



RECURSOS SILVESTRES



Stock

PINHAL SUSTENTÁVEL: O COMBATE AO NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO COM FUNGOS ANTAGONISTAS

A doença da murchidão do pinheiro, causada pelo nemátode da madeira do pinheiro, é uma das maiores ameaças ao pinhal em Portugal. Os meios de luta contra o nemátode são ainda limitados, mas a utilização de fungos antagonistas para o seu controlo pode ser uma opção promissora e viável.

David Pires¹, Jorge M.S. Faria¹, M^a Lurdes Inácio¹, Cláudia S.L. Vicente², Manuel Mota²

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



² NemaLab. Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (MED), Universidade de Évora





A Fileira do Pinho é um motor socioeconómico extremamente importante do setor florestal em Portugal. De acordo com os mais recentes indicadores de Comércio Internacional divulgados pelo Instituto Nacional de Estatística, as exportações desta Fileira ascenderam a 2,2 mil milhões de euros em 2021, um aumento de cerca de 25% face ao ano anterior. Segundo o relatório de uso e ocupação de solo em Portugal Continental de 2018, o pinheiro-bravo, *Pinus pinaster* Aiton, é a conífera mais abundante, correspondendo a 29% de toda a floresta portuguesa. Contudo, a sua área tem vindo a diminuir após séculos de expansão. Alguns dos fatores que podem explicar esta tendência preocupante são o desinteresse geral por áreas rurais, a falta de investimento na sua replantação ou a sua substituição por eucaliptal, vagas de incêndios cada vez mais frequentes, exacerbadas pelas alterações climáticas, e a doença da murchidão do pi-

nheiro (DMP), provocada pelo nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bührer) Nickle (Fig. 1). Estima-se que a perda de stock florestal diretamente associada ao NMP poderá chegar aos 22 mil milhões de euros, num período de 22 anos (2008–2030).

O NMP é um organismo de quarentena em muitos países, tendo sido detetado pela primeira vez na Europa em 1999, na Península de Setúbal (Mota *et al.*, 1999). É considerado desde há muito, e ainda hoje, um dos nemátodes fitoparasitas com maior impacto económico (Kantor *et al.*, 2022). Além do nemátode, a DMP depende da interação de outros fatores: o inseto-vetor, capaz de dispersar o parasita, e um hospedeiro suscetível, como *P. pinaster*, a espécie mais afetada no nosso território. Em Portugal, o único vetor do NMP é o inseto *Monochamus galloprovincialis*, vulgarmente designado por longicórnio-do-pinheiro (Fig. 2).

