira

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	13.8560	3.46400	20.14	0.0001
WITHIN	10	1.72000	0.17200		
TOTAL	14	15.5760			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	5.27	4	0.2604

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.5000	32.250

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	1.09733
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
AziTestemu	0.8333	3	0.4163
Azi 6.500	1.9000	3	0.1732
Azi 16.250	3.0333	3	0.4619
Azi 32.500	3.6333	3	0.1155
Azi162.500	2.4000	3	0.6557
TOTAL	2.3600	15	0.4147

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

F.6.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azi 32.500	3.6333	I
Azi 16.250	3.0333	I I
Azi162.500	2.4000	.. I I
Azi 6.500	1.9000	... I
AziTestemu	0.8333 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.228	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7545		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3386		

**ANEXO VI - EFEITO DE FACTORES AMBIENTAIS NA INFECÇÃO DO SISTEMA RADICULAR DE
QUERCUS SUBER E *Q. ROTUNDIFOLIA* POR *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI***

A. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM AZINHEIRAS

A.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
INÓCULO (A)	1	1.98017	1.98017	2.05	0.1679
TEMPERATURA (B)	4	25.0043	6.25108	6.46	0.0017
REPETIÇÃO (C)	5	6.82750	1.36550	1.41	0.2626
A*B	4	3.38233	0.84558	0.87	0.4966
A*C	5	13.0128	2.60257	2.69	0.0512
B*C	20	42.0017	2.10008	2.17	0.0453
A*B*C	20	19.3397	0.96698		
TOTAL	59	111.549			

A.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da temperatura (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TEMPERATURA

TEMPERATURA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
10	2.9917	I
20	2.8083	I I
25	2.1250	.. I I
30	1.8167 I I
15	1.2333 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8374
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4015

ERROR TERM USED: ZOOSP*TEMP*REP, 20 DF

A.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
INÓCULO (A)	1	25.2202	25.2202	69.74	0.0000
TEMPERATURA (B)	4	3.63900	0.90975	2.52	0.0738
REPETIÇÃO (C)	5	2.65883	0.53177	1.47	0.2434
A*B	4	1.25567	0.31392	0.87	0.5001
A*C	5	1.40683	0.28137	0.78	0.5770
B*C	20	4.21700	0.21085	0.58	0.8818
A*B*C	20	7.23233	0.36162		
TOTAL	59	45.6298			

A.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INÓCULO

INÓCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	2.8000	I
Testemunha	1.5033	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.3239
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1553

ERROR TERM USED: ZOOSP*TEMP*REP, 20 DF

A.3. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte aérea da azinheira

```

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
-----
BETWEEN     9      30.3668  3.37409  2.08  0.0495
WITHIN     50      81.1817  1.62363
TOTAL      59      111.549

BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES      CHI-SQ      DF      P
-----
                        2.15      9      0.9888

COCHRAN'S Q      0.1766
LARGEST VAR / SMALLEST VAR      3.0802

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS      0.29174
EFFECTIVE CELL SIZE      6.0

TRATAMENTO      MEAN      SAMPLE SIZE      GROUP STD DEV
-----
AziTest10      3.0667      6      0.9647
AziTest15      1.1167      6      1.1907
AziTest20      2.7500      6      1.3590
AziTest25      1.5000      6      1.3023
AziTest30      1.6333      6      1.6931
AziInf10      2.9167      6      1.2640
AziInf15      1.3500      6      1.2834
AziInf20      2.8667      6      1.3721
AziInf25      2.7500      6      1.0252
AziInf30      2.0000      6      1.1402
TOTAL      2.1950      60      1.2742

CASES INCLUDED 60      MISSING CASES 0
    
```

A.3.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

```

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO      MEAN      HOMOGENEOUS GROUPS
-----
AziTest10      3.0667      I
AziInf10      2.9167      I I
AziInf20      2.8667      I I
AziTest20      2.7500      I I I
AziInf25      2.7500      I I I
AziInf30      2.0000      I I I I
AziTest30      1.6333      I I I I
AziTest25      1.5000      . . I I I
AziInf15      1.3500      . . . I I
AziTest15      1.1167      . . . . . I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE      2.009      REJECTION LEVEL      0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON      1.4776
STANDARD ERROR FOR COMPARISON      0.7357
    
```

