

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM BIOLOGIA DE PRAGAS E DOENÇAS DE PLANTAS

**FUNGOS ASSOCIADOS A *PLATYPUS CYLINDRUS* FAB.
(COLEOPTERA: PLATYPODIDAE) E SUA RELAÇÃO
COM O DECLÍNIO DO SOBREIRO EM PORTUGAL**

Joana Margarida Cordeiro Henriques

Sob a orientação de Professora Doutora Ivone Clara e
Doutor Edmundo Sousa

Esta dissertação não inclui críticas e sugestões feitas pelo júri.

Évora, 2007

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM BIOLOGIA DE PRAGAS E DOENÇAS DE PLANTAS

**FUNGOS ASSOCIADOS A *PLATYPUS CYLINDRUS* FAB.
(COLEOPTERA: PLATYPODIDAE) E SUA RELAÇÃO
COM O DECLÍNIO DO SOBREIRO EM PORTUGAL**

Joana Margarida Cordeiro Henriques

Sob a orientação de Professora Doutora Ivone Clara e
Doutor Edmundo Sousa
e coorientação de Eng^a Maria de Lurdes Inácio

Realizado no Departamento de Protecção Florestal
ESTAÇÃO FLORESTAL NACIONAL



163 355

Esta dissertação não inclui críticas e sugestões feitas pelo júri.

Évora, 2007

Trabalhos publicados no âmbito desta dissertação:

INÁCIO, M.L.; HENRIQUES, J. & SOUSA, E. (2005). As relações mutualistas entre fungos e insectos: sua influência no estado sanitário das florestas em Portugal. *Actas das Comunicações do 5º Congresso Florestal Nacional*, Instituto Politécnico de Viseu (formato digital).

INÁCIO, M.L.; HENRIQUES, J. & SOUSA, E. (2005). Interações insectos-fungos no declínio do montado de sobre: bases para a definição de novos meios de luta. *A Produção Integrada e a Qualidade e Segurança Alimentar – Actas do VII Encontro Nacional de Protecção Integrada*, Instituto Politécnico de Coimbra, pp. 414-421.

HENRIQUES, J.; INÁCIO, M.L. & SOUSA, E. (2006). Ambrosia fungi in the insect-fungi symbiosis in relation to cork oak decline. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(3): 183-186.

**FUNGI ASSOCIATED TO *PLATYPUS CYLINDRUS* FAB. (COLEOPTERA: PLATYPODIDAE) IN
RELATION TO CORK OAK DECLINE IN PORTUGAL**

ABSTRACT

The insect *Platypus cylindrus* Fab. establishes symbioses with fungi that inoculates in galleries excavated in cork oak. Fungal genera *Acremonium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocadium*, *Nodulisporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Raffaelea*, *Scytalidium*, *Trichoderma*, order Mucorales and the actinomicete genus *Streptomyces*, were isolated from insect and galleries. Some of these were found for the first time in this interaction. *Raffaelea* spp. includes ambrosia fungi and a pathogenic species to a *Quercus* sp.. *R. ambrosiae*, *R. montetyi* and *R. canadensis* were identified, the latter reported for the first time associated with the insect and in Portugal. The transport of *Nodulisporium* sp., the cause of cork oak charcoal disease, was confirmed. Fungal involvement in insect feeding, wood degradation, colony management in the galleries and host weakness processes was also demonstrated. The knowledge of insect settling strategies on cork oak is very important for the development of control measures for this pest.

Errata

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
3	19	procando	provocando
4	7	A relações	As relações
4	10	hopedeiros	hospedeiros
4	19	estebelecimento	estabelecimento
12	19	Platipodidae	Platytopidae
21	5	Do mesmo modo	São igualmente favoráveis
27	17	foram através	foram capturados através
29	5	JOEL	JEOL
34	Quadro 7	Extensão	Extensão
35	2	Blast	BLAST
36	4	KCl, 20	KCl, 10
39	24	1 a 47	1 a 53
45	1	O aspecto	Os aspectos
46	13	Blast	BLAST
46	13	sequencias	sequências
46	19	Blast	BLAST
47	20	<i>monteyi</i>	<i>montetyi</i>
48	3	indentificado	identificado
49	9	Blast	BLAST
50	20	Blast	BLAST
51	21	rRNA	rDNA
53	6	Blast	BLAST
55	8	conodioforos	conidióforos
55	13	particulamente	particularmente
56	1	fungos	conídios
57	4	arredondado	arredondado
58	5	associações	associações
58	30	gera	geram
59	29	abondono	abandono
61	15	<i>cylincrus</i>	<i>cylindrus</i>
65	8	fêmeas mesmos	fêmeas os mesmos
65	9	fungos nos	fungos
71	7	principas	principais
76	29	incluiem	incluem
80	29	<i>Raffaella</i>	<i>Raffaelea</i>
105	3	Blast	BLAST
117	6	compreensão	compreensão

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de quadros	v
Resumo	vii
Abstract	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. AS SIMBIOSES NO SUCESSO DA COLONIZAÇÃO DO HOSPEDEIRO PELOS INSECTOS	3
2.1. INTERACÇÕES INSECTO-FUNGO	4
2.1.1. Os insectos e fungos ambrósia	5
• Aspectos evolutivos da relação	6
• A componente micológica da interacção	7
• Mecanismos de adaptação para o sucesso da associação	8
• Vantagens do mutualismo	9
2.1.2. Relações com outros fungos	11
2.2. O CASO PARTICULAR DE <i>Platypus cylindrus</i> EM SOBREIRO	12
2.2.1. Importância económica, ecológica e social do sobreiro	15
2.2.2. Principais pragas e doenças envolvidas no declínio do montado	16
2.2.3. O enquadramento do <i>Platypus cylindrus</i> no declínio	20
2.2.4. Os fungos no processo de colonização e de desenvolvimento do insecto	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A <i>Platypus cylindrus</i>	27
3.1.1. Origem do material	27
3.1.2. Observação dos insectos	28
3.1.3. Isolamento e caracterização dos fungos	29
• Caracterização morfocultural e sensibilidade à ciclohexamida	30

• Análise molecular	33
3.2. AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS FUNGOS NA ECTOSSIMBIOSE	35
3.2.1. Degradação de madeira	35
• Detecção de celulases	35
• Detecção de lenhinases	36
3.2.2. Acção antagonista	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 O INSECTO <i>Platypus cylindrus</i> E AS SUAS ESTRUTURAS ESPECÍFICAS DE TRANSPORTE DE FUNGOS	39
4.2. FUNGOS ASSOCIADOS A <i>Platypus cylindrus</i> E SUAS GALERIAS EM SOBREIRO	41
4.2.1. Caracterização morfo-cultural e molecular dos fungos e sua potencial importância na interacção	41
4.2.2. Localização dos fungos isolados de <i>Platypus cylindrus</i> e suas galerias em sobreiro	60
4.3. AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES DESEMPENHADAS PELOS FUNGOS NA ECTOSSIMBIOSE	69
4.3.1. Degradação de madeira	70
4.3.2. Antagonismos entre fungos	75
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1	99
ANEXO 2	105
ANEXO 3	111
AGRADECIMENTOS	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografias de <i>Platypus cylindrus</i> : a) fêmea, b) macho (10x).	13
Figura 2 – Sintomas manifestados em sobreiros atacados por <i>Platypus cylindrus</i> : a) serrim; b) aspecto geral da árvore.	21
Figura 3 – Toros instalados no laboratório para recolha de insectos.	27
Figura 4 – Estratificação espacial das galerias: 1. cortiça; 2. entrecasco; 3. parentais; 4. larvas; 5. câmara pupal (adaptado de Sousa, 1996).	28
Figura 5 – Esquema de inoculação dos fungos nos testes de antagonismos. Cada número indica a posição relativa de cada fungo em estudo.	37
Figura 6– Fotografias de <i>Platypus cylindrus</i> por SEM: a) fêmea; b) macho; c) micângios de fêmea; d) micângios de macho; e) estruturas fúngicas nos micângios de fêmeas.	40
Figura 7 – Aspecto cultural, da face superior e inferior, dos géneros de fungos cultivados em PDA; (1) aspecto da colónia jovem, isto é, antes de atingir o bordo da placa; (2) aspecto típico das colónias após 21 dias de crescimento; para os géneros <i>Nodulisporium</i> , <i>Scytalidium</i> e <i>Trichoderma</i> observam-se alterações, nomeadamente ao nível da coloração.	42
Figura 8 – Estruturas observadas em fungos do genero <i>Raffaelea</i> , (a-e) isolado B5: a) cordões de hifas (x100), b) conidióforo com conídios triangulares (x600), c) conidióforo com conídios alantóides (x600), d) escleroto (x20), e) esporodóquio (x10); (f-i) isolado B6: f) cordões de hifas (x200), g) conidióforos e conídios fusiformes a alantóides (x600), h) conídios triangulares (x1000), i) conídios e conidióforos fusiformes (x600); (j-l) isolado X: j) cadeias monilióides (x600), l) conidióforos e conídios (x600); m) isolado M, conidióforos e conídios (x600).	45
Figura 9 – Resultados do teste de sensibilidade à ciclohexamida.	46
Figura 10 – Relação entre vários isolados de <i>Raffaelea</i> sp. obtidos de <i>Platypus cylindrus</i> e suas galerias em sobreiro.	47
Figura 11 – Árvore filogenética que representa a comparação da região ITS rDNA de <i>Acremonium</i> sp. com espécies próximas.	49
Figura 12 – Árvore filogenética que representa a comparação da região ITS rDNA de <i>Nodulisporium</i> sp. com espécies próximas.	50
Figura 13 - Árvore filogenética que representa a comparação da região 18S rDNA de <i>Scytalidium</i> sp. com espécies próximas.	52
Figura 14 - Árvore filogenética que representa a comparação da região 28S rDNA de <i>Gliocladium</i> sp. com espécies próximas.	54

- Figura 15 – Estruturas microscópicas dos fungos: a) hifas formando anastomoses em *Acremonium* sp. (x600); b) cordões de hifas e conidióforo com conídios de *Acremonium* sp. (x600); c) conidióforos e conídios de *Nodulisporium* sp. (x600); d) formação de artroconídios em *Scytalidium* sp. (x600); e) conidióforos e conídios de *Trichoderma* sp. (x600); f) estruturas conidiogénicas de *Gliocladium* sp. (x400). 55
- Figura 16 – Comparação das dimensões dos fungos (comprimento e largura) medidas nos meios de cultura PDA e CLA (B5 – *Raffaelea* sp. isolado B5; B6 – *Raffaelea* sp. isolado B6; B7 – *Acremonium* sp.; B8 – *Nodulisporium* sp.; B4 – *Scytalidium* sp.; B2 – *Trichoderma* sp.; P23 – *Gliocladium* sp.). 56
- Figura 17 - Percentagem de fungos isolados de galerias de *Platypus cylindrus* das diferentes secções do toro de sobreiro: cortiça, entrecasco e cerne. 61
- Figura 18 – Percentagem de fungos isolados das secções das galerias de *Platypus cylindrus* em sobreiro (cortiça, entrecasco, secção antes dos parentais, secção larvar e extremidade da galeria) a diferentes distâncias: revestimento, galeria, a 0,5 cm e 1,0 cm. 62
- Figura 19 - Percentagem de fungos isolados a partir de fêmeas (F) e machos (M) de *Platypus cylindrus*. 64
- Figura 20 – Percentagem de fungos isolados do conteúdo intestinal (CI), exosqueleto (EXOSQ) e micângios (MIC) de *Platypus cylindrus*. 65
- Figura 21 – Percentagem de géneros de fungos isolados das diferentes partes (conteúdo intestinal, exosqueleto e micângios) de fêmeas (F) e machos (M) de *Platypus cylindrus*. 66
- Figura 22 – Resultados dos testes de degradação de celulose. A migração da cor azul do meio para a camada inferior é indicadora de degradação do composto (0 não inoculado, 1 *Raffaelea* sp. isolado B5, 2 *Raffaelea* sp. isolado B6, 3 *Acremonium* sp., 4 *Nodulisporium* sp., 5 *Scytalidium* sp., 6 *Trichoderma* sp., 7 *Gliocladium* sp.). 70
- Figura 23 – Resultados dos testes de acção de lenhinases (testes de azul de metileno, azul de dextrano e azul de Coomassie). A alteração de cor dos meios de cultura é indicadora de reacção de degradação dos respectivos compostos. 71
- Figura 24 – Exemplos das placas de cultura dos testes de antagonismo. 74
- Figura 25 – Diagrama representativo da interpretação dos resultados dos testes de antagonismo. 75

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Factores que influenciam o declínio do montado de sobreiro	18
Quadro 2 – Principais pragas do sobreiro	19
Quadro 3 – Principais doenças do sobreiro	20
Quadro 4 – Fungos associados a <i>Platypus cylindrus</i> isolados de micângios, conteúdo intestinal e exosqueleto e suas galerias nos hospedeiros	25
Quadro 5 – Região amplificada e respectivos primers utilizados para cada fungo	33
Quadro 6 - Composição da mistura usada na amplificação de DNA dos fungos na técnica PCR	34
Quadro 7 - Programa de amplificação de PCR utilizado	34
Quadro 8 – Tempo de inoculação dos diferentes fungos no teste de antagonismo com inoculação faseada	38
Quadro 9 – Ordens e géneros de fungos isolados a partir de insecto <i>Platypus cylindrus</i> e sua galerias em sobreiro	41
Quadro 10 – Descrição macroscópica das culturas em meio PDA	43
Quadro 11 – Fungos presentes nas diferentes secções das galerias (cortiça, entrecasco, secção antes dos parentais, secção larvar e extremidade da galeria) e isolados do conteúdo intestinal, exosqueleto e micângios de <i>Platypus cylindrus</i>	68
Quadro 12 – Análise da capacidade dos fungos para degradar substratos análogos de celulose e lenhina em meios de cultura corados	70

FUNGOS ASSOCIADOS A *PLATYPUS CYLINDRUS* FAB. (COLEOPTERA: PLATYPODIDAE) E SUA RELAÇÃO COM O DECLÍNIO DO SOBREIRO EM PORTUGAL

RESUMO

A explosão populacional de *Platypus cylindrus* está relacionada com o declínio do montado de sobreiro em Portugal. Sendo um insecto ambrósia, alimenta-se de fungos que transporta e inocula nas galerias que constrói no hospedeiro. Para averiguar a importância desta micoflora, foram efectuados isolamentos de fungos do insecto (micângios, conteúdo intestinal e exosqueleto) e galerias em sobreiro. Identificaram-se quinze géneros, entre eles: *Acremonium*, *Gliocadium*, *Nodulisporium*, *Raffaelea*, *Scytalidium* e *Trichoderma*. Pela primeira vez, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Geotrichum* e *Streptomyces* foram associados a esta interacção. Foram identificadas três espécies de *Raffaelea*: *R. ambrosia*, *R. montetyi* e *R. canadensis*, esta última ainda não associada ao insecto nem referida no país. Os fungos isolados estão envolvidos nos processos de alimentação dos insectos, degradação de madeira, antagonismo de fungos nas galerias e enfraquecimento do hospedeiro. O conhecimento das estratégias de colonização do sobreiro pode contribuir para o desenvolvimento de métodos de controlo desta praga.

**FUNGI ASSOCIATED TO *PLATYPUS CYLINDRUS* FAB. (COLEOPTERA: PLATYPODIDAE) IN
RELATION TO CORK OAK DECLINE IN PORTUGAL**

ABSTRACT

Platypus cylindrus population outbreak is related to cork oak decline in Portugal. Being an ambrosia beetle, it feeds on fungi that carries and inoculates in galleries that constructs in the host. To averiguate this mycoflora's importance, fungi were isolated both from the beetle (mycangia, intestinal content and exoskeleton) and cork oak galleries. Fifteen fungi were identified, namely *Acremonium*, *Gliocladium*, *Nodulisporium*, *Raffaelea*, *Scytalidium* and *Trichoderma* genus. For the first time, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Geotrichum* and *Streptomyces* were associated to this interaction. Three *Raffaelea* species: *R. ambrosia*, *R. montetyi* and *R. canadensis* were identified, this last never related to this interaction or reported in the country. The isolated fungi were found to be involved in insect feeding, wood degradation, fungi antagonism in the galleries and host weakness processes. The knowledge of insects settling strategies on cork oak will contribute for future development of control measures for this pest.

1. INTRODUÇÃO

O sobreiro (*Quercus suber* L.) constitui um componente base de um ecossistema complexo e multifuncional, que assegura uma diversidade biológica rica e variada, sendo reconhecida a sua grande importância ecológica, económica e social para o nosso país. No entanto, o fenómeno do declínio do montado de sobreiro, constatado em Portugal desde o início do século XX (Natividade, 1950), representa um sério problema que ameaça a sobrevivência deste importante recurso florestal por toda a bacia Mediterrânica (Sechi *et al.*, 2002).

A progressiva degradação do montado enquadra-se no declínio generalizado que tem vindo a ser assinalado em relação a várias espécies de carvalhos nos Estados Unidos e na Europa, quer na extensão e gravidade do fenómeno, quer na sintomatologia evidenciada (Santos, 2000), tendo levado à formulação de várias hipóteses explicativas cujos contornos variam com os factores ecológicos, práticas silvícolas, espécies envolvidas e respectivas interacções.

Desde as últimas décadas, tem-se vindo a estudar e a debater as principais causas do declínio dos sobreiros, com particular ênfase na detecção e caracterização de populações de agentes nocivos, procurando encontrar relações entre a incidência destes agentes e a sintomatologia exibida pelas árvores. Contudo, persistem ainda inúmeras lacunas de conhecimento em áreas tão importantes como as interacções no sistema insectos-fungos-hospedeiro, entre outras (Santos, 2000).

A partir da década de 80 e coincidindo com o agravamento da degradação progressiva do montado de sobreiro, tem vindo a verificar-se um aumento dos ataques de espécies de insectos da ordem Coleoptera, nomeadamente do xilomicetófago *Platypus cylindrus* Fab. Em Portugal, este insecto foi identificado em 1870 (Heyden, 1870), mas nunca foi considerado com impacto significativo nos povoamentos (Seabra, 1939; Baeta-Neves, 1950) até à sua explosão populacional: os danos causados por *P. cylindrus* estavam limitados a árvores mortas ou enfraquecidas (Cecconi, 1924; Español, 1964) tendo, no entanto, sido referidos ataques esporádicos em árvores aparentemente sãs (Peyerimhoff,

1919; Balachowsky, 1949) e, em Marrocos, é mesmo considerado um agente primário (Villemant & Fraval, 1993).

De acordo com Sousa *et al.* (1995), pode considerar-se que *P. cylindrus* se insere numa sucessão de agentes bióticos que intervêm no ciclo de declínio do sobreiro em Portugal: a explosão dos seus níveis populacionais resultaria directamente de um elevado número de árvores enfraquecidas. A compreensão dos aumentos populacionais de *P. cylindrus*, sobretudo nos povoamentos portugueses, pode ser baseada em três pressupostos: mudanças graduais nos montados, alterações nas populações do insecto e dos seus inimigos naturais e desenvolvimento de mecanismos de colonização do hospedeiro mais específicos. Neste contexto, as simbioses com novos fungos podem contribuir para o enfraquecimento do hospedeiro, criando condições ideais para o estabelecimento dos insectos (Sousa & Inácio, 2005).

As interacções que este insecto estabelece com fungos, alguns dos quais potencialmente patogénicos para o sobreiro, parecem ser de extrema importância. De acordo com Beaver (1989), grande parte dos patogénios com maior impacte em povoamentos florestais são transmitidos por insectos, sendo bem conhecidos os casos de Scolytidae e Platytodidae na dispersão de fungos extremamente graves para os ecossistemas florestais.

Com a realização do presente trabalho pretende-se fundamentalmente adquirir conhecimentos mais profundos sobre a biodiversidade da micoflora associada ao insecto *P. cylindrus* e determinar possíveis funções dos diferentes fungos na interacção insecto-fungo-hospedeiro envolvidas na instalação e manutenção das populações dos insectos no hospedeiro, gestão das colónias fúngicas nas galerias e contribuição para o gradual declínio do montado de sobreiro. O conhecimento destas variáveis contribuirá para o estabelecimento de medidas indirectas de controlo das populações de insectos vectores, nomeadamente através da inibição do desenvolvimento da micoflora a elas associada.

2. AS SIMBIOSSES NO SUCESSO DA COLONIZAÇÃO DO HOSPEDEIRO PELOS INSECTOS

As interações entre insectos e plantas incluem a maioria das espécies multicelulares terrestres e constituem uma fonte de recursos básicos para muitos dos restantes organismos (Farrell *et al.*, 2001). Muitas destas interações, talvez a maioria, envolvem também associações com microrganismos, incluindo fungos patogénicos de plantas (Paine *et al.*, 1997). Expandindo a capacidade dos insectos para usar os recursos vegetais, as interações mutualistas entre insectos herbívoros e fungos acabam, elas próprias, por promover a diversificação destas associações (Farrell *et al.*, 2001).

São muitos os insectos que utilizam recursos vegetais, desde plantas herbáceas às mais frondosas árvores. Se uns constituem pragas primárias para os seus hospedeiros, atacando plantas vigorosas e conseguindo ultrapassar as suas defesas, outros não têm essa capacidade, colonizando apenas plantas já debilitadas ou levando consigo aliados que quebram essas barreiras. Fungos, vírus e nemátodes estão frequentemente envolvidos com os insectos nessas relações, debilitando os hospedeiros e tornando-os assim acessíveis aos insectos. Os microrganismos, por seu lado, conseguem deste modo percorrer as distâncias entre os hospedeiros (Tainter & Baker, 1996).

Na floresta encontram-se variados exemplos de insectos que estabelecem simbioses com outros organismos procurando danos redobrados nas árvores atacadas, como a doença dos ulmeiros provocada pelo fungo *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf vectorizada pelo insecto *Scolytus scolytus* F. ou o nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle, transmitido pelo insecto *Monochamus galloprovincialis* Oliv. (Mota *et al.*, 1999; Agrios, 2005).

2.1. INTERACÇÕES INSECTOS-FUNGOS

Os insectos e os fungos estão intimamente associados na maioria dos ambientes, e têm surgido repetidamente muitos tipos de interacções entre diversos taxa destes organismos. De um modo geral, as interacções podem ser categorizadas como associações de parasitismo necrotrófico e biotrófico, dispersão e fertilização, simbioses de micetocultura e endossimbioses (Blackwell & Jones, 1997).

A relações entre fungos e insectos vectores podem ser mutuamente benéficas em certos aspectos: para o fungo, o vector oferece não só um meio de transporte que ultrapassa as descontinuidades espaciais entre as plantas como também assegura a sua inoculação em hospedeiros susceptíveis e com condições favoráveis ao seu desenvolvimento. O insecto, beneficia de um habitat adequado e de abundante fonte de alimento, quer sejam os tecidos vegetais em decomposição quer seja o micélio do seu parceiro. No entanto, existem também pontos fracos nesta associação: (i) podem surgir dificuldades para fungos e insectos estabelecerem e manterem a relação, particularmente evidente no caso de fungo patogénicos vasculares que durante o desenvolvimento da doença se separam do vector, necessitando depois de se reunir para completar o ciclo; (ii) o fungo e o seu insecto vector podem entrar em conflito directo, por exemplo quando se dá uma invasão demasiado rápida ou precoce do hospedeiro por um interveniente pode gerar-se competição entre ambos para o seu estabelecimento; e (iii) o comportamento do insecto influencia a sua eficiência como vector (Webber & Gibbs, 1989).

Para além da inoculação dos fungos que pode fragilizar o hospedeiro pelo seu efeito patogénico, os fungos podem constituir um importante recurso para os insectos, como fonte de alimentação ou metabolitos. É do conhecimento comum a “agricultura” levada a cabo por insectos, de facto, o uso e cultura de fungos acontece em ordens distintas que incluem as formigas, as térmitas e os insectos ambrósia (Mueller *et al.*, 2005).

2.1.1. Os insectos e fungos ambrósia

Alguns escolitídeos, por exemplo os géneros *Corthylus*, *Gnathotrichus*, *Tripodendron*, *Xyleborus* e *Xylosandrus*, e quase todos os membros dos Platypodidae são considerados insectos ambrósia pois as larvas e os adultos alimentam-se principalmente de fungos que revestem as paredes das suas galerias nos hospedeiros - fungos ambrósia (Batra, 1963). Este nome mítico de origem grega significa “alimento dos deuses” e foi usado pela primeira vez por Schidberger em 1836 ao encontrar uma substância viscosa desconhecida a cobrir as galerias dos insectos onde larvas e adultos se alimentavam, que assumiu como seiva coagulada. Foi Hartig, em 1844, que reconheceu esta substância como um fungo mas, mantendo a ideia de geração espontânea, considerou que esses fungos eram originados a partir de seiva juntamente com excreções dos insectos (Hartig, 1844).

A publicação dos trabalhos de Hubard sobre os insectos ambrósia nos Estados Unidos, em 1897, foi um grande impulso para investigações posteriores (Hubbard, 1897). No entanto, foi nos anos 60 a 80 do século XX, que foram publicados mais trabalhos sobre este assunto (Batra, 1963, 1966, 1967; Franck-Grosmann, 1967; Baker & Norris, 1968; Subramanian, 1983; Batra, 1985). Este tipo de associações pode ser encontrado em diversas espécies florestais, nomeadamente nos géneros *Pinus* (Lieutier, 1993), *Cupressus* (Tibberi & Battisti, 1998), *Ulmus* (Smalley *et al.*, 1993) e *Quercus* (Sousa *et al.*, 1997), sendo particularmente estudadas as simbioses com fungos do complexo *Ophiostoma/ Ceratocystis*, responsáveis pelas doenças genericamente designadas por “azulamento da madeira” (Lieutier & Lévieux, 1985; Lieutier *et al.*, 1989; Lévieux & Cassier, 1994). Mueller & Gerardo estimaram a existência de cerca de 3400 espécies de insectos ambrósia (Mueller & Gerardo, 2002).

Aspectos evolutivos da relação

O sucesso evolutivo da relação simbiótica insectos-fungos foi assegurado pela continuidade temporal (Graham, 1967). Ao longo da evolução, as variações morfológicas, químicas e comportamentais não modificaram a interdependência simbiose (Batra, 1963).

As associações insecto-fungo ancestrais das interações ambrósia basear-se-iam apenas na dispersão de esporos de fungos pelos insectos, tendo a micetofagia e micetocultura surgido secundariamente. Dois factos apoiam esta teoria: (i) existem insectos próximos dos insectos ambrósia que intervêm na dispersão de esporos não se alimentando de fungos, e (ii) os fungos ambrósia derivam de fungos não simbióticos mas dependem de artrópodes para a sua dispersão (Mueller & Gerardo, 2002).

Os insectos ambrósia surgiram pelo menos sete vezes há 20-60 milhões de anos (Mueller *et al.*, 2005). As múltiplas origens desta micetocultura não são inesperadas dada a elevada diversidade de espécies de insectos envolvidos e a importância da especialização dos hábitos alimentares na sua diversificação (Mueller & Gerardo, 2002). Do mesmo modo, e apesar dos fungos associados e transportados por insectos apresentarem adaptações morfológicas semelhantes (Cain, 1972), a análise de sequências de 18S-rDNA mostra que eles derivam de linhagens independentes, partilhando uma origem comum (Cassar & Blackwell, 1996; Rollins *et al.*, 2001); entanto, as múltiplas origens não impedem a coevolução dos insectos e fungos associados dentro de cada linha independente.

A questão da possível especificidade das associações insecto-fungo cria alguma controvérsia (Cooke, 1977). Tem sido categoricamente afirmado que cada espécie de insecto está associada a um fungo ambrósia ou complexo de fungos particular que é essencial para o desenvolvimento da sua descendência. Tem sido também sugerido que espécies de insectos proximamente relacionados estão associados com fungos também relacionados ou diferentes estirpes dos mesmos fungos, e que esses fungos estão não apenas altamente adaptados ao seu insecto simbiote mas também ao ambiente onde normalmente encontrados (Francke-Grosman, 1967). Embora isto possa ser válido para muitas associações, existem dados que evidenciam que não é sempre as

(Buchnan, 1941): pelo menos alguns insectos não estão exclusivamente adaptados para utilizar um fungo particular como já se verificou com a descendência do insecto *Xylosandrus germanus* Blandford que se alimentou de fungos não ambrósia como *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau, *C. piceae* (Münch) Bakshi e *Pestalotia* sp. (Coocke, 1977).

A componente micológica da interacção

Os fungos ambrósia foram classificados por Batra (1985) em primários e auxiliares. Os fungos ambrósia primários são altamente específicos, pelo que a sua distribuição corresponde à dos insectos seus simbiossiontes. Eles estão presentes e dominantes nas galerias onde são consumidos e são frequentemente isolados de micângios de insectos em fase de voo ou durante a abertura das galerias. Os fungos ambrósia primários são mutualistas obrigatórios, extremamente susceptíveis à secura, não sendo geralmente encontrados fora dos micângios ou das galerias dos insectos (Batra, 1966). Os fungos ambrósia auxiliares são transitórios e não específicos relativamente ao insecto simbiossionte, podendo aparecer após o desenvolvimento completo dos insectos. Eles podem estar presentes facultativamente nas câmaras larvares ou em insectos adultos, e o seu habitat e distribuição não estão relacionados com os insectos ambrósia ocasionalmente associados (Batra, 1985). Muitos destes fungos oportunistas produzem esporos mucilaginosos que permitem o seu transporte externo por diversos animais, incluindo insectos. Muitos fungos auxiliares são facilmente isolados e cultivados sendo erroneamente considerados fungos ambrósia primários (Lévieux & Cassier, 1994).

Tipicamente, os fungos ambrósia são dimórficos: crescem sob a forma ambrósia (forma de levedura) ou como micélio. As secreções das larvas e dos adultos parecem ser responsáveis pela indução da forma ambrósia que se desenvolve após o contacto físico entre o insecto e o fungo. Sob condições apropriadas, células ambrosiais podem originar micélio vegetativo e vice-versa (Batra, 1967). Este fenómeno é conhecido por pleomorfismo (Batra, 1985). A forma ambrósia que se origina no interior das galerias no hospedeiro é, então, uma das características de diagnóstico destes fungos: pode ser de cor variável e usualmente consiste em cadeias de células que formam uma paliçada compacta cobrindo o túnel principal e as câmaras (Batra, 1963).

A taxonomia dos fungos ambrósia tem sido bastante confusa e instável, embora, na sua maioria, estejam classificados em quatro géneros mitospóricos: *Ambrosiella*, *Raffaelea*, *Monacrosporium* e *Phialophoropsis*. No entanto, muito mais géneros estão envolvidos incluindo *Acremonium*, *Candida*, *Fusarium* e *Graphium*. Leveduras como *Ascoidea* sp. e *Endomycopsis* sp. podem também participar na interacção. Vários fungos que provocam danos em plantas lenhosas, como *Ceratocystis* sp., *Botryodiplodia* sp. e *Leptographium* sp., poderão ser considerados fungos ambrósia primários ou auxiliares, permanecendo a dúvida em aberto (Batra, 1963, 1967; Francke-Grosman, 1967; Baker & Norris, 1968).

Mecanismos de adaptação para o sucesso da associação

Segundo Francke-Grosman (1967), estas interacções insectos ambrósia-fungos ambrósia são consideradas ectossimbioses: o microssimbionte pode viver em órgãos especiais do macrossimbionte ou viver fora do seu corpo mas, com o intuito de ser disseminado, pode estar armazenado temporariamente em órgãos especiais de origem ectodérmica.

A maioria destes insectos apresenta órgãos especializados – micângios – que asseguram o transporte dos fungos simbióticos (Batra, 1963). Os micângios incluem glândulas de secreção que mantêm as condições favoráveis para os esporos durante as fases de voo e de dispersão dos insectos (Lévieux *et al.*, 1991). A estrutura morfológica dos micângios e a sua localização no corpo do insecto variam muito consoante as espécies, assim como a sua ocorrência nos dois sexos. Nos escolitídeos, os micângios estão presentes no sexo responsável pelo ataque dos hospedeiros (Francke-Grosman, 1967). Já para a maioria das espécies de platipodídeos acontece precisamente o contrário: os machos escolhem as árvores a colonizar mas são principalmente as fêmeas que têm os micângios (Baker, 1963, Sousa & Inácio, 2005). De salientar que são conhecidas algumas simbioses em que não existem órgãos de transporte especializados no corpo do insecto (Lévieux & Cassier, 1994), ocorrendo apenas o transporte passivo de fungos aderentes ao exosqueleto e também através do seu conteúdo intestinal (Baker, 1963). Noutros ainda,

observam-se relações mais complexas como sucede com o transporte de esporos de Ophiostomatales por ácaros, em certos insectos sub-corticais (Moser, 1985).

A dispersão de esporos vectorizada por insectos é conhecida em muitos grupos de fungos, incluindo Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e fungos mitospóricos, assim como Myxomycota e “fungos” mucilaginosos (não pertencentes ao Reino Fungi) (Abbott, 2002). Muitos destes fungos desenvolveram adaptações específicas ao seu transporte por insectos, como a produção de esporos aderentes ou recolhidos em estruturas ou gotas mucilaginosas, emissão de substâncias odoríferas fétidas e secreções açucaradas odoríferas e formação de esporos em estruturas elevadas (corémios ou peritecas com colos longos) (Abbott, 2002).

Vantagens do mutualismo

A simbiose com os fungos oferece diversas vantagens para o insecto: os fungos constituem uma fonte de alimento para os insectos ambrósia que não se alimentam exclusivamente de madeira (xilomicetófagos), participam na decomposição dos tecidos da madeira facilitando a construção de galerias e criando condições favoráveis para o adequado desenvolvimento dos descendentes, contribuem para o declínio das árvores e induzem a produção de feromonas (Christansen & Hornvedt, 1983). Sendo transportados pelos insectos, os fungos encontram um mecanismo eficaz de disseminação e um método de inoculação directa nos hospedeiros mais favoráveis para o seu crescimento (Subramanian, 1983; Beaver, 1989).

As hifas constituem uma fonte mais rica em proteínas do que a madeira morta, sendo capazes de concentrar o azoto a partir de substratos em que este ocorre em concentrações muito baixas (Martin, 1979; Swift & Boddy, 1984). Para além dos compostos azotados, os fungos produzem esteróis essenciais para o desenvolvimento de diversas fases do ciclo de vida dos insectos (Norris, 1976). Segundo Kok (1979), o ergosterol é o nutriente essencial e crítico que forma a base química da relação mutualista insecto-fungo. Também poderão estar envolvidas vitaminas produzidas pelos fungos.

Para além das vantagens de que ambos os intervenientes das relações mutualistas beneficiam, existem também alguns custos associados à perda de independência de cada um: os esporos dos fungos ambrósia não estão expostos em corpos de frutificação na superfície da madeira e estes fungos estão dependentes da sobrevivência da nova geração de insectos para a sua dispersão e inoculação, sendo provável que a mortalidade dos insectos durante a sua fase de dispersão seja elevada. Os fungos ambrósia deixam de controlar o seu próprio crescimento vegetativo e normalmente abdicam da reprodução sexuada. A produção de descendência de insectos ambrósia e o seu desenvolvimento está dependente do crescimento de fungos ambrósia nas galerias e não de alimento obtido directamente da madeira ou do floema do hospedeiro. O sucesso de uma geração está ainda dependente da sobrevivência e comportamento da sua fêmea progenitora. Há também um custo energético para o adulto na manutenção de micângios especializados (Beaver, 1989).