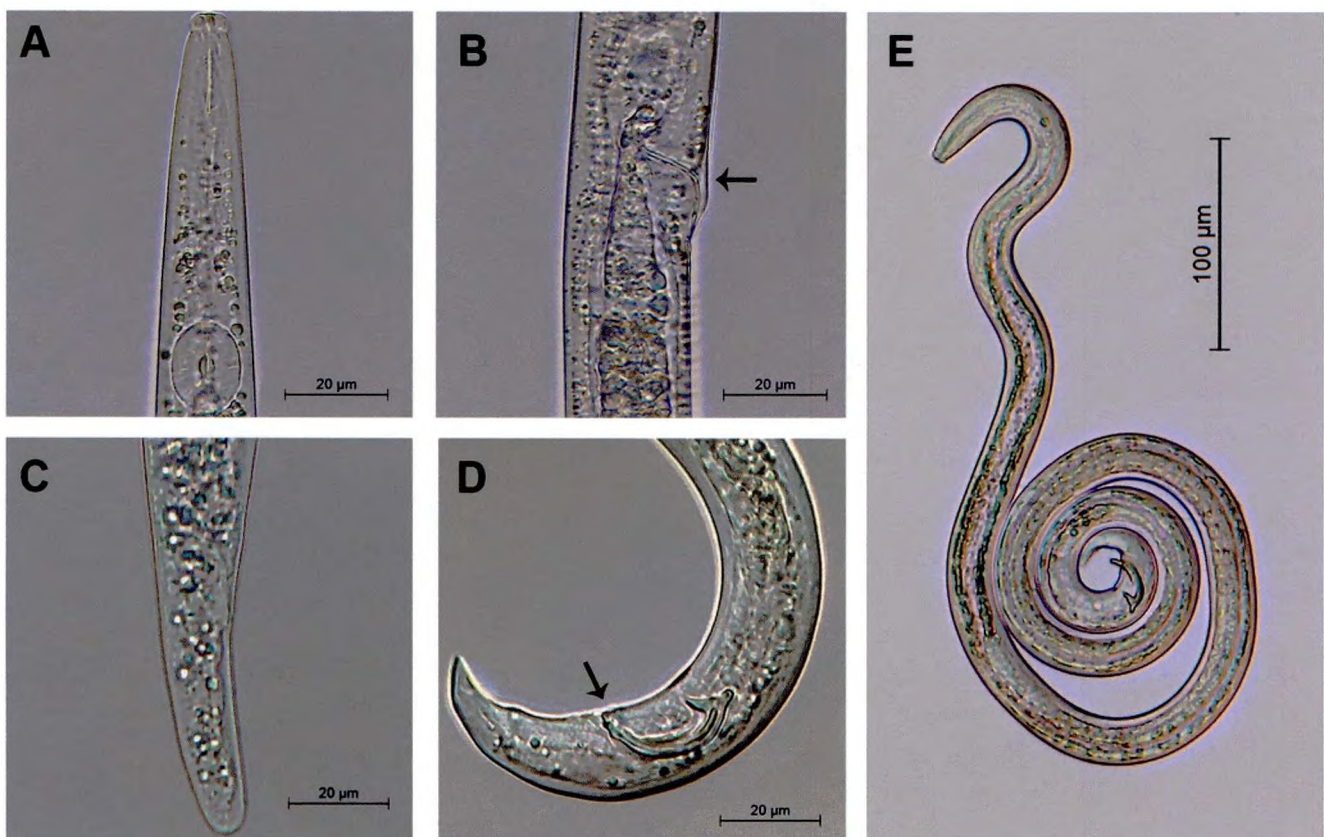


Figura 1 – Características anatómicas distintivas do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. **A** – cabeça; **B** – vulva e prega vulvar (seta) de uma fêmea; **C** – cauda de uma fêmea; **D** – cauda e órgão copulatório (espícula) de um macho; **E** – corpo inteiro de um macho.



RECURSOS SILVESTRES



Figura 2 – *Monochamus galloprovincialis*, inseto-vetor do nemátode da madeira do pinheiro (barra = 1 cm).

Modos de dispersão e ciclo de vida

O NMP pode ser disseminado naturalmente de duas formas: por transmissão primária e/ou secundária (Fig. 3). O inseto-vetor adulto, ao alimentar-se de ramos de pinheiros aparentemente sãos, transmite o nemátode, atraído por compostos voláteis libertados pelo tecido danificado do pinheiro. O NMP abandona o inseto e entra pelas feridas resultantes da alimentação (transmissão primária). Uma vez dentro da árvore, o NMP migra através dos canais resiníferos, onde se alimenta de células vegetais do