A.4. Análise da variância em função do tratamento para a avaliação visual de sintomas na parte radicular da azinheira

```

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE      DF      SS      MS      F      P
-----
BETWEEN     9      30.1148  3.34609  10.78  0.0000
WITHIN     50      15.5150  0.31030
TOTAL      59      45.6298

      CHI-SQ      DF      P
-----
BARTLETT'S TEST OF
EQUAL VARIANCES  17.82      9      0.0374

COCHRAN'S Q      0.2498
LARGEST VAR / SMALLEST VAR  16.971

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS  0.50597
EFFECTIVE CELL SIZE  6.0

TRATAMENTO      MEAN      SAMPLE      GROUP
-----
SIZE      STD DEV
AziTest10      1.1833      6      0.2137
AziTest15      1.5333      6      0.3502
AziTest20      1.5333      6      0.5538
AziTest25      1.7500      6      0.8803
AziTest30      1.5167      6      0.4401
AziInf10      2.3000      6      0.7183
AziInf15      2.4500      6      0.8666
AziInf20      3.2000      6      0.4472
AziInf25      2.9333      6      0.3327
AziInf30      3.1167      6      0.2858
TOTAL      2.1517      60      0.5570

CASES INCLUDED 60      MISSING CASES 0

```

A.4.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular da azinheira em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

```

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO      MEAN      HOMOGENEOUS
-----
GROUPS
AziInf20      3.2000      I
AziInf30      3.1167      I
AziInf25      2.9333      I I
AziInf15      2.4500      .. I
AziInf10      2.3000      .. I I
AziTest25      1.7500      ... I I
AziTest15      1.5333      ..... I
AziTest20      1.5333      ..... I
AziTest30      1.5167      ..... I
AziTest10      1.1833      ..... I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE      2.009      REJECTION LEVEL      0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON  0.6460
STANDARD ERROR FOR COMPARISON  0.3216

```

B. INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO SOLO NA SEVERIDADE DE SINTOMAS EM *QUERCUS SUBER* E *Q. ROTUNDIFOLIA*

B.1. Regime hídrico – Saturação constante

B.1.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1.69000	1.69000	1.28	0.2842
INOCULO (B)	2	38.0772	19.0386	14.43	0.0011
REP (C)	5	4.97889	0.99578	0.75	0.6017
A*B	2	4.36167	2.18083	1.65	0.2398
A*C	5	5.93333	1.18667	0.90	0.5175
B*C	10	11.6061	1.16061	0.88	0.5784
A*B*C	10	13.1950	1.31950		
TOTAL	35	79.8422			

B.1.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA12	3.1417	I
PE55	2.2667	I
Testigo	0.6583	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.0449
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4690

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

B.1.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1.24694	1.24694	3.34	0.0975
INOCULO (B)	2	47.8606	23.9303	64.11	0.0000
REP (C)	5	2.09806	0.41961	1.12	0.4074
A*B	2	2.76056	1.38028	3.70	0.0628
A*C	5	2.88472	0.57694	1.55	0.2606
B*C	10	2.43944	0.24394	0.65	0.7433
A*B*C	10	3.73278	0.37328		
TOTAL	35	63.0231			

B.1.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA12	3.2583	I
PE55	2.2333	.. I
Testigo	0.4667 I

ALL 3 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.5558
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2494

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

B.2. Regime hídrico – Rega normal

B.2.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	2.83361	2.83361	4.27	0.0657
INOCULO (B)	2	4.16889	2.08444	3.14	0.0873
REP (C)	5	7.74139	1.54828	2.33	0.1190
A*B	2	2.82889	1.41444	2.13	0.1694
A*C	5	7.52806	1.50561	2.27	0.1265
B*C	10	4.00111	0.40011	0.60	0.7811
A*B*C	10	6.63444	0.66344		
TOTAL	35	35.7364			

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY INOCULO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	4.16889	2.08444	2.18	0.1292
WITHIN	33	31.5675	0.95659		
TOTAL	35	35.7364			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	7.09	2	0.0289

COCHRAN'S Q	LARGEST VAR / SMALLEST VAR	P
		0.4755
		5.1593

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	EFFECTIVE CELL SIZE	P
		0.09399
		12.0

INOCULO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PE55	1.4583	12	1.1681
PA12	1.5583	12	1.1139
Testigo	0.7917	12	0.5143
TOTAL	1.2694	36	0.9781