A associação insecto-fungo não deve ser considerada independentemente do hospedeiro onde ambos vivem. Para a maioria dos insectos ambrósia, a árvore é um interveniente essencialmente passivo pois está já em declínio na altura do ataque, mas quando a árvore está viva, exerce uma defesa activa contra os ataques dos insectos e fungos (Sousa, 1996). Muitos insectos ambrósia são, assim, classificados como insectos secundários, que atacam hospedeiros em decadência ou mortos que estão já a ser explorados pelo menos por um insecto xilófago primário mais agressivo ou mortal para a árvore (Furniss & Carolin, 1977). No entanto, existem já citados na literatura vários exemplos de espécies que atacam preferencial ou obrigatoriamente árvores sãs e que ainda manifestam uma defesa activa contra o ataque dos insectos e dos fungos (Kühlholz *et al.*, 2003). A relação entre árvore-insecto e árvore-fungo é, então, antagonista e não mutualista (Beaver, 1989).

2.1.2. Relações com outros fungos

Para além dos fungos directamente envolvidos na alimentação, existem também outros géneros associados ao insecto, como fungos patogénicos para o hospedeiro que podem ser importantes na sua selecção e colonização pelo insecto. Estes fungos desempenham um papel tão importante na interacção insecto-fungo-hospedeiro quão saudável é a árvore colonizada. Os insectos que invadem e se desenvolvem em árvores sãs e vigorosas empregam duas tácticas para suprimir a capacidade do hospedeiro activar os seus mecanismos de resistência: o ataque massivo e a inoculação de fungos patogénicos (Kirkendall *et al.*, 1997). De facto, estes fungos provocam o declínio rápido da planta criando as condições ideais para o estabelecimento dos insectos (Lévieux *et al.*, 1991). Os efeitos do insecto no hospedeiro podem, assim, assumir duas vertentes: como agente nocivo (efeito directo) e como vector de fungos potencialmente patogénicos (efeito indirecto) (Sousa, 1996).

O uso de hospedeiros mortos ou em decadência é a mais fácil e, em termos evolutivos, a mais básica estratégia de colonização, uma vez que não envolve nenhuma capacidade especial do insecto para ultrapassar os mecanismos de resistência constitutiva ou induzida do hospedeiro (Külholz *et al.*, 2003). São poucos os insectos ambrósia que invadem hospedeiros vivos e vigorosos (Rollins *et al.*, 2001). No entanto, Külholz *et al.* (2003) identificaram cinco factores que podem conduzir a um aumento dos ataques de insectos ambrósia secundários a árvores sãs: i) uma fase de voo precoce antes da árvore hospedeira ter recuperado a capacidade de resistir ao ataque na Primavera, possivelmente associada a alterações climáticas; ii) independência nutricional do hospedeiro o que possibilita ao insecto alimentar-se de fungos ambrósia que vivem em tecidos mortos em árvores vivas; iii) fungos potencialmente patogénicos podem tornar-se mais agressivos com as alterações climáticas ou por hibridação com estirpes exóticas; iv) comportamento críptico dos insectos que facilita o seu transporte internacional e o estabelecimento de espécies e genótipos exóticos; v) uma ecologia química complexa que permite aos insectos ambrósia secundários localizar árvores sob stress que poderão ser hospedeiros temporários adequados para os insectos.

Vários mecanismos foram já há muito propostos para a interpretação da morte súbita dos hospedeiros causada pela actividade dos fungos patogénicos, nomeadamente: a produção de toxinas, a penetração do micélio nos tecidos vegetais, a formação de

vesículas de gás no interior das células ou de outras partículas que obstruam os espaços intracelulares (Anderson, 1960; Agrios, 2005). Estas acções, aliadas à actividade de escavação das galerias levada a cabo pelos insectos, causam sérias perturbações fisiológicas nas árvores, tais como o stress hídrico, o bloqueio da circulação da seiva, a diminuição dos nutrientes na planta e a redução da concentração de monoterpenos, que acabam por conduzir à sua morte (Horntvedt *et al.*, 1983; DeAngelis *et al.*, 1986, Nebeker *et al.*, 1993).

Para muitas espécies de insectos tem sido verificada uma correlação directa entre a sua presença no hospedeiro e o aparecimento de doenças nas árvores. Assim, de acordo com Beaver (1989), grande parte dos patogénios com maior impacte económico em povoamentos florestais é transmitida por insectos, sendo bem conhecidos os casos de escolitídeos e platipodídeos na dispersão de fungos extremamente gravosos para os ecossistemas florestais (Lieutier & Levieux, 1985; Bright, 1993) tais como *Ceratocystis*, *Graphium*, *Leptographium* e *Ophiostoma* (Subramanian, 1983; Léviex & Cassier, 1994). Estudos filogenéticos baseados em sequências de rDNA concordantes com padrões de sensibilidade à ciclohexamida mostram que os fungos ambrósia estão próximo de espécies de *Ophiostoma* e *Ceratocystis* (Cassar & Blackwell, 1996).

2.2. O CASO PARTICULAR DE *Platypus cylindrus* EM SOBREIRO

P. cylindrus é um insecto da ordem Coleoptera, família Platipodidae, que foi descrito por Fabricius em 1801. O nome vulgar é Plátipo e os nomes específicos *P. cylindriciformis* Reitter e *P. bimaculatus* Duft. são seus sinónimos (Cabral & Ferreira, 1999).

O género *Platypus* compreende 550 espécies, das quais apenas *P. cylindrus* e *P. oxyurus* Duf. se encontram na região Paleártica (Ferreira & Ferreira, 1989). A distribuição geográfica de *P. cylindrus* compreende a Europa Meridional (Espanha, França, Itália e Portugal), Alemanha Ocidental, Argélia, Marrocos, Japão, Cáucaso, Arménia e Iraque. Para além do sobreiro, *P. cylindrus* tem como plantas hospedeiras outros carvalhos (*Q. rotundifolia* Lam., *Q. robur* L.), o castanheiro (*Castanea sativa* Miller), o choupo (*Populus* spp.), o eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), o freixo (*Fraxinus* spp.), o

ulmeiro (*Ulmus* spp.), a faia (*Fagus sylvatica* L.) e a cerejeira (*Prunus avium* L.) (Ferreira & Ferreira, 1991; Cabral & Ferreira, 1999; Sousa, 2002).

P. cylindrus é considerado um insecto xilomicetófago e ambrósia pois as suas larvas alimentam-se sobretudo de micélio dos fungos ambrósia que se desenvolvem nas paredes das galerias que vai construindo no hospedeiro (Batra, 1963).

Os adultos de *P. cylindrus* atingem um comprimento de 5 a 7 mm e 1,5 mm de largura, têm corpo alongado, castanho-escuro e pubescência amarelo-dourado, a cabeça é visível quando se observa o insecto dorsalmente (Figura 1). O pronoto é brilhante, com pontos muito finos no disco e grosseiros lateral e posteriormente, com um disco sulcado a meio do terço posterior. Élitros sub-paralelos com estrias e interestrias pontuadas, carenadas e terminadas por denticulos na parte superior do declive. Os machos apresentam a terceira interestria tuberculada e a oitava interestria terminada num dente pequeno apical quitinoso; bordo apical e declive dos élitros muito pubescentes. As fêmeas têm élitros inermes, muito pubescentes no ápice. As larvas são ápodas, cilíndricas e brancas com um protórax grande. As pupas são brancas, com os apêndices dos imagos. Os ovos são brancos, ovais e translúcidos, e são depositados em grupos de 3-4 no fim das galerias (Ferreira & Ferreira, 1991, Sousa, 2002).

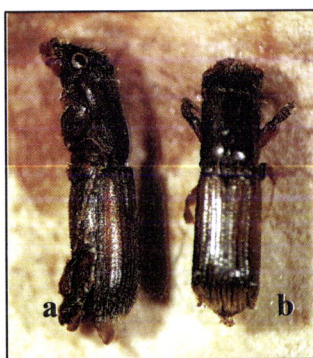


Figura 1 - Fotografias de *Platypus cylindrus*: a) fêmea, b) macho (10x).

É possível encontrar insectos adultos em voo durante as estações quentes: a sua emergência ocorre aproximadamente de Maio a Outubro nas condições portuguesas. A dispersão e duração dos insectos são directamente influenciadas pela conjugação de factores ambientais e populacionais dos insectos (Sousa & Inácio, 2005).

O mecanismo de selecção dos hospedeiros não está ainda totalmente esclarecido: obedece provavelmente a estímulos complexos, em particular olfactivos, e não apenas à silhueta das árvores (Chararas, 1979; Byers *et al.*, 1985). A composição e a concentração de substâncias voláteis, humidade da madeira, pressão osmótica e o fluxo de seiva são factores que poderão também influenciar a escolha (Graham, 1968; Sousa *et al.*, 2005). A elevada densidade de ataque de *P. cylindrus* na mesma árvore sugere a existência de mecanismos de atracção complexos envolvendo a produção de uma cairomona e uma feromona de agregação (Algarvio, 2000; Novas, 2001; Correia, 2003; Teixeira, 2003; Sousa & Inácio, 2005).

São os machos que iniciam a colonização das árvores, seleccionando as mais susceptíveis e iniciando a abertura de um corredor de entrada da galeria (1-2 cm) (Sousa, 2002). Após a instalação na árvore, os machos atraem as fêmeas, dando início ao único acto de acasalamento de todo o ciclo de vida do casal. Esta espécie reproduz-se durante dois anos consecutivos, originando 150 a 200 ovos por fêmea. A fêmea começa então a escavar as galerias a partir do corredor de entrada, inoculando-as simultaneamente com os fungos ambrósia, enquanto o macho vai removendo o serrim para o exterior. A galeria pode tornar-se bastante complexa devido ao número variável de ramificações em diferentes planos relativamente ao inicial. As posturas são efectuadas de forma escalonada desde o Outono até à Primavera seguinte, podendo encontrar-se ovos, larvas, pupas e adultos nas galerias. O comportamento e fecundidade das fêmeas dependem de vários factores como o espaço disponível na galeria, o alimento e o número de larvas em desenvolvimento. Os ovos eclodem duas a seis semanas após a postura e sucedem-se seis fases larvares. Durante o desenvolvimento das larvas, os machos mantêm-se nos primeiros centímetros da galeria, protegendo-a e impedindo as larvas de sair. A ninfose inicia-se após a clausura da galeria com serrim e excrementos. O desenvolvimento das larvas e das pupas é lento, demorando cerca de cinco meses desde o ovo até ao adulto. O período de emergência no primeiro ano do ciclo de vida dos insectos é mais alargado do que no segundo pois, neste ano, como as galerias já estão construídas o período de postura é menos prolongado (Baker, 1963; Sousa, 2002; Sousa & Inácio, 2005).

Para o sobreiro, a simbiose entre o insecto *P. cylindrus* e os seus fungos ambrósia tem vindo a tornar-se mais relevante no panorama português acompanhando, assim, o

problema do declínio do montado. A sua recente explosão populacional, desencadeada sobretudo na zona meridional do país, leva a relacionar os seus ataques com o processo actual de declínio dos montados de sobro e azinho (Sousa *et al.*, 1995; Sousa & Débouzie, 2002).

2.2.1. Importância económica, ecológica e social do sobreiro

O sobreiro - *Quercus suber* L. (1753) - é uma árvore da família *Fagaceae* (*Angiospermae*) também conhecida como sobro, chaparro (árvore jovem) ou sobreira (árvore imponente) (Natividade, 1950). É uma árvore muito antiga, que se supõe existir há cerca de 30 milhões de anos e da qual se conhecem inúmeros testemunhos fósseis (MADRP, 2000). Considera-se que terá tido origem mediterrânica, encontrando-se actualmente as maiores extensões contínuas no sudoeste da Península Ibérica e nas costas magrebina (Marrocos, Argélia e Tunísia). Encontram-se também na Europa atlântica (noroeste da Península Ibérica e Landes francesa), na costa mediterrânica de Espanha, França, Itália e ilhas do Mediterrâneo ocidental (Baleares, Córsega, Sardenha e Sicília) e pontualmente no Mediterrâneo oriental (ex-Jugoslávia, Albânia e Grécia) (Correia & Oliveira, 2002). Em Portugal, encontra-se em todo o território, excepto nas regiões montanhosas mais frias e excessivamente húmidas do norte e centro, nas regiões salinas, junto ao litoral e nas zonas de acentuada continentalidade, caso das regiões fronteiriças do centro e sul (Correia & Oliveira, 2002).

O sistema agro-florestal em que o sobreiro se encontra inserido é um sistema estável, sustentável, multifuncional e em equilíbrio com o meio natural, assegurando uma diversidade biológica rica e constituindo uma barreira eficaz às tendências desertificantes que têm vindo a ocorrer numa parte importante das regiões mediterrânicas (MADRP, 2000).

As florestas de sobreiros representam um contributo importante para a economia e a ecologia: Portugal é o principal produtor, possuindo cerca de 736 000 ha de exploração, que representam 32,5% da área total de montado de sobro, seguido de Espanha, Argélia e Marrocos (DGF, 2006). A fileira do sobreiro e da cortiça é responsável por cerca de 60% do balanço das exportações do sector florestal português, caracterizando-se, a par

dos vinhos, como um dos poucos sectores positivos dentro de um cenário agrícola de crescente importação (Zacarias, 2002). A importância económica dos povoamentos suberícolas não se limita apenas à sua produção principal, a cortiça, uma vez que os sobreiros são geradores directos de outros produtos valorizáveis, como frutos e folhas, com interesse para a alimentação animal, despojos das podas, desbastes e abates utilizados para carvão ou lenha de queima para uso doméstico ou industrial. Por outro lado, o sob-coberto dos montados, para além de ser rico numa grande variedade de plantas aromáticas e medicinais, suporta uma fauna cinegética de valor económico relevante, bem como uma grande variedade de cogumelos silvestres, sendo também aproveitado, por vezes em excesso, como área de pastagem natural ou de cultivo de arvenses para sistemas pecuários extensivos (MADRP, 2000). É também inegável a importância ecológica dos montados a vários níveis: pela sua acção na atmosfera, recursos hídricos, estrutura, fertilidade e erosão do solo.

2.2.2. Principais pragas e doenças envolvidas no declínio do montado

Os problemas sanitários dos montados de sobreiro não são um fenómeno recente. Já no final do século XIX foi registada uma anormal mortalidade de sobreiros em algumas regiões do país, assim como nas primeiras décadas do século seguinte (Pestana, 1898; Baeta-Neves, 1949). Nos anos 40 observaram-se infestações de pragas que provocaram elevados prejuízos económicos e que apenas vieram a ser controladas nos anos 60, após sucessivas campanhas com o ainda autorizado DDT (Silva, 2002). Factores climáticos adversos, como períodos de seca relativamente prolongados, foram apontados como principais responsáveis por grandes surtos de mortalidade de sobreiros no passado, passando depois a ser considerados como detonadores do aparecimento ou agravamento de pragas e doenças. No entanto, Natividade (1950) destaca como possíveis causas para o declínio do montado a má gestão dos ecossistemas, com lavouras profundas, arroteias de matos e culturas agrícolas esgotantes, podas exageradas e exploração excessiva de cortiça. O declínio e morte dos sobreiros têm suscitado de novo uma crescente preocupação, atingindo, no ano 2000, o abate de um número máximo de árvores da última década (Barros *et al.*, 2002). Tanto produtores e indústrias do sector, como instituições de investigação, continuam a debater as causas, consequências e soluções para este problema.

Os principais sintomas de declínio podem resumir-se em: rarefacção da copa que fica “transparente” e apenas com folhas do ano; seca prematura das folhas, as quais ficam fixas à árvore, mesmo depois desta morrer, por um período variável, mas que pode ser superior a um ano; descoloração das folhas; existência de tufos de folhas no meio das pernas; pontas secas; aparecimento de manchas escuras e depois esbranquiçadas no exterior da cortiça; sinais no tronco e ramos da presença de fungos e insectos (Cabral & Sardinha, 1992). Distinguem-se, todavia, dois tipos de sintomatologia: (1) “morte súbita” é observado em exemplares de todas as idades e portes, e desde o amarelecimento inicial das folhas à seca integral das árvores pode decorrer pouco mais de uma semana, é identificável entre Setembro e Dezembro; (2) “declínio progressivo” é observado em árvores mais velhas, de grande porte, caracteriza-se por desfoliações parciais e morte de ramos, falta de renovação foliar, rarefacção da copa e rebentação de substituição verticilada, nos troncos e pernas. Em qualquer um dos tipos são visíveis ataques secundários de pragas e doenças da copa (Pereira, *et al.*, 1999b). Uma sintomatologia semelhante tem vindo a ser referida noutros países como França, Espanha e Marrocos, podendo incluir-se no fenómeno mais vasto do declínio das quercíneas que se tem constatado em vários países (Cabral & Sardinha, 1992; Bakry & Abourouh, 1996; Oak *et al.*, 1996; Riziero *et al.*, 2002).

Na realidade, a degradação que tem vindo a verificar-se nos montados de sobro, constitui um fenómeno cuja compreensão se reveste de elevada complexidade devendo-se, sobretudo, a um conjunto de causas múltiplas, resultado da sua interacção, sem que nenhuma delas, por si só a determine (Silva, 2002). Cabral & Sardinha (1992) agregam diversos factores que influenciam o declínio dos montados em três grupos, englobando factores de ordem social, do sistema edafo-climático e do sistema de produção, factores bióticos e abióticos e de intervenção humana. O Quadro 1 resume-os segundo os factores de predisposição, se actuam durante a vida da árvore, enfraquecendo-a; factores de indução, se actuam independentemente do vigor da árvore, mas com impacto mais grave em árvores mais fracas; factores de aceleração, se só actuam em árvores previamente enfraquecidas.

Quadro 1 – Factores que influenciam o declínio do montado de sobreiro

Factores de predisposição	Factores de indução	Factores de aceleração
<ul style="list-style-type: none"> • sobreexploração dos recursos • gestão incorrecta • ausência de acções preventivas • ocupação agrícola e pecuária intensa • perturbação da estrutura e fertilidade do solo 	<ul style="list-style-type: none"> • variações climáticas (seca) • descortiçamento e podas excessivas • intervenções no sob-coberto: remoção de ciclos de decomposição e falta de protecção 	<ul style="list-style-type: none"> • insectos • fungos • fogo

(adaptado de Cabral & Sardinha, 1992; Sousa, 1995)

O aparecimento das pragas nos montados é relativamente recente, sendo possível relacioná-lo com as alterações destes ecossistemas associadas aos sintomas de declínio. Segundo Ferreira & Ferreira (1986), em Portugal são conhecidas 92 espécies de insectos que podem causar danos no sobreiro mas nem todas têm repercussões económicas. É geralmente considerado que os desfolhadores, como os lepidópteros *Lymantria dispar* L. (limântria ou lagarta do sobreiro), *Euproctis chryorrhoea* L. (portésia) e *Tortrix viridana* L. (burgo), e o himenóptero *Periclista* spp. actuam como factores primários, enquanto os xilófagos são considerados como agentes secundários.

As primeiras referências relativas àqueles desfolhadores do sobreiro no território nacional datam do final do século XIX devido à acção de *L. dispar*. Em 1945-48 os seus níveis populacionais atingiram valores elevados, provocando danos muito severos nos povoamentos de sobreiro, sobretudo a sul do rio Tejo (Nogueira, 1967). As causas desta explosão demográfica continuam por esclarecer mas pode supor-se que a intensificação do programa de desenvolvimento agrícola privilegiando a cultura do trigo nos montados, com mobilizações profundas do solo e grandes fertilizações, contribuiu para o desequilíbrio ecológico deste ecossistema (Silva, 1944). Na sequência de tão elevados efectivos populacionais, foi amplamente utilizada a luta química como meio de controlo da espécie o que conduziu ao aumento das populações de outros desfolhadores (Baeta-Neves, 1944).

A partir da década de 80, e coincidindo com a degradação progressiva do montado de sobreiro, tem vindo a verificar-se um aumento dos ataques de espécies de coleópteros como o *Coroebus florentinus* (Herbst.) (cobrilha dos ramos), *C. undatus* (Fab.) (cobrilha da cortiça) e do xilomicetófago *P. cylindrus* (Sousa, 1995; Cabral & Ferreira, 1999).

No Quadro 2 estão resumidos os danos e sintomas e factores favoráveis das principais pragas que ocorrem actualmente nos montados em Portugal.

Quadro 2 – Principais pragas do sobreiro

Nome científico / vulgar	Ordem / Família	Sintomas	Factores favoráveis
Desfolhadores			
<i>Euproctis chrysorrhoea</i> / portésia	Lepidoptera / Lymantriidae	ninhos de folhas e fios de seda; posturas com pêlos laranja na página inferior, folhas esqueletizadas, desfolha da copa	solos pobres e secos e Verão muito quente
<i>Lymantria dispar</i> / limântria	Lepidoptera / Lymantriidae	massas cremes de posturas no tronco, desfolha da copa	árvores enfraquecidas (solos pobres e secos), com fendas na casca do tronco
<i>Tortrix viridana</i> / burgo	Lepidoptera / Tortricidae	folhas enroladas com teias de seda, destruição dos gomos, desfolha	árvores enfraquecidas (solos pobres e secos) e isoladas
<i>Periclista</i> spp. / lagarta verde	Hymenoptera / Tenthredinidae	folhas roídas, desfolha estratificada da copa	clima e solos desfavoráveis
xilófagos e sub-corticais			
<i>Coroebus florentinus</i> / cobrilha dos ramos	Coleoptera / Buprestidae	folhas avermelhadas e seca dos ramos, levantamento da casca	árvores isolada e expostas à luz solar
<i>Coroebus undatus</i> / cobrilha da cortiça	Coleoptera / Buprestidae	galerias larvares no entrecasco, exsudações amareladas na cortiça	árvores enfraquecidas, com casca fina, solos arenosos, pobres e ácidos, períodos de seca, podas e descortiçamentos excessivos
<i>Platypus cylindrus</i> / plátipo	Coleoptera / Platypodidae	folhas acastanhadas que depois caem, galerias sinuosas no lenho, orifícios circulares no tronco e serrim laranja	árvores em stress

Tem sido mencionado um grande número de fungos tanto patogénicos, como saprófitas e também simbiontes associados ao montado de sobreiro nas últimas décadas. Santos *et al.* (1999) compilaram toda essa informação consoante o órgão da árvore atacado num artigo de referência da micoflora do sobreiro em Portugal.

Os principais fungos patogénicos actualmente considerados com importância no processo de declínio dos sobreiros em Portugal são: ao nível da copa e tronco *Diplodia mutila* (Fr.) Mont, no tronco *Biscogniauxia mediterranea* (de Not.) Kuntze e *Endothiella gyrosa* Sacc. e ao nível da raiz *Armillaria mellea* (Fr.) Kummer e *Phytophthora cinnamomi* Rands., sendo este último fungo frequentemente apontado como um factor determinante da “morte súbita” dos sobreiros (Brasier *et al.*, 1992; Moreira, 2002; Tuset *et al.*, 2002) (Quadro 3).

Quadro 3 – Principais doenças do sobreiro

Nome científico / vulgar	Filo / Ordem	Sintomas	Factores favoráveis
<i>Biscogniauxia mediterranea</i> / carvão do entrecasco	Ascomycota / Xylariales	transparência da copa, fendilhamento e placas carbonáceas	períodos de seca, descortiçamento e poda excessiva
<i>Diplodia mutila</i> (<i>Botryosphaeria stevensii</i>)	mitospórico / Sphaeropsidales	amarelecimento parcial da copa, cancro, necrose, frutificação	árvores debilitadas
<i>Endothiella gyrosa</i> (<i>Endothia gyrosa</i>) / ferrugem alaranjada do entrecasco	mitospórico / Sphaeropsidales	seca dos ramos, frutificações, cirros alaranjados	árvores debilitadas, descortiçamento excessivo
<i>Armillaria mellea</i> / podridão radicular	Basidiomycota / Agaricales	“dieback” progressivo da copa; micélio, carpóforos, rizomorfos	árvores debilitadas
<i>Phytophthora cinnamomi</i> / fitóftora	Oomycota (Stramenopila) / Peronosporales	seca das árvores, podridão do colo	Invernos amenos, solos alagados

2.2.3. O enquadramento do *Platypus cylindrus* no declínio

O insecto *P. cylindrus* tem sido associado ao declínio dos sobreiros mas geralmente como praga secundária. Ataca árvores de todas as idades, independentemente da exposição e do tipo de solo. No entanto, mostra preferência por sobreiros grandes, descortiçados, enfraquecidos ou por madeira cortada, desde que mantenha um certo grau de humidade (Ferreira & Ferreira, 1991; Sousa & Debouzie, 1999). A mortalidade ocorre em árvores isoladas ou em pequenos grupos dispersos pelo montado. A morte das árvores ocorre poucos meses depois da penetração dos insectos no lenho, podendo demorar até dois anos, dependendo da resistência e do vigor de cada árvore. A cortiça é desvalorizada pois perde peso e é de má qualidade.

Os ataques de *P. cylindrus* localizam-se nos troncos e ramos de maior diâmetro. Os principais sintomas são a presença de pequenos orifícios circulares de entrada (2mm) e saída dos insectos no tronco e nos ramos e serrim laranja saindo desses orifícios (Figura 2a) na Primavera, Verão e Outono. Se o ataque for intenso, o solo junto à árvore fica também coberto deste serrim. Árvores com parte da copa verde e parte com folhas descoloridas, castanho-avermelhadas ou rosadas ou toda a copa descolorida e rarefeita (Figura 2b). A queda das folhas vai-se tornando cada vez mais acentuada mas é gradual e a maior parte das folhas permanece na copa por um período longo (Ferreira & Ferreira, 1991; Sousa & Debouzie, 1993; Cabral & Ferreira, 1999).



Figura 2 – Sintomas manifestados em sobreiros atacados por *Platypus cylindrus*: a) serrim; b) aspecto geral das árvores.

Factores climáticos, nomeadamente anos sucessivos de seca e muito quentes, e excesso de água, provocando asfixia das raízes, são factores favoráveis ao desenvolvimento de *P. cylindrus*. Do mesmo modo, técnicas culturais como podas e descortiçamentos exagerados e ferimentos na árvore. A falta de medidas de saneamento florestal, por exemplo a permanência de árvores doentes ou infestadas e lenha de poda constituem novos focos de dispersão da espécie (Sousa & Inácio, 2005).

De acordo com Sousa *et al.* (1995), pode considerar-se que *P. cylindrus* se insere numa sucessão de agentes bióticos que intervêm no ciclo de declínio do sobreiro em Portugal: a sua explosão populacional resultaria directamente de um elevado número de árvores enfraquecidas. Perturbações ao nível do solo (acidificação, teores reduzidos de cálcio e potássio e concentrações elevadas de alumínio e zinco) são favoráveis ao declínio do sobreiro, criando boas condições para a instalação do insecto. Este parece atacar sobretudo árvores com concentrações foliares reduzidas em cálcio, ferro e alumínio e instaladas em solos cuja camada superficial exiba teores reduzidos de matéria orgânica e carbono total. Solos com baixas concentrações de cálcio e elevados valores de sódio e zinco parecem também favorecer a selecção de hospedeiros por *P. cylindrus*.

No sobreiro, o ataque deste insecto ocorre frequentemente associado à presença do fungo *B. mediterranea* (Sousa & Debouzie, 1993; Sousa, 2002). O papel deste agente no declínio do sobreiro está já demonstrado (Torres Juan, 1975). A presença simultânea das duas espécies pode simplesmente ser interpretada pelas exigências similares para o seu estabelecimento no hospedeiro, no entanto, não existem trabalhos específicos sobre a relação destas duas espécies (Sousa *et al.*, 2005).

Como medidas de prevenção, para além das medidas de sanidade recomendáveis em qualquer povoamento, como sejam a remoção e queima da madeira morta antes da emergência de insectos adultos e o corte das árvores com sintomatologia de ataque (também antes da dispersão dos adultos), recomenda-se nos locais muito atacados a utilização de armadilhas constituídas por madeira recém-cortada ou com recurso a substâncias atractivas (Ferreira & Ferreira, 1991).

O desenvolvimento de armadilhas iscadas com atractivos semioquímicos no controlo das populações de *P. cylindrus* em montado de sobreiro mostra grande potencial uma vez que surge como alternativa ao eventual uso de insecticidas orgânicos e apresentam um elevado grau de especificidade (Romeiras, 1995; Algarvio, 2000). Constatou-se que o mecanismo de atracção primária envolvendo ambos os sexos de *P. cylindrus* é mediado por compostos odoríferos de sobreiro (Novas, 2001), entre os quais poderão estar o α -thujeno, canfeno e β -pineno (Algarvio, 2000). Estes compostos deverão fazer parte de uma mistura odorífera mais ampla que poderá estar relacionada com a debilidade fisiológica da planta hospedeira (Algarvio, 2000). A detecção de componentes feromonais, possivelmente em simultâneo com a detecção de alguns compostos com origem na própria planta, desencadeará um processo de colonização em massa (Algarvio, 2000; Novas, 2001). A atracção em massa de conspécíficos para uma mesma planta hospedeira permite aos insectos ultrapassar das defesas dessa planta. A feromona de agregação de *P. cylindrus* deverá ser constituída por uma mistura de três compostos: 1-hexanol, sulcatol e sulcatona (Algarvio, 2000; Correia, 2003; Teixeira, 2003) e capaz de atrair igualmente machos e fêmeas, o que poderá permitir o controlo directo deste xilomicetófago (Algarvio *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003).

Medidas correctivas de perturbações químicas do solo poderão também contribuir para uma melhoria do estado das árvores e, conseqüentemente, para o controlo de novas infestações. A toxicidade provocada por elevadas concentrações de alumínio pode, por exemplo, ser minimizada pela utilização de agentes biológicos (como fungos micorrízicos) ou meios químicos (Bondout *et al.*, 1994).

O efeito de predação para o controlo de *P. cylindrus* em montado de sobreiro é muito limitado e em Portugal conhece-se apenas um insecto predador: *Colydium elongatum* F., enquanto que em Marrocos se conhece ainda *Corticeus pini* Panz. e *Platysoma oblongum* F. Estas duas espécies existem também em Portugal mas associadas a outras pragas florestais (Sousa & Inácio, 2005).

2.2.4. Os fungos no processo de colonização e de desenvolvimento do insecto

Sendo *P. cylindrus* um insecto xilomicetófago e ambrósia, assegura o transporte de propágulos dos fungos nos micângios (Batra, 1963). Estes ocorrem em ambos os sexos, embora em maior número na fêmea (330 +/- 104) que no macho (5 – 25). São estruturas ovóides localizadas na parte superior do protórax e constituídas por cavidades semi-esféricas onde são transportados os fungos. Os micângios têm ainda glândulas secretoras que desempenham um papel importante no controlo do desenvolvimento dos fungos indesejáveis assim como na manutenção das condições favoráveis para os fungos durante o voo e dispersão dos insectos (Cassier *et al.*, 1996).

A inoculação dos fungos ocorre passivamente durante a abertura das galerias: o processo de escavação das fêmeas provoca o aumento das secreções glandulares nos micângios estimulando a saída dos esporos (Francke-Grosmann, 1967; Farris & Funk, 1965). As fêmeas preparam ainda as galerias com uma mistura de serrim e exsudados para a inoculação e desenvolvimento dos fungos (Baker, 1963), e são também mantidas condições favoráveis de temperatura e humidade dentro das galerias (Ferreira & Ferreira, 1991). A observação das galerias permite confirmar a existência de um revestimento muito fino e de cor clara, constituído por micélio dos fungos simbiotes (Inácio *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2005).

Após completar o ciclo biológico no interior da árvore, enquanto os imagos aguardam as condições ideais para iniciar a procura de novos hospedeiros, os insectos vão-se deslocando nas galerias, contribuindo para a dispersão aleatória e não específica dos fungos transportados ao longo dessas galerias (Inácio *et al.*, 2005).

Os fungos transportados e inoculados no hospedeiro são muito diversificados: *R. ambrosiae* e *R. montetyi* são fungos ambrósia primários específicos de *P. cylindrus* (Arx

& Hennebert, 1965; Morelet, 1998). Para além destes, outros fungos têm sido isolados a partir das galerias de *P. cylindrus* em *Q. suber* e outras quercíneas, assim como directamente a partir do insecto: micângios, conteúdo intestinal e exosqueleto (Quadro 4). Estes fungos terão que assegurar as funções indispensáveis de modo a permitir a eficiente colonização do hospedeiro: para além do papel na alimentação dos insectos, poderão contribuir para o enfraquecimento geral da árvore, auxiliar na degradação da madeira facilitando o processo de abertura das galerias e assegurar a gestão equilibrada das colónias fúngicas no seu interior (Sousa & Inácio, 2005; Henriques *et al.*, 2006).

Quadro 4 – Fungos associados a *Platypus cylindrus* isolados de micângios, conteúdo intestinal e exosqueleto e suas galerias nos hospedeiros

Fungos	Galerias			Insecto		
	<i>Quercus</i> sp.	<i>Q. suber</i>	<i>Q. rubra</i>	micâng.	cont. int.	exosq.
<i>Acremonium</i> sp. (syn. <i>Cephalosporium</i> sp.)	a	c				a
<i>Alternaria</i> sp.				b		b
<i>Ascoidea</i> sp.		c		c	c	
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom.		c		c		
<i>Botrytis</i> sp.	a					
<i>Candida</i> sp.	a				a	a
<i>Ceratocystis piceae</i> (Münch) B.K. Bakshi (teleom. <i>Ophiostoma piceae</i> (Münch) Syd. & P. Syd.)	a					
<i>Ceratocystis pilifera</i> (Fr.) C. Moreau	a					
<i>Ceratocystis pluriannulata</i> (Hedgc.) C. Moreau	a					
<i>Coryne sarcoides</i> (Jacq.) Tul. & C. Tul. (teleom. <i>Ascocoryne sarcoides</i> (Jacq.) J.W. Groves & D.E. Wilson)	a					
<i>Endomyces platypodis</i> J.M. Baker & Kreger (teleom. <i>Hormoascus platypodis</i> (J.M. Baker & Kreger) Arx)	a				a	a
<i>Eurotium</i> sp.				c		
<i>Fusarium</i> sp.	a					
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (teleom. <i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman)		c		c	c	
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier		c		c	c	
<i>Gliocladium solani</i> (Hartig) Petch.		c		c		
<i>Graphium</i> sp.	a					
<i>Mucor</i> sp.				b		b
Mucorales	a					
<i>Nodulisporium</i> sp.		c		c		
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	a	a				
<i>Penicillium</i> sp.	a	c		b		b
<i>Punctularia strigosozonata</i> (Schwein) P.H.B. Talbot		c			c	
<i>Raffaelea ambrosiae</i> v.Ar. & Henneb.		c		c	c	
<i>Raffaelea monteyi</i> M. Morelet			d	d		
<i>Scytalidium</i> sp.		c				
<i>Sporothrix</i> sp.	a				a	a
<i>Stysanus</i> sp.	a					
<i>Trichoderma</i> sp.				b		b
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	a	c				
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link		c				

(a - Baker, 1963; b - Cassier *et al.*, 1996; c - Sousa, 1996; d - Morelet, 1998)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Platypus cylindrus*

3.1.1. Origem do material

A recolha de material para a caracterização dos fungos associados ao insecto apresentou duas componentes: a partir de material vegetal e de galerias de insectos, e directamente dos insectos. Simultaneamente, foram utilizados em alguns estudos culturas puras de fungos associados ao insecto obtidos por Sousa (1996), assim como outros fungos de referência que servem de controlo em determinados ensaios. Estes fungos pertencem à Micoteca do Departamento de Protecção Florestal da Estação Florestal Nacional.