epitélio (fase fitófaga), perturbando a produção de resina e, conseqüentemente, a capacidade da planta se defender eficazmente de ataques secundários. À medida que a planta hospedeira vai ficando mais enfraquecida, devido ao stress hídrico provocado pela interrupção do transporte de água que, por sua vez, compromete a fotossíntese, aparecem os primeiros sintomas da DMP: o amarelecimento das agulhas e posterior murchidão. Outros insetos começam a atacar a árvore, que já não consegue produzir resina, o que a torna ainda um local ideal de oviposição para vários insetos. Neste caso, quando a fêmea de *M. galloprovincialis* deposita os seus ovos na madeira de pinheiros recentemente mortos ou em declínio, pode igualmente transmitir o nemátode (transmissão secundária). Em pinheiros mortos, o NMP alimenta-se essencialmente de fungos transportados e inoculados por outros insetos, como escolitídeos (fase micetófaga). O nemátode multiplica-se rapidamente, passando por quatro estádios de desenvolvimento antes do adulto (fase propagativa). À semelhança de outros nemátodes, o NMP pode desenvolver um estádio de resistência às condições adversas do meio envolvente e bem-adaptado ao transporte pelo inseto-vetor. Quando os recursos são limitados, este fitoparasita entra na fase dispersiva do seu ciclo de vida logo após a muda do segundo estádio juvenil (J₂), passando a juvenil de sobrevivência (J_{III}), cujo metabolismo é reduzido e que não se alimenta, retomando o seu desenvolvimento quando as condições forem mais favoráveis. Neste estádio, os J_{III} alojam-se na madeira circundante das câmaras pupais do inseto-vetor, provavelmente atraídos por substâncias emitidas pela pupa, sofrendo uma nova muda e transformando-se no estádio dispersivo seguinte, o chamado juvenil dauer (J_{IV}), que acaba por entrar no inseto adulto mesmo antes deste emergir da câmara pupal e levantar voo para se alimentar.

Medidas de controlo do nemátode e gestão da doença

A monitorização regular do pinhal, tanto de árvores sintomáticas e assintomáticas, bem como do in-

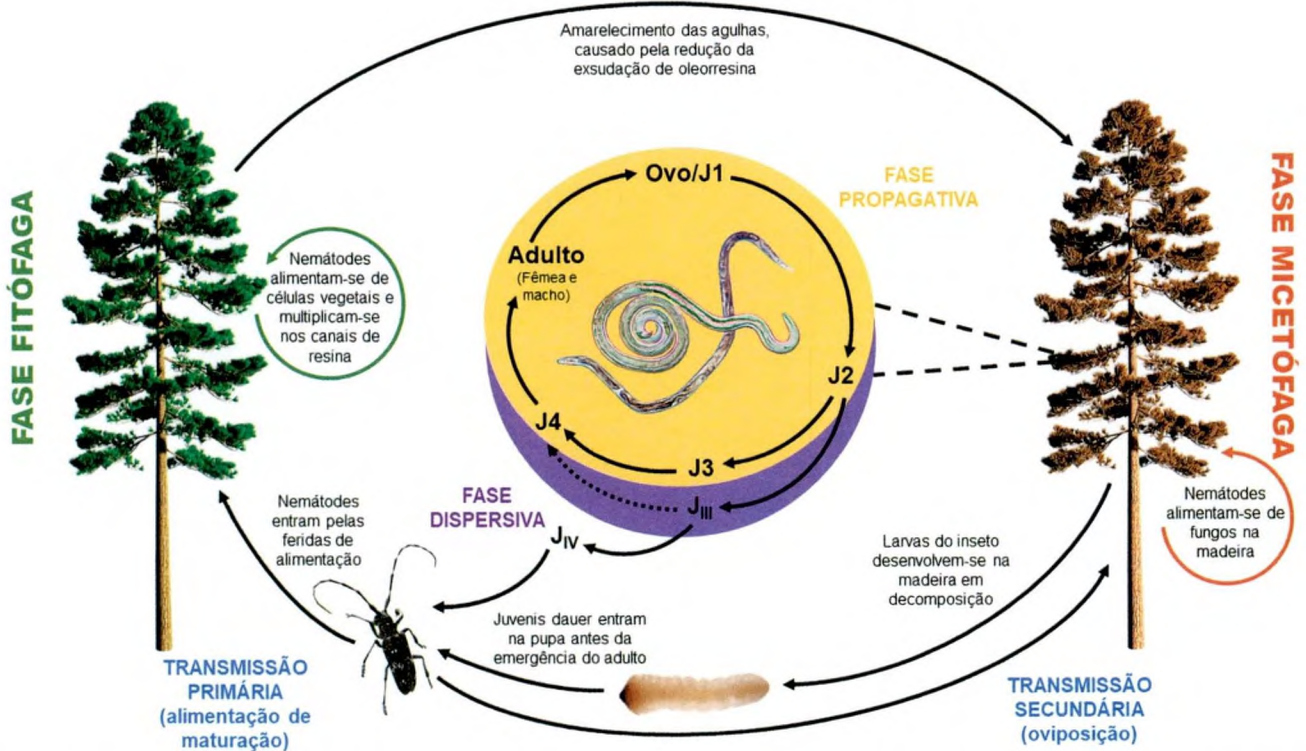
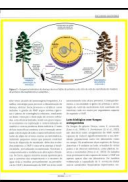