CASES INCLUDED 36 MISSING CASES 0

B.2.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	4.41000	4.41000	10.88	0.0080
INOCULO (B)	2	33.0706	16.5353	40.81	0.0000
REP (C)	5	3.45556	0.69111	1.71	0.2208
A*B	2	2.78167	1.39083	3.43	0.0733
A*C	5	1.70667	0.34133	0.84	0.5494
B*C	10	2.64944	0.26494	0.65	0.7430
A*B*C	10	4.05167	0.40517		
TOTAL	35	52.1256			

B.2.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Encina	2.9889	I
Alcornoque	2.2889	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	STANDARD ERROR FOR COMPARISON	REJECTION LEVEL
	2.228	0.4728	0.050
		0.2122	

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

B.2.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do inóculo (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY INOCULO

INOCULO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA12	3.4417	I
PE55	3.1833	I
Testigo	1.2917	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.228 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.5790
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2599

ERROR TERM USED: PLANTA*INOCULO*REP, 10 DF

ANEXO VII - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* PA₂₀ E PE₁₃ EM MEIO DE CULTURA CMA

1. Análise global da variância para o diâmetro da colônia de PA₂₀ e PE₁₃

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
ISOLAMENTO (A)	1	1118.02	1118.02	395.93	0.0000
SUBSTANCIA (B)	4	29054.7	7263.67	2572.35	0.0000
REPETIÇÃO (C)	5	28.3333	5.66667	2.01	0.1214
A*B	4	764.275	191.069	67.66	0.0000
A*C	5	15.7333	3.14667	1.11	0.3843
B*C	20	33.4583	1.67292	0.59	0.8749
A*B*C	20	56.4750	2.82375		
TOTAL	59	31071.0			

1.1. Comparação de médias do diâmetro da colônia de PA₂₀ e PE₁₃ em função do isolamento (teste LSD, P = 0,05)

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PA ₂₀	29.000	I
PE ₁₃	20.367	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.9051		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4339		

ERROR TERM USED: ISOLAMENTO*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 20 DF

1.2. Comparação de médias do diâmetro da colônia de PA₂₀ e PE₁₃ em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

SUBSTANCIAS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	66.542	I
Metalaxil-5G	20.667	.. I
Metalaxil-25WP	19.042 I
Posetil-Al	15.750 I
Posfito-K	1.4167 I

ALL 5 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.4310		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.6860		

ERROR TERM USED: ISOLAMENTO*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 20 DF

2. Análise da variância para o diâmetro da colônia de PA₂₀

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
SUBSTÂNCIA (A)	4	17562.3	4390.58	2143.49	0.0000
REPETIÇÃO (B)	5	10.7000	2.14000	1.04	0.4192
A*B	20	40.9667	2.04833		
TOTAL	29	17614.0			

2.1. Comparação de médias do diâmetro da colônia de PA₂₀ em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

SUBSTANCIAS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	73.583	I
Metalaxil-5G	28.750	.. I
Metalaxil-25WP	25.500 I
Posetil-Al	15.417 I
Posfito-K	1.7500 I

ALL 5 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.086	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.7236		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.8263		

ERROR TERM USED: SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 20 DF

3. Análise da variância para o diâmetro da colônia de PE₁₃

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
SUBSTANCIA (A)	4	12256.6	3064.16	1251.53	0.0000
REPETIÇÃO (B)	5	33.3667	6.67333	2.73	0.0491
A*B	20	48.9667	2.44833		
TOTAL	29	12339.0			

3.1. Comparação de médias do diâmetro da colônia de PE₁₃ em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

SUBSTANCIAS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Testemunha	59.500	I
Fosetil-Al	16.083	.. I
Metalaxil-25WP	12.583 I
Metalaxil-5G	12.583 I
Fosfito-K	1.0833 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.086 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.8844
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.9034

ERROR TERM USED: SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 20 DF

4. Análise global da variância para a Inibição Relativa do Crescimento (IRC) de PA₂₀ e PE₁₃

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR IRC

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
ISOLAMENTO (A)	1	501.153	501.153	83.17	0.0000
SUBSTANCIA (B)	3	5746.06	1915.35	317.87	0.0000
REPETIÇÃO (C)	5	38.4950	7.69899	1.28	0.3241
A*B	3	1084.50	361.501	59.99	0.0000
A*C	5	28.1421	5.62841	0.93	0.4867
B*C	15	61.5231	4.10154	0.68	0.7674
A*B*C	15	90.3829	6.02553		
TOTAL	47	7550.26			

4.1. Comparação de médias da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) em função do isolamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF IRC BY ISOLAMENTO

ISOLAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PE13	82.593	I
PA20	76.131	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.131 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.5104
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.7086