Para detecção e identificação de fungos a partir de galerias e material vegetal foram abatidas árvores atacadas pelo insecto, estando o abate destas árvores dependente da autorização pelas entidades competentes, e os toros transportados para o laboratório. As superfícies cortadas foram revestidas com parafina a fim de evitar a sua desidratação e os toros foram mantidos, durante todo o ensaio, numa sala fechada e exclusiva para o efeito. Uma parte dos toros foi dissecada para o isolamento de fungos das galerias e da madeira sã, o restante material permaneceu intacto para a captura de insectos adultos.

Os insectos adultos foram através de um sistema composto por um saco de tecido transparente (étamine) e um tubo plástico colocado sobre o orifício de entrada do insecto. Uma junta de plasticina isolou a superfície de contacto (Figura 3) (Sousa, 1996).

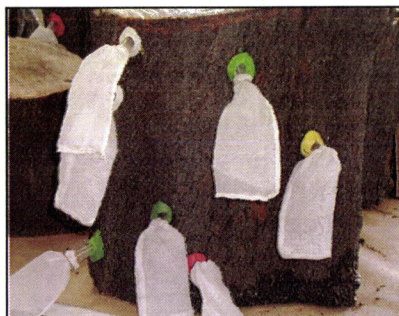


Figura 3 – Toros instalados no laboratório para recolha de insectos.

Os fragmentos de madeira foram recolhidos assepticamente seguindo uma estratificação espacial de acordo com Baker (1963) e Sousa (1996): cortiça, entrecasco, secção antes da localização dos parentais, secção larvar, câmara pupal e extremidade das galerias (Figura 4). Para cada secção assim definida foram obtidas 6 amostras do revestimento, da madeira da galeria, da madeira a 0,5 cm de distância da galeria e a 1,0 cm de distância. De cada uma destas amostras foram efectuadas seis repetições.

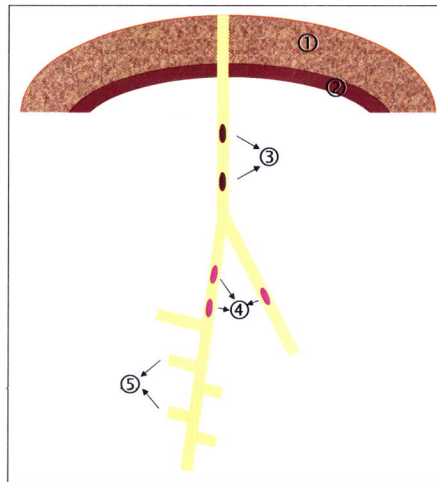


Figura 4 – Estratificação espacial das galerias: 1. cortiça; 2. entrecasco; 3. parentais; 4. larvas; 5. câmara pupal (adaptado de Sousa, 1996).

Todos os insectos foram recolhidos assepticamente e colocados em tubos individualizados, sendo preferencialmente analisados de imediato ou conservados a cerca de 4° C até à sua utilização. Os insectos foram dissecados de modo a possibilitar o isolamento directo de fungos a partir dos élitros ou outras partes do exosqueleto, dos micângios e do conteúdo intestinal. Foram amostrados 100 insectos em cada ano (2004, 2005 e 2006).

3.1.2. Observação dos insectos

Parte dos insectos adultos capturados foram observados para confirmar a sua identificação e analisar as suas estruturas de transporte de fungos por *P. cylindrus*. Para além da visualização global do insecto com lupa binocular, micângios de machos e de fêmeas foram examinados em microscopia óptica e os seus orifícios contados. Os

insectos foram também observados em microscopia electrónica de varrimento (SEM – Scanning Electron Microscopy) de modo a verificar a presença e forma de inóculo fúngico transportado. Foram ainda fotografados outros aspectos do insecto em SEM. Os exemplares sofreram uma metalização a ouro: paládio (98: 2) e foram observados num microscópio JOEL 35 SEM.

3.1.3. Isolamento e caracterização dos fungos

A preparação do material foi efectuada de acordo com a metodologia de Norris & Baker (1968): antes de efectuar o isolamento dos fungos, de modo a evitar a contaminação exterior, tanto os insectos como os fragmentos de madeira foram imersos numa solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 1 minuto, depois passados por água destilada esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado, sendo colocados individualmente em tubos esterilizados ou seguindo de imediato o procedimento de isolamento.

Os insectos foram dissecados à lupa binocular, sendo-lhes retirados os élitros (como amostra do exosqueleto), micângios e conteúdo intestinal que prosseguiram directamente para isolamento. No primeiro ano de amostragem (2004) todos os insectos foram preparados de acordo com o método da esterilização fraccionada de Francke-Grosmann (1967) e modificado por Batra (1985). Esta técnica consiste na exposição dos insectos a condições de humidade durante 12 horas, seguidas de uma secagem por igual período, sendo o ciclo repetido três vezes consecutivas. Em 2005 e 2006, apenas 20 insectos por ano foram sujeitos a esta técnica antes do isolamento e os restantes 80 insectos da amostra prosseguiram directamente para o isolamento após emergirem.

Após o processo de desinfeção exterior, tanto os fragmentos de madeira como as partes dos insectos foram transferidas para placas de Petri de 50 mm de diâmetro com 10 ml de meio gelosado de extracto de malte (MEA, Difco™ Malt Agar), suplementado, após autoclavagem e arrefecimento a 45° C, com 500 mg de estreptomicina por litro de meio (MEA + E) e MEA suplementado do mesmo modo com 500 mg (Upadhyay, 1981) de ciclohexamida (MEA + C) por litro de meio. A estreptomicina é um antibiótico de largo espectro que actua contra bactérias permitindo o crescimento normal da maioria dos fungos (Hawksworth *et al.*, 1995), enquanto a ciclohexamida para além de

antibacteriano é também um composto antifúngico usado para seleccionar fungos do complexo *Ceratocystis/ Ophiostoma* (Harrington, 1981; Hawksworth *et al.*, 1995). As placas foram incubadas na obscuridade a $25\pm 1^\circ$ C até ao aparecimento de micélio, sendo as diferentes colónias de fungos isoladas por repicagens sucessivas em MEA até à obtenção de culturas a partir das quais se estabeleceram culturas monospóricas.

As diversas culturas obtidas foram quantificadas e agrupadas de acordo com as suas características macroscópicas tendo sido escolhidos representantes de cada grupo para identificação ao nível do género.

Fungos representantes de cada grupo de fungos foram transferidos para MEA inclinado em frascos MacCartney e conservados a 4° C, assim como para frascos de água destilada esterilizada igualmente conservados, de modo a garantir a sua preservação e viabilidade para posteriores estudos.

A identificação dos fungos foi baseada nas características culturais e morfológicas dos conidióforos e conídios de acordo com Ellis (1971, 1976), Lanier *et al.* (1978), Kiffer & Morelet (1997) e Barnett & Hunter (1998). Para uma melhor observação dos isolados fizeram-se, para além de preparações extemporâneas, lâminas de Riddell de modo a evitar a destruição das estruturas reprodutivas dos fungos. Todos os trabalhos de microscopia óptica foram efectuados no microscópio Olympus BX41TF.

Os géneros mais frequentes (mais do que 10% do total de isolados obtidos) ou cujas referências na bibliografia consultada indicaram alguma relevância ao nível da interacção insecto-fungo-hospedeiro prosseguiram nos estudos de caracterização e função desempenhada nesta interacção.

Caracterização morfocultural e sensibilidade à ciclohexamida

Para cada um dos géneros de fungos foi feita a caracterização cultural, morfológica e biométrica dos conídios. Simultaneamente, e de modo a complementar as identificações baseadas em caracteres morfológicos, foi efectuada a amplificação e sequenciação de

regiões do DNA ribossomal de acordo com a informação bibliográfica referente a cada género.

A observação macroscópica dos fungos foi baseada em culturas em meio dextrosado de batata (PDA, DifcoTM Potato Dextrose Agar) em placa de Petri de poliestireno de 90 mm, com 20ml de meio, incubadas na obscuridade a $25\pm 1^\circ$ C. Como inóculo, foram utilizados cilindros, com 5 mm de diâmetro, retirados da zona periférica de cada uma das colónias dos fungos em estudo. Foram registados e fotografados os seguintes aspectos das culturas (frente e verso): aspecto cultural, densidade, coloração, frente de crescimento, aspecto à transparência e zonagem. A cor das culturas foi determinada por comparação com a carta de cores de Saccardo (1891).

A caracterização morfológica, tanto das estruturas reprodutivas assexuadas como das estruturas vegetativas, baseou-se na observação microscópica dos fungos com recurso a lâminas de Riddell, preparações extemporâneas montadas com água destilada, lactofenol ou coradas com azul de algodão e respectivo registo fotográfico.

Com o objectivo de induzir a produção de estruturas sexuadas em fungos eventualmente autoférteis, utilizou-se o meio de cultura constituído por uma base mínima de sais e palitos previamente autoclavados dispostos em “N” ligeiramente embebidos no meio. Dois inóculos do mesmo isolado foram colocados a cerca de 1 cm do bordo da placa, em posições opostas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e sob luz fluorescente permanente durante vários meses, até ao aparecimento de qualquer tipo de estrutura. Este meio de cultura foi descrito por Guerber & Correll (2001) e a metodologia adaptada a este trabalho.

A biometria dos conídios dos diferentes fungos foi determinada tanto em PDA como em gelose de folha de craveiro (CLA, Carnation Leaf Agar) (Crous *et al.*, 1992) sendo as placas de cultura incubadas na obscuridade a $25\pm 1^\circ$ C durante cinco a dez dias. Para cada meio de cultura, foram medidos 40 conídios por fungo em preparação extemporânea, utilizando uma ampliação de x600. Na interpretação dos resultados fez-se a análise de variância do comprimento e da largura dos conídios dos diferentes fungos comparando o efeito dos dois meios de cultura, através do programa STATISTICA (version 6 - StatSoft, Inc., 2003), tendo-se utilizado o teste de Wilks’

lambda na comparação de médias. Foi também efectuada a análise de variância dos valores das dimensões dos conídios de dois isolados de *Raffaelea* sp. nos dois meios e para comparação das médias recorreu-se ao teste LSD.

Determinaram-se as temperaturas mínimas, óptimas e máximas para o crescimento micelial dos fungos em estudo. As placas de Petri, contendo 20 ml de PDA, foram inoculadas e colocadas em estufas de incubação na obscuridade, durante 14 dias. As temperaturas estudadas foram 0°; 2,5°; 5°; 7,5°; 10°; 15°; 20°; 25°; 27,5°; 30°; 32,5°; 35°; 37,5°; 40°; 42,5° e 45°C. Para cada fungo, foram efectuadas seis repetições por temperatura. Diariamente, ou de dois em dois dias no caso de fungos com taxa de crescimento mais lenta, efectuou-se a medição do diâmetro da colónia segundo duas direcções ortogonais para cada repetição.

Para cada fungo foi analisada a evolução do crescimento micelial acumulado e dos acréscimos diários para as diferentes temperaturas testadas. Considerando o diâmetro atingido após a fase de crescimento exponencial ou, nos casos em que essa fase não foi evidente, o valor mediano das dimensões aferidas ao longo do tempo, foi registado o número de dias que cada fungo levou a atingir esses diâmetros, para as temperaturas que apresentaram valores de crescimento óptimos próximos. Foram comparadas as médias desses valores utilizando um teste T, de modo a definir os intervalos de temperaturas óptimas de crescimento.

Para testar a tolerância/ sensibilidade dos fungos cujos teleomorfos poderiam pertencer ao complexo *Ophiostoma* avaliou-se o seu crescimento em placas de Petri de 90 mm com 20 ml de MEA suplementado com as seguintes concentrações de ciclohexamida: 0, 5, 10, 100, 500 e 1000 ppm, incubadas na obscuridade a 27,5±1° C durante 5 dias (Harrington, 1981; Wingfield, comunicação pessoal). Testaram-se três isolados diferentes para cada fungo e um isolado de *O. ulmi* como controlo positivo, com 6 repetições de cada isolado. Os resultados foram obtidos por comparação do crescimento em MEA não suplementado (0 ppm), sendo registando “+” para crescimento ou “-“ para ausência de crescimento.

Análise molecular

A análise molecular dos isolados baseou-se na amplificação e sequenciação de regiões do DNA ribossomal de acordo com a informação bibliográfica referente a cada género, de modo a permitir a comparação com sequências já publicadas. Esta fase do trabalho foi levada a cabo pela empresa STABVIDA, Oeiras.

A extracção do DNA foi realizada com o kit “Puregene® DNA Purification Kit”, específico para fungos, seguindo o protocolo próprio. A avaliação da quantidade e qualidade do DNA obtido foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em TAE (em solução tampão Tris-acetato 40 mM EDTA 1mM pH 8.0). A electroforese decorreu durante 20 minutos a 110 volts e utilizou-se 10 µl da amostra, 1 µl de Loading Dye (azul de bromofenol) e o marcador Λ PST I (Fermentas).

A partir dos extractos de DNA genómico procedeu-se à amplificação das regiões escolhidas para cada género. No Quadro 5 estão descritos a região amplificada, os primers utilizados e respectivas referências bibliográficas para cada um dos géneros.

Quadro 5 – Região amplificada e respectivos primers utilizados para cada fungo

Fungo	Região amplificada	Primers	Referências bibliográficas
B5/ B6	18S rDNA	NS3 GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	White <i>et al.</i> , 1990; Cassar & Blackwell, 1996, Jones & Blackwell, 1998 e Rollins <i>et al.</i> , 2001
		NS6 GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	
B7	ITS1-5,8S-ITS2 rDNA	ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	Zuccaro <i>et al.</i> , 2004
		ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
B8	ITS1-5,8S-ITS2 rDNA	ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990; Collado <i>et al.</i> , 2001; Platas <i>et al.</i> , 2002
		ITS5 GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	
B4	18S rDNA	1500F GATGCCCTTAGACGTTCTGG	Ueda-Nishimura & Mikata, 1999; Ueda-Nishimura & Mikata, 2000
		550F GCAGCCGCGGTAATTCCAGC	
B2	ITS1-5,8S-ITS2 rDNA	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1991; Hermosa <i>et al.</i> , 2000
		ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	
P23	28S rDNA	LROR GTACCCGCTGAACTTAAGC	Rehner & Samuels, 1994
		LR7 TACTACCACCAAGATCT	

Cada reacção de amplificação foi realizada num volume final de 50 µl contendo a mistura indicada no Quadro 6, à qual se adicionou 1 µl de DNA. Utilizou-se um controlo positivo e um negativo na Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR decorreu segundo o programa referido no Quadro 7, num aparelho PCR My Cycler (Biorad).

Quadro 6 - Composição da mistura usada na amplificação de DNA dos fungos na técnica PCR

Reagente	Concentração
Tampão PCR	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP's	0,2 mM
Primer Forward	0,2 µM
Primer Reverse	0,2 µM
Taq	0,02 U/µl

Quadro 7 - Programa de amplificação de PCR utilizado

Etapa	Temperatura [°C]	Tempo [minutos]	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5min	1
Desnaturação	94°C	1min	35
“Annealing”	50°C	1min	
Extensão	72°C	1min	
Extensão final	72°C	5min	1
Arrefecimento final	4°C	”	1

A análise do produto amplificado foi feita por electroforese em gel de agarose a 1% em TAE. A electroforese decorreu durante 20 minutos a 110 volts e utilizou-se 5 µl da amostra e 1 µl de Loading Dye (azul de bromofenol) e o marcador Λ PST I (Fermentas).

A purificação dos produtos de PCR foi feita com o kit “Jet Quick PCR Purification Spin Kit” (Genomed) de acordo com o protocolo próprio.

As reacções de sequenciação foram efectuadas usando os primers de PCR com Kit BDT v1.1 (Applied Biosystems). A electroforese capilar decorreu no sequenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados com o Software Sequencing analysis 3.7.

Utilizou-se o programa BioEdit versão 7.0.5.3 para juntar as sequências complementares e o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast) para pesquisar sequências homólogas no GenBank (NCBI); o alinhamento foi efectuado com BioEdit e as análises filogenéticas foram realizadas usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004).

3.2. AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS FUNGOS NA ECTOSSIMBIOSE

Com o objectivo de avaliar a importância e a função dos fungos isolados foram realizados vários testes específicos determinantes da sua participação na interacção insecto-fungo-hospedeiro: o potencial de degradação de madeira e a acção antagonista dos diferentes fungos. A determinação dos fungos directamente envolvidos na alimentação dos insectos foi efectuada através da análise dos seus conteúdos intestinais.

3.2.1. Degradação de madeira

Foi efectuado um rastreio da potencial actividade celulolítica e lenhicolítica dos fungos em estudo utilizando testes colorimétricos que se baseiam fundamentalmente em alterações de cor dos substratos usados nos meios de cultura.

Detecção de celulasas

A análise da actividade celulolítica foi efectuada com recurso ao teste baseado nas características da celulose-azure. Sendo a celulose-azure um corante associado a cadeias de celulose, quando as celulasas actuam, esta associação desfaz-se e o corante liberta-se, difundindo-se no meio geloso. O grau relativo de celulólise detecta-se pela maior ou menor quantidade de cor azul que se difunde da camada superior para o meio basal A. Assim, e de acordo com Valente *et al.* (2002), procedeu-se do seguinte modo:

- Preparação do meio A – adicionou-se 0,1 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 20 mg de KCl, 20 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 ml de água destilada, acertou-se o pH para $4,5 \pm 0,2$ e, por

fim, adicionou-se 1,2 g de agar. O meio foi dissolvido e dividido por tubos com 6 ml de meio cada um. Estes foram autoclavados a 121° C, durante 15 minutos, e deixados à temperatura ambiente até solidificarem.

- Preparação do meio B – adicionou-se 0,05 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 mg de KCl, 20 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33 ml de água destilada; acertou-se o pH para $4,5 \pm 0,2$ e, por fim, adicionou-se 0,6 g de agar. Dissolveu-se e autoclavou-se o meio, sendo depois mantido em banho-maria a 60° C.
- Preparação de solução de celulose-azure – suspendeu-se 0,5 g de celulose-azure (Sigma) previamente autoclavada em água destilada e esta foi deixada durante a noite em agitação. No dia seguinte, de modo a lavar a celulose-azure e retirar o corante não associado à celulose, foram efectuadas centrifugações até que o sobrenadante se apresentasse transparente. Adicionou-se ao precipitado final 17 ml de água destilada e, a quente, adicionou-se o meio B à celulose-azure, constituindo esta mistura o meio C. Em condições de assepsia, a cada um dos tubos com meio A preparados, adicionou-se 1,5 ml do meio C. Os tubos foram inoculados e mantidos a 30°C na estufa durante 17 dias.

Detecção de lenhinases

Para detecção das lenhinases recorreu-se a três tipos de meios cuja constituição é semelhante possuindo apenas diferentes substratos na sua composição. Estes ensaios são considerados presuntivos pois utilizam-se compostos corantes que são degradados pelo complexo enzimático que é comum às lenhinases. Assim, uma diminuição da intensidade da cor característica do meio, resultado da degradação do composto corante inicial, indicia que o fungo presente é potencialmente degradador da lenhina. O uso de diferentes substratos confere fiabilidade em caso de concordância de resultados. Os diferentes meios foram preparados de acordo com Valente *et al.* (2002):

- Meio de azul dextrano – adicionaram-se 0,5 g de glucose, 0,025 g de peptona micológica, 0,0025 g de extracto de levedura, 0,125 g de azul dextrano, 3,75 g de agar e 250 ml de água destilada. Depois de dissolvido o meio foi autoclavado e plaqueado. As placas inoculadas permaneceram na estufa a 30°C durante 25 dias.

- Meio de azul de Coomassie – este meio foi preparado de modo semelhante ao anterior mas substituindo o azul dextrano por 0,0125 g de azul de Coomassie. As placas permaneceram na estufa a 30°C durante 25 dias.
- Meio de azul de metileno – de preparação idêntica ao primeiro meio mas usando 0,00125 g de azul metileno em substituição do azul dextrano. As placas permaneceram na estufa a 30°C durante 25 dias.

3.2.2. Acção antagonista

Foram utilizadas placas de Petri de poliestireno quadradas com 100 mm de lado, com 40 ml de PDA, inoculadas com cilindros de 5 mm de diâmetro de acordo com os esquemas representados na Figura 5, incubadas a $27,5\pm 1^\circ$ C, na obscuridade e por um período suficiente para observar o aspecto da frente de crescimento de cada fungo relativamente aos fungos adjacentes. O esquema de inoculação escolhido permite que todos os fungos em estudo sejam confrontados entre si e auto-confrontados, sempre com seis repetições. A inoculação com os vários fungos foi feita de dois modos: (1) simultaneamente e (2) de modo faseado dando vantagem temporal aos fungos cujo crescimento é mais lento. A ordem e tempos de inoculação utilizados no segundo método testado estão indicados no Quadro 8.

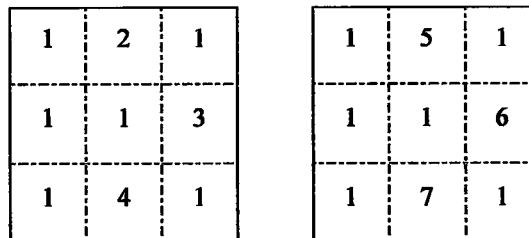


Figura 5 – Esquema de inoculação dos fungos nos testes de antagonismos. Cada número indica a posição relativa de cada fungo em estudo.

Quadro 8 – Tempo de inoculação dos diferentes fungos no teste de antagonismo com inoculação faseada

Dia de inoculação	Fungo
1	<i>Raffaelea</i> sp. (B5)
1	<i>Raffaelea</i> sp. (B6)
3	<i>Acremonium</i> sp.
3	<i>Gliocladium</i> sp.
7	<i>Nodulisporium</i> sp.
8	<i>Scytalidium</i> sp.
9	<i>Trichoderma</i> sp.

Os resultados dos testes de antagonismos foram observados de acordo com os critérios adaptados de Wald *et al.* (2004): sobreposição (quando o fungo cresce sobrepondo-se ao micélio do outro), invasão (quando o fungo cresce mais rápido que o outro, invadindo o seu espaço), “deathlock” (quando o crescimento dos dois fungos é mutuamente inibido). A cada comportamento foi atribuído um valor: à sobreposição o valor 1; à invasão 0,75; ao deathlock 0,5; quando o fungo foi invadido 0,25 e sobreposto 0. Foi calculado o valor médio das seis repetições de cada confrontação e representado numa barra que simboliza o comportamento dos dois fungos confrontados. O comprimento total da barra significa o valor 1 e está dividida em quatro intervalos (0 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1), o intervalo preenchido por cada fungo (pela respectiva cor) simula o seu comportamento na confrontação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos transportados por *P. cylindrus* podem ter um papel determinante no sucesso da colonização dos sobreiros susceptíveis. De modo a identificar esta micoflora, foram realizados isolamentos de fungos das galerias e directamente do insecto, e observadas as estruturas especializadas de transporte para verificar a presença de inóculo fúngico. Os principais fungos isolados foram depois caracterizados e testadas possíveis funções na interacção insecto-fungo-hospedeiro.

4.1. O INSECTO *Platypus cylindrus* E AS SUAS ESTRUTURAS ESPECÍFICAS DE TRANSPORTE DE FUNGOS

Dos toros de sobreiro instalados no laboratório emergiram insectos, identificados de acordo com Balachowsky (1949) como *P. cylindrus*. Também os sinais exibidos, nomeadamente os orifícios circulares com cerca de 2 mm de diâmetro que servem de entrada e saída ao imago e o serrim acumulado, indicaram a presença activa destes insectos.

As observações de *P. cylindrus* em SEM permitiram confirmar a identificação específica pela visualização das características do insecto referidas em 2.2. e verificar as diferenças exteriores entre machos e fêmeas ao nível de dimensões, sendo a fêmea maior do que o macho, e pela presença dos apêndices posteriores no macho (Figura 6a e b). Em ambos os sexos, na região do protórax estão localizados os micângios, mais visíveis nas fêmeas por existirem em muito maior número (Figura 6c e d): segundo Baker (1963) são elas que transportam e inoculam os fungos nas galerias, razão pela qual possuem maior número de micângios (Cassier *et al.*, 1996). Esta variação nos micângios entre os dois sexos foi também determinada em microscopia óptica. O número de micângios por macho varia de 1 a 47 orifícios por indivíduo, sendo o número médio 16; entre os dois lóbulos dos micângios não se verificaram diferenças quantitativas (8 orifícios em média em ambos os lóbulos). Nas fêmeas o número de orifícios é bastante superior, tornando-se inviável a sua contagem por este método, pelo que não foram quantificados. A presença de fungos nos micângios pode ser comprovado

por SEM: a maioria dos orifícios encontram-se preenchidos, sendo visíveis em alguns casos estruturas com aparência de hifas e esporos (Figura 6e).

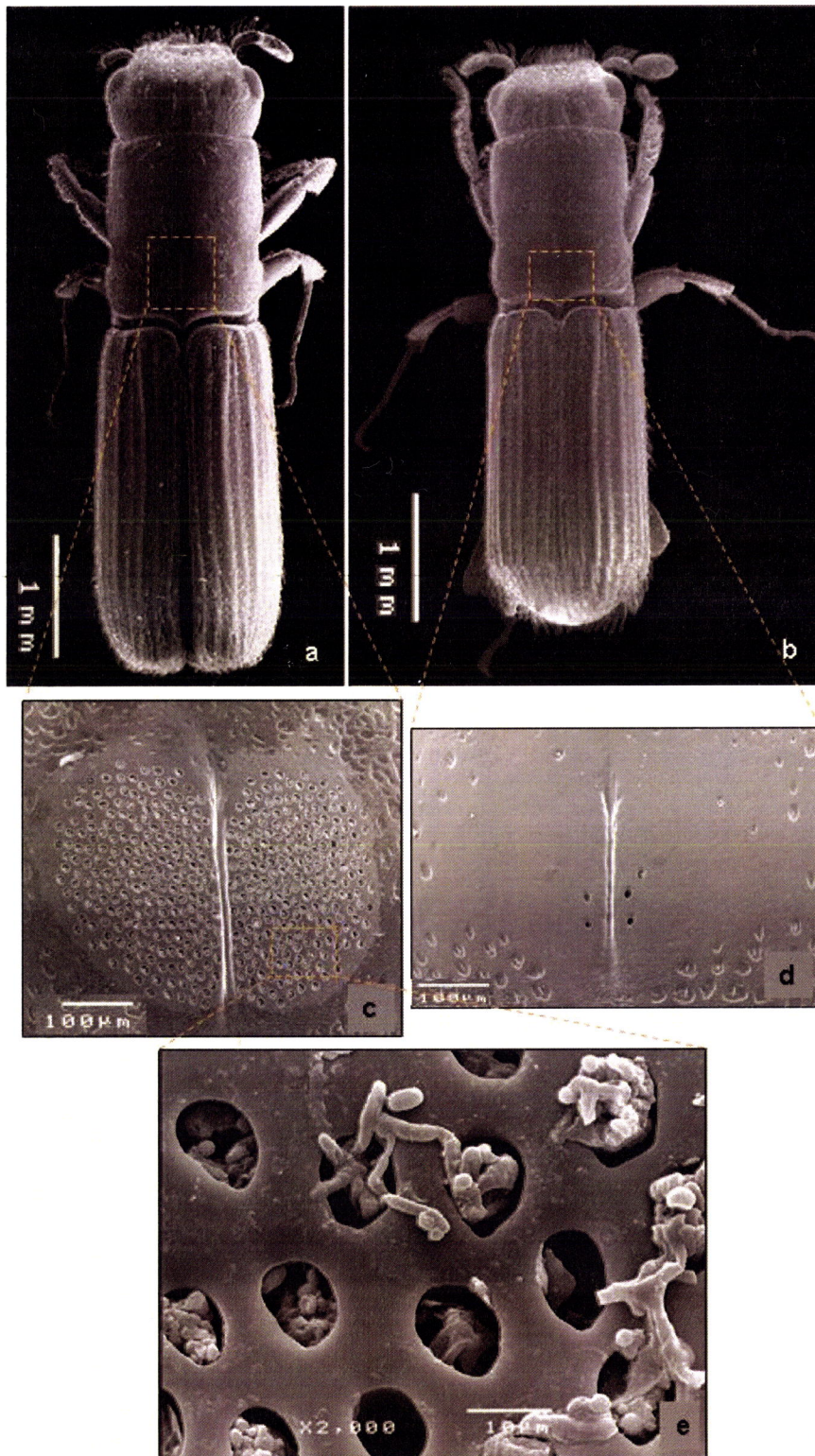


Figura 6— Fotografias de *Platypus cylindrus* por SEM: a) fêmea; b) macho; c) micângios de fêmea; d) micângios de macho; e) estruturas fúngicas nos micângios de fêmeas.

4.2. FUNGOS ASSOCIADOS A *Platypus cylindrus* E SUAS GALERIAS EM SOBREIRO

Foram obtidos vários fungos dos isolamentos realizados tanto a partir das diferentes partes de *P. cylindrus* como de todas as zonas das suas galerias. Entre estes fungos encontram-se os considerados ambrósia (específicos da interacção insecto-fungo), alguns potencialmente patogénicos para o sobreiro, outros mais generalistas mas já anteriormente relacionados com esta associação e ainda outros cosmopolitas. A maioria dos fungos foi identificada até ao género, excepto no caso dos pertencentes à ordem Mucorales. Em alguns casos, não foram observáveis estruturas que possibilitassem essa identificação e/ou a sua frequência não o exigiu, sendo esses fungos englobados sob a designação “diversos”. No Quadro 9 estão enumerados os fungos obtidos.

Quadro 9 – Ordens e géneros de fungos isolados a partir de insecto *Platypus cylindrus* e suas galerias em sobreiro

Fungos isolados		Origem	
Ordem	Género	Insecto	Galerias
Eurotiales	<i>Aspergillus</i>	X	X
	<i>Paecilomyces</i>	X	X
	<i>Penicillium</i>	X	X
Helotiales	<i>Botrytis</i>		X
Hypocreales	<i>Acremonium</i>	X	X
	<i>Beauveria</i>	X	
	<i>Fusarium</i>		X
	<i>Gliocladium</i>	X	X
	<i>Trichoderma</i>	X	X
Mucorales	---	X	X
Ophiostomatales	<i>Raffaelea</i>	X	X
Saccharomycetales	<i>Geotrichum</i>		X
Sordariales	<i>Chaetomium</i>		X
Streptomycetales	<i>Streptomyces</i>	X	
Xylariales	<i>Nodulisporium</i>	X	X
	<i>Scytalidium</i>	X	X

4.2.1. Caracterização morfocultural e molecular dos fungos e sua potencial importância na interacção

A identificação dos fungos ao nível de género baseou-se nas suas características culturais e microscópicas. Da totalidade de fungos isolados foram seleccionados, com base na bibliografia consultada, tanto referente aos fungos e sua participação em

associações com insectos, como referente aos fungos que ocorrem naturalmente na madeira, e pela sua frequência, os géneros *Raffaelea* sp., *Acremonium* sp., *Nodulisporium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. para os ensaios sobre as possíveis funções desempenhadas na interacção insecto-fungo-hospedeiro. Estes fungos foram caracterizados mais pormenorizadamente, tanto a nível cultural como molecular, na perspectiva de uma identificação específica.

A caracterização cultural dos géneros seleccionados, baseada nas observações macroscópicas está registada no Quadro 10, podendo verificar-se os respectivos aspectos observados na face superior e inferior do meio de cultura, ilustrados na Figura 7. De seguida é apresentada a caracterização morfológica e molecular dos mesmos géneros e discutida a sua possível relação com o insecto *P. cylindrus* e o hospedeiro. Posteriormente apresenta-se a descrição sumária dos restantes fungos isolados.

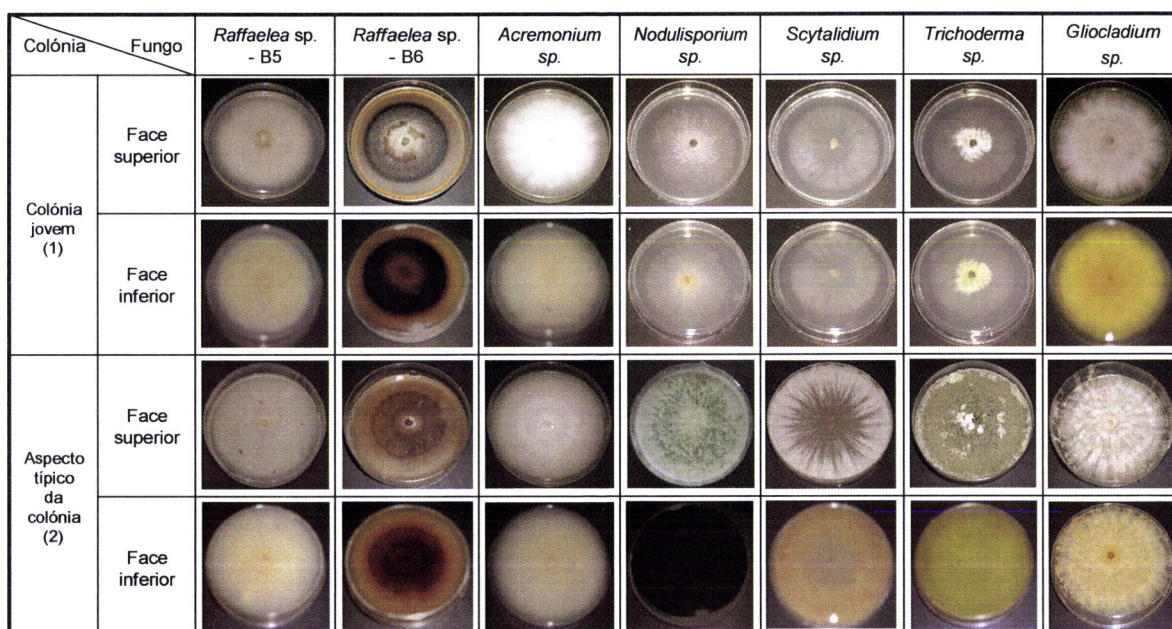


Figura 7 – Aspecto cultural, da face superior e inferior, dos géneros de fungos cultivados em PDA; (1) aspecto da colónia jovem, isto é, antes de atingir o bordo da placa; (2) aspecto típico das colónias após 21 dias de crescimento; para os géneros *Nodulisporium*, *Scytalidium* e *Trichoderma* observam-se alterações nomeadamente ao nível da coloração.