Figura 3 – Esquema ilustrativo da doença da murchidão do pinheiro e do ciclo de vida do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*.

seto-vetor, através de amostragens frequentes, é a melhor estratégia para prevenir a disseminação da doença, detetar focos precoces e erradicar casos isolados. A gestão da DMP segue normas rigorosas e planos de contingência robustos, resultando no abate, remoção e destruição de árvores infetadas, com eficácia limitada, tendo um grave impacto económico na exploração e comercialização de madeira e outros produtos desta indústria. O meio de luta mais eficaz continua a ser a remoção atempada e destruição de todo o material lenhoso resultante do abate de árvores mortas ou sintomáticas, incluindo pequenos ramos que possam constituir focos de dispersão do nemátode. Além dos avultados prejuízos, a DMP é uma séria ameaça à biodiversidade, perturbando ecossistemas florestais e comprometendo a resiliência às alterações climáticas. De facto, alguns cenários atuais apontam para que o aumento das temperaturas e a escassez de água virão a resultar, provavelmente, na prevalência do NMP e disseminação da DMP em áreas onde

anteriormente não estava presente. Consequentemente, a necessidade urgente de práticas e estratégias de controlo sustentáveis tem suscitado um interesse cada vez maior por organismos capazes de suprimir o NMP.

Luta biológica com fungos antagonistas

Os fungos do género *Esteya*, como *E. vermicola* (Liou *et al.*, 1999) e *E. floridanum* (Li *et al.*, 2021), são descritos como antagonistas do NMP, sendo capazes de reduzir significativamente a sua densidade populacional, tanto em laboratório como no campo. Há atualmente duas espécies de *Esteya* descritas e 9 isolados ao todo, oriundos de vários países e de diversos substratos, como plantas, insetos e nemátodes (Pires *et al.*, 2022). Os isolados mais promissores são capazes de matar o NMP em apenas quatro dias em laboratório. Foi também evidenciada a capacidade de *E. vermicola* matar outros nemátodes fitoparasitas importantes, no-



meadamente do género *Ditylenchus*, sendo incapaz de parasitar *Meloidogyne incognita*, *Heterodera avenae* e *Pratylenchus penetrans*, espécies que pertencem a géneros incluídos no *ranking* dos mais nocivos (Kantor *et al.*, 2022). No entanto, a sua aplicação no solo pode não surtir efeitos desejados, uma vez que poderia prejudicar nemátodes benéficos dos sistemas agrícolas, como *Panagrellus redivivus* – espécie contra a qual o fungo também foi testado, que ocupam nichos ecológicos importantes para o funcionamento dos ecossistemas que habitam, uma vez que se alimentam de bactérias e contribuem para a reciclagem de nutrientes no solo, mobilizando, assim, recursos para as plantas. Os fungos *Esteya* têm ainda a capacidade de produzir compostos químicos que atraem o NMP até si, iniciando o ciclo de infeção quando estes entram em contacto com os esporos do fungo, que se acoplam à cutícula do nemátode e germinam entre 18 a 24 horas, causando a morte do animal quando os órgãos internos são completamente destruídos pelas estruturas vegetativas do fungo. Pensa-se que a capacidade de atração será, na verdade, atribuída a bactérias que mantêm uma relação de simbiose com *Esteya*. Através de ensaios em condições naturais, foi demonstrado que estes fungos potenciam um efeito de remediação em árvores infetadas, reduzindo a densidade populacional do nemátode, e conferindo uma proteção alargada em pinheiros assintomáticos suscetíveis de desenvolver a DMP. Além disso, nunca foram descritos como patogénicos para as plantas. Apesar de serem fungos frequentemente associados a insetos, nunca foram encontrados no inseto-vetor do NMP, o que dificulta o encontro fortuito entre ambos na natureza. Recentemente, estes fungos foram aplicados com sucesso em pinheiros asiáticos, igualmente suscetíveis ao nemátode, mas nunca foram testados em pinheiro-bravo.