ERROR TERM USED: ISOLAMENTO*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 15 DF

4.2. Comparação de médias da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF IRC BY SUBSTANCIA

SUBSTANCIA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Fosfito-K	97.939	I
Fosetil-Al	76.468	.. I
Metalaxil-25WP	72.606 I
Metalaxil-5G	70.434 I

ALL 4 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.131 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 2.1360
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.0021

ERROR TERM USED: ISOLAMENTO*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 15 DF

5. Análise da variância da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) de PA₂₀

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR IRC

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
SUBSTANCIA (A)	3	4744.88	1581.63	500.31	0.0000
REPETIÇÃO (B)	5	7.91251	1.58250	0.50	0.7712
A*B	15	47.4192	3.16128		
TOTAL	23	4800.22			

5.1. Comparação de médias da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) de PA₂₀ em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF IRC BY SUBSTANCIA

SUBSTANCIA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Fosfito-K	97.660	I
Fosetil-Al	79.389	.. I
Metalxil-25WP	65.909 I
Metalaxil-5G	61.564 I

ALL 4 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.131	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	2.1880		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.0265		

ERROR TERM USED: SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 15 DF

6. Análise da variância da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) de PE₁₃

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR IRC

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
SUBSTANCIA (A)	3	2085.68	695.226	99.81	0.0000
REPETIÇÃO (B)	5	58.7245	11.7449	1.69	0.1986
A*B	15	104.487	6.96579		
TOTAL	23	2248.89			

6.1. Comparação de médias da Inibição Relativa do Crescimento (IRC) de PE₁₃ em função das substâncias químicas (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF IRC BY SUBSTANCIA

SUBSTANCIA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Fosfito-K	98.218	I
Metalxil-25WP	79.304	.. I
Metalaxil-5G	79.304	.. I
Fosetil-Al	73.547 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.131	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	3.2479		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.5238		

ERROR TERM USED: SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 15 DF

ANEXO VIII - CONTROLO QUÍMICO DO DECLÍNIO

A. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM *LUPINUS ALBUS*

A.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TRATAMENTO (A)	9	147.927	16.4363	15.47	0.0000
REP (B)	8	5.31956	0.66494	0.63	0.7533
A*B	72	76.4849	1.06229		
TOTAL	89	229.732			

A.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	3.5556	I
FosfitoK-0,3ml	2.9667	I I
FosetAl-0,25g	2.5778	.. I
FosfitoK-0,03ml	1.1333 I
Metaxil25-0,1g	0.8333 I I
FosetAl-0,025g	0.5778 I I
Testemunha	0.0889 I
Metaxil5-0,01g	0.0556 I
Metaxil25-0,01g	0.0333 I
Metaxil5-0,1g	0.0000 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.993 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.9686
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4859

ERROR TERM USED: TRATAMENTO*REP, 72 DF

A.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TRATAMENTO (A)	9	200.616	22.2906	42.67	0.0000
REP (B)	8	3.52400	0.44050	0.84	0.5679
A*B	72	37.6093	0.52235		
TOTAL	89	241.749			

A.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	3.8333	I
FosfitoK-0,3ml	3.6667	I
FosetAl-0,25g	2.7444	.. I
FosetAl-0,025g	0.7778 I
Metaxil25-0,1g	0.5778 I I
FosfitoK-0,03ml	0.4000 I I
Metaxil5-0,1g	0.0333 I
Metaxil5-0,01g	0.0000 I
Testemunha	0.0000 I
Metaxil25-0,01g	0.0000 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.993 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.6792
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3407

ERROR TERM USED: TRATAMENTO*REP, 72 DF

B. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM SOBREIROS E AZINHEIRAS, INFESTADOS COM 13.000 zoósporos/ml, DESENVOLVENDO-SE EM VERMICULITE

B.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.50417	0.50417	1.12	0.3045
TRATAMENTO (B)	9	6.38683	0.70965	1.57	0.1976
REP (C)	2	0.07433	0.03717	0.08	0.9213
A*B	9	3.35750	0.37306	0.83	0.6006
A*C	2	3.00033	1.50017	3.32	0.0591
B*C	18	17.8357	0.99087	2.20	0.0521
A*B*C	18	8.12300	0.45128		
TOTAL	59	39.2818			