Quadro 10 – Descrição macroscópica das culturas em meio PDA

Género	Face superior					Face inferior	Observações
	Aspecto cultural	Densidade	Coloração	Frente de crescimento	Aspecto à transparência		
<i>Raffaelea</i> (isolado B5)	leveduloide com aflorescimento feltroso no centro da colónia	média	creme (27) com aflorescimento central oliváceo claro (39)	regular	Homogéneo	concêntrica fraca	idem face superior excepto na cor [creme (27) com aflorescimento central oliváceo claro (39)]
<i>Raffaelea</i> (isolado B6)	feltroso; alguns isolados com aflorescimento leveduloide na zona central	fraca a média	oliváceo claro (39) a fuliginoso (11)	regular	homogéneo ou heterogéneo	concêntrica fraca ou ausente	idem face superior excepto na cor [oliváceo claro (39) a fuliginoso (11)] grande variabilidade entre crescimentos do mesmo isolado em todos os parâmetros de crescimento
<i>Acremonium</i>	Feltroso	forte	branco (1)	regular	homogéneo	Ausente	idem face superior excepto na cor [branco (1)]
<i>Nodulisporium</i>	cotonoso baixo	forte	branco (1) a cinzento (2) com aflorescimento verde (35) no centro da colónia	regular	homogéneo	Ausente	idem face superior excepto na cor [fuliginoso (11)]
<i>Scytalidium</i>	feltroso a farinoso no bordo da colónia	fraca	cor de aveia (7)	regular	heterogéneo radial	Ausente	idem face superior excepto na cor [cor de aveia (7)]
<i>Trichoderma</i>	flocos de micélio de coloração branco (1) a cinzento (2) Feltroso	média	verde amarelado (33) a verde (35)	regular	homogéneo	concêntrica média	idem face superior excepto na cor [verde amarelado (33) a verde (35)]
<i>Gliocladium</i>	Feltroso	forte	amarelo enxofre (25) a amarelo palha (26)	irregular	homogénea	concêntrica fraca	idem face superior excepto na cor [amarelo cítrico (24)]

***Raffaelea* spp.**

Os fungos do género *Raffaelea* foram isolados de insectos e galerias em sobreiro. Neste género distinguiram-se desde o início do trabalho dois isolados aparentemente diferentes, designados B5 e B6, sendo só posteriormente obtidos outros isolados diferentes por o seu aspecto cultural não apresentar nitidamente características deste género, designados X e M. De facto, destes dois isolados foram obtidos poucas culturas pelo que poderão ter sido subvalorizados, particularmente no caso da *Raffaelea* M. Este fungo não foi contabilizado nas duas primeiras épocas de amostragem por se confundir com contaminantes.

O isolado B5 caracteriza-se por hifas septadas e hialinas, que se associam em cordões compactos (Figura 8a); conidióforos macronematosos e mononematosos, erectos, septados, estreitos e com ápice afilado; conídios simpodulospóricos, originados sucessivamente no ápice do conidióforo, deixando cicatrizes após a sua libertação, unicelulares, hialinos, de forma variável: triangular, oval e alantóide (Figura 8b e c). As dimensões dos conídios triangulares (mais frequentes) em PDA são 5,01-8,35µm x 1,67-3,34 µm, enquanto que em CLA são 2,51-5,01 µm x 0,84-1,67 µm. Verificou-se a formação de esclerotos negros em PDA após três semanas de incubação (Figura 8d) e a formação de esporodóquios sobre os palitos do meio descrito por Guerber & Correl (2001) (Figura 8e). Este isolado poderá ser *R. ambrosia* (Arx & Hennebert, 1965; Batra, 1966): a ocorrência desta espécie era espectável, sendo este o principal fungo ambrósia de *P. cylindrus* descrito.

No isolado B6 observam-se hifas (Figura 8f) e conidióforos semelhantes aos de B5, ainda que não se verifiquem cicatrizes nos locais de formação e libertação de conídios tão acentuadas. Os conídios têm formas variadas: triangulares, ovóides e fusiformes (Figura 8g, h e i). As dimensões dos conídios em PDA são 3,34-5,01 µm x 1,67-3,34 µm, em CLA são 3,34-5,01 µm x 1,67-2,51 µm. Este isolado apresenta os aspectos macro e microscópicos muito variáveis e inconclusivos relativamente à identificação específica.

O aspecto macro e microscópicos dos isolados M e X é diferente dos já descritos. O isolado X mostra um aspecto levedulóide, oliváceo escuro a negro e com afloramentos feltrosos brancos no centro; os seus conídios apresentam forma variada piriforme a globosa, alguns germinam *in situ* originando cadeias monilioides de aspecto toruloso, as suas dimensões em PDA são 20-5 μm x 7,5-2,5 μm (Figura 8j e l). A descrição deste isolado coincide com a de *R. canadensis* (Batra, 1967). O isolado M apresenta um crescimento relativamente rápido, formando culturas acastanhadas de aspecto levedulóide a farinoso e com hifas aéreas longas, vigorosas, esparsas; os conídios são claviformes de base truncada e de dimensões 10,02-5,01 μm x 5,84-2,51 μm em PDA (Figura 8m). Estas características estão de acordo com a descrição de *R. montetyi* (Morelet, 1998).

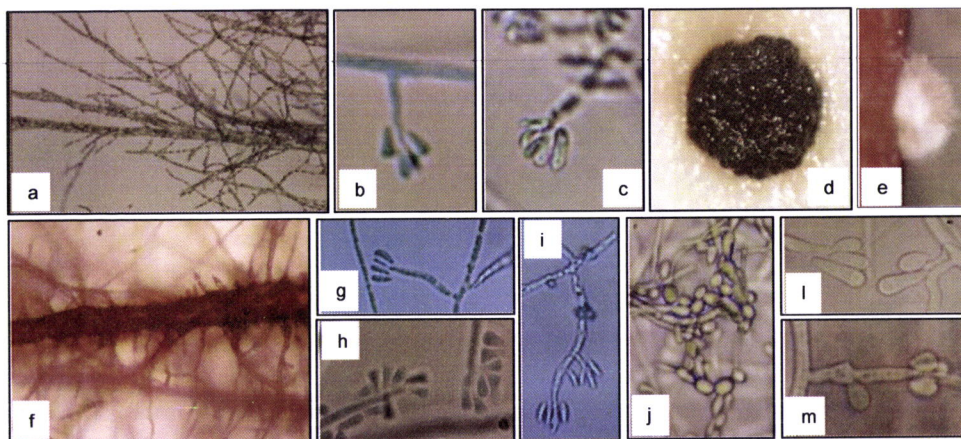


Figura 8 – Estruturas observadas em fungos do genero *Raffaelea*, (a-e) isolado B5: a) cordões de hifas (x100), b) conidióforo com conídios triangulares (x600), c) conidióforo com conídios alantóides (x600), d) escleroto (x20), e) esporodóquio (x10); (f-i) isolado B6: f) cordões de hifas (x200), g) conidióforos e conídios fusiformes a alantóides (x600), h) conídios triangulares (x1000), i) conídios e conidióforos fusiformes (x600); (j-l) isolado X: j) cadeias monilioides (x600), l) conidióforos e conídios (x600); m) isolado M, conidióforos e conídios (x600).

A gama de temperaturas a que se desenvolvem os isolados B5 e B6 é equivalente, variando dos 10° aos 35°C. No entanto, o intervalo óptimo de crescimento é ligeiramente diferente nos dois casos: enquanto para o isolado B5 é 20°- 30°C, com um máximo a 27,5°C, para o isolado B6 é 20°- 32,5°C, com um máximo a 30°C (Anexo 1).

Estes foram testados quanto à tolerância ou sensibilidade à ciclohexamida comparativamente com um isolado de *Ophiostoma ulmi* como controlo positivo. Como

se verifica na Figura 9, todos os fungos se desenvolveram nas diferentes concentrações de ciclohexamida, observando-se uma diminuição de crescimento à medida que a concentração de antibiótico aumenta. A ciclohexamida é um antibiótico que inibe a síntese proteica na maioria dos eucariotas. No entanto, espécies do complexo *Ceratocystis/ Ophiostoma* têm uma parede celular típica (composta por celulose e ramnose) cuja estrutura impede a entrada das moléculas de antibiótico na célula, tornando estes fungos tolerantes à ciclohexamida (Harrington, 1981). Para ambos os isolados de *Raffaelea* (B5 e B6) ficou, assim, verificada a semelhança de comportamento com este complexo.

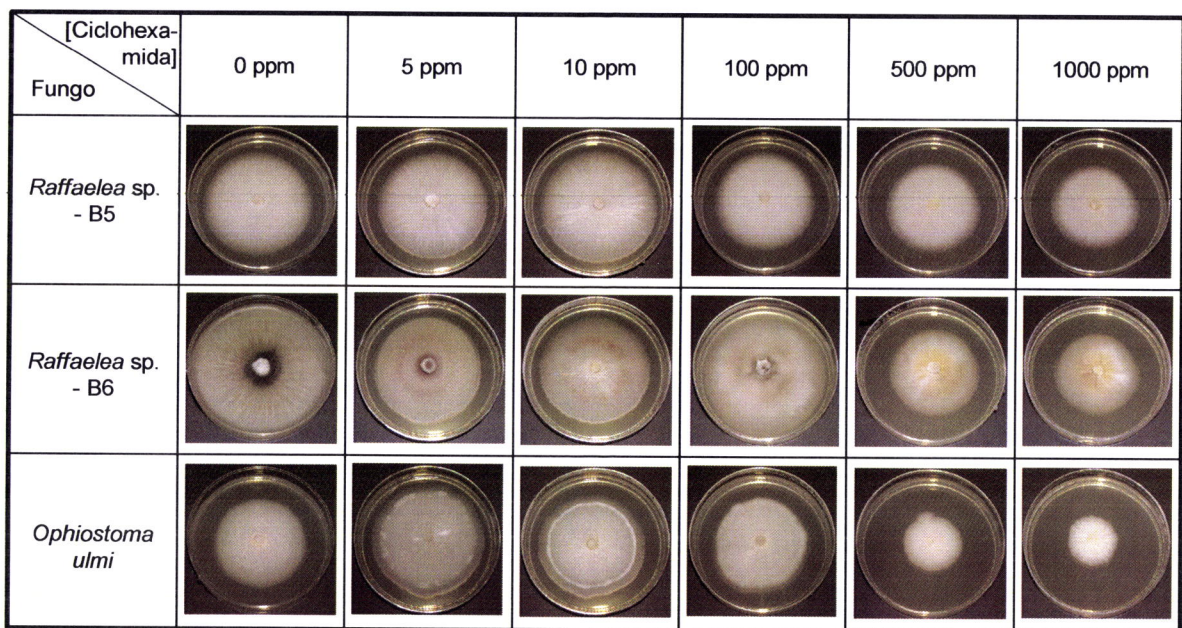


Figura 9 – Resultados do teste de sensibilidade à ciclohexamida.

A sequenciação parcial da subunidade pequena (18S) do rDNA dos isolados do género *Raffaelea* permitiu, mais uma vez, posicionar este género na ordem Ophiostomatales. Aplicando o Blast às sequências obtidas, verifica-se para a maioria dos isolados, incluindo os isolados B5 e B6, uma maior semelhança com vários fungos do género *Ophiostoma*, nomeadamente *O. ulmi*, *O. quercus* e *O. piliferum*; para o isolado X e outros aparentemente iguais maior semelhança com *R. canadensis*, seguida de *Ophiostoma* spp.; e para o isolado M maior semelhança com *R. montetyi* (Anexo 2). No entanto, a comparação entre as sequências de todos os isolados e espécies potencialmente relacionadas, baseadas nos resultados de Blast e na bibliografia sobre as

espécies, não foi conclusiva, não permitindo a construção de uma árvore filogenética significativa. O recurso a estas análises moleculares nem sempre nos permite uma apreciação suficientemente próxima da realidade, são utilizadas apenas pequenas fracções do vasto e complexo genoma dos organismos, pelo que a sequência comparada poderá não ser suficientemente representativa. Para o caso de *Raffaelea* spp., sendo fungos muito pouco estudados, são poucas as sequências disponíveis para comparação e a maioria são provenientes de culturas já muito antigas.

A comparação das sequências de vários isolados vem corroborar a hipótese de estarem associadas a *P. cylindrus* pelo menos três grupos de *Raffaelea* sp. distintos, apesar de as relações dentro de cada grupo não serem satisfatoriamente nítidas (Figura 10): os isolados B, B5, B6, A e C constituem um grupo mais próximo de *R. ambrosiae*, os isolados D, E e X estão mais relacionados com *R. canadensis* e o isolado M com *R. montetyi*.

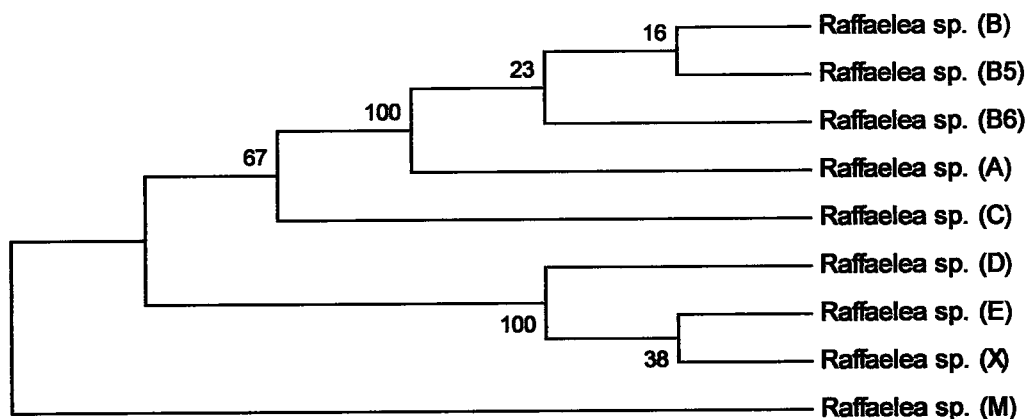


Figura 10 – Relação entre vários isolados de *Raffaelea* sp. obtidos de *Platypus cylindrus* e suas galerias em sobreiro.

Os fungos do género *Raffaelea* destacam-se dentro da diversidade de fungos obtidos pela sua já conhecida relação específica com *P. cylindrus*. Encontram-se descritas doze espécies neste género, a maioria associada a insectos ambrósia (Kubono & Ito, 2002; Bisby *et al.*, 2006). Em relação a *P. cylindrus* foram já identificados *R. ambrosia* e *R. montetyi* como seus fungos ambrósia principais (Arx & Hennebert, 1965; Morelet, 1998). Em termos bibliográficos há ainda a considerar *Sporothrix* sp. descrito por Baker

(1963) que foi posteriormente classificado por Arx & Hennebert (1965) como *R. ambrosiae*, assim como isolados de *Cephalosporium* sp. efectuados por Baker (1963) e um fungo acastanhado não indentificado por Cassier *et al.* (1996) mais tarde classificado como *R. montetyi* por Morelet (1998).

Raffaelea é um género mitospórico pouco estudado, talvez pela sua natureza críptica: embora cosmopolitas (Kiffer & Morelet, 1998), vivendo em simbiose com os insectos não são comumente observados. Apesar de continuar desconhecida a sua fase sexuada, observações do desenvolvimento conidial de *Raffaelea* spp. são concordantes com a posição deste género dentro do grupo dos Ophiostomatales (Gebhardt & Oberwinkler, 2005). Segundo os resultados da análise de sequências de 18S-rDNA, se excluirmos *R. hennebertii* Scott & du Toit, o género *Raffaelea* forma uma linhagem monofilética que representa um grupo muito próximo de espécies de *Ophiostoma* (Jones & Blackwell, 1998).

Estudos sobre o declínio das quercíneas na Europa mostram que fungos do complexo *Ophiostoma/Ceratocystis* são frequentes patógenos de espécies de *Quercus* (Badler, 1992; Degreef, 1992; Delatour *et al.*, 1992). Santos *et al.* (1999) registaram a ocorrência de *Ophiostoma* sp. em *Q. suber* em Portugal. O efeito de *Raffaelea* spp. em *Q. suber* é ainda desconhecido, no entanto, no Japão foi provada a patogenicidade de *R. quercivora* Kubono & Ito, ambrósia primário do insecto *P. quercivorus* Murayama, associada a um fenómeno de mortalidade massiva de Fagáceas, especialmente *Q. serrata* Thunb., *Q. mongólia* Fich. e *Q. crispula* Blume (Kubono & Ito, 2002; Kinuura & Kobayashi, 2006).

***Acremonium* spp.**

Os fungos do género *Acremonium* são caracterizados por hifas septadas e hialinas, por vezes associadas por anastomoses, formando cordões com várias células de diâmetro (Figura 15a); conidióforos macronematosos e mononematosos, erectos, simples, estreitos e afilados no ápice, com septo basal a separar das hifas vegetativas. No ápice do conidióforo são produzidos conídios filospóricos, unicelulares, de forma ovóide, agregados numa gota mucilaginosa (Figura 15b). As dimensões dos conídios em PDA

são 5,01-8,35 μm x 1,67-3,34 μm e em CLA são 4,18-11,69 μm x 1,67-3,34 μm . Este fungo cresce no intervalo de temperaturas de 10° a 35°C, apresentando um óptimo de 20° a 27,5°C e um máximo de crescimento a 25°-27,5°C (Anexo 1).

As observações morfológicas de *Acremonium* sp. não são conclusivas para a identificação a nível específico. Este género é muito vasto (93 espécies enumeradas em Bisby *et al.* (2006)) tendo as descrições das espécies muito dispersas e inacessíveis. No entanto, quando analisada a região ITS do rDNA de *Acremonium* sp. verifica-se uma maior proximidade de *A. crotochinigenum* relativamente a outras espécies cujo resultado da aplicação de Blast demonstrou também alguma proximidade (Figura 11, Anexo 2).

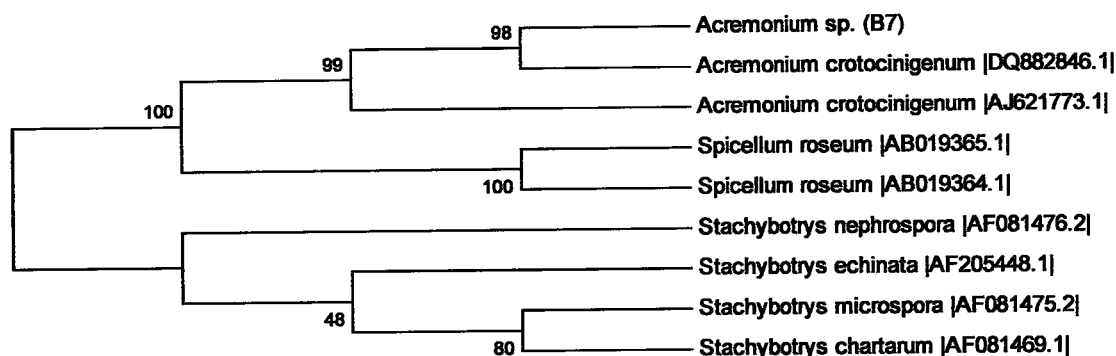


Figura 11 – Árvore filogenética que representa a comparação da região ITS rDNA de *Acremonium* sp. com espécies próximas.

Acremonium sp. foi já associado a *P. cylindrus* em sobreiro por Sousa (1996), tendo sido isolado de várias secções das galerias. É um género cosmopolita, muito abundante na natureza e altamente polifilético cujos teleomorfos pertencem, na sua maioria, à família Hypocreaceae (Glenn *et al.*, 1996). De acordo com Kiffer & Morelet (1997), espécies deste género poderão ser anamórficas de *Nectria* sp., sendo, assim um potencial patogénico já identificado para diversas lenhosas. Espécies deste género poderão também exercer uma acção antagonista sobre outros fungos (Kiffer & Morelet, 1997).

***Nodulisporium* sp.**

O género *Nodulisporium* apresenta hifas septadas e de cor castanha; conidióforos macronematosos e mononematosos, a surgir lateralmente das hifas vegetativas, com eixo principal erecto, septado, ramificado, hialino a castanho claro, ligeiramente rugoso; células conidiogénicas poliblasticas e simpodiais, finas ou curtas e espessas, em arranjo verticilado; conídios simpodulospóricos, acropleurogenosos, unicelulares, hialinos ou castanhos a oliváceos (em massa), de forma elipsoidal ou obovóide, lisos ou verrugosos, com um hilo denticulado quando destacado (Figura 15c). As dimensões dos conídios em PDA são 3,34-6,68 µm x 3,34-5,01 µm e em CLA são 3,34-6,68 µm x 1,67-3,34 µm. A gama de temperaturas de crescimento varia de 7,5° a 37,5°C, apresentando um crescimento óptimo a 30°- 32,5°C (Anexo 1).

Em Collado *et al.* (2001) são apresentadas as descrições macro e microscópicas de *Nodulisporium* sp. anamórfico de *B. mediterranea*, coincidentes com as observações do fungo *Nodulisporium* sp. acima descritas. Estes autores acrescentam ainda a frequente formação de exsudados castanhos-escuros e a libertação de um odor característico, as dimensões dos conidióforos (0,5 mm de comprimento e 5 µm de largura) e das células conidiogénicas (8-14,5 µm x 3,5-6 µm). A análise molecular da região ITS do rDNA de *Nodulisporium* sp. isolado vem corroborar a hipótese de ser o mesmo fungo: quando comparado com as espécies que apresentaram maior valor de similaridade como resultado do Blast, verifica-se na árvore filogenética a proximidade da sequência do isolado (*Nodulisporium* sp. B8) de *B. mediterranea* (Figura 12, Anexo 2).

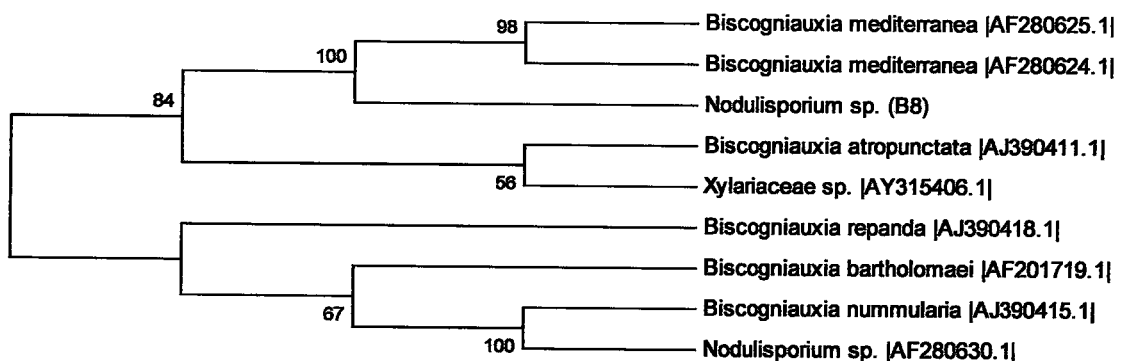


Figura 12 – Árvore filogenética que representa a comparação da região ITS rDNA de *Nodulisporium* sp. com espécies próximas.

Nodulisporium sp. é um fungo saprófita da madeira e outros detritos vegetais, anamorfo de Xylareaceae (Hawksworth *et al.*, 1995). A comparação de análises filogenéticas de sequências de vários representantes do género *Nodulisporium* e de um grupo de Xilareáceas com anamorfos tipo-*Nodulisporium* demonstrou que este género é coespecífico do fungo *B. mediterranea* (Collado *et al.*, 2001). Este fungo é responsável por estromas carbonáceos nos troncos e ramos em espécies de *Quercus*, tendo particular importância em *Q. suber* (Mazzaglia *et al.*, 2001) onde a sua ocorrência em simultâneo com os ataques de *P. cylindrus* tem sido referida (Sousa & Debouzie, 1993; Santos, 2002). Nos trabalhos de Sousa (1996) foi já isolado *Nodulisporium* sp. a partir das galerias deste insecto em sobreiro assim como dos micângios.

***Scytalidium* sp.**

O género *Scytalidium* apresenta hifas pouco densas, espessas, septadas, pouco ramificadas, hialinas ou castanho claro, dispostas paralelamente; conidióforos micronematomatosos e mononematomatosos com células conidiogénicas terminais, formando artroconídios por fragmentação holotática de hifas indiferenciadas (Figura 15d). Os conídios são catenulados, esquizogénicos, uni ou bicelulares, hialinos, rectangulares, de dimensões, em PDA, 3,34-8,35 μm x 1,67-5,01 μm e em CLA, 5,01-8,35 μm x 1,67-3,34 μm . Tem ainda clamidósporos intercalares ou terminais, de parede espessa, castanhos e elipsóides. *Scytalidium* sp. cresce num intervalo de temperaturas de 15° a 35°C, registando um crescimento óptimo a 20°-32,5°C (Anexo 1).

Comparando a sequência parcial da subunidade 18S do rRNA de um isolado de *Scytalidium* sp. com sequências de várias espécies do mesmo género e de outro artrospórico (*Geotrichum* sp.) (Figura 13, Anexo 2), verifica-se uma maior proximidade de *S. lignicola*. Os teleomorfos de *Scytalidium* sp. não são totalmente conhecidos, pelo que este género não está ainda englobado numa família de Ascomycota (Bisby *et al.*, 2006). No entanto, *Chaetomium* sp., também isolado a partir das galerias do insecto em sobreiro, poderá ser teleomorfo de *Scytalidium* sp. (Halin, 1997).

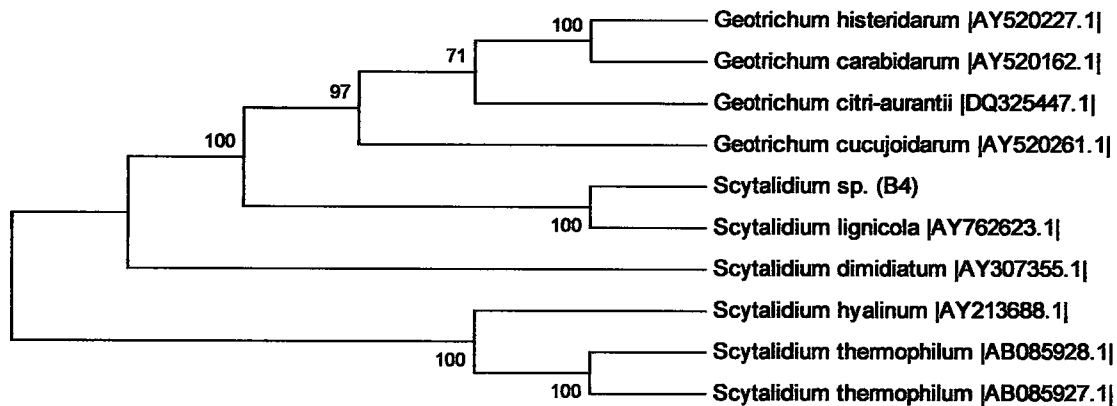


Figura 13 - Árvore filogenética que representa a comparação da região 18S rDNA de *Scytalidium* sp. com espécies próximas.

Fungos do género *Scytalidium* são conhecidos como patogénicos de plantas e animais, micoparasitas de ferrugens e fungos degradadores de madeira. São também considerados fungos antagonistas e produtores de antibióticos (Hawksworth *et al.*, 1995; Kiffer & Morelet, 1997; Moltzan, *et al.*, 2001). *S. lignicola* é um organismo globalmente disperso na micoflora natural não apresentando efeitos patogénicos. Contudo, em casos limitados, biotipos desta espécie demonstraram ser fitopatogénicos. De facto, este fungo já foi referido como causa de doença de várias plantas no Brasil, incluindo espécies arbóreas (Oren *et al.*, 2001). Os mesmos autores referem-no também como antagonista de fungos patogénicos de árvores florestais (Oren *et al.*, 2001). A relação deste género com *P. cylindrus* foi já referida por Sousa (1996) que o isolou a partir de galerias do insecto em sobreiro.

***Trichoderma* sp.**

Trichoderma sp. é caracterizado por hifas hialinas e septadas, conidióforos macronematosos e mononematosos, hialinos e ramificados, apresentando uma disposição piramidal com células conidiogénicas hialinas e em forma de garrafa, dilatadas na base, inseridas nos conidióforos formando ângulos rectos (Figura 15e). Conídios fialospóricos, enteroblásticos e monoblásticos, unicelulares, de forma globosa a subglobosa e cor verde, agrupados no topo das fiálides. As dimensões dos conídios em PDA são 1,67-3,34 µm x 1,67-2,51 µm e em CLA são 1,67-3,34 µm x 1,67-2,51 µm.

Este género cresce numa vasta gama de temperaturas: 5° a 42,5°C, apresentando um valor óptimo de crescimento entre 30° e 35°C (Anexo 1).

O género *Trichoderma* pertence à ordem Hypocreales. É um género muito extenso, pelo que a observação das suas estruturas morfológicas não foram suficientemente elucidativas para a sua identificação ao nível de espécie. A análise da região ITS de rDNA do isolado de *Trichoderma* sp. utilizando Blast revelou uma maior proximidade de *T. citrinoviride* e *Hypocrea schweinitzii* (seu teleomorfo) (Anexo 2). Porém, não foi possível obter uma árvore filogenética representativa destas relações.

Trichoderma é um género de fungos mitospóricos bastante dispersos na natureza, geralmente encontrados em todos os solos incluindo a camada de húmus florestal, não sendo, no entanto, considerados endófitos ou envolvidos em relações de parasitismo com plantas (Samuels, 1996). Dada a sua capacidade de produzir extrólitos que incluem variadas enzimas, como celulasas e quitinases, antibióticos como a gliotoxina e a gliovirina e substâncias voláteis, muitas das espécies de *Trichoderma* exercem uma forte acção antagonista sobre outros fungos, sendo mesmo utilizadas no controlo biológico de doenças de plantas (Samuels, 1996; Hermosa *et al.*, 2000). Também o seu potencial enzimático tem vindo a ser explorado industrialmente, nomeadamente na degradação de materiais celulósicos por celulasas (Samuels, 1996). Relativamente à interacção com *P. cylindrus*, já outros autores tinham referido o seu isolamento apenas a partir das galerias construídas nos hospedeiros e não directamente dos insectos (Baker, 1963; Sousa, 1996).

***Gliocladium* sp.**

Gliocladium sp. apresenta hifas septadas e hialinas, conidióforos macronematosos e mononematosos, erectos, septados e ramificados, terminando num sistema ramificado de fiálides em verticilos densos de três fiálides por métula (Figura 15f) onde se acumulam conídios fialospóricos unicelulares, hialinos, ovóides ou cilíndricos numa grande gota terminal mucilaginosa. As dimensões dos conídios em PDA são 3,34-5,01 µm x 1,67-3,34 µm e em CLA 2,51-5,01 µm x 1,67-3,34 µm. *Gliocladium* sp. desenvolve-se no intervalo de temperaturas 5°-35°C, apresentando um óptimo de

crescimento de 20° a 32,5°C e um valor máximo a 30°C (Anexo1). A observação morfológica dos isolados de *Gliocladium* sp. obtidos está de acordo com a descrição do género de Schroers *et al.* (1999), mas não foi suficientemente conclusiva quanto à identificação específica.

A análise moléculas deste isolado não contribuiu para especificar a sua identificação, apenas confirmou a sua relação com os géneros *Gliocladium* e *Clonostachys* (seu sinónimo) e os teleomorfos *Nectria* e *Bionectria* (Anexo 2). Na figura 14 está a árvore filogenética que representa a comparação da sequência parcial da região 28S rDNA de *Gliocladium* sp. com outras espécies relativamente próximas.

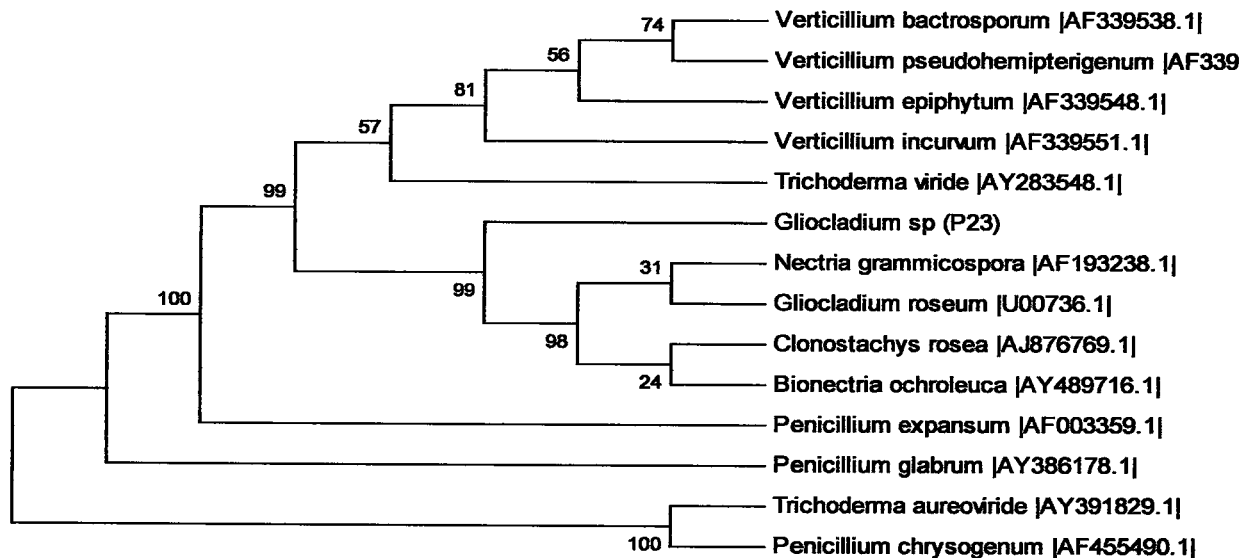


Figura 14 - Árvore filogenética que representa a comparação da região 28S rDNA de *Gliocladium* sp. com espécies próximas.

Apesar de muitas das espécies de *Gliocladium* não terem teleomorfos comprovados, vários estudos tanto morfo-culturais como moleculares colocam este género na ordem Hypocreales, incluindo géneros como *Hypomyces*, *Nectria*, *Nectriopsis*, *Roumegueriella*, *Sarawakus* e *Sphaerostibella* como teleomorfos. A relação dos anamorfos *Gliocladium* a um tão vasto e distinto conjunto de teleomorfos revela a polifilia deste género (Rehner & Samuels, 1994).

Gliocladium é um género de fungos filamentosos amplamente disperso no solo e na vegetação em decomposição, sendo de um modo geral considerado um contaminante. Contudo, algumas espécies são conhecidas pelo seu potencial como agentes de biocontrolo (Papavizas, 1985). Foram já descritas duas espécies de *Gliocladium* associadas a *P. cylindrus*: *G. roseum* e *G. solani*, isoladas a partir das galerias em sobreiro, micângios e conteúdo intestinal do insecto (Sousa, 1996).