Aplicações em pinheiro-bravo

Algumas das maiores limitações na aplicação destes fungos são os desafios de produzir esporos virulentos em larga escala, a metodologia de inoculação e os fatores abióticos que possam com-

prometer a viabilidade dos esporos, como a luz ultravioleta, o stress térmico ou a desidratação, limitando assim os seus efeitos de bioproteção. Experiências recentes revelaram que os fungos do género *Esteya* são capazes de colonizar os vasos condutores da planta hospedeira, aumentando a probabilidade de encontro com o NMP em árvores infetadas. Os métodos de inoculação mais eficientes são a microinjeção no tronco ou aplicação em *spray* numa incisão artificial. A sua eficácia pode também variar consoante a idade da planta e o efeito pretendido: preventivo (prevenindo a progressão do nemátode) ou curativo (eliminando o nemátode). No entanto, como já foi amplamente comprovado em *P. densiflora*, a presença do fungo permite aumentar e estabilizar a taxa de sobrevivência ao longo do tempo de pinheiros infetados, em cerca de 40%. Estes indicadores são encorajadores para a sua utilização no pinhal em Portugal, incluída numa estratégia de luta integrada contra a DMP.

Linhas de investigação de controlo biológico

Nos laboratórios de Nematologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) e do Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (MED), da Universidade de Évora, estamos atualmente a desenvolver linhas de investigação para avaliar a eficácia e otimizar métodos de inoculação destes fungos em pinheiro-bravo. Estas linhas de trabalho são suportadas pelos projetos “PineENEMY – Estudo das interações nemátode-fungos na doença da murchidão do pinheiro” (LISBOA-01-0145-FEDER-028724) – que foi distinguido na 7.^a edição do Prémio de Inovação e Empreendedorismo do Crédito Agrícola, em 2020, com o conceito “MycoExplorer”, e “PineProtect – Exploração do potencial de biocontrolo de *Esteya* spp. contra o nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, em *Pinus pinaster*” (2021.08030.BD), ambos financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). Embora sejam preliminares, os resultados obtidos até ago-



ra são animadores, uma vez que ambas as espécies do fungo são capazes de colonizar discos de madeira de pinheiro-bravo, abrindo a porta a potenciais aplicações nesta resinosa. 🍄

Agradecimentos

À Dra. Alena Kubátová (Charles University, República Checa), ao Dr. Bryan Sung (DBio, Inc., Coreia do Sul) e ao Dr. You Li (University of Florida, Estados Unidos da América) por facultarem os isolados de *Esteya*.

Bibliografia

Kantor, M. et al. (2022). Top ten most important U.S.-regulated and emerging plant-parasitic nematodes. *Horticulturae*, **8**:208.

Li, Y. et al. (2021). *Esteya floridanum* sp. nov.: an Ophiostomatalean nematophagous fungus and its potential to control the pine wood nematode. *Phytopathology*, **111**(2):304–311.

Liou, J.Y. et al. (1999). *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Mycology Research*, **103**:242–248.

Mota, M. et al. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**:727–734.

Pires, D. et al. (2022). The potential of *Esteya* spp. for the biocontrol of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Microorganisms*, **10**(1):168.