B.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1.73400	1.73400	4.64	0.0450
TRATAMENTO (B)	9	21.5540	2.39489	6.41	0.0004
REP (C)	2	0.03633	0.01817	0.05	0.9527
A*B	9	0.88267	0.09807	0.26	0.9772
A*C	2	0.81900	0.40950	1.10	0.3554
B*C	18	12.1670	0.67594	1.81	0.1090
A*B*C	18	6.72433	0.37357		
TOTAL	59	43.9173			

B.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinhaira	1.7633	I
Sobreiro	1.4233	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.101	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.3316		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1578		

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*REP, 18 DF

B.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FosfitK-0,03g	2.5000	I
Metaxil25-0,1g	2.2000	I I
FosetAl-0,025g	2.1667	I I I
Infestadas	2.0000	I I I I
FosetAl-0,25g	1.6667	.. I I I
FosfitK-0,3g	1.4667	... I I I
Metaxil25-0,01g	1.3167 I I I
Metaxil5-0,01g	1.1167 I I I
Metaxil5-0,1g	1.0333 I I I
Testemunha	0.4667 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.101	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.7414		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3529		

ERROR TERM USED: PLANTA*PRODUTO*REP, 18 DF

C. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM SOBREIROS E AZINHEIRAS, INFESTADOS COM 32.500 zoósporos/ml, DESENVOLVENDO-SE EM VERMICULITE

C.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	26.1037	26.1037	38.82	0.0000
TRATAMENTO (B)	10	5.92394	0.59239	0.88	0.5566
REP (C)	5	11.1649	2.23298	3.32	0.0115
A*B	10	10.2521	1.02521	1.52	0.1585
A*C	5	5.11038	1.02208	1.52	0.2004
B*C	50	25.0142	0.50028	0.74	0.8504
A*B*C	50	33.6188	0.67238		
TOTAL	131	117.188			

C.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	1.4576	I
Sobreiro	0.5682	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.009	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.2867		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.1427		

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMEN*REP, 50 DF

C.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.05523	0.05523	0.12	0.7258
TRATAMENTO (B)	10	15.8652	1.58652	3.55	0.0004
REP (C)	5	4.48674	0.89735	2.01	0.0833
A*B	10	12.2906	1.22906	2.75	0.0047
A*B*C	105	46.9049	0.44671		
TOTAL	131	79.6027			

C.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Metaxil15-1g	2.5167	I
FosetAl-1g	2.5167	I
FosetAl-0,5g	2.4250	I I
Infestadas	2.4167	I I I
Metaxil25-1g	2.1833	I I I
Metaxil25-0,1g	2.1333	I I I
FosfitK-1ml	2.0667	I I I
Metaxil5-0,01g	2.0167	.. I I
FosfitK-0,5ml	1.8917 I
Metaxil5-0,1g	1.7667 I I
Testemunha	1.3250 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.009	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.4968		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2474		

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*REP, 50 DF

D. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM SOBREIROS E AZINHEIRAS SUBMETIDOS A ENCHARCAMENTO CONTINUO

D.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	51.0050	51.0050	46.71	0.0000
SUBSTANCIA (B)	5	45.5261	9.10522	8.34	0.0001
REP (C)	5	4.53111	0.90622	0.83	0.5406
A*B	5	19.3283	3.86567	3.54	0.0148
A*C	5	2.95667	0.59133	0.54	0.7430
B*C	25	41.2056	1.64822	1.51	0.1549
A*B*C	25	27.3000	1.09200		
TOTAL	71	191.853			

D.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	2.6611	I
Sobreiro	0.9778	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.060	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5073		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2463		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 25 DF

D.1.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função da substância química (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY SUBSTANCIA

SUBSTANCIA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Metaxil25	3.0250	I
FosfitoK	2.3583	I I
Infestadas	1.8083	.. I
Fosetilal	1.7167	.. I
Metaxil5	1.6000	.. I
Testemunhas	0.4083 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.060	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.8786		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4266		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 25 DF

D.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.50000	0.50000	1.15	0.2935
SUBSTANCIA (B)	5	18.5911	3.71822	8.56	0.0001
REP (C)	5	1.81278	0.36256	0.83	0.5373
A*B	5	1.72833	0.34567	0.80	0.5628
A*C	5	0.48667	0.09733	0.22	0.9486
B*C	25	17.7722	0.71089	1.64	0.1123
A*B*C	25	10.8550	0.43420		
TOTAL	71	51.7461			

D.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da substância química (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY SUBSTANCIA

SUBSTANCIA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Metaxil25	3.0417	I
Infestadas	2.5833	I I
FosfitoK	2.3833	.. I I
Metaxil5	1.8833	... I I
FosetilAl	1.8583 I I
Testemunhas	1.5333 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE	2.060	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5540		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2690		