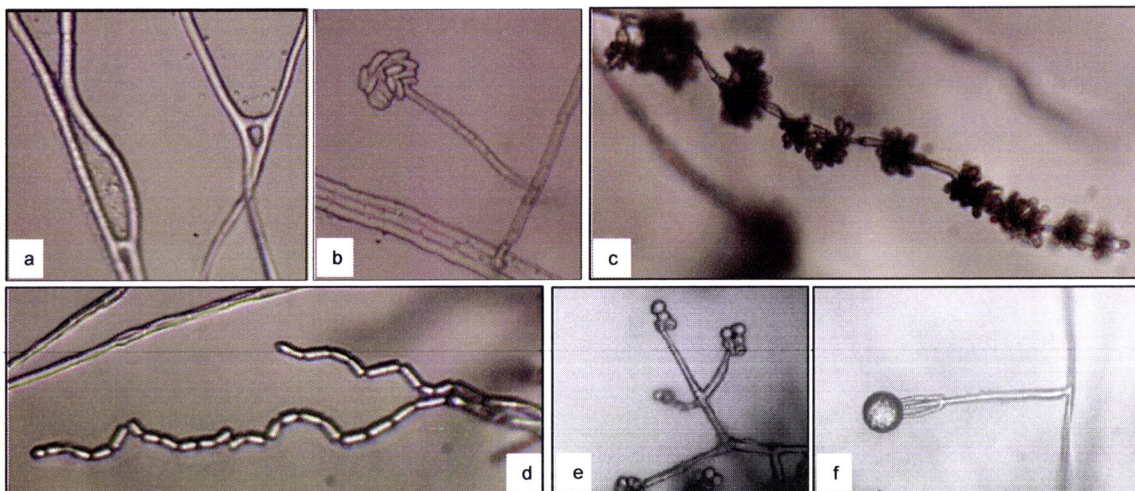


Figura 15 – Estruturas microscópicas dos fungos: a) hifas formando anastomoses em *Acremonium* sp. (x600); b) cordões de hifas e conidióforo com conídios de *Acremonium* sp. (x600); c) conidióforos e conídios de *Nodulisporium* sp. (X600); d) formação de artroconídios em *Scytalidium* sp. (X600); e) conidióforos e conídios de *Trichoderma* sp. (X600); f) estruturas conidiogénicas de *Gliocladium* sp. (x400).

A medição das dimensões dos esporos nos dois meios de cultura (PDA e CLA) revelou, por um lado as variações entre os esporos de fungos diferentes, sendo particularmente importante a comparação entre os dois fungos do género *Raffaelea* (isolados B5 e B6), e por outro, as diferenças induzidas pelo meio de cultura (Figura 16). Entre os isolados B5 e B6, foi em PDA que se verificaram diferenças tanto na largura como no comprimento dos esporos, mais significativas no comprimento ($F(1,78)=143,283$; $p<0,001$). Analisando a relação entre os diferentes fungos (comprimento e largura) e o meio de cultura, conclui-se que há diferenças significativas nas medições nos dois meios para os fungos *Raffaelea* sp. isolado B5 e *Acremonium* sp. relativamente ao comprimento ($F(6, 546)=19,143$; $p<0,001$) e para os fungos *Raffaelea* sp. isolado B5, *Acremonium* sp., *Nodulisporium* sp., *Scytalidium* sp. e *Gliocladium* sp. relativamente à largura ($F(6, 546)=8,3900$; $p<0,001$).

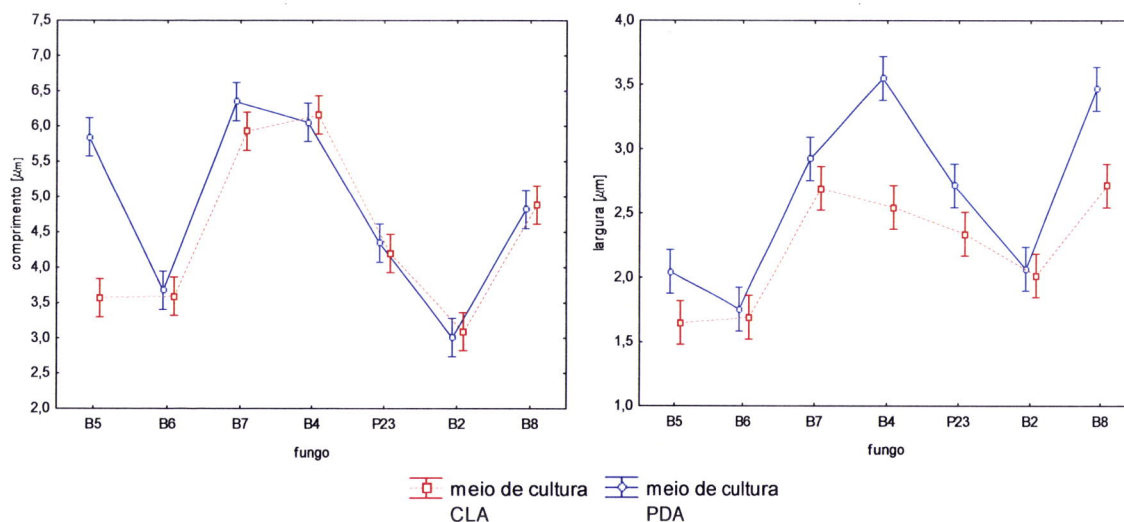


Figura 16 – Comparação entre as dimensões dos fungos (comprimento e largura) medidas nos meios de cultura PDA e CLA (B5 – *Raffaelea* sp. isolado B5; B6 – *Raffaelea* sp. isolado B6; B7 – *Acremonium* sp.; B8 – *Nodulisporium* sp.; B4 – *Scytalidium* sp.; B2 – *Trichoderma* sp.; P23 – *Gliocladium* sp.).

Outros fungos isolados

Foram isolados vários fungos do género *Aspergillus* com aspecto cultural diferente, possivelmente correspondentes a espécies diferentes. Em PDA, estes fungos exibem um crescimento rápido, formando colónias de cor variável (branco, amarelo, vários tons de verde e negro) e textura pulverulenta, a face inferior das colónias tem cor amarelada. Microscopicamente, observam-se hifas septadas e ramificadas, conidióforos erectos, simples, com uma vesícula terminal que suporta fiálides que radiam de toda a sua superfície. Formam-se conídios fialospóricos, unicelulares, globosos, hialinos mas coloridos em massa, dispostos em longas cadeias basiptais. Este género é um dos mais comuns na natureza, inclui fungos de solo, cosmopolitas muito comuns, saprófitas ou parasitas de vários substratos e toxinogénicos (Hawksworth *et al*, 1995; Kiffer & Morelet, 1997). Sousa (1996) identificou *A. carbonarius* nos micângios de *P. cylindrus* e nas suas galerias em sobreiro.

O género *Beauveria* apresenta crescimento lento em PDA, formando colónias brancas de aspecto cotonoso denso a pulverulento. Produz conidióforos simples, agrupados irregularmente, mais grossos na base e afilados na região apical fértil, que toma um aspecto sinusoidal após a produção dos conídios simpodulospóricos, unicelulares, hialinos, ovóides e denticulados. Este género compreende fungos entomopatogénicos

utilizados como bio-insecticidas (Kiffer & Morelet, 1997), estando já demonstrada a patogenicidade de *B. bassiana* e *B. brongniartii* para *Platypus* spp. (Glare *et al.*, 2002).

Botrytis sp. tem um rápido desenvolvimento em PDA, formando colónias de cor cinzenta e contorno arredondado regular, com micélio aéreo feltroso, pouco denso, e face inversa da placa de igual cor à apresentada na face superior. Em termos microscópicos, mostra conidióforos castanhos, espessos e ramificados irregularmente, com células apicais dilatadas onde são produzidos sincronizadamente conídios botrioblastospóricos, assumindo o aspecto de cachos. Os conídios são hialinos a acinzentados em massa, unicelulares, ovóides com um dentículo. Estes fungos são principalmente saprófitas, podendo ser patogénicos para numerosos vegetais economicamente importantes e toxinogénicos (Kiffer & Morelet, 1997). Foi isolado a partir das galerias de *P. cylindrus* em *Quercus* sp. (Baker, 1963).

O género *Chaetomium*, pertencente ao filo Ascomycota, apresenta estruturas de reprodução sexuadas na cultura em PDA. Forma colónias de crescimento rápido, aspecto feltroso e contorno circular regular, de cor variável: inicialmente brancas, tornando-se acinzentadas a oliváceas e avermelhadas com o efeito da maturação e castanhas escuras na face inferior. Foram observadas peritecas globosas, castanhas, cobertas por filamentos de vários tamanhos, ascos clavados pedunculados com paredes evanescentes e ascósporos unicelulares, oliváceos, limoniformes. Compreende fungos saprófitas, comumente isolados do solo e de material vegetal em decomposição, em particular madeira (Hawksworth *et al.*, 1995). Este género pode ser teleomórfico de *Scytalidium* sp. (Halin, 1997).

Fusarium sp. forma colónias de micélio aéreo branco cotonoso, abundante, com bordo regular e face inversa com coloração carmim a amarela. Apresenta conidióforos septados e ramificados, que geram conídios fialospóricos, hialinos, fusiformes, a maioria com 5 a 6 septos transversais, agregados em massas mucilaginosas; não foram observados microconídios. É um género cosmopolita, patogénico ou saprófita sobre diversos órgãos de numerosos vegetais e toxinogénico (Kiffer & Morelet, 1997). É interveniente em relações com insectos ambrósia tendo sido já isolado a partir da interacção *P. cylindrus*- sobreiro (Sousa, 1996).

O género *Geotrichum* apresenta colónias pulverulentas, com micélio pouco abundante. Este micélio é branco, septado, sem conidióforos diferenciados formando conídios artrospóricos, hialinos, unicelulares e cilíndricos com as extremidades truncadas. Fungos deste género são considerados saprófitas, telúricos e alguns micoparasitas (Kiffer & Morelet, 1997). Várias espécies já foram identificadas em associações com insectos (Suh & Blackwell, 2006).

Paecilomyces sp. forma colónias de crescimento rápido, aspecto pulverulento e cor verde acastanhada. Observam-se conidióforos com ramificações e fiálides, com arranjo tipo “pincel”, semelhantes a *Penicillium* sp. mas mais divergentes. Produz conídios fialospóricos, unicelulares, hialinos e ovóides. São fungos do solo, muito comuns, saprófitas ou parasitas de vários substratos, toxinogénicos, podendo parasitar insectos e outros animais e ser fungícolas (Hawksworth *et al*, 1995; Kiffer & Morelet, 1997. Baker (1963) já anteriormente isolou *P. variotii* de galerias de *P. cylindrus* em sobreiro e outras quercíneas.

Do género *Penicillium*, foram isoladas numerosas culturas com aspectos diferentes que poderão constituir espécies distintas. Em PDA, as colónias apresentam um contorno arredondado regular, o micélio superficial e pulverulento, apresentando um aspecto raiado, de vários tons de verde a castanho. Por vezes aparecem gotas de exsudado imersas nas culturas. Na face inversa da placa, apresentam um tom amarelado que vai escurecendo à medida que as culturas envelhecem. Este género é reconhecido pelas suas estruturas densas, tipo “pincel”, que produzem e suportam os esporos. Os conidióforos são simples ou ramificados e terminam em fiálides onde são produzidos os conídios unicelulares, globosos ou ovóides, hialinos a corados de verde, formando cadeias. São fungos do solo, cosmopolitas muito comuns, saprófitas ou parasitas de vários substratos, toxinogénicos e antagonistas (Hawksworth *et al*, 1995; Kiffer & Morelet, 1997. Foram já isolados a partir de *P. cylindrus*, sobreiro e outros hospedeiros (Baker, 1963, Cassier *et al.*, 1996; Sousa, 1996).

Streptomyces sp. apresenta colónias de crescimento muito lento em PDA, de contorno irregular, aspecto pulverulento e cor cinzenta. Forma filamentos e esporos de dimensões muito reduzidas, os esporos produzidos por fragmentação dos filamentos gera cadeias

helicoidais. Este género é produtor de antibióticos, sendo considerado um defensor antimicrobiano nas interações térmitas-fungos (Mueller & Gerardo, 2002).

Os fungos da ordem **Mucorales** formam colónias de crescimento muito rápido, com micélio cotonoso aéreo muito abundante, branco a cinzento, com esporangióforos erectos abundantes com esporângios escuros, globosos no ápice. São fungos do solo, cosmopolitas, saprófitas, raramente micoparasitas, alguns (poucos) parasitas facultativos de plantas ou animais (Hawksworth *et al.*, 1995). Baker (1963) e Cassier *et al.* (1996) obtiveram fungos desta ordem tanto a partir do insecto como do seu hospedeiro.

Muitos dos géneros isolados estão descritos na micoflora associada ao sobreiro e outros *Quercus* na região mediterrânica como *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Nodulisporium* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* spp. (Santos *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2000; Riziero *et al.*, 2002; Ragazzi *et al.*, 2003). Sendo considerados cosmopolitas, a maioria destes fungos ocorrem naturalmente nos troncos das quercíneas vivas, participando na sua comunidade biológica e, por vezes, determinando a susceptibilidade das árvores a ataques de agentes patogénicos (Subramanian, 1983). Várias espécies de *Fusarium* (*F. oxysporium* e *F. solani*) e *Nodulisporium* sp. estão indicadas como potencialmente patogénicas para o sobreiro (Santos *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2000).

Os fungos transportados por *P. cylindrus*, tanto em órgãos mais especializados (micângios e conteúdo intestinal) como no exosqueleto, são inoculados nas galerias, onde o seu crescimento é gerido pelas fêmeas progenitoras (Beaver, 1989). No hospedeiro, estes fungos passam assim a fazer parte de uma sucessão em que o seu ataque combinado com os insectos promove o enfraquecimento da árvore, predispondo-a para a colonização por fungos saprófitas ou basidiomicotas fracamente parasitas que ocorre alguns meses após o ataque inicial (Subramanian, 1983).

A vasta diversidade de fungos encontrada tanto nas galerias como nos insectos, nomeadamente fungos cosmopolitas e saprófitas, poderá estar relacionada com o estado de desenvolvimento ou já abandono das galerias. Na realidade, dadas as actuais restrições ao abate de sobreiros, a obtenção de material para estudo é bastante

dificultada, estando por vezes limitada a árvores já num avançado estado de declínio. Os toros utilizados na primeira época de amostragem de galerias apresentavam sintomas de declínio, sendo visíveis os sinais de ataque por *P. cylindrus*; na segunda época de amostragem, os toros apesar de exibirem sinais do insecto, eram fogueados, apresentando-se num estado mais avançado de degradação. Por outro lado, o ciclo de vida do insecto no hospedeiro é bianual, originando duas gerações de descendentes (Sousa & Inácio, 2005) e, após o seu desenvolvimento, observa-se um abrandamento dos cuidados dos progenitores na gestão dos fungos no interior da galeria, acabando mesmo por aparecer fungos contaminantes (Subramanian, 1983).

São muito poucas as alusões de fungos saprófitas em associações com insectos ambrósia. Cassier *et al.* (1996) refere o isolamento de fungos como *Penicillium* sp., *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp. mas apenas estabelecendo uma relação comensalista com o insecto. No entanto, a maioria dos autores não enumera ou discute fungos tão generalistas.

4.2.2. Localização dos fungos isolados de *P. cylindrus* e suas galerias em sobreiro

A amostragem realizada a partir de material vegetal baseou-se na pesquisa de fungos ao longo das galerias do insecto, desde o orifício de entrada ao nível da cortiça até à sua extremidade. A dissecação dos toros de sobreiro em laboratório permitiu a visualização dos danos causados pelos insectos nas árvores atacadas: todo o interior dos toros, desde a cortiça ao cerne, encontrava-se perfurado, constituindo uma extensa rede de galerias que, segundo Sousa & Inácio (2005), podem apresentar um número variável de ramificações acima e abaixo do plano inicial tornando-se, com frequência, bastante complexas. A cobrir as galerias observa-se, mesmo a olho nu, um revestimento de cor clara já descrito por Inácio *et al.* (2005) como um revestimento fino e esbranquiçado de origem fúngica.

Os insectos foram dissecados de modo a proceder ao isolamento de fungos dos micângios, conteúdo intestinal e élitros (como amostra de exosqueleto). Os isolamentos a partir dos insectos foram inicialmente efectuados pelo método da esterilização fraccionada. Contudo, a maioria destes isolamentos não permitiu recuperar qualquer

fungo (dos 100 insectos amostrados apenas se isolaram fungos em 11). Por este motivo, nas duas épocas de amostragem seguintes, dos 100 insectos amostrados, em 80 efectuou-se isolamento directo e apenas em 20 se utilizou o primeiro método.

A comparação da distribuição dos fungos nas diferentes secções das galerias e corpo dos insectos permitiu verificar que nas galerias está presente uma maior variedade de fungos. Dos 15 géneros isolados destacaram-se, pela sua maior representatividade, *Penicillium*, seguido de *Gliocladium*, *Raffaelea*, *Trichoderma* e *Scytalidium* (Figura 17). A maioria dos fungos isolados foi obtida nas três grandes secções dos toros: cortiça, entrecasco e cerne, mantendo-se, de um modo geral, as proporções de cada fungo. Na cortiça encontrou-se maior diversidade de fungos, destacando-se os cosmopolitas, embora ainda se tenha obtido uma percentagem relativamente alta de *Raffaelea* sp., sendo também isolados outros já referidos em associações com insectos: *Acremonium* sp., *Fusarium* sp. e *Geotrichum* sp. Os que se encontraram no entrecasco foram semelhantes aos da cortiça, apesar de se registar menor diversidade.

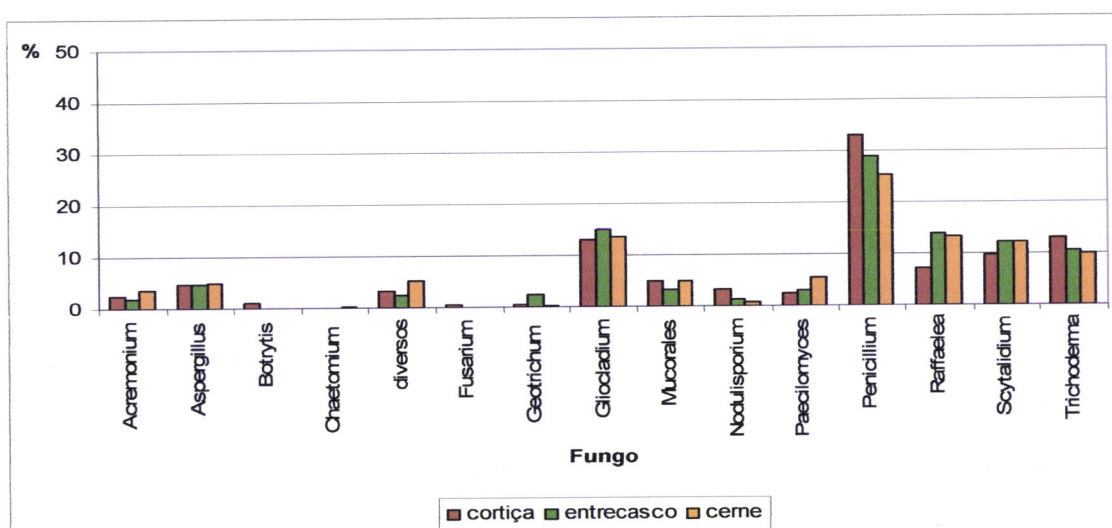


Figura 17 - Percentagem de fungos isolados de galerias de *Platypus cylindrus* das diferentes secções do toro de sobreiro: cortiça, entrecasco e cerne.

Ao longo das galerias distinguem-se cinco zonas pela sua proximidade do exterior, contacto com os parentais e presença dos diferentes estádios do insecto: cortiça (i) e entrecasco (ii), ambas as partes bastante expostas ao ambiente externo, segue-se a secção já no cerne mas anterior à localização dos parentais (iii), a secção larvar (iv) e a

extremidade da galeria (v). Entre as cinco secções das galerias não se verificam grandes diferenças quantitativas, mantendo-se um padrão de variabilidade e percentagem de fungos isolados comum, o que vem, mais uma vez, sugerir que as galerias não se encontravam no melhor estado de manutenção. Também entre as diferentes distâncias das galerias (revestimento, galeria, 0,5 cm e 1,0 cm), analisadas de modo a verificar a penetração dos fungos na madeira, não se registaram diferenças (Figura 18) tal como constatado por Sousa *et al.* (1997).

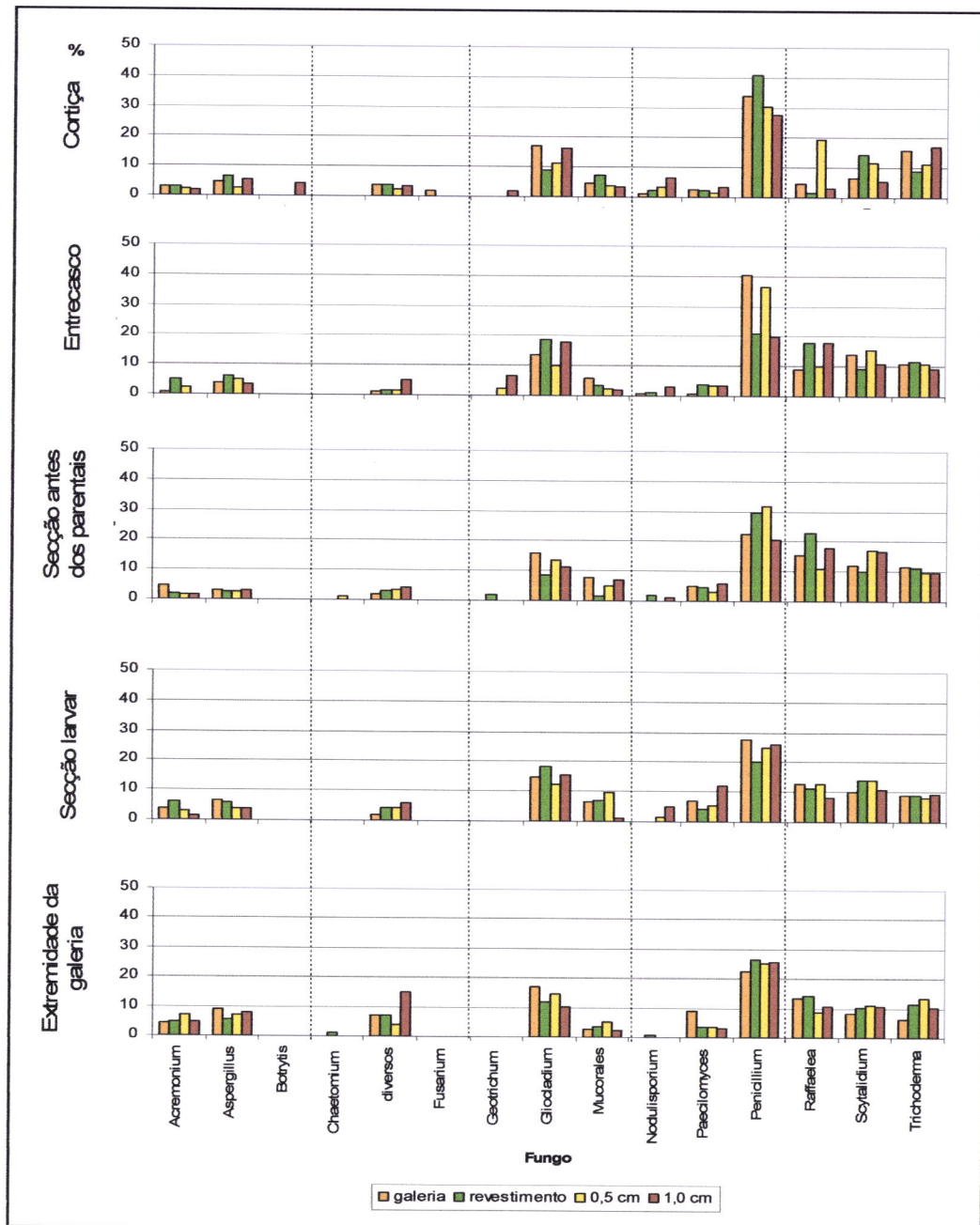


Figura 18 – Percentagem de fungos isolados das secções das galerias de *Platypus cylindrus* em sobreiro (cortiça, entrecasco, secção antes dos parentais, secção larvar e extremidade da galeria) a diferentes distâncias: revestimento, galeria, a 0,5 cm e 1,0 cm.

No entanto, durante os períodos de actividade dos insectos, os fungos não apresentam todos a mesma distribuição espacial ao longo das galerias: de acordo com Sousa (1996), fungos isolados nas galerias onde as larvas se alimentam (*R. ambrosiae*, *Ascoidea* sp., *Acremonium* sp., *F. solani*, *G. roseum*, *G. solani*, *Nodulisporium* sp. e *P. strigosozonata*) não estão presentes na entrada da galeria. Fungos como *A. carbonarius*, *Penicillium* sp., *P. variotii*, *T. viride*, *T. roseum* só se encontram na entrada ou em galerias cujas colónias já se encontram em declínio (Baker, 1963; Sousa, 1996). A zona localizada após a camada de cortiça mas antes da presença de insectos adultos é uma zona de transição da micoflora da galeria estando presentes tanto os fungos saprófitas, típicos da entrada, como também alguns dos fungos mais directamente envolvidos com os insectos (Sousa, 1996).

Entre os fungos isolados, o género *Raffaelea* esteve sempre presente em todas as secções a todas as distâncias da galeria, registando-se uma maior percentagem destes fungos na secção antes dos parentais (67% na totalidade das distâncias) e a menor na entrada ao nível da cortiça (29%). Fungos do género *Acremonium* estão também presentes em todas as secções, em maior percentagem na extremidade da galeria (21%). *Nodulisporium* sp. encontra-se principalmente ao nível da cortiça (13,4%), embora esteja também presente em todas as secções. *Botrytis* sp. e *Fusarium* sp. foram apenas isolados esporadicamente ao nível da cortiça (4% e 2%, respectivamente), do mesmo modo que *Chaetomium* sp. foi isolado no cerne (2%). *Geotrichum* sp. foi também isolado numa percentagem muito baixa apenas no início da galeria até à secção antes dos parentais (13% no total). Fungos cosmopolitas como *Aspergillus* sp., *Gliocladium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e Mucorales, também se encontraram em todas as localizações amostradas, no seu conjunto em elevadas percentagens, apresentando apenas pequenas variações entre elas.

No caso de *P. cylindrus*, tem sido dada maior relevância aos fungos isolados directamente de insectos do que aos isolados a partir de galerias: Baker (1963) destacou como fungos ambrósia associados apenas aqueles isolados a partir do insecto (principalmente do conteúdo intestinal); Cassier *et al.* (1996) só estabeleceram culturas a partir dos micângios e exosqueleto do insecto. Sousa (1996) registou todos os fungos isolados a partir do insecto (tanto micângios de fêmeas como conteúdo intestinal de larvas e insectos), também encontrados nas galerias, principalmente nas zonas onde as

larvas se alimentam e na zona de transição. No entanto, apenas considerou directamente envolvidos na alimentação de insectos e larvas aqueles isolados do seu conteúdo intestinal, a maioria dos quais foram também isolados de micângios (*Ascoidea* sp., *F. solani*, *G. roseum* e *R. ambrosiae*), sugerindo assim a sua vecção específica por *P. cylindrus*.

Os isolamentos a partir dos insectos demonstraram, em termos globais, uma distribuição muito semelhante entre os dois sexos, tendo-se obtido os mesmos 13 fungos em percentagens próximas em ambos os casos (Figura 19). Tal como nas galerias, foram os géneros *Raffaelea* (25,6% em fêmeas e 23,5% em machos) e *Penicillium* (21,5% e 23,8%) que mais se destacaram.

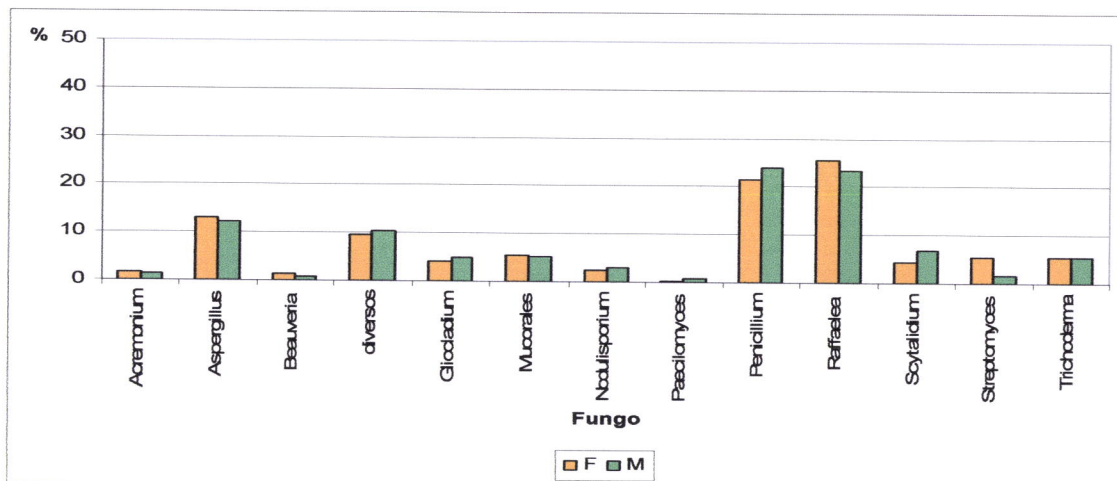


Figura 19 - Percentagem de fungos isolados a partir de fêmeas (F) e machos (M) de *Platypus cylindrus*.

Foi no exosqueleto que se isolou a maior variedade e percentagem de fungos, comparativamente aos micângios e conteúdo intestinal (Figura 20). De facto, dos 13 géneros de fungos isolados dos insectos, todos foram encontrados no exosqueleto e alguns (*Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp.) observaram-se apenas nesta região. Fungos cosmopolitas como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e Mucorales apareceram em maior percentagem no exterior, apesar de terem sido também isolados dos outros órgãos do insecto. Já nos trabalhos de Cassier *et al.* (1996) foram isolados fungos saprófitas como *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. a partir do exterior do insecto que o autor considerou estarem apenas envolvidos numa relação

comensalista com o hospedeiro. De facto, a associação aleatória de fungos ao exosqueleto dos platipodídeos e seu conseqüente transporte e dispersão foi referida por outros autores (Francke-Grosmann, 1967; Moser, 1985).

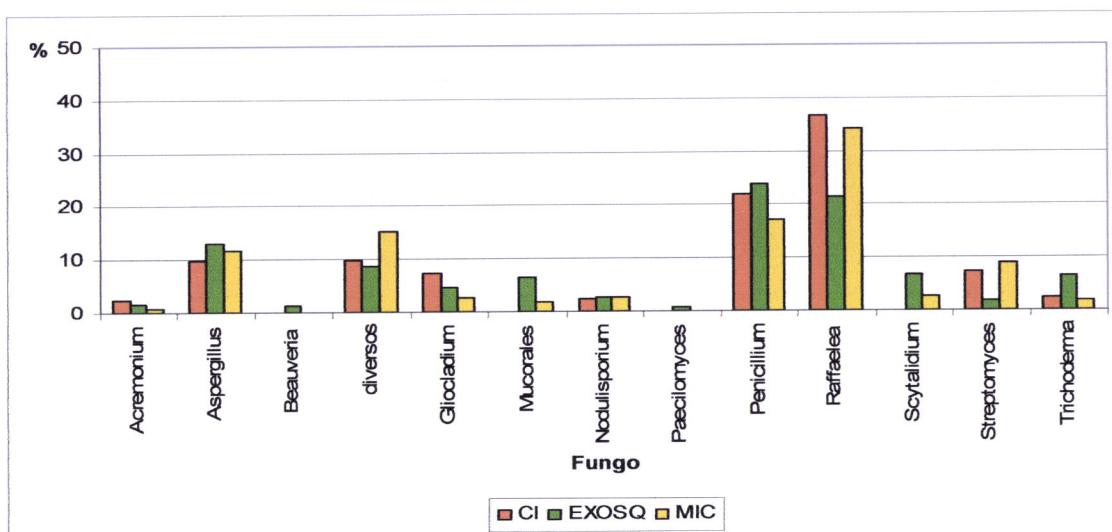


Figura 20 – Percentagem de fungos isolados do conteúdo intestinal (CI), exosqueleto (EXOSQ) e micângios (MIC) de *Platypus cylindrus*.

A generalidade dos fungos presentes no exosqueleto é também verificada na comparação dos géneros de fungos isolados dos dois sexos de *P. cylindrus*, tendo-se isolado nos machos e fêmeas mesmos géneros de fungos. Nos micângios, a fêmea apresenta maior percentagem e variedade de fungos nos (10 géneros de fungos nas fêmeas vs 9 géneros no macho), assim como no conteúdo intestinal (9 géneros de fungos nas fêmeas vs 5). Em ambos os sexos e em todas as partes do insecto, encontram-se fungos considerados ambrósia assim como outros, incluindo cosmopolitas (Figura 21).

Dos micângios foi isolada uma grande variedade de fungos (11 géneros), sobressaindo os do género *Raffaelea* (34%), seguidos de *Penicillium* (17%) (Figura 20). Os géneros *Acremonium*, *Scytalidium* e *Streptomyces* não estavam ainda descritos em associação aos micângios de *P. cylindrus*. Em ambos os sexos foram isolados fungos ambrósia como *Raffaelea* sp., cosmopolitas como *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Mucorales* e potencialmente patogénicos como *Nodulisporium* sp. (Figura 21).

Apesar de se ter obtido uma maior quantidade e variedade de fungos a partir dos micângios de fêmeas, espectável pelo maior número de orifícios micangiais que contêm, os isolamentos efectuados a partir de micângios dos machos vêm demonstrar que também estes participam no transporte de fungos. Estas observações vêm contrapor a teoria de que o transporte específico de fungos ambrósia para as galerias em novos hospedeiros é exclusivo das fêmeas (Baker, 1963).

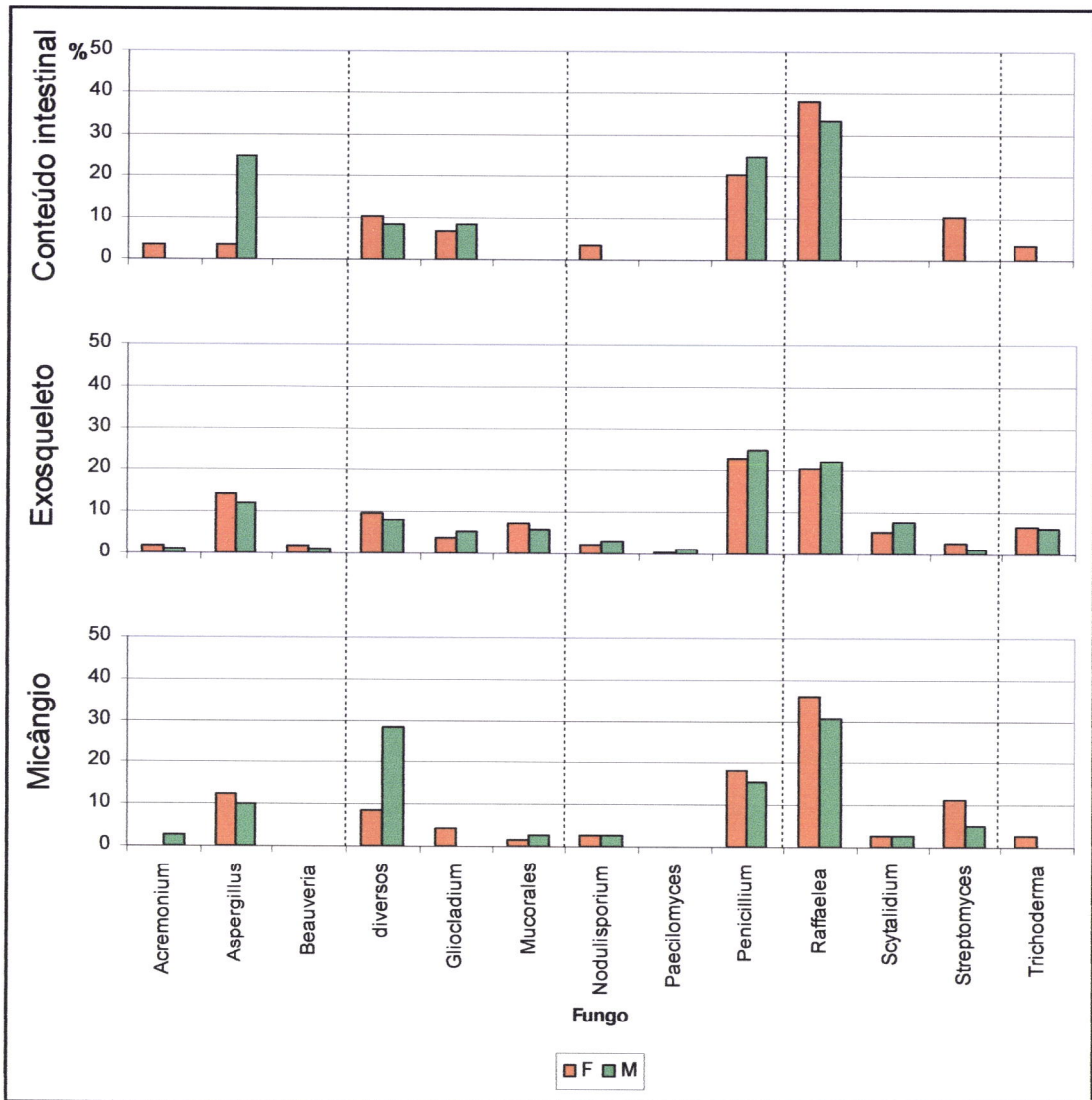


Figura 21 – Percentagem de géneros de fungos isolados das diferentes partes (conteúdo intestinal, exosqueleto e micângio) de fêmeas (F) e machos (M) de *Platypus cylindrus*.

Batra (1963) justificou o isolamento ocasional de fungos não considerados ambrósia a partir dos micângios, pela presença de uma elevada densidade de fungos estranhos na galeria, provavelmente resultado de uma actividade lenta dos insectos parentais. Uma vez presentes nos micângios, esses fungos usufruem da protecção e transporte dos verdadeiros ambrósia.

Do conteúdo intestinal dos insectos resultou um muito menor número de fungos isolados (9 géneros) relativamente aos outros órgãos, observando-se uma maior percentagem de *Raffaelea* sp. (37%), seguido de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Gliocladium* (Figura 20). Entre sexos, é no conteúdo intestinal das fêmeas que se encontra tanto maior variedade como maior quantidade de fungos, encontrando-se, em ambos os casos, *Raffaelea* sp. assim como outros fungos não considerados ambrósia (Figura 21). Foi isolado *Streptomyces* mas apenas do conteúdo intestinal das fêmeas. Relativamente a dados de trabalhos anteriores da associação com *P. cylindrus* (Baker, 1963; Sousa, 1996), registou-se uma elevada percentagem de fungos considerados cosmopolitas e até saprófitas no conteúdo intestinal dos insectos. No entanto, segundo Subramanian (1983), na maioria dos casos, enquanto as larvas se alimentam exclusivamente dos fungos ambrósia primários, os adultos são xilomicetófagos, alimentando-se tanto dos fungos ambrósia primários como auxiliares e até da própria madeira, o que justifica a presença de tão vasta variedade de fungos no seu conteúdo intestinal.

Comparando os fungos presentes no insecto com os presentes nas secções das galerias é possível averiguar o transporte, especializado ou não, dos fungos para as galerias, assim como o seu envolvimento na alimentação dos insectos (Quadro 11). Nos micângios encontram-se 11 dos 15 géneros de fungos isolados das galerias. Para além dos fungos isolados das galerias em pequenas percentagens (*Botrytis* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp. e *Geotrichum* sp.) apenas *Paecilomyces* sp. não apareceu nestes órgãos de transporte, assim como *Beauveria* sp. apenas isolado a partir do exterior do insecto. Os fungos isolados a partir do conteúdo intestinal dos insectos serão, à partida, aqueles de que se alimentam, encontrando-se muitos dos fungos presentes nas galerias (7 de 15), a maioria dos quais são cosmopolitas. Para além dos fungos presentes nas galerias em percentagens reduzidas, apenas os fungos da ordem Mucorales e dos géneros *Paecilomyces* sp. e *Scytalidium* sp. não foram isolados no conteúdo intestinal. Por outro lado, fungos do género *Streptomyces* estavam no conteúdo intestinal não tendo sido

encontrados nas galerias. A maioria dos fungos presentes nas galerias foi também encontrada no exosqueleto (11 de 15): de facto, os 4 géneros de fungos que não se isolaram dessa parte do insecto são os que estavam presentes nas galerias em percentagens bastante baixas.

Quadro 11 – Fungos presentes nas diferentes secções das galerias (cortiça, entrecasco, secção antes dos parentais, secção larvar e extremidade da galeria) e isolados do conteúdo intestinal, exosqueleto e micângios de *Platypus cylindrus*

Fungos isolados	Insectos			Galerias				
	CI	Exosq	Mic	Cortiça	Entrecasco	Secção antes dos parentais	Secção larvar	Extremidade da galeria
<i>Acremonium</i>								
<i>Aspergillus</i>								
<i>Beauveria</i>								
<i>Botrytis</i>								
<i>Chaetomium</i>								
<i>Fusarium</i>								
<i>Geotrichum</i>								
<i>Gliocladium</i>								
Mucorales								
<i>Nodulisporium</i>								
<i>Paecilomyces</i>								
<i>Penicillium</i>								
<i>Raffaelea</i>								
<i>Scytalidium</i>								
<i>Streptomyces</i>								
<i>Trichoderma</i>								
diversos								

A ocorrência dos fungos registados vem fomentar o desde sempre controverso conceito de fungos ambrósia, bem como a sua especificidade. Segundo a definição, os fungos ambrósia são aqueles que estando associados aos insectos ambrósia, são a sua fonte de alimento específica, sendo por isso transportados nos órgãos de transporte específicos, cultivados nas galerias e então consumidos. Seria, assim, de supor que os isolamentos a partir de órgãos mais especializados do insecto revelassem esses fungos, sendo mais provável o aparecimento dos secundários ou auxiliares ao nível do exterior do insecto e galerias. No entanto, neste trabalho, obtiveram-se tanto dos micângios como do conteúdo intestinal dos insectos muitos fungos cosmopolitas. Por um lado, pode justificar-se a sua presença pelo estado de degradação das galerias, por outro, a frequente ocorrência destes fungos, mesmo em trabalhos anteriores (Cassier *et al.*, 1996;

Sousa, 1996), pode indiciar a possível relevância destes fungos na interacção insecto-fungo-hospedeiro. A noção de que cada insecto ambrósia estaria associado a um fungo ambrósia específico foi já refutada por Batra (1985) que defendeu a existência de um complexo de fungos associados aos insectos, considerados fungos ambrósia principais e, de acordo com Sousa *et al.* (1997), a grande diversidade de fungos encontrados em associação com *P. cylindrus* será fundamental para o sucesso do desenvolvimento das populações do insecto.

4.3. FUNÇÕES DESEMPENHADAS PELOS FUNGOS NA ECTOSSIMBIOSE

A importância dos fungos em estudo dever-se-á, naturalmente, às suas funções desempenhadas na interacção insecto-fungo-hospedeiro. Para além de constituírem uma fonte de alimento para o insecto, poderão estar envolvidos no processo de enfraquecimento da árvore e degradação de madeira, para facilitar a abertura de galerias, e também participar na própria gestão dos fungos nas galerias, exercendo relações de antagonismo entre si de modo a seleccionar os fungos presentes.

Nos ensaios desenvolvidos para detecção da actividade de degradação de madeira e efeito antagonista sobre outros fungos presentes nas galerias nos hospedeiros foram usados os seis géneros atrás descritos com maior detalhe: *Raffaelea* sp. (isolados B5 e B6), *Acremonium* sp., *Nodulisporium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp.

4.3.1. Degradação de madeira

Sendo no processo de abertura das galerias que ocorre a inoculação dos fungos transportados, os insectos para além de usarem a sua possante armadura bucal trituradora, poderão tirar partido da capacidade de degradação da madeira de certos fungos para facilitar o processo. Para além disso, sendo os fungos os primeiros de uma sucessão de microrganismos que se desenvolve nas galerias acompanhando o ciclo de vida dos insectos, o seu potencial como degradadores de madeira será determinante para o estabelecimento e crescimento das colónias fúngicas.

A madeira é composta por celulose (40-50%), hemicelulose (25-40%), lenhina (20-35%) e componentes não estruturais como terpenos, fenóis, alcalóides e taninos (Santos & Lima, 2005). Uma vez que a celulose é o componente maioritário da madeira e a lenhina o factor limitante para a degradação dos compostos lenhocelulósicos, o potencial de degradação dos fungos foi apenas testado para estes dois componentes. Os resultados estão resumidos no Quadro 12. Na Figura 22 estão ilustrados os resultados obtidos na pesquisa de celulases e na Figura 23 nos diferentes testes para as lenhinas.

Quadro 12 – Análise da capacidade dos fungos para degradar celulose e substratos análogos de lenhina em meios de cultura corados

Fungo \ Teste	Celulose		Lenhina	
	celulose-azure	azul de metileno	azul de dextrano	azul Coomassie
<i>Raffaelea</i> sp. - B5	-	-	-	-
<i>Raffaelea</i> sp. - B6	-	-	-	-
<i>Acremonium</i> sp.	+	-	-	-
<i>Nodulisporium</i> sp.	++	++	+	-
<i>Scytalidium</i> sp.	++	++	+	-
<i>Trichoderma</i> sp.	++	+	+	-
<i>Gliocladium</i> sp.	++	+	+	-
<i>Trametes</i> sp.		++	++	++

- não degrada

+ degrada

++ degrada intensamente

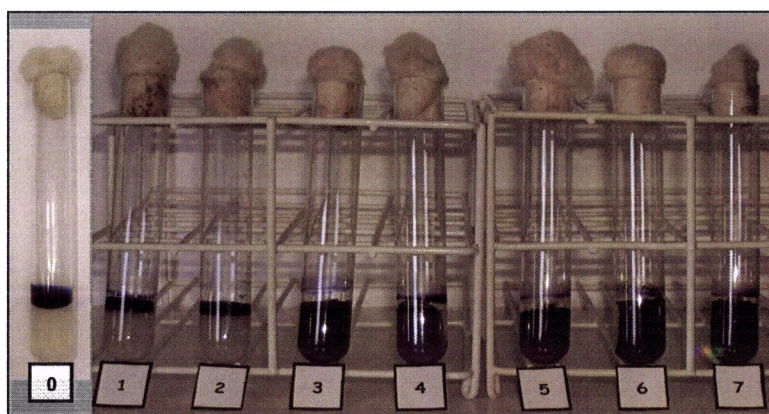


Figura 22 – Resultados dos testes de degradação de celulose. A migração da cor azul do meio para a camada inferior é indicadora de degradação do composto (0 não inoculado, 1 *Raffaelea* sp. isolado B5, 2 *Raffaelea* sp. isolado B6, 3 *Acremonium* sp., 4 *Nodulisporium* sp., 5 *Scytalidium* sp., 6 *Trichoderma* sp., 7 *Gliocladium* sp.).

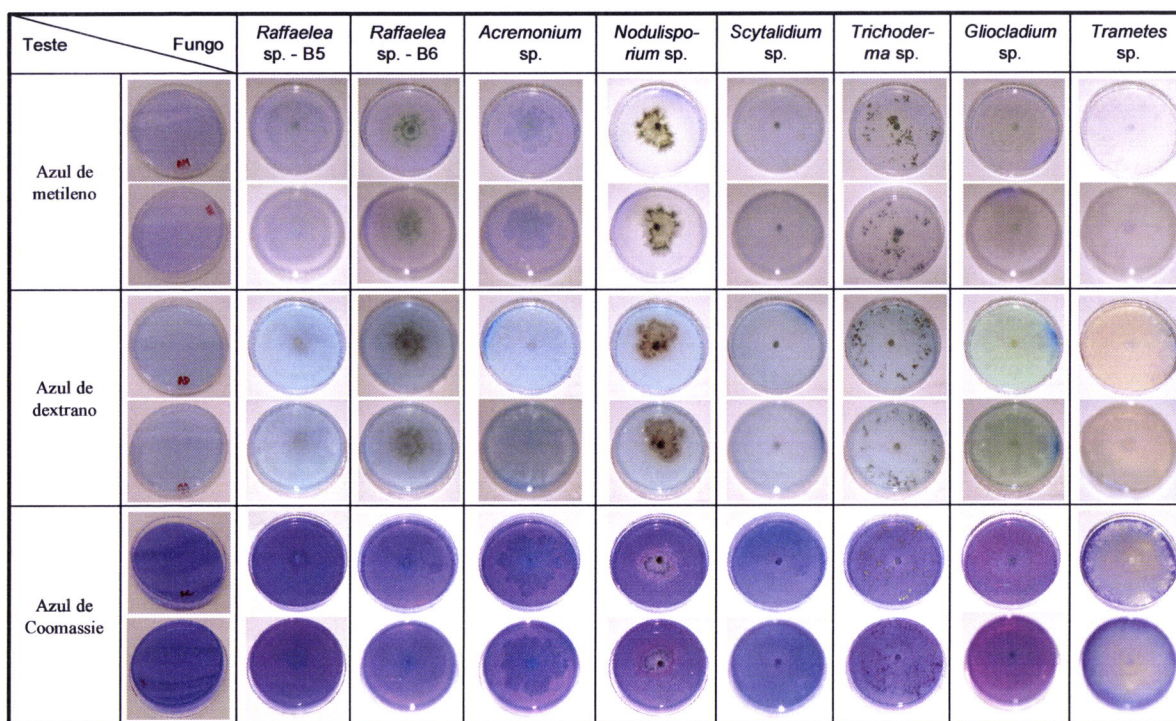


Figura 23 – Resultados dos testes indicativos da acção de lenhinases (testes de azul de metileno, azul de dextrano e azul de Coomassie). A alteração de cor dos meios de cultura é indicadora de reacção de degradação dos respectivos compostos.

Os dois isolados do género *Raffaelea* (B5 e B6) testados não degradaram nem a celulose-azul nem nenhum dos compostos análogos de lenhina (azul de metileno, azul de dextrano e azul de Coomassie) não apresentando, *in vitro*, potencial de degradação dos principais constituintes da madeira. Sendo estes fungos muito pouco estudados, não se encontra bibliografia sobre o assunto, mesmo sobre *Ophiostoma* sp. Muitos fungos desta ordem são conhecidos por deteriorar a madeira, causando a doença do azulado da madeira. No entanto, este processo apenas envolve a descoloração do xilema pela produção de hifas pigmentadas que crescem principalmente no raio do parênquima, sendo disseminadas pelo xilema e causando as linhas de descoloração; não há referências da degradação enzimática da madeira (Tainter & Baker, 1996).

Os resultados negativos de *Raffaelea* sp. nestes testes de detecção de enzimas lenhinocelulolíticas levam a questionar a possibilidade de estes fungos ambrósia serem os primeiros a colonizar as galerias dos insectos nos hospedeiros: sem a capacidade de degradar a madeira, os fungos são incapazes de explorar a fonte de carbono necessário ao seu desenvolvimento. Possivelmente, haverá a inoculação simultânea ou anterior de outros microrganismos (de natureza fúngica ou não) que servem de substrato para a

colonização destes fungos ou talvez a excreção de substâncias nutritivas por parte dos insectos aquando da abertura das galerias.

Acremonium sp. revelou a acção de celulasas, embora com reduzida intensidade, não apresentando qualquer actividade lenhínolítica. Em fungos deste género tem sido verificada a produção de celulasas *in vitro*, apesar de a degradação efectiva da madeira não ser eficiente (Nilson, 1974).

Nodulisporium sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. registaram uma forte actividade celulolítica e algum potencial de degradação de lenhina, mais intenso para os géneros *Nodulisporium* e *Scytalidium*. De facto, fungos da família Xylariaceae colonizam e decompõem a madeira, degradando não só celulose mas também lenhina (Pointing *et al.*, 2003). Os géneros *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. são todos reconhecidos como degradadores de madeira (Kiffer & Morelet, 1997), sendo particularmente estudados os dois últimos tanto pela sua boa capacidade celulolítica como também lenhínolítica, apesar de menos intensa (Szakacs & Tengerdy, 1997; Kluczek-Turpeinen *et al.*, 2003). Os fungos saprófitas são, de entre os microrganismos existentes, os que realizam com maior eficiência a degradação de compostos lenhocelulósicos, devido, essencialmente, à acção de variados complexos enzimáticos por eles produzidos (Knapp, 1985).

Por razões de simplicidade, rapidez e economia, os métodos de difusão em agar são muito usados para a detecção primária de actividades enzimáticas extracelulares e ao mesmo tempo fornecem uma estimativa da quantidade de enzima produzida. Estes métodos usam as propriedades físico-químicas específicas do substrato utilizado como fonte de carbono como, por exemplo, a sua solubilidade, a capacidade de gelificar ou a possibilidade de interagir com corantes (Santos & Lima, 2005). O uso de corantes poliméricos como substratos análogos da lenhina constitui um método simples, rápido e quantitativo, por espectrofotometria, para avaliar a actividade do metabolismo secundário envolvido no sistema de degradação da lenhina. Estes corantes são compostos facilmente solúveis e estáveis, são obtidos comercialmente em estado puro, não são dispendiosos e apresentam muito reduzida toxicidade para os fungos. A correlação entre a descoloração dos corantes e a actividade lenhínolítica foi testada por comparação do efeito de parâmetros fisiológicos, mutações e estimulação/ inibição de

ambos os processos, verificando-se o comum envolvimento do sistema de degradação de lenhina dos fungos (Glenn & Gold, 1983).

As possíveis deduções dos testes *in vitro* para a situação natural apresentam as limitações inerentes a testes presuntivos, em que os substratos utilizados representam os compostos existentes na natureza, com culturas puras de fungos e em condições supostamente ideais para a actividade enzimática a detectar mas que podem não ser as óptimas para o crescimento ou produção de extrólitos fúngicos.

4.3.2. Antagonismos entre fungos

Após a abertura das galerias e estabelecimento de fungos torna-se necessária a manutenção das colónias dos fungos que servem de alimento a larvas e imagos, o controlo de fungos indesejáveis e evitar a asfixia pelo excessivo crescimento de micélio. Apesar da gestão dos fungos nas galerias dos insectos ambrósia nos hospedeiros ser assegurada principalmente pela actividade dos parentais, também as interacções entre os vários fungos exercem um autocontrolo determinante da sucessão micológica espaciotemporal das galerias. A avaliação das relações interespecíficas tem grande importância tanto na compreensão do papel ecológico de cada fungo nas comunidades microbianas como na definição da capacidade combativa de potenciais agentes de biocontrolo.

Para avaliar uma possível acção de antagonismo entre os fungos em estudo estabeleceu-se a confrontação directa entre cada par de fungos de acordo com os esquemas descritos em 3.2.2., observando-se finalmente o seu crescimento nas várias condições de vizinhança. Na Figura 24 apresentam-se exemplos das placas cultura resultantes dos testes de confrontação realizados.

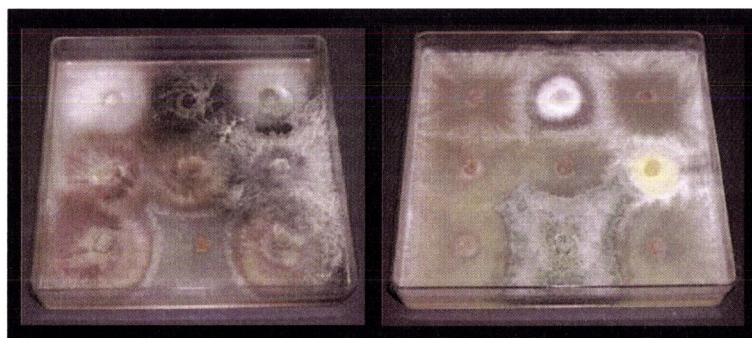


Figura 24 – Exemplos das placas de cultura dos testes de antagonismo.

Os resultados foram analisados para cada par de fungos em confrontação directa e registados de acordo com os critérios indicados por Wald *et al.* (2004): sobreposição, invasão e “deathlock” (Anexo 3). Após o cálculo dos valores representativos do comportamento de cada fungo nas confrontações construiu-se o diagrama da Figura 25 onde, para além de verificar cada situação independente, é possível ter uma visão generalizada da acção de cada fungo sobre os outros e comparar os resultados das duas situações analisadas: a inoculação simultânea de todos os fungos no meio de cultura e a inoculação faseada em que se inoculou os diferentes fungos de acordo com as respectivas taxas de crescimento de modo a anular este efeito.

Na competição entre fungos há que ter em conta a captura primária de recursos, quando dois ou mais micélios estão limitados pela dependência comum do substrato nutritivo ou outro factor ambiental, e a captura secundária dos recursos, se um fungo já tiver colonizado o substrato primário mas for substituído por outro competidor (Jeffries & Young, 1994). O sucesso na captura primária dos recursos é determinado por vários factores, incluindo a dispersão eficiente, rápida germinação dos esporos e extensão micelial e a capacidade para utilizar os compostos orgânicos disponíveis (Boddy, 2000). Os processos de interacção entre os fungos, principalmente ao nível do micoparasitismo, são por vezes muito específicos, envolvendo mecanismos bioquímicos e fisiológicos de reconhecimento e resposta que determinam a invasão física do hospedeiro ou dos seus recursos (Jeffries & Young, 1994).

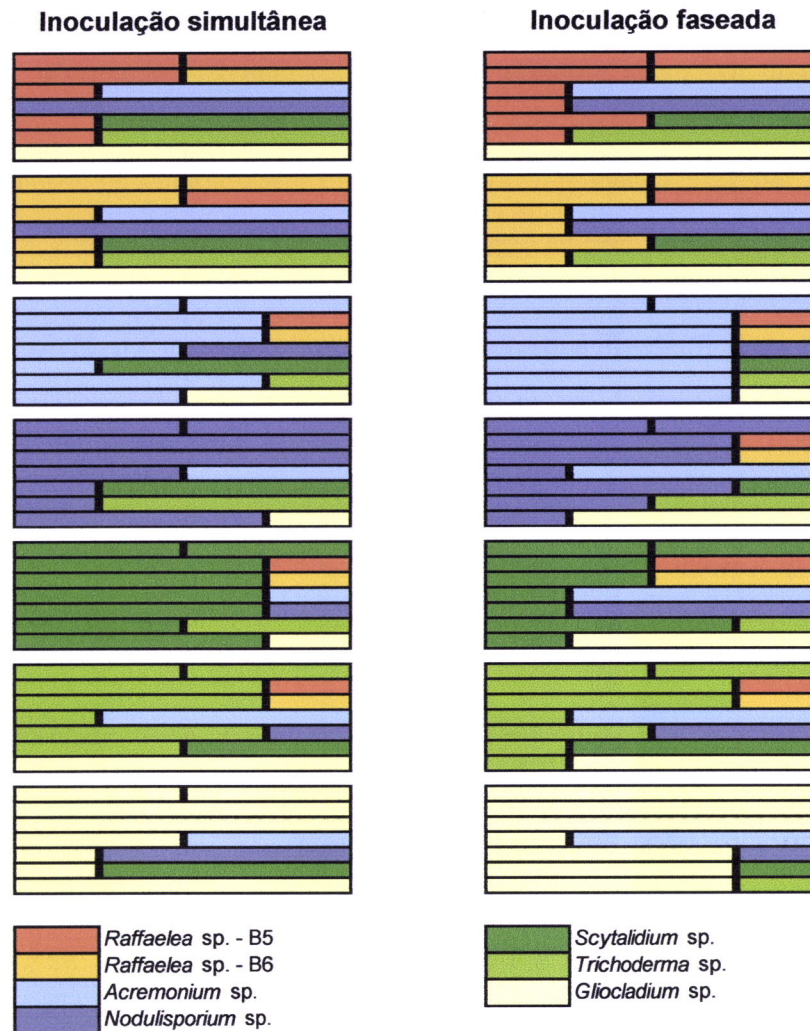


Figura 25 – Diagrama representativo dos resultados dos testes de antagonismo.

A capacidade antagonista de um fungo é determinada, em parte, pelo seu estado fisiológico, pelo que alterações das condições químicas e fisiológicas ou nutricionais associadas com a utilização dos recursos vão afectar o resultado final da interacção. Podem distinguir-se vários mecanismos envolvidos nos processos de antagonismo como produção de antibióticos, secreção de enzimas líticas, interferência de hifas e penetração directa no hospedeiro (Jeffries & Young, 1994).

Entre os vários fungos isolados directamente a partir dos insectos e das suas galerias em sobreiro, vários são já conhecidos como antagonistas, sendo mesmo usados no controlo de diversos patógenos de plantas. O que demonstrou maior acção antagonista sobre os outros fungos testados foi *Acremonium* sp., especialmente quando inoculado de modo a compensar as diferentes taxas de crescimento, em que invade o espaço de todos os

outros fungos, conseguindo assim a captura primária dos recursos ao contrário do que acontece quando inoculado simultaneamente. Este género é considerado antagonista fúngico e toxinogénico (Kiffer & Morelet, 1997). *Acremonium zeae* Gams & Sumner, por exemplo, interfere fortemente no crescimento das colónias de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg quando confrontados em placa de Petri. O seu efeito inibidor tanto do crescimento dos fungos como da consequente produção de toxinas foi verificado sobre grãos de milho, estando envolvidas substâncias antibióticas neste processo de interacção com os fungos competidores (Wicklow *et al.*, 2005).

Trichoderma sp., apesar do seu rápido crescimento, acaba por sofrer a acção dos outros fungos que invadem o seu espaço ou crescem sobre o seu micélio, apenas consegue invadir *Raffaelea* sp.. *Gliocladium* sp., quando em igualdade de crescimento, consegue invadir ou sobrepor os outros fungos excepto *Acremonium* sp. que o invade a ele. É o único fungo que para além da captura primária consegue exercer a captura secundária dos recursos principalmente em relação a *Raffaelea* sp.

Tanto *Trichoderma* spp. como *Gliocladium* spp. compreendem fungos antagonistas, usados comercialmente em controlo biológico de várias doenças. De facto, várias espécies de *Trichoderma*, como *T. harzianum* Rifai, *T. polysporum* (Link) Rifai e *T. viride* Pers. e *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (*Gliocladium virens* J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) têm demonstrado uma eficiente acção antifúngica em fungos dos géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Cryphonectria*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, entre outros, assim como no controlo de fungos degradadores de madeira como *Lentinus*, *Trametes*, *Phlebia*, *Irpex*, *Postia*, *Neolentinus* e *Gloeophyllum* (Highley & Ricard, 1988; Samuels, 1996; Hermosa *et al.*, 2000; Wilhite & Straey, 1996; Highley, 1997). Ensaio *in vitro* (confrontação em placa de Petri) revelaram também a acção antagonista de *T. virens* sobre fungos do azulamento da madeira (*Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau, *C. minor* (Hedgc) J. Hunt e *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud) (Highley *et al.*, 1997). Para além da panóplia de enzimas líticas, que incluem quitinases e β -1,3-glucanases, determinantes na acção de degradação da parede celular fúngica, *Trichoderma* spp. é também produtor de vários antibióticos que interferem nos processos de crescimento e esporulação dos fungos combativos (Wilhite & Straey, 1996; Barbosa *et al.*, 2001). Do mesmo modo, os

fungos do género *Gliocladium* são conhecidos antagonistas de fungos, sendo comercializados produtos fungicidas à base deste fungo utilizados em modo de produção biológico. Espécies do género *Gliocladium* exercem a sua acção sobre fungos como *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., entre outros (Teperi *et al.*, 1998; Köhl *et al.*, 1999).

Os dois isolados do género *Raffaelea* apresentam um comportamento equivalente em ambas as situações: quando confrontados consigo mesmo ou entre si atingem uma situação de “deathlock” em que ambos param de crescer sem que se sobreponham ou invadam o espaço do outro; quando confrontados com fungos dos outros géneros ou deixam invadir o seu espaço ou mesmo sobrepor o seu micélio. Tanto na inoculação simultânea como na faseada, *Gliocladium* sp. tem a capacidade de sobrepor *Raffaelea* sp., enquanto em relação a *Nodulisporium* sp. e *Scytalidium* sp. há uma diferença de comportamento quando *Raffaelea* sp. tem oportunidade de se desenvolver primeiro, confrontando-se já em igualdade de crescimento: na inoculação faseada é invadida por *Nodulisporium* e encontra-se em “deathlock” com *Scytalidium* sp. Não existe informação quanto à capacidade antagonista de *Raffaelea* sp, nem mesmo de outros fungos da ordem Ophiostomatales. Ficou verificado que para além da sua reduzida taxa de crescimento, estes fungos não revelaram acção combativa quando confrontados com os outros fungos, mesmo na inoculação faseada, deixando-se na maioria dos casos invadir ou mesmo sobrepor.

Scytalidium sp. revelou actividade antagonista, principalmente quando inoculado simultaneamente; na inoculação faseada, apenas consegue invadir o espaço de *Raffaelea* sp. e *Trichoderma* sp. A captura primária efectuada por este fungo parece estar associada essencialmente à sua elevada taxa de crescimento. O género *Scytalidium* é considerado um fungo antagonista (Kiffer & Morelet, 1997). É conhecido um metabolito isolado de filtrados de culturas deste género que apresenta actividade contra vários fungos *in vitro* (Subramanian, 1983). Em 1973, Klingstrom & Johansson, mostraram que várias espécies deste género (*S. aurantiacum* Klingstrom & Beyer, *S. album* Beyer & Klingstrom e *S. lignicola*) mostraram acção antagonista contra fungos degradadores de madeira mas foram fracos inibidores de fungos do azulamento da madeira. Em blocos de madeira de bétula verificou-se a acção antagonista de *Scytalidium* sp. sobre fungos causadores de podridão branca e podridão castanha (Cease *et al.*, 1989).

Nodulisporium sp. apresenta uma taxa de crescimento elevada, sendo a sua capacidade de captura de recursos bastante influenciada por esse factor. Não se encontram referências a estudos anteriores de antagonismo relativos a este fungo, conhecendo-se apenas a sua capacidade de produzir um composto com propriedade insecticida (ácido nodulispórico) (Platas *et al.*, 2002). Já em relação ao seu teleomorfo, *B. mediterranea*, foram realizados vários testes de confrontação em placa de Petri com fungos endófitos de sobreiro, tendo-se verificado para a maioria das espécies vantagem competitiva, nomeadamente várias espécies de *Trichoderma* (*T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, *T. citrinoviride* Bissett, *T. fertile* Bissett, *T. harzianum* Rifai) cujo micélio sobrepôs o de *B. mediterranea* (Franceschini, 2006; Maddau *et al.*, 2006).

Apesar dos ensaios laboratoriais fornecerem informações válidas, a interpretação dos resultados e a sua extrapolação para o campo tem que ser cautelosa uma vez que as interacções em culturas artificiais e em substratos naturais não são necessariamente semelhantes. Os testes *in vitro* são feitos com misturas de culturas puras em condições ambientais favoráveis e excesso de nutrientes, pelo que apenas fornecem a indicação da susceptibilidade dos fungos na ausência dos competidores naturais (Jeffries & Young, 1994). O potencial hídrico, regime gasoso e a temperatura afectam consideravelmente os resultados das interacções nas culturas artificiais, assim como as dimensões e a qualidade dos recursos a que os fungos têm acesso. A configuração inicial do padrão de inoculação de mais de duas espécies influencia consideravelmente o desenvolvimento da comunidade, independentemente da quantidade e proporção de inóculo (Boddy, 2000).

5. CONCLUSÕES

P. cylindrus tem sido considerado, ao longo dos últimos anos, como um dos mais importantes agentes bióticos directamente implicados no processo de declínio do sobreiro. Sendo um insecto ambrósia, estabelece uma relação simbiótica com fungos essenciais ao desenrolar do seu ciclo de vida. O conhecimento da micoflora associada ao insecto e o esclarecimento das funções desempenhadas por cada fungo na interacção insecto-fungo-hospedeiro, são contributos indispensáveis para a compreensão das estratégias de ataque de *P. cylindrus* ao sobreiro.

Neste trabalho, foi obtida uma vasta panóplia de fungos, tanto directamente do insecto como das suas galerias em sobreiro, alguns ainda não relacionados com *P. cylindrus* ou mesmo com outros insectos ambrósia. Foram isolados fungos dos géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocadium*, *Nodulisporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Raffaella*, *Scytalidium*, *Streptomyces*, *Trichoderma* e ordem Mucorales. Os géneros *Beauveria*, *Chaetomium*, *Geotrichum* e *Streptomyces* não tinham ainda sido isolados desta interacção, assim como a espécie *R. canadensis*, que assume redobrada importância: o género *Raffaelea* inclui vários fungos ambrósia, nomeadamente *R. ambrosiae* e *R. montetyi*, específicas de *P. cylindrus*, no entanto, *R. canadensis* não estava ainda associada ao insecto nem referida em Portugal.

A importância relativa dos fungos isolados a partir dos insectos e suas galerias é muito variável e discutível: para além dos envolvidos na alimentação do insecto, alguns são potencialmente patogénicos para a árvore hospedeira, enquanto outros poderão ser antagonistas ou simplesmente saprófitas que se envolvem numa relação comensalista com o hospedeiro.