ERROR TERM USED: PLANTA*SUBSTANCIA*REPETIÇÃO, 25 DF

E. CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM DE SOBREIROS E AZINHEIRAS SUBMETIDAS A ENCHARCAMENTO 2 DIAS SUCESSIVOS POR SEMANA

E.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1.22189	1.22189	3.21	0.0792
TRATAMENTO (B)	10	11.3550	1.13550	2.98	0.0050
REPETIÇÃO (C)	5	2.89129	0.57826	1.52	0.2005
A*B	10	2.57894	0.25789	0.68	0.7395
A*C	5	2.76220	0.55244	1.45	0.2223
B*C	50	29.2495	0.58499	1.54	0.0658
A*B*C	50	19.0220	0.38044		
TOTAL	131	69.0808			

E.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FosetilAl-medio	1.6500	I
Metalaxil5-baixo	1.3167	. I I
FosetilAl-baixo	0.9750	.. I I
FosfitoK-baixo	0.9417	.. I I
Metalaxil5-medio	0.9333	.. I I
FosetilAl-alto	0.9083	.. I I
Infestadas	0.8417	.. I I
FosfitoK-alto	0.8333	.. I I
Metalaxil5-alto	0.7667 I
FosfitoK-medio	0.6667 I
Testemunhas	0.5250 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.009 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.5058
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2518

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*REPETIÇÃO, 50 DF

E.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	1.05485	1.05485	7.83	0.0073
TRATAMENTO (B)	10	33.6197	3.36197	24.94	0.0000
REPETIÇÃO (C)	5	0.94333	0.18867	1.40	0.2406
A*B	10	2.51182	0.25118	1.86	0.0733
A*C	5	0.39333	0.07867	0.58	0.7124
B*C	50	9.38667	0.18773	1.39	0.1225
A*B*C	50	6.74000	0.13480		
TOTAL	131	54.6497			

E.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função da planta (teste LSD, P = 0,05)

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	2.8742	I
Sobreiro	2.6955	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.009 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.1284
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0639

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*REPETIÇÃO, 50 DF

E.2.2. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	3.1667	I
FosetilAl-baixo	3.1667	I
FosetilAl-medio	3.1000	I
FosetilAl-alto	3.0083	I
FosfitoK-baixo	3.0083	I
FosfitoK-medio	2.9750	I
FosfitoK-alto	2.9167	I
Metalaxil-baixo	2.9083	I
Metalaxil-medio	2.5333	.. I
Metalaxil-alto	2.5167	.. I
Testemunhas	1.3333 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.009 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.3011
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1499

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*REPETIÇÃO, 50 DF

F. EFEITO DA APLICAÇÃO DE SAIS POTÁSSICOS DE FOSFITOS E DE FOSFATOS NO CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

F.1. Plantas com 6 meses

F.1.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	0.01125	0.01125	0.05	0.8311
TRATAMENTO (B)	4	13.5713	3.39283	13.87	0.0000
BLOCO (C)	4	2.68480	0.67120	2.74	0.0390
REPETIÇÃO (D)	3	1.36415	0.45472	1.86	0.1491
A*B	4	1.47750	0.36938	1.51	0.2140
A*C	4	0.96300	0.24075	0.98	0.4250
A*D	3	1.96975	0.65658	2.68	0.0570
B*C	16	7.04120	0.44008	1.80	0.0595
B*D	12	5.94510	0.49543	2.03	0.0422
C*D	12	4.43360	0.36947	1.51	0.1532
A*B*C	16	6.39200	0.39950	1.63	0.0959
A*B*D	12	6.72050	0.56004	2.29	0.0213
A*C*D	12	3.13300	0.26108	1.07	0.4072
B*C*D	48	20.9784	0.43705	1.79	0.0234
A*B*C*D	48	11.7380	0.24454		
TOTAL	199	88.4236			

F.1.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Fosfato20	1.0725	I
Infestadas	0.8350	.. I
Fosfato10	0.7325	.. I
Fosfito-K	0.4425 I
Testemunha	0.3600 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.011 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.2223
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1106