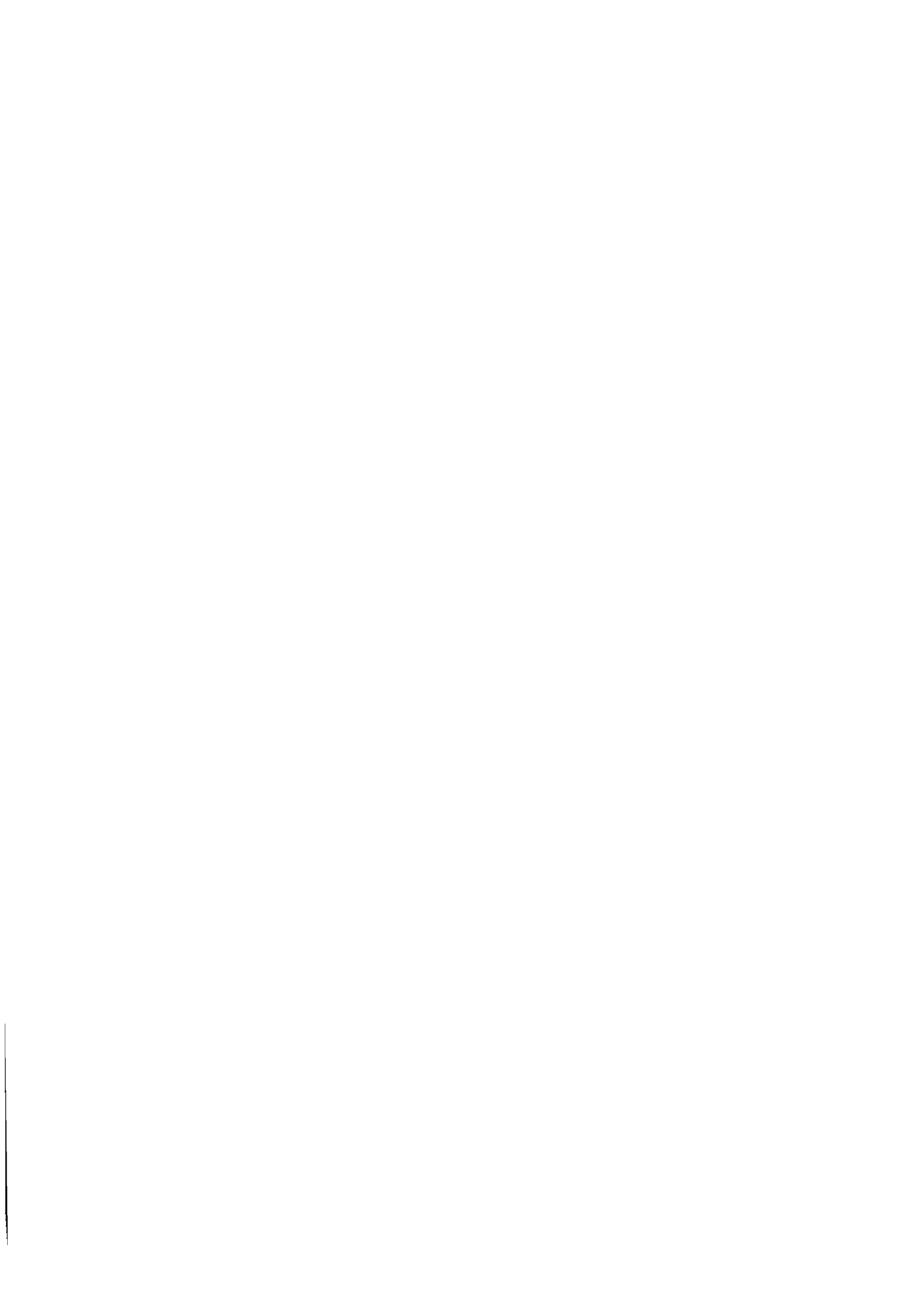
A maioria dos insectos ambrósia mais agressivos está associada a pelo menos um fungo patogénico, possivelmente necessário para superar as defesas do hospedeiro. Os casos mais estudados são os ataques de escolitídeos que transportam e inoculam fungos da ordem Ophiostomatales em coníferas (Paine *et al.*, 1997), no entanto, são várias as situações de Fagáceas, nomeadamente quercíneas que sofrem ataques similares. A situação mais paralela da interacção *P. cylindrus* – fungos ambrósia – sobreiro reporta-

se ao caso japonês, atrás referido, em que foi provado o efeito patogénico de *R. quercivora* em vários hospedeiros. Deste modo, para além de pormenorizar a caracterização dos vários fungos do género *Raffaelea* obtidos, torna-se essencial testar a sua patogenicidade assim como dos outros fungos potencialmente prejudiciais ao sobreiro. A vecção (específica ou aleatória) de fungos nocivos para o sobreiro foi ainda verificada no caso de *Nodulisporium* sp., anamorfo do fungo responsável pelo carvão do entrecasco.

A presença de *Raffaelea* spp. tanto nos vários órgãos do insecto amostrados como nas suas galerias em sobreiro foi bastante evidente, apoiando a possibilidade de estes fungos integrarem o complexo de fungos ambrósia específicos de *P. cylindrus*. De qualquer modo, para além destes, foi obtido um conjunto de fungos maioritariamente saprófitas, cuja incidência aponta para um envolvimento na interacção. Grande parte dos fungos foi ingerida pelos insectos, revelando o seu papel na alimentação dos imagos (*Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Gliocladium* sp., *Nodulisporium* sp., *Penicillium* sp., *Raffaelea* sp., *Streptomyces* sp. e *Trichoderma* sp.). O potencial de degradação da madeira, que auxilia na abertura das galerias e permite a obtenção de nutrientes orgânicos necessários ao estabelecimento das colónias fúngicas, foi apenas observado para alguns fungos (*Nodulisporium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp.). A acção antagonista, que poderá contribuir para a gestão do crescimento dos fungos nas galerias, foi mais intensa no caso de *Acremonium* sp. e *Gliocladium* sp., sobretudo quando se anula o efeito das diferentes taxas de crescimento.

Com estas observações pretendia-se avaliar a implicação dos diferentes fungos na relação com o insecto e o sobreiro, assim como a sua sucessão nas galerias: parte-se do princípio que os fungos com capacidade lenhinocelulolítica seriam os primeiros a estabelecer-se nas galerias e que a acção antagonista entre os vários fungos presentes contribuiria para a definição de colónias posteriores. Os resultados obtidos não foram totalmente esclarecedores, sobretudo atribuindo aos ensaios *in vitro* um carácter meramente indicador e não representativo dos ecossistemas naturais. Uma das principais conclusões refere-se a *Raffaelea* spp., que apesar de não ser um fungo pioneiro, consegue impôr-se nas galerias de sobreiro e órgãos de transporte do insecto, estabelecendo uma nítida relação de fungo ambrósia principal com *P. cylindrus*.

Sendo os fungos ambrósia essenciais ao desenrolar do ciclo de vida destes insectos, a inibição do seu desenvolvimento poderá ser uma ferramenta interessante para o controlo da praga *P. cylindrus* no montado. A aplicação de fitofármacos em sistemas florestais é muito condicionada, nomeadamente pelas normas impostas pelos sistemas de certificação florestal (FSC, 2005). São muito poucos os produtos homologados e, de um modo geral, a implementação de medidas de luta química para além de envolver avultados recursos financeiros e humanos, tem efeitos ecológicos negativos, particularmente no caso do sobreiro cuja utilização da cortiça no sector vinícola proíbe a utilização de produtos com cloro, organoclorados e organofosforados pela sua possível implicação no aparecimento de TCA (tricloroanisol) na cortiça (Pereira *et al.*, 1999a). Entre os novos métodos de protecção que podem vir a ser testados, deverão privilegiar-se métodos biológicos: o uso de fungos antagonistas dos fungos ambrósia principais (como *Gliocladium* sp. que revelou a capacidade de se sobrepor a *Raffaelea* sp. impedindo o seu desenvolvimento, *in vitro*) e de armadilhas iscadas com feromonas específicas para *P. cylindrus* constituem estratégias de grande interesse, tanto para o controlo indirecto como directo desta praga.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S.P. (2002). Insects and other arthropods as agents of vector-dispersal in fungi. <http://www.temperature.com/pdf/AbbottInsectdispersal.pdf> (consultado em 15/04/2006).
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5ª ed., Elsevier Academic Press, USA, 922 pp.
- Algarvio, R. (2000). *Feromonas de agregação em *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae): Evidência Electrofisiológica*. Trabalho de Fim de Curso na Licenciatura em Biologia, Universidade de Évora, Évora, 56 pp.
- Algarvio, R.; Teixeira, C.; Barata, E.; Pickett, J.; Casas Novas, P. & Figueiredo, D. (2002). Identification of a putative aggregation pheromone from males *Platypus cylindrus* (Coleoptera: Platypodidae). In *Proceedings of the 19th Annual Meeting International Society of Chemical Ecology*, University of Hamburg, Germany, pp. 151.
- Anderson, R.F. (1960). Inner-bark boring insects. In *Forests and shade tree entomology*, J. Wiley & Sons (Eds.), New York, pp. 203-244.
- Arx, J.A. von & Hennebert, G.L. (1965). Deux champignons ambrosia. *Mycol. Mycopath. Appl.*, **25**: 309-315.
- Badler, H. (1992). Pathogenicity of *Ceratocystis* spp. in oaks under stress. In *Proceedings of an International Congress "Recent Advances in Studies on oak decline"*, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, pp. 31-37.
- Baeta-Neves, C.M. (1944). Problemas suberícolas na zona pliocénica ao sul do Tejo. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça*, **65**.
- Baeta-Neves, C.M. (1949). A seca dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias*, **2168**.
- Baeta-Neves, C.M. (1950). Introdução à Entomologia Florestal portuguesa. A Serra e o Homem. Colecção Livros Agrícolas.
- Baker, J.M. (1963). Ambrosia beetle and their fungi, with particular reference to *Platypus cylindrus* Fab. *Symp. Soc. General Microbiol.*, **13**: 323-354.
- Baker, J.M. & Norris, D.M. (1968). A complex of fungi mutualistically involved in the nutrition of the Ambrosia beetle *Xyleborus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **11**: 246-250.
- Bakry, M. & Abourouh, M. (1996). Nouvelles données sur le dépérissement du chêne-liège (*Quercus suber* L.) au Maroc. *Ann. Rech. Maroc*, **29**: 24-39.

- Balachowsky, A.S. (1949). *Faune de France Coléoptères Scolytides*. 50, Lechevalier (Ed.), Paris, 320 pp.
- Barata, E.; Casas Novas, P.; Correia, S.; Algarvio, R.; Baltazar, N. & Figueiredo, D. (2002). Cork oak male beetles (*Platypus cylindrus*) release a putative aggregation pheromone that attracts both sexes. In *Proceedings of the 19th Annual Meeting International Society of Chemical Ecology*, University of Hamburg, Germany, pp. 152.
- Barbosa, M.A.G.; Rehn, G.; Menezes, M. & Mariano, R.L. (2001). Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**: 98-104.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1988). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4^a ed, APS Press, Minnesota, USA, 218 pp.
- Barros, M.C.; Mateus, F. & Rodrigues, J.M.G. (2002). The main regions of cork oak decline in Portugal. *IOBC/wprs Bull.*, **25**(5): 1-4.
- Batra, L.R. (1963). Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Trans. Kansas Acad. Sci.*, **66**: 213-236.
- Batra, L.R. (1966). Ambrosia fungi: Extent of specificity to ambrosia beetles. *Science*, **153**: 193-195.
- Batra, L.R. (1967). Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia*, **59**: 976-1017.
- Batra, L.R. (1985). Ambrosia beetle and their associated fungi: Research trends and techniques. *Proc. Indian. Acad. Plant. Sci.*, **49**: 137-148.
- Beaver, R.A. (1989). Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. In *Insect-Fungus Interactions*, N. Wilding, N.M. Collins; P.M. Hammond & J.F. Webber (Eds.), Academic Press, London, pp. 121-143.
- Bisby, F.A.; Ruggiero, M.A.; Roskov, Y.R.; Cachueta-Palacio, M.; Kimani, S.W.; Kirk, P.M.; Soulier-Perkins, A. & van Hertum, J. (2006). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2006 Annual Checklist*. <http://www.sp2000.org>. (consultado em 08/10/2006)
- Blackwell, M. & Jones, K. (1997). Taxonomic diversity and interactions of insect-associated ascomycetes. *Biodiversity and Conservation*, **6**: 689-699.
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**: 185-194.

- Bondout, J.P.; Becquer, T; Merlet, D. & Rouiller, J. (1994). Aluminium toxicity in declining forests: a general overview with a seasonal assessment in a silver fir forest in the Vosges Mountains (France). *Ann. Sci. For.*, **51**: 27-51.
- Brasier, C.M.; Moreira, A.C.; Ferraz, J.F.P. & Kirk, S. (1992). High mortality of cork oak in Portugal associated with *Phytophthora cinnamomi*. In *International Congress Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Selva di Fasano (Brindisi), Italy, pp. 461-462.
- Bright, D.E. (1993). Systematics of bark beetles. In *Beetle-Pathogen Interactions in Conifer Forests*. T.D. Schowalter & G.M. Filip (Eds.), Academic Press, London, pp. 24-36.
- Buchanan, W.D. (1941). *J. Econ. Ent.*, **34**:367. (cit in Cooke, 1977)
- Byers, J.A.; Lanne, B.S.; Löfqvist, J.; Schlyter, F. & Bergström, G. (1985). Olfactory recognition of host-tree susceptibility by pine shoot beetles. *Naturwissenschaften*, **72**: 324-326.
- Cabral, M.T. & Ferreira, M.C. (1999). *Pragas dos Montados*. Estação Florestal Nacional, Lisboa, 94 pp.
- Cabral, M.T. & Sardinha, R.M.A. (1992). Perspectiva integrada do declínio dos montados de sobre alentejanos. In *Actas do II Encontro sobre montados de sobre e azinho*, Évora, pp. 217-231.
- Cain, R.F. (1972). Evolution of the fungi. *Mycologia*, **64**: 1-14.
- Cassar, S. & Blackwell, M. (1996). Convergent origins of ambrosia fungi. *Mycologia*, **88**: 596-601.
- Cassier, P.; Lévieux, J.; Morelet, M. & Rougon, D. (1996). The mycangia of *Platypus cylindrus* Fab. and *P. oxyurus* Dufour (Coleoptera: Platypodidae). Structure and associated fungi. *J. Insect Physiol.*, **42**: 171-179.
- Cease, K.R.; Blanchette, R.A. & Highley, T.L. (1989). Interactions between *Scytalidium* species and brown- or white-rot basidiomycetes in birch wood. *Wood Science and Technology*, **23**(2): 151-161.
- Cecconi, G. (1924). *Manuale di entomologia forestale*. Tipographia del Seminario, Pádova, 680 pp.
- Chararas, C. (1979). *Écophysiologie des insectes parasites des forêts*. C. Chararas (Ed.), Paris, 297 pp.
- Christiansen, E. & Horntvedt, R. (1983). Combined *Ips*/ *Ceratocystis* attack on Norway spruce, and defensive mechanisms of the trees. *Z. ang. Entomol.*, **96**: 110-118.

- Collado J.; Platas, G. & Peláez, F. (2001). Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia*, **93**: 875-886.
- Coocke, R. (1977). *The Biology of Symbiotic Fungi*. John Wiley & Sons Ltd., London, 282 pp.
- Correia, A. & Oliveira, A.C. (2002). Principais espécies florestais com interesse para Portugal – Zonas de influência mediterrânica. *Estudos e Informação*, nº328, MADRP-DGF, 2ª ed., Lisboa, 119 pp.
- Correia, S. (2003). *Feromona de agregação em Platypus cylindrus Fab. (Coleoptera: Platypodidae): Teste de atracção de conspécificos para fonte de odor de machos em túnel de vento*. Trabalho de Fim de Curso na Licenciatura em Biologia, Universidade de Évora, Évora, 79 pp.
- Crous, P.W.; Phillips, A.J. & Wingfield, M.J. (1992). Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. *Mycologia*, **84**: 497-504.
- DeAngelis, J.D., Nebeker, T.E. & Hodges, J.D. (1986). Influence of tree age and growth rate on the radial resin duct system in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. Bot.*, **64**: 1046-1049.
- Degreef, J. (1992). Isolation of *Ophiostoma querci* (Georgev.) Nannfeldt from declining oaks in Belgium: selection techniques and pathogenicity test. In *Proceedings of an International Congress "Recent Advances in Studies on oak decline"*. Selva di Fasano (Brindisi), Italy, pp. 471-473.
- Delatour, C; Menard, A.; Vautrot, A. & Simonin, G. (1992). Pathogenicity assessment of Ophiostomatales: *Ophiostoma querci* on oak compared to *O. novo-ulmi* on elm. In *Proceedings of an International Congress "Recent Advances in Studies on oak decline"*. Selva di Fasano (Brindisi), Italy, pp. 59-65.
- DGF (2006). A produção suberícola – Área de montado de sobro. In <http://www.realcork.org/artigo.php?art=289> (consultado em 15/01/2007).
- Ellis, M.B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB, England, 608 pp.
- Ellis, M.B. (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB, England, 507 pp.
- Español, F. (1964). Los Platipodidos de Cataluña (Col. Phytophagoidea). *Bol. Ser. Plagas For.*, **7**: 115-117.

- Farrell, B.D.; Sequeira, A.S.; O'Meara, B.C.; Normark, B.B.; Chung, J.H. & Jordal, B.H. (2001). The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, **55**(10): 2011-2027.
- Farris, S.H. & Funk, A. (1965). Repositories of symbiotic fungus in the ambrosia beetle *Platypus wilson* Swaine (Coleoptera: Platypodidae). *Can. Entomol.*, **97**: 527-532.
- Ferreira, M.C. & Ferreira, G.W.S. (1986). Notas sobre os insectos nocivos ao *Quercus suber* L. em Portugal. In *Actas do 1º Encontro sobre os Montados de Sobro e Azinho*. Évora, pp. 405-422.
- Ferreira, M.C. & Ferreira, G.W.S. (1989). *Platypus cylindrus* F. (Coleoptera: Platipodidae) Plaga de *Quercus suber*. *Boletim de Sanidade Vegetal Plagas*, **4**: 301-305.
- Ferreira, M.C. & Ferreira, G.W.S. (1991). *Pragas das folhosas*. Publicações D.G.P.A., série Divulgação, 5, MAPA, Lisboa, 191 pp.
- Franceschini, A. (2006). Studies on endophytic fungi of oak trees. In *Abstracts of the Seminar The Vitality of Cork and Holm Oak Stands*, Évora.
- Francke-Grosman, H. (1967). Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects. In: *Symbiosis, its physical and biochemical significance*. S.M. Henry (Ed.), Academic Press, New York, pp. 141-203.
- FSC (2005). FSC Pesticides Policy: proposed revisions. *Forest Stewardship Council*, A.C.
- Furniss, R.L. & Carolin, V.M. (1977). Western Forest Insects. *Forest Service, Miscellaneous Publications* No. 1339. (cit in Kühnholz *et al.*, 2003)
- Gebhardt, H. & Oberwinkler, F. (2005). Conidial development in selected ambrosial species of the genus *Raffaelea*. *Antoine van Leeuwenhoek*, **88**: 61-66.
- Glare, T.R.; Placet, C.; Nelson, T.L. & Reay, S.D. (2002). Potencial of *Beauveria* and *Metarhizium* as control agents of pinhole borers (*Platypus* spp.). *New Zealand Plant Protection*, **55**: 73-79.
- Glenn, A.E.; Bacon, C.W.; Price, R. & Hanlin, R.T. (1996). Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*: **88**(3): 369-383.
- Glenn, J.K. & Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(6): 1741-1747.

- Graham, K. (1967). Fungal-insect mutualism in trees and timber. *Ann. Rev. Entomol.*, **12**: 105-126.
- Graham, K. (1968). Anaerobic induction of primary chemical attractancy for ambrosia beetles. *Can. J. Zool.*, **46**: 905-908.
- Guerber; J.C. & Correll, J.C. (2001). Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*, **93**: 216-229.
- Halin, R.T. (1997). *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol I., APS Press, Minnesota, 263 pp.
- Harrington, T.C. (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, **73**:1123-1129.
- Hartig, T. (1844). Ambrosia des *Bostrichus dispar*. *Allgem. Forst – Jagdztg.* **13**: 73 (cit. in Francke-Grosmann, 1967).
- Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C. & Pegler, D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8^a ed., CAB International, UK, 616 pp.
- Henriques, J.; Inácio, M.L. & Sousa, E. (2006). Ambrosia fungi in the insect-fungi symbiosis in relation to cork oak decline. *Rev. Iberoam. Micol.* **23**: 185-188.
- Hermosa, M.R.; Grondona, I.; Iturriaga, E.A.; Diaz-Minguez, J.M.; Castro, C.; Monte, E. & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(5): 1890-1898.
- Heyden, L.V. (1870). Entomologische Reise nach den sudlichen Spanien der Sierra Guadarama und Sierra Moura, Portugal und den cantabrischen Gedirgen. L.V. Heyden (Ed.), Berlin, 30 pp. (cit in Sousa, 1996).
- Highley, T.L. (1997). Control of wood decay by *Trichoderma* (*Gliocladium virens*) – I. Antagonistic proprieties. *Material und Organismen*, **31**(3): 79-89.
- Highley, T.L.; Anantha Padmanabha H.S. & Howell, C.R. (1997). Control of wood decay by *Trichoderma* (*Gliocladium virens*) – II. Antibiosis. *Material und Organismen*, **31**(3): 157-166.
- Highley, T.L. & Ricard, J. (1988). Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi. *Material und Organismen*, **23**(3): 154-169.
- Horntvedt, R.; Christiansen, E.; Solheim, H. & Wang, S. (1983). Artificial inoculation with *Ips typographus* associated blue-stain fungi can kill healthy Norway spruce trees. *Med. Norsk. Inst. Skogforsk.*, **38**: 1-20.

- Hubbard, H.C. (1897). The ambrosia beetles of the United States. *U.S. Dept. Agr., Div. Entomol. Bull.*, 7: 9-35 (cit. Francke-Grosmann, 1967).
- Inácio, M.L.; Henriques, L. & Sousa, E. (2005). As relações mutualistas entre fungos e insectos: sua influência no estado sanitário da floresta em Portugal. In *Actas das comunicações do 5º Congresso Florestal Nacional*, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu. (formato digital)
- Jeffries, P. & Young, T.W.K. (1994). *Interfungal parasitic relationships*. CAB International, England, 296 pp.
- Jones, K.G. & Blackwell, M. (1998). Phylogenetic analysis of ambrosial species in the genus *Raffaelea* based on 18S rDNA sequences. *Mycol. Res.*, 102: 661-665.
- Kiffer, E. & Morelet, M. (1997). *Les Deutéromycètes – classification et clés d'identification générique*. INRA Editions, Paris, 306 pp.
- Kinuura, H. & Kobayashi, M. (2006). Death of *Quercus crispula* by inoculation with adult *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae). *Appl. Entomol. Zool.* 41(1): 123-128.
- Kirkendall, L.R.; Kent, D.S. & Raffa, K.F. (1997). Interactions among males, females, offspring in bark and ambrosia beetles: The significance of living in tunnels for the evolution of social behaviour. In *The evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids*. J.C. Choe, & B.J. Crespi (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp.181-215 (cit in Kühnholz *et al.*, 2003).
- Klingstrom, A.E. & Johansson, S.M. (1973). Antagonism of *Scytalidium* isolates against decay fungi. *Phytopathology*, 63(4): 473-479.
- Kluczek-Turpeinen, B.; Tuomela, M. ; Hatakka, A. & Hofrichter, M. (2003). Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 374-379.
- Knapp, J.S. (1985). Biodegradation of celluloses and lignins. In *Comprehensive Biotechnology*. M.M. Young (Ed.), vol. 4, Pergamon Press, Oxford, pp. 835-846.
- Köhl, J.; Lombaers-Van Der Plas, C.H.; Molhoek, W.M.L.; Kessel, G.J.T. & Goossen-Van Der Geijn, H.M. (1999). Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *BioControl*, 44: 329-346.

- Kok, L.T. (1979). Lipids of ambrosia fungi in the life of the mutualistic beetles. In *Insect-Fungus symbiosys*. L.R. Batra, (Ed.), Halsted Press, Chichester, Sussex, pp. 33-52 (cit in Beaver, 1989).
- Kubono, T. & Ito, S. (2002). *Raffaelea quercivora* sp. nov. associated with mass mortality of Japanese oak, and the ambrosia beetle (*Platypus quercivorus*). *Mycoscience*, **43**: 255-260.
- Kühlholz, S.; Borden, J.H. & Uzunovic (2003). Secondary ambrosia beetles in apparently healthy trees: Adaptations, potential causes and suggested research. *Integrated Pest Management Reviews*, **6**: 209-219.
- Lanier, L.; Joly, P.; Bondoux, P. & Bellemère; A. (1978). *Mycologie et pathologie forestières*. Tome I - Mycologie forestière. Masson, Paris. 487 pp.
- Lévieux, J. & Cassier, P. (1994). Vection de champignons pathogènes des résineux par les xylophages forestiers. *Ann. Biol.*, **33**: 19-37.
- Lévieux, J.; Cassier, P. & Guilaumin, D. (1991). Structures implicated in the transportation of pathogenic fungi by the European bark beetle, *Ips sexdentatus* Boerner: ultrastructure of a mycangium. *Can. Ent.*, **123**: 245-254.
- Lieutier, F. (1993). Induced defence reaction of conifers to bark beetles and their associated *Ophiostoma* species. In *Ceratocystis and Ophiostoma, taxonomy ecology and pathogenicity*. M.J. Wingfield, K.A. Seifert & J.F. Webber (Eds.), APS Press, Minnesota, pp. 225-234.
- Lieutier, F. & Levieux, J. (1985). Les relations conifères-scolytides: Importance et perspectives de recherches. *Ann. Sci. For.*, **42**: 359-370.
- Lieutier, F.; Yart, A.; Garcia, J.; Ham, M.C.; Morelet, M. & Levieux, J. (1989). Champignons phytopathogènes associés à deux coléoptères scolytidae du pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et étude préliminaire de leur agressivité envers l'hôte. *Ann. Sci. For.*, **46**: 201-216.
- Luque, J.; Parladé, J. & Pera, J. (2000). Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Path.*, **30**: 247-263.
- Maddau, L.; Linaldeddu, B.T. & Franceschini, A. (2006). Antagonistic interactions between fungal endophytes and pathogens involved in oak decline. In *XXVIII Congresso Nazionale della Società Italiana de Patologia*. Università degli studi di Pavia, Pavia.
- MADRP (2000). *O sobreiro e a Cortiça*. DGDR, Lisboa.

- Martin, M.M. (1979). Biochemical implications of insect mycophagy. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **54**: 1-21. (cit in Beaver, 1989)
- Mazzaglia, A.; Anselmi, N.; Gasbarri, A. & Vannini, A. (2001). Development of Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. *Mycol. Res.*, **105**: 952-956.
- Moltzan, B.D.; Blenis, P.V. & Hiratsuka, Y. (2001). Temporal occurrence and impact of *Scytalidium uredinicola*, a mycoparasite of western gall rust. *Can. J. Plant Pathol.* **23**: 384-390.
- Moreira, C. (2002). Distribution of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *IOBC/wprs Bulletin.* **25**(5):41-48.
- Morelet, M. (1998). Une espèce nouvelle de *Raffaelea*, isolée de *Platypus cylindrus*, coléoptère xylomycétophage des chênes. *Extrait des Annales de la S.S.N.A.T.V.*, **50**: 185-193.
- Moser, J.C. (1985). Use of sporothecae by phoretic *Tarsonemus* mites to transport ascospores of coniferous bluestain fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*: **84**, 750-753.
- Mota, M.; Braasch, H.; Bravo, M.A.; Penas, A.C.; Burgermeister, W.; Metge, K. & Sousa; E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**: 727-734.
- Mueller, U.G. & Gerardo, N. (2002). Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *PNAS*, **99**(24): 15247-15249.
- Mueller, U.G.; Gerardo, N.M.; Aanen, D.K.; Six, D.L. & Schultz, T.R. (2005). The Evolution of Agriculture in Insects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **36**: 563-95.
- Natividade, J.V. (1950). *Subericultura*. 1ª ed. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral das Florestas. Lisboa.
- Nebeker, T.E.; Hodges, J.D. & Blanche, C.A. (1993). Host response to bark beetle and pathogen colonization. In *Beetle-Pathogen Interactions in Conifer Forests*. T. D. Schowalter & G. M. Filip (Eds.), Academic Press, London, pp. 157-173.
- Nilson, T. (1974). The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannase and amylase by wood attacking microfungi. *Studia Forestalia Suecica*, **114**, 35 pp.
- Nogueira, C.D.S. (1967). *Panorama sanitário dos maciços florestais a sul do Tejo*. Folhetos de divulgação. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas.

- Norris, D.M. (1976). Chemical interdependencies among *Xyleborus* spp. ambrosia beetles and their symbiotic microbes. *Beith. Mater. Org.*, **3**: 479-488. (cit in Beaver, 1989).
- Norris, D.M. & Baker & J.M. (1968). A complex of fungi mutualistically involved in the nutrition of the ambrosia beetle *Xyleborus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **11**: 246-250.
- Novas, P.M.C. (2001). *Feromona de agregação em Platypus cylindrus Fab. (Coleoptera: Platypodidae): Evidência Comportamental em Túnel de Vento*. Trabalho de Fim de Curso na Licenciatura em Biologia. Universidade de Évora, Évora, 63 pp.
- Oak, S.; Tainter, F.; Williams, J. & Starkey, D. (1996). Oak decline risk rating for the southeastern United States. *Ann. Sci. For.*, **53**: 721-730.
- Oren, Y.; Sadowsky, A.; Gefen, D.; Solel, Z. & Kimchy, M. (2001). *Scytalidium* wilt of citrus. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 467-470.
- Paine, T.D.; Raffa, K.F. & Harrington, T.C. (1997). Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 179-206.
- Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathology*, **23**: 23-54.
- Pereira, C.S.; Danesh, P.; Marques, J.J.F. & San Romão, M.V. (1999a). O gosto a rolha em vinhos – estado actual dos conhecimentos. *Ciência Tec. Vitiv.*, **14**(2): 79-99.
- Pereira, J.S.; Conceição, M. & Rodrigues, J.M. (1999b). As causas da mortalidade do sobreiro revisitadas. *Revista Florestal*. Vol. **XII**, nº1/2: 20-23.
- Pestana, C. (1898). Doenças do sobreiro. *Arquivo rural*, **3**.
- Peyerimhoff, P. (1919). Notes sur la biologie de quelques coléoptères phytophages du Nord-Africain. *Annal. Soc. Entomol. Fr.*, **28**: 257-258.
- Platas, G.; Polishook, J.D. & Peláez, F. (2002). VNTR polymorphism in the ITS1 region (rDNA) in isolates of a *Nodulisporium* species. *Mycol. Res.* **106**(11): 1293-1298.
- Pointing, S.B.; Parungao, M.M. & Hyde, K.D. (2003). Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.*, **107**(2): 231-235.

- Ragazzi, A.; Moricca, S.; Capretti, P.; Dellavalle, I. & Turco, E. (2003). Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *For. Path.*, **33**: 31-38.
- Rehner, S.A. & Samuels, G.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **98**(6): 625-634.
- Riziero, T.; Ragazzi A.; Marianelli, L.; Sabbatini, P. & Roversi, P.F. (2002). Insects and fungi involved in oak decline in Italy, *IOBC/wprs Bull.*, **25**(5): 67-74.
- Rollins, F.; Jones, K.; Krokene, P.; Solheim, H. & Blackwell, M. (2001). Phylogeny of asexual fungi associated with bark and ambrosia beetles. *Mycologia*, **93**: 992-996.
- Romeiras, M. (1995). *Protecção do montado de sobre: Estudo de alguns aspectos da bioecologia de Platypus cylindrus F. (Coleoptera, Platypodidae)*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre. Mestrado em Protecção Integrada. ISA-UTL Lisboa, 157 pp.
- Saccardo, P.A. (1891). *Chromotaxia seu nomenclator colorum polyglottus adclitis speciminibus coloratis ad botanicorum et zoologorum*. Patavii, 22 pp.
- Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, **100**(8): 923-935.
- Santos, I.M. & Lima, N. (2005). Rastreo de actividades enzimáticas extracelulares de fungos. *Workshop "Macromicetas Parasitas e Patogénicos de Espécies Florestais e Ornamentais"*, UTAD, Vila Real. (Formato digital).
- Santos, M.N. (2000). *Factores bióticos e abióticos associados ao declínio do montado de sobre em Portugal e inter-relações*. Bases para um programa de investigação, Estação Florestal Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária, 67 pp.
- Santos, M.N. (2002). Carvão do entrecasco, Quer-F-2. Common Forests Pests and Diseases in SW-Europe. <http://iefc.net/>. (consultado em 03/03/2006).
- Santos, M.N.; Machado, M.H.; Bragança, M.H.; Ramos, H.; Sousa, E. & Tomaz, I. (1999). Mycoflora associated with cork oak (*Quercus suber* L.) in Portugal. *IOBC/wprs Bulletin*, **22**(3): 25-28.
- Schroers, H.J.; Samuels, G.J.; Seifert, K.A. & Gams, W. (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, **91**(2): 365-385.

- Seabra, A.F. (1939). Contribuição para a história de entomologia em Portugal. *Publicações da D.G.S.F.A.*, **6**: 1-20.
- Sechi, C.; Ruiu, P.A.; Franceschini, A. & Corda, P. (2002). Further researches on the distribution of declining cork oak stands in Sardinia (Italy). *IOBC/wprs Bulletin*, **25**(5): 5-12.
- Silva, F.A. (1944). Ensaio de delimitação da área atacada por *Lymantria dispar* L. em Portugal. Relatório Final do Curso de Eng^o Silvicultor, I.S.A., Lisboa, 63 pp.
- Silva, R.O. (2002). O montado de sobro em Portugal. Que futuro? *Investigação Agrária – INIA*, **4**(6): 16-17.
- Smalley, E.B.; Raffa, K.F.; Proctor, R.H. & Klepzig, K.D. (1993). Tree responses to infection by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In *Ceratocystis and Ophiostoma, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. M.J. Wingfield, K.A. Seifert & J.F. Webber (Eds.), APS Press, Minnesota, pp. 207-218.
- Sousa, E. (1995). Les principaux ravageurs du chêne liège au Portugal. Leurs relations avec le déclin des peuplements. *IOBC/wprs Bulletin*, **18**(6): 18-22.
- Sousa, E. (1996). *Contribution à l'étude de la biologie de populations de Platypus cylindrus (Coleoptera: Platypodidae) dans des peuplements de chênes liège au Portugal*. Thèse de Doctorat, Lyon, France, 153 pp.
- Sousa, E. (2002). Plátipo, Quer-I-2. Common Forests Pests and Diseases in SW-Europe. <http://iefc.net/>. (consultado em 03/03/2006).
- Sousa E. & Debouzie, D. (1993). Contribution à la connaissance de quelques variables sylvicoles es écologiques au coléoptère *Platypus cylindrus* F., ravageur du chêne liège au Portugal. *Silva Lusitana*, **1**(2): 183-197.
- Sousa, E. & Debouzie, D. (1999). Distribution spatio-temporelle des attaques de *Platypus cylindrus* F. (Coleoptera:Platypodidae) dans des peuplements de chêne-lièges au Portugal. *IOBC/wprs Bulletin*, **22**(3): 47-58.
- Sousa, E. & Débouzie, D. (2002). Caractéristiques bioécologiques de *Platypus cylindrus* au Portugal. *IOBC/ wprs Bulletin*, **25**: 75-83.
- Sousa , E.; Debouzie, D. & Pereira, H. (1995). Le rôle de l'insecte *Platypus cylindrus* F. (Coleoptera, Platypodidae) dans le processus de dépérissement des peuplements de chêne-liège au Portugal. *IOBC/ wprs Bulletin*, **18**: 24-37.
- Sousa, E. & Inácio, M.L. (2005). New Aspects of *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae) Life History on Cork Oak Stands in Portugal. *Entomological*

- Research in Mediterranean Forest Ecosystems*. F. Lieutier & D. Ghaioule (Eds.), INRA Editions, 280 pp.
- Sousa, E.; Inácio, M.L.; El. Antry, S.; Bakry, M. & Kadiri, Z.A. (2005). Comparaison de la bio-écologie et du comportement de l'insecte *Platypus cylindrus* Faber. (Coléoptère, Platypodidae) dans les subérais Portugaises et Marocaines. *IOBC/wprs Bulletin*, **28**: 137-144.
- Sousa, E., Tomaz, I.L.; Moniz, F.A. & Basto, S. (1997). La répartition spatiale des champignons associés à *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae). *Phytopath. Medit.*, **36**: 145:153.
- Subramanian, C.V. (1983). *Hyphomycetes. Taxonomy and biology*. Academic Press, London, 502 pp.
- Suh, S.O. & Blackwell, M. (2006). Three new asexual astroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histeridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. *Mycol. Res.* **110**: 220-228.
- Swift, M.J. & Boddy, L. (1984). Animal-microbial interactions in wood decomposition. In *Invertebrate-Microbial Interactions*. J.M. Anderson, A.D.M. Rayner & D.W.H. Walton (Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 89-131 (cit in Beaver, 1989).
- Szakacs, G. & Tengerdy, R.P. (1997). Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **13**: 487-490.
- Tainter, F.H. & Baker, F.A. (1996). *Principles of Forest Pathology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 805 pp.
- Teixeira, C. (2003). *Confirmação da actividade biológica de análogos de três componentes da putativa feromona de agregação de Platypus cylindrus: evidências comportamentais e fisiológicas*. Trabalho de Fim de Curso na Licenciatura em Biologia, Universidade de Évora, Évora, 61 pp.
- Teixeira, C.; Algarvio, R.M.; Casas Novas, P. & Barata, E.N. (2003). Actividade biológica de análogos de três componentes da putativa feromona de agregação de *Platypus cylindrus* (Coleoptera: Platypodidae). In *V Congresso Nacional de Etologia*, Universidade do Algarve, Faro, 29 pp.