ERROR TERM USED: PLANTA*TRATAMENTO*BLOCO*REPETIÇÃO, 48 DF

F.1.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
PLANTA (A)	1	42.9665	42.9665	131.14	0.0000
TRATAMENTO (B)	4	84.6547	21.1637	64.60	0.0000
BLOCO (C)	4	1.24470	0.31117	0.95	0.4436
REPETIÇÃO (D)	3	0.23255	0.07752	0.24	0.8704
A*B	4	2.86130	0.71533	2.18	0.0850
A*C	4	1.56830	0.39208	1.20	0.3244
A*D	3	0.67815	0.22605	0.69	0.5626
B*C	16	11.9578	0.74736	2.28	0.0142
B*D	12	6.42570	0.53547	1.63	0.1136
C*D	12	4.62370	0.38531	1.18	0.3267
A*B*C	16	6.57520	0.41095	1.25	0.2648
A*B*D	12	2.89910	0.24159	0.74	0.7083
A*C*D	12	5.34010	0.44501	1.36	0.2189
B*C*D	48	19.4718	0.40566	1.24	0.2310
A*B*C*D	48	15.7264	0.32763		
TOTAL	199	207.226			

F.2. Plantas com 12 meses

F.2.1. Análise individual da variância e comparação de médias para a avaliação visual de sintomas na parte aérea em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY PLANTA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	1	3.21437	3.21437	4.69	0.0316
WITHIN	188	128.854	0.68540		
TOTAL	189	132.069			

BARTLETT'S TEST OF	CHI-SQ	DF	P
EQUAL VARIANCES	6.26	1	0.0124

COCHRAN'S Q	VALUE
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.6271 / 1.6819

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	VALUE
EFFECTIVE CELL SIZE	0.02662 / 95.0

PLANTA	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
Sobreiro	1.3872	94	0.9284
Azinhaira	1.1271	96	0.7159
TOTAL	1.2558	190	0.8279

CASES INCLUDED 190 MISSING CASES 10

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Sobreiro	1.3872	I
Azinhaira	1.1271	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.973 REJECTION LEVEL 0.050
 STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

F.2.2. Análise individual da variância para a severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento

ONE-WAY AOV FOR AEREO BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	6.75335	0.75037	1.08	0.3813
WITHIN	180	125.315	0.69620		
TOTAL	189	132.069			

BARTLETT'S TEST OF	CHI-SQ	DF	P
EQUAL VARIANCES	13.86	9	0.1274

COCHRAN'S Q	VALUE
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	0.1763 / 4.9836

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	VALUE
EFFECTIVE CELL SIZE	0.00285 / 19.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
Infestadas+fosfito-K	1.1579	19	0.7691
Testemunha+fosfito-K	1.1450	20	0.6134
Fosfato10+fosfito-K	0.8267	15	0.4935
Fosfato20+fosfito-K	1.2750	20	0.9043
Fosfito-K+fosfito-K	1.5842	19	1.1016
Infestadas	1.3263	19	0.9445
Testemunha	1.4200	20	0.7317
Fosfato10	1.0842	19	0.8764
Fosfato20	1.2600	20	0.7857
Fostifo-K	1.3842	19	0.9112
TOTAL	1.2558	190	0.8344

CASES INCLUDED 190 MISSING CASES 10

F.2.3. Análise individual da variância e comparação de médias para a avaliação visual de sintomas na parte radicular em função da espécie de planta (teste LSD, P = 0,05)

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY PLANTA

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	1	7.47170	7.47170	13.61	0.0003
WITHIN	188	103.230	0.54910		
TOTAL	189	110.702			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
0.61	1	0.4337

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
1.1759	0.5404

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	0.07288
	95.0

PLANTA	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
Sobreiro	2.0117	94	0.7101
Azinheira	2.4083	96	0.7701
TOTAL	2.2121	190	0.7410

CASES INCLUDED 190 MISSING CASES 10

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY PLANTA

PLANTA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Azinheira	2.4083	I
Sobreiro	2.0117	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.973 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES
VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

F.2.4. Análise individual da variância e comparação de médias para a severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

ONE-WAY AOV FOR RAIZ BY TRATAMENTO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	9	36.6598	4.07331	9.90	0.0000
WITHIN	180	74.0424	0.41135		
TOTAL	189	110.702			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
14.49	9	0.1059

COCHRAN'S Q

LARGEST VAR / SMALLEST VAR	Q
3.4869	0.1403

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS

EFFECTIVE CELL SIZE	Value
	0.19285
	19.0

TRATAMENTO	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
Infestadas+fosfito-K	2.4421	19	0.7206
Testemunha+fosfito-K	1.4750	20	0.4064
Fosfato10+fosfito-K	2.1133	15	0.5604
Fosfato20+fosfito-K	2.6700	20	0.7306
Fosfito-K+fosfito-K	2.3895	19	0.7279
Infestadas	2.7632	19	0.5842
Testemunha	1.4850	20	0.4368
Fosfato10	2.2895	19	0.6376
Fosfato20	2.5450	20	0.7265
Fosfito-K	1.9632	19	0.7588
TOTAL	2.2121	190	0.6414

CASES INCLUDED 190 MISSING CASES 10

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
Infestadas	2.7632	I
Fosfato20+fosfito-K	2.6700	I I
Fosfato20	2.5450	I I I
Infestadas+fosfito-K	2.4421	I I I
Fosfito-K+fosfito-K	2.3895	I I I
Fosfato10	2.2895	.. I I I
Fosfato10+fosfito-K	2.1133 I I
Fosfito-K	1.9632 I
Testemunha	1.4850 I
Testemunha+fosfito-K	1.4750 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.973 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES
VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

G. EFEITO DE DOIS MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO CONTROLO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM SOBREIROS SUBMETIDOS A ENCHARCAMENTO 2 DIAS SUCESSIVOS POR SEMANA

G.1. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte aérea

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR AEREO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TRATAMENTO (A)	13	75.7277	5.82521	7.60	0.0000
BLOCO (B)	1	0.60457	0.60457	0.79	0.3785
REPETIÇÃO (C)	4	2.88186	0.72046	0.94	0.4482
A*B	13	4.27143	0.32857	0.43	0.9519
A*C	52	35.5901	0.68443	0.89	0.6576
B*C	4	7.79043	1.94761	2.54	0.0506
A*B*C	52	39.8536	0.76641		
TOTAL	139	166.720			

G.1.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte aérea em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF AEREO BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C-acfosfRa	3.0100	I
I-fosfMgPa	2.9900	I
E-acfosfPa	2.8200	I
L-fosfK-Rb	2.7500	I
D-acfosfRb	2.6100	I
J-fosfMgPb	2.5800	I
M-fosfK-Pa	2.4300	I I
B-Testinoc	2.4000	I I I
N-fosfK-Pb	2.2700	I I I
K-fosfK-Ra	1.7400	.. I I I
F-acfosfPb	1.6400 I I
G-fosfMgRa	1.3400 I
H-fosfMgRb	1.0900 I I
A-testinoc	0.5500 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.007 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.7856
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3915

ERROR TERM USED: TRATAMENTO*BLOCO*REP, 52 DF

G.2. Análise global da variância para a avaliação visual de sintomas na parte radicular

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR RAIZ

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TRATAMENTO (A)	13	46.6400	3.58769	14.97	0.0000
BLOCO (B)	1	0.04829	0.04829	0.20	0.6554
REP (C)	4	1.00814	0.25204	1.05	0.3899
A*B	13	3.48171	0.26782	1.12	0.3664
A*C	52	11.0479	0.21246	0.89	0.6674
B*C	4	2.09529	0.52382	2.19	0.0835
A*B*C	52	12.4647	0.23971		
TOTAL	139	76.7860			

G.2.1. Comparação de médias da severidade de sintomas na parte radicular em função do tratamento (teste LSD, P = 0,05)

LSD (T) COMPARISON OF MEANS OF RAIZ BY TRATAMENTO

TRATAMENTO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
N-fosfK-Pb	3.4400	I
L-fosfK-Rb	3.3500	I
D-acfosfRb	3.2700	I I
C-acfosfRa	3.2700	I I
E-acfosfPa	3.2200	I I
B-testinoc	3.2200	I I
M-fosfK-Pa	3.1500	I I
I-fosfMgPa	3.1400	I I
J-fosfMgPb	3.1300	I I
G-fosfMgRa	3.0900	I I
H-fosfMgRb	3.0900	I I
K-fosfK-Ra	2.9100	.. I I
F-acfosfPb	2.5300 I
A-testninoc	1.0500 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.007 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.4394
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2190

ERROR TERM USED: TRATAMENT*BLOCO*REP, 52 DF

H. EFEITO DA APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS POR INJEÇÃO NO TRONCO EM SOBREIROS ADULTOS**H.1. Análise global da variância para o índice de desfoliação dos sobreiros**

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR ID

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
Época (A)	2	0.01167	0.00583	0.14	0.8713
Substância (B)	3	0.28917	0.09639	2.33	0.1740
A*B	6	0.24833	0.04139		
TOTAL	11	0.54917			