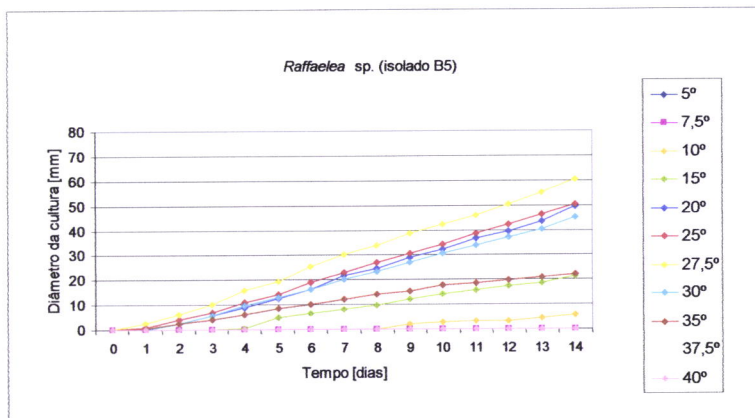
- Teperi, E.; Keskinen, M.; Ketoja, E. & Tahvonen (1998). Screening for fungal antagonists of seed-borne *Fusarium culmorum* on wheat using in vivo tests. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 243-251.
- Tibberi, R. & Battisti, A. (1998). Insetti coinvolti nella diffusione di *Seridium cardinale*. In *Giornata di studio e aggiornamento sulle avversità del Cupressus sempervirens L.*, Firenze, Itália.
- Torres Juan, J. (1975). *Patologia forestal*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Madrid.
- Tuset, J.J.; Hinarejos, C.; Mira, J.J. & Cobos, J.M. (2002). Distribution of the isolations of *Phytophthora cinnamomi* in the Spanish *Quercus* areas with oak decline disease. *IOBC/wprs Bulletin* **25**(5): 49-52.
- Ueda-Nishimura, K. & Mikata, K. (1999). A new yeast genus, *Tetrapisispora* gen. nov. and *Terapisispora arboricola* sp. nov. from the Nansei Island, and reclassification of *Kluyveromyces phaffi* (van der Walt) van der Walt as *Tetrapisispora phaffi* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1915-1924.
- Ueda-Nishimura, K. & Mikata, K. (2000). Two distinct 18S rDNA secondary structures in *Dipodascus* (Hemiascomycetes). *Microbiology*, **146**: 1045-1051.
- Upadhyay, H.P. (1981). A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press, Athens, GA. 176 pp.
- Valente, L.; Santos, I.M. & Lima, N. (2002). Implementação de técnicas para avaliação do potencial degradativo de compostos naturais por fungos. In *Ecologia dos Fungos*. I.M. Santos, A. Venâncio & N. Lima (Eds.), Micoteca da Universidade do Minho, Braga, pp. 67-82.
- Villemant, C. & Fraval, A. (1993). La faune entomologique du chêne-liège en forêt de la Mamora (Maroc). *Ecologia Mediterranea*, **19**: 89-98.
- Wald, P.; Pitkänen, S. & Boddy, L. (2004). Interspecific interactions between the rare tooth fungi *Creolophus cirrhatus*, *Hericium erinaceus* and *H. coralloides* and other wood decay species in agar and wood. *Mycol. Res.*, **108**: 1447-1457.
- Webber, J.F. & Gibbs, J.N. (1989). Insect dissemination of fungal pathogens of trees. In *Insect-fungus interactions*. N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond & J.F. Webber (Eds.), Academic Press, Inc., London, pp 161-189.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols – A guide*

- to methods and applications*. M.A. Innis; D.H. Gelfand; J.J. Sninsky & T.J. White (Eds.) Academic Press, Inc., London, pp. 314-322.
- Wicklow, D.T.; Roth, S.; Deyrup, S.T. & Gloer, B. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticilloides*. *Mycol. Res.*, **109**(5): 610-618.
- Wilhite, S.E. & Stracy, D.C. (1996). Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 513-518.
- Zacarias, M.A. (2002). Montado de sobro está em declínio!... *Floresta e Ambiente*, **57**: 41-42.
- Zuccaro, A.; Summerbell, R.C.; Gams, W.; Schroers, H.J. & Mitchell, J.I. (2004). A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. *Studies in Mycology*, **50**: 283-297.

ANEXO 1

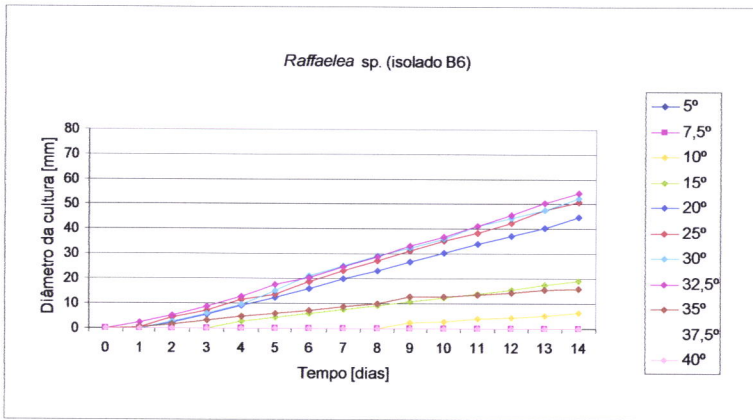
Gráficos representativos dos crescimentos acumulados de micélio ao longo do tempo, a diferentes temperaturas para os fungos *Raffaelea* sp., isolados B5 e B6, *Acremonium* sp., *Nodulisporium* sp., *Scytalidium* sp., *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp.

Resultados do tratamento estatístico referente à definição das temperaturas ótimas de crescimento para os diferentes géneros: médias e desvios padrão do número de dias de crescimento até o diâmetro da colónia atingir o final da fase logarítmica ou, nos casos em que essa fase não foi definida, as medianas das dimensões atingidas até ao final do tempo de ensaio (*Raffaelea* sp. – 3 cm, *Acremonium* sp. – 7 cm, *Nodulisporium* sp. – 7 cm, *Scytalidium* sp. – 7 cm, *Trichoderma* sp. – 7 cm e *Gliocladium* sp. – 4 cm); comparação através de teste T das médias do número de dias calculados para as temperaturas que apresentaram valores de crescimento ótimos próximos.



Temperatu	Dados	Total
20	Média de B5	9,666666667
	DesvPad de B5	0,492365964
25	Média de B5	9
	DesvPad de B5	0
27,5	Média de B5	7,333333333
	DesvPad de B5	0,492365964
30	Média de B5	10,33333333
	DesvPad de B5	0,492365964
(em branco)	Média de B5	
	DesvPad de B5	
Total Média de B5		9,083333333
Total DesvPad de B5		1,199881791

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 27											
Group 2: 20											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	27	20				27	20	27	20	Variances	Variances
B5	7,333333	9,666667	-11,6082	22	0,000000	12	12	0,492366	0,492366	1,000000	1,000000
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 27											
Group 2: 25											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	27	25				27	25	27	25	Variances	Variances
B5	7,333333	9,000000	-11,7260	22	0,000000	12	12	0,492366	0,00	0,00	1,000000
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 27											
Group 2: 30											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	27	30				27	30	27	30	Variances	Variances
B5	7,333333	10,33333	-14,9248	22	0,000000	12	12	0,492366	0,492366	1,000000	1,000000

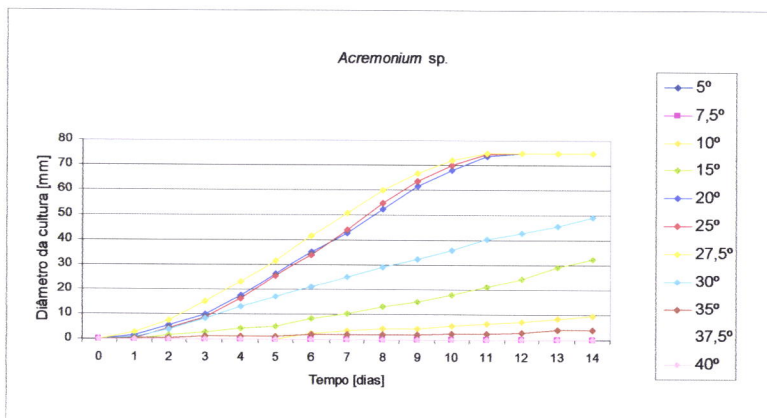


Temperatura	Dados	Total
20	Média de B6	10,33333333
	DesvPad de B6	0,492365964
25	Média de B6	9
	DesvPad de B6	0
30	Média de B6	8,583333333
	DesvPad de B6	0,514928651
32,5	Média de B6	9,75
	DesvPad de B6	0,452267017
(em branco)	Média de B6	
	DesvPad de B6	
Total Média de B6		9,416666667
Total DesvPad de B6		0,794484533

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 30											
Group 2: 20											
Variable	Mean 30	Mean 20	t-value	df	p	Valid N 30	Valid N 20	Std.Dev. 30	Std.Dev. 20	F-ratio Variances	p Variances
B6	8,583333	10,333333	-8,50899	22	0,000000	12	12	0,514929	0,492366	1,093750	0,884516

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 30											
Group 2: 25											
Variable	Mean 30	Mean 25	t-value	df	p	Valid N 30	Valid N 25	Std.Dev. 30	Std.Dev. 25	F-ratio Variances	p Variances
B6	8,583333	9,000000	-2,80306	22	0,010363	12	12	0,514929	0,00	0,00	1,000000

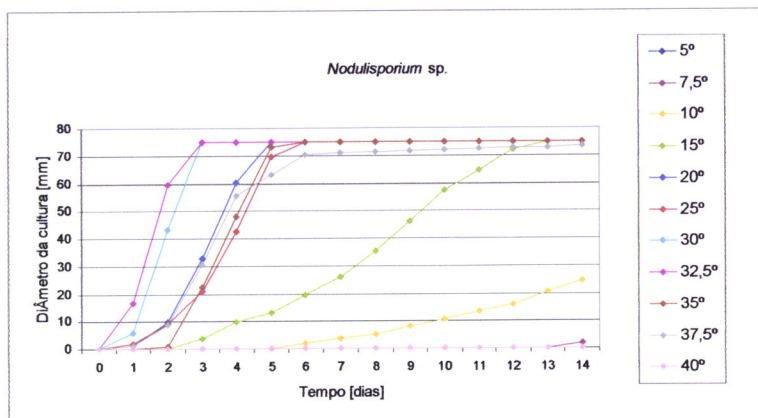
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 30											
Group 2: 32											
Variable	Mean 30	Mean 32	t-value	df	p	Valid N 30	Valid N 32	Std.Dev. 30	Std.Dev. 32	F-ratio Variances	p Variances
B6	8,583333	9,750000	-5,89696	22	0,000006	12	12	0,514929	0,452267	1,296296	0,674398



Temperatura	Dados	Total
20	Média de B7	10,5
	DesvPad de B7	0,522232968
25	Média de B7	10,41666667
	DesvPad de B7	0,514928651
27,5	Média de B7	10,08333333
	DesvPad de B7	0,288675135
(em branco)	Média de B7	
	DesvPad de B7	
Total Média de B7		10,33333333
Total DesvPad de B7		0,478091444

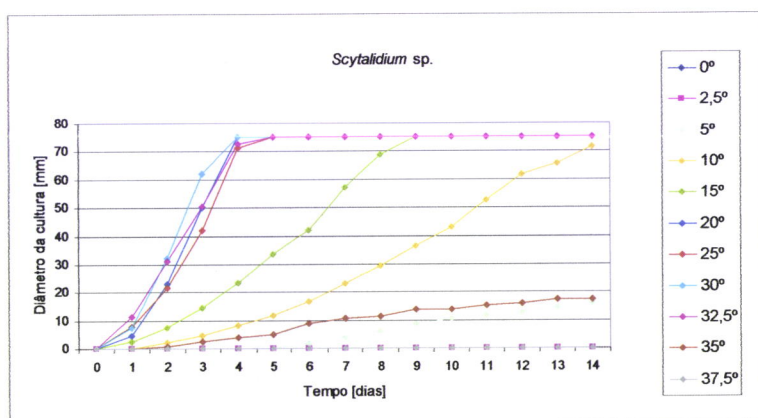
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 27											
Group 2: 25											
Variable	Mean 27	Mean 25	t-value	df	p	Valid N 27	Valid N 25	Std.Dev. 27	Std.Dev. 25	F-ratio Variances	p Variances
B7	10,08333	10,41667	-1,95604	22	0,063276	12	12	0,288675	0,514929	3,181818	0,067440

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 27											
Group 2: 20											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	27	20				27	20	27	20	Variances	Variances
B7	10,08333	10,50000	-2,41890	22	0,024287	12	12	0,288675	0,522233	3,272727	0,061344



Temperatura	Dados	Total
30	Média de B8	3
	DesvPad de B8	0
32,5	Média de B8	2,75
	DesvPad de B8	0,452267017
(em branco)	Média de B8	
	DesvPad de B8	
Total Média de B8		2,875
Total DesvPad de B8		0,337831962

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 30											
Group 2: 32											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	30	32				30	32	30	32	Variances	Variances
B8	3,000000	2,750000	1,914854	22	0,068603	12	12	0,00	0,452267	0,00	1,000000

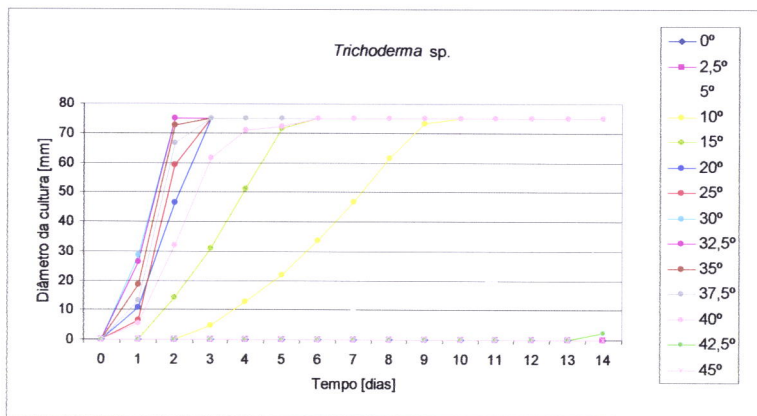


Temperatura	Dados	Total
20	Média de B4	4
	DesvPad de B4	0
25	Média de B4	4,083333333
	DesvPad de B4	0,288675135
30	Média de B4	4
	DesvPad de B4	0
32,5	Média de B4	4,166666667
	DesvPad de B4	0,389249472
(em branco)	Média de B4	
	DesvPad de B4	
Total Média de B4		4,0625
Total DesvPad de B4		0,244623027

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 32											
Group 2: 30											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	32	30				32	30	32	30	Variances	Variances
B4	4,166667	4,000000	1,483240	22	0,152196	12	12	0,389249	0,00	0,00	1,000000

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 25											
Group 2: 30											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	25	30				25	30	25	30	Variances	Variances
B4	4,083333	4,000000	1,000000	22	0,328183	12	12	0,288675	0,00	0,00	1,000000

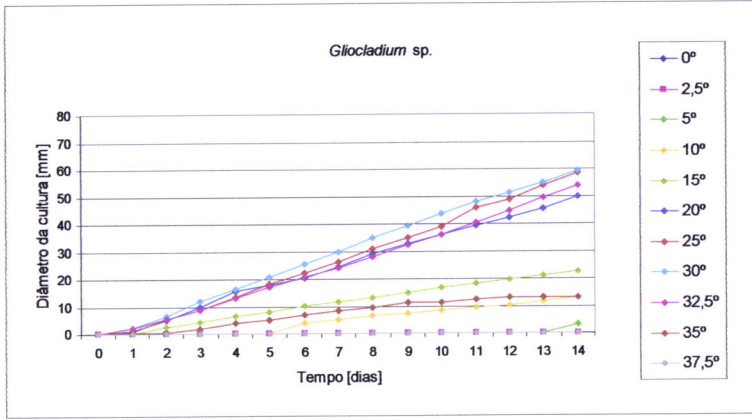
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 20											
Group 2: 30											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	20	30				20	30	20	30	Variances	Variances
B4	4,000000	4,000000		22		12	12	0,00	0,00		



Temperatura	Dados	Total
25	Média de B2	3
	DesvPad de B2	0
30	Média de B2	2
	DesvPad de B2	0
32,5	Média de B2	2
	DesvPad de B2	0
35	Média de B2	2
	DesvPad de B2	0
37,5	Média de B2	2,75
	DesvPad de B2	0,452267017
(em branco)	Média de B2	
	DesvPad de B2	
Total Média de B2		2,35
Total DesvPad de B2		0,480994732

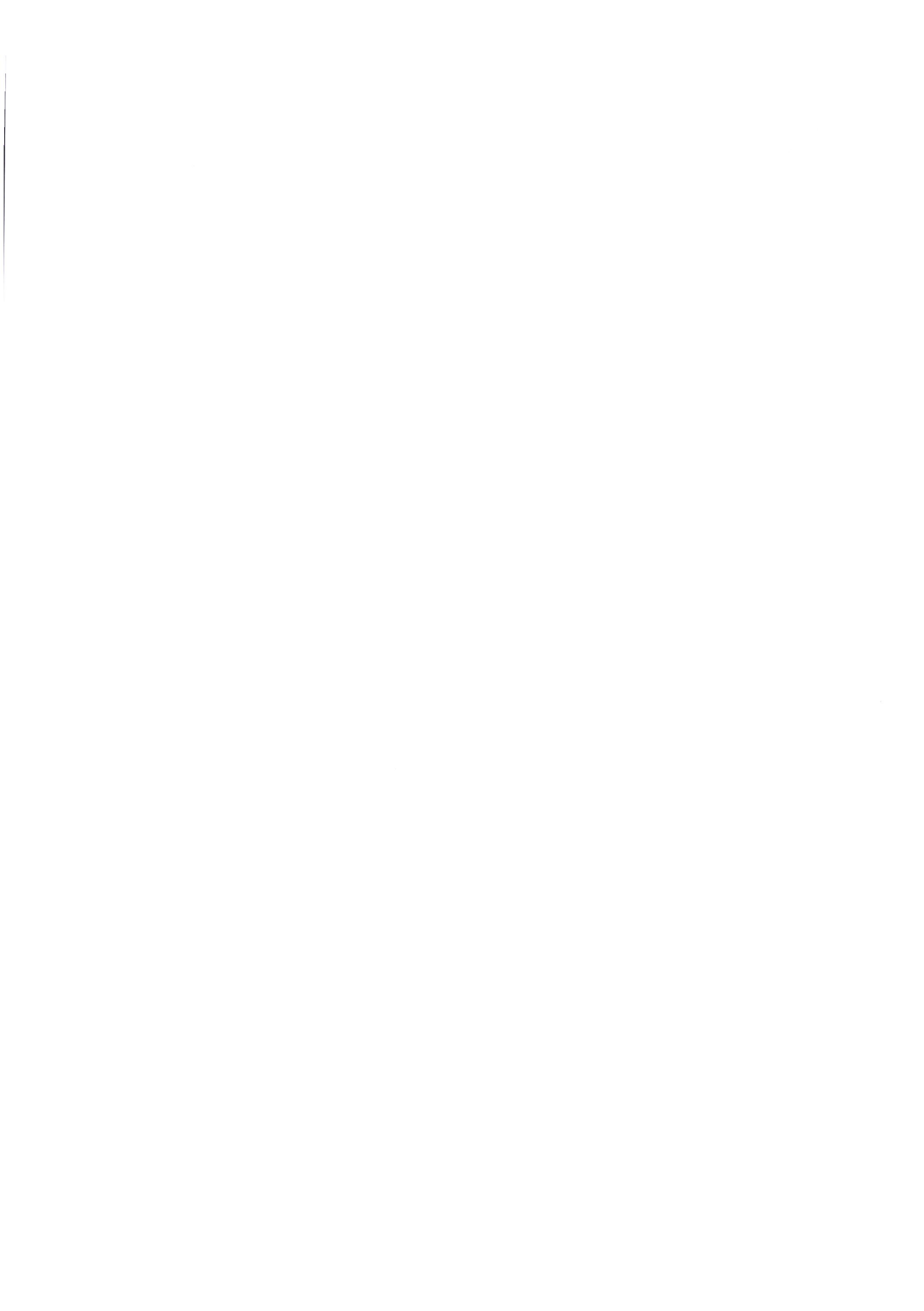
T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 37											
Group 2: 32											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	37	32				37	32	37	32	Variances	Variances
B2	2,750000	2,000000	5,744563	22	0,000009	12	12	0,452267	0,00	0,00	1,000000

T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)											
Group 1: 25											
Group 2: 30											
Variable	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	25	30				25	30	25	30	Variances	Variances
B2	2,991667	2,000000	119,0000	22	0,00	12	12	0,028868	0,00	0,00	1,000000



Temperatura	Dados	Total
20	Média de P23	11,75
	DesvPad de P23	1,215431087
25	Média de P23	10,41666667
	DesvPad de P23	0,514928651
30	Média de P23	9,5
	DesvPad de P23	0,522232968
32,5	Média de P23	11,33333333
	DesvPad de P23	0,651338947
(em branco)	Média de P23	
	DesvPad de P23	
Total Média de P23		10,75
Total DesvPad de P23		1,157767477

Variable	T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)										
	Group 1: 30										
	Group 2: 20										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	30	20				30	20	30	20	Variances	Variances
P23	9,500000	11,75000	-5,89188	22	0,000006	12	12	0,522233	1,215431	5,416667	0,009292
Variable	T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)										
	Group 1: 30										
	Group 2: 25										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	30	25				30	25	30	25	Variances	Variances
P23	9,500000	10,41667	-4,32972	22	0,000270	12	12	0,522233	0,514929	1,028571	0,963576
Variable	T-tests; Grouping: Temperatura (temperaturas)										
	Group 1: 30										
	Group 2: 32										
	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	30	32				30	32	30	32	Variances	Variances
P23	9,500000	11,33333	-7,60720	22	0,000000	12	12	0,522233	0,651339	1,555556	0,475573



ANEXO 2

Resultados da análise de sequências de isolados dos vários géneros com o programa Blast.

> *Raffaelea* sp. (isolado A)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA		<u>1443</u> 0.0
gb DQ471003.1 Ophiostoma piliferum isolate AFTOL-ID 910 18S ...		<u>1432</u> 0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str		<u>1432</u> 0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non		<u>1432</u> 0.0
gb AY497515.1 Ophiostoma quercus voucher TUB F4272 small sub...		<u>1430</u> 0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa		<u>1426</u> 0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA		<u>1426</u> 0.0
gb AF267227.1 AF267227 Endomyces scopularum strain NRRL Y-176...		<u>1421</u> 0.0
gb AF234835.1 AF234835 Ophiostoma querci AU13 18S ribosomal RNA		<u>1421</u> 0.0
gb AF139810.1 AF139810 Ophiostoma floccosum isolate 387N 18S ...		<u>1421</u> 0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado B)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA		<u>1476</u> 0.0
gb AY497515.1 Ophiostoma quercus voucher TUB F4272 small sub...		<u>1471</u> 0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str		<u>1465</u> 0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non		<u>1465</u> 0.0
gb AY497510.1 Ophiostoma araucariae voucher TUB F3264 small ...		<u>1463</u> 0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa		<u>1459</u> 0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA		<u>1459</u> 0.0
gb DQ471003.1 Ophiostoma piliferum isolate AFTOL-ID 910 18S ...		<u>1458</u> 0.0
gb AY858662.1 Ophiostoma penicillatum strain TUB F4280 small...		<u>1458</u> 0.0
gb AY497511.1 Ophiostoma arborea voucher TUB F4270 small sub...		<u>1458</u> 0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado B5)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA		<u>1467</u> 0.0
gb AY497515.1 Ophiostoma quercus voucher TUB F4272 small sub...		<u>1461</u> 0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str		<u>1456</u> 0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non		<u>1456</u> 0.0
gb AY497511.1 Ophiostoma arborea voucher TUB F4270 small sub...		<u>1452</u> 0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa		<u>1450</u> 0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA		<u>1450</u> 0.0
gb AY497510.1 Ophiostoma araucariae voucher TUB F3264 small ...		<u>1450</u> 0.0
gb DQ471003.1 Ophiostoma piliferum isolate AFTOL-ID 910 18S ...		<u>1448</u> 0.0
gb AY497512.1 Ophiostoma bicolor voucher TUB F4269 small sub...		<u>1448</u> 0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado B6)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA	<u>1489</u>	0.0
gb AY497515.1 Ophiostoma quercus voucher TUB F4272 small sub...	<u>1483</u>	0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str	<u>1478</u>	0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non	<u>1478</u>	0.0
gb AY497510.1 Ophiostoma araucariae voucher TUB F3264 small ...	<u>1478</u>	0.0
gb AY858662.1 Ophiostoma penicillatum strain TUB F4280 small...	<u>1474</u>	0.0
gb AY497511.1 Ophiostoma arborea voucher TUB F4270 small sub...	<u>1474</u>	0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa	<u>1472</u>	0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA	<u>1472</u>	0.0
gb DQ471003.1 Ophiostoma piliferum isolate AFTOL-ID 910 18S ...	<u>1471</u>	0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado C)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA	<u>1489</u>	0.0
gb AY497515.1 Ophiostoma quercus voucher TUB F4272 small sub...	<u>1483</u>	0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str	<u>1478</u>	0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non	<u>1478</u>	0.0
gb AY497510.1 Ophiostoma araucariae voucher TUB F3264 small ...	<u>1476</u>	0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa	<u>1472</u>	0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA	<u>1472</u>	0.0
gb DQ471003.1 Ophiostoma piliferum isolate AFTOL-ID 910 18S ...	<u>1471</u>	0.0
gb AY858662.1 Ophiostoma penicillatum strain TUB F4280 small...	<u>1471</u>	0.0
gb AY497511.1 Ophiostoma arborea voucher TUB F4270 small sub...	<u>1471</u>	0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado D)

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb AY497516.1 Ophiostoma serpens voucher CBS 649.89 small su...	<u>1482</u>	0.0
gb AY858665.1 <i>Raffaelea canadensis</i> strain CBS 168.66 small s...	<u>1467</u>	0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB Sporothrix schenckii 18S ribosomal RNA, pa	<u>1461</u>	0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA Ophiostoma stenoceras 18S ribosomal RNA	<u>1461</u>	0.0
gb AF267227.1 AF267227 Endomyces scopularum strain NRRL Y-176...	<u>1456</u>	0.0
emb AJ243295.1 OPI243295 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, str	<u>1456</u>	0.0
emb AJ243294.1 OPI243294 Ophiostoma piliferum 18S rRNA gene, non	<u>1456</u>	0.0
gb M83261.1 OPHRR18S Ophiostoma ulmi 18S ribosomal RNA	<u>1456</u>	0.0
gb AY858662.1 Ophiostoma penicillatum strain TUB F4280 small...	<u>1456</u>	0.0
dbj AB007664.1 Ophiostoma cucullatum gene for 18S rRNA, part...	<u>1452</u>	0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado E)

Sequences producing significant alignments:		E value	Score (Bits)
gb AY858665.1 	<i>Raffaelea canadensis</i> strain CBS 168.66 small s...	168.66	<u>1461</u> 0.0
gb AY497516.1 	<i>Ophiostoma serpens</i> voucher CBS 649.89 small su...	649.89	<u>1459</u> 0.0
gb AY497513.1 	<i>Ophiostoma cucullatum</i> voucher TUB F3234 small ...	F3234	<u>1441</u> 0.0
gb AY858662.1 	<i>Ophiostoma penicillatum</i> strain TUB F4280 small...	F4280	<u>1435</u> 0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB	<i>Sporothrix schenckii</i> 18S ribosomal RNA, pa		<u>1432</u> 0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA	<i>Ophiostoma stenoceras</i> 18S ribosomal RNA		<u>1432</u> 0.0
gb AF267227.1 AF267227	<i>Endomyces scopularum</i> strain NRRL Y-176...		<u>1426</u> 0.0
emb AJ243295.1 OPI243295	<i>Ophiostoma piliferum</i> 18S rRNA gene, str		<u>1426</u> 0.0
emb AJ243294.1 OPI243294	<i>Ophiostoma piliferum</i> 18S rRNA gene, non		<u>1426</u> 0.0
gb M83261.1 OPHRR18S	<i>Ophiostoma ulmi</i> 18S ribosomal RNA		<u>1426</u> 0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado M)

Sequences producing significant alignments:		E value	Score (Bits)
gb AY497522.1 	<i>Raffaelea montetyi</i> voucher TUB F4264 small sub...	F4264	<u>1051</u> 0.0
gb AY497521.1 	<i>Raffaelea montetyi</i> voucher TUB F4263 small sub...	F4263	<u>1051</u> 0.0
gb AY497520.1 	<i>Raffaelea montetyi</i> voucher CBS 463.94 small su...	463.94	<u>1051</u> 0.0
gb AY497509.1 	<i>Ambrosiella sulfurea</i> voucher TUB F4271 small s...	F4271	<u>1029</u> 0.0
gb AY858661.1 	<i>Dryadomyces amasae</i> strain TUB F4290 small subu...	F4290	<u>994</u> 0.0
gb AY497514.1 	<i>Ophiostoma piceaperdum</i> voucher TUB F3232 small...	F3232	<u>985</u> 0.0
gb AY858660.1 	<i>Dryadomyces amasae</i> strain CBS 116694 small sub...	116694	<u>976</u> 0.0
gb AY497516.1 	<i>Ophiostoma serpens</i> voucher CBS 649.89 small su...	649.89	<u>974</u> 0.0
gb AY497513.1 	<i>Ophiostoma cucullatum</i> voucher TUB F3234 small ...	F3234	<u>974</u> 0.0
dbj AB007667.1 	<i>Ophiostoma europioides</i> gene for 18S rRNA, pa...		<u>970</u> 0.0

> *Raffaelea* sp. (isolado X)

Sequences producing significant alignments:		E value	Score (Bits)
gb AY858665.1 	<i>Raffaelea canadensis</i> strain CBS 168.66 small s...	168.66	<u>1443</u> 0.0
gb AY497516.1 	<i>Ophiostoma serpens</i> voucher CBS 649.89 small su...	649.89	<u>1419</u> 0.0
gb AY497513.1 	<i>Ophiostoma cucullatum</i> voucher TUB F3234 small ...	F3234	<u>1419</u> 0.0
gb AY497514.1 	<i>Ophiostoma piceaperdum</i> voucher TUB F3232 small...	F3232	<u>1408</u> 0.0
gb AY858662.1 	<i>Ophiostoma penicillatum</i> strain TUB F4280 small...	F4280	<u>1397</u> 0.0
gb M85053.1 OPHRR18SB	<i>Sporothrix schenckii</i> 18S ribosomal RNA, pa		<u>1391</u> 0.0
gb M85054.1 OPHRR18SA	<i>Ophiostoma stenoceras</i> 18S ribosomal RNA		<u>1391</u> 0.0
gb AY497518.1 	<i>Raffaelea ambrosiae</i> voucher CBS 185.64 small s...	185.64	<u>1387</u> 0.0
gb AF267227.1 AF267227	<i>Endomyces scopularum</i> strain NRRL Y-176...		<u>1386</u> 0.0
emb AJ243295.1 OPI243295	<i>Ophiostoma piliferum</i> 18S rRNA gene, str		<u>1386</u> 0.0

> *Acremonium* sp.

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb DQ882846.1 <i>Acremonium</i> <i>crotocinigenum</i> strain cc56 internal...	929	0.0
emb AJ621773.1 <i>Acremonium</i> <i>crotocinigenum</i> 5.8S rRNA gene, ITS...	885	0.0
dbj AB019365.1 <i>Spicellum</i> <i>roseum</i> genes for ITS1, 5.8S rRNA an...	750	0.0
dbj AB019364.1 <i>Spicellum</i> <i>roseum</i> genes for ITS1, 5.8S rRNA an...	750	0.0
gb AF081476.2 AF081476 <i>Stachybotrys</i> <i>nephrospora</i> 18S ribosomal...	603	3e-169
gb AF081475.2 AF081475 <i>Stachybotrys</i> <i>microspora</i> 18S ribosomal ...	599	4e-168
emb AJ301992.1 MLE301992 <i>Myrothecium</i> <i>leucotrichum</i> 18S rRNA ge...	595	5e-167
gb AF081469.1 AF081469 <i>Stachybotrys</i> <i>chartarum</i> strain UAMH 790...	588	8e-165
gb AY095977.1 <i>Stachybotrys</i> <i>chartarum</i> strain B6 18S ribosomal...	584	1e-163
gb AY095976.1 <i>Stachybotrys</i> <i>chartarum</i> strain B18 18S ribosoma...	584	1e-163

> *Nodulisporium* sp.

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb AF280625.1 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> JC55 internal trans...	941	0.0
gb AF280624.1 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> CFB993 internal tra...	941	0.0
emb AJ246222.1 BME246222 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> 5.8S rRNA...	918	0.0
gb AF280626.1 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> JC4 internal transc...	915	0.0
emb AJ246226.1 BME246226 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> 5.8S rRNA...	915	0.0
emb AJ246225.1 BME246225 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> 5.8S rRNA...	915	0.0
emb AJ246221.1 BME246221 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> 5.8S rRNA...	915	0.0
emb AJ246227.1 BME246227 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> 5.8S rRNA...	909	0.0
gb AF326482.1 AF326482 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> strain JC26...	907	0.0
gb AF326479.1 AF326479 <i>Biscogniauxia</i> <i>mediterranea</i> strain JC80...	907	0.0

> *Scytalidium* sp.

Sequences producing significant alignments:	E value	Score (Bits)
gb AY762623.1 <i>Scytalidium</i> <i>lignicola</i> strain UAMH 1502 18S rib...	1351	0.0
gb DQ471016.1 <i>Pezicula</i> <i>carpinea</i> isolate AFTOL-ID 938 18S sma...	1338	0.0
gb AY357286.1 <i>Tricladium</i> <i>splendens</i> strain 162-1436 18S ribos...	1338	0.0
gb AY357276.1 <i>Geniculospora</i> <i>grandis</i> strain UMB 198.01 18S ri...	1338	0.0
gb AY357264.1 <i>Anguillospora</i> <i>mediocris</i> 18S ribosomal RNA gene...	1338	0.0
gb AY357263.1 <i>Anguillospora</i> <i>fustiformis</i> strain CCM F-06584 1...	1338	0.0
gb AY357262.1 <i>Anguillospora</i> <i>furtiva</i> strain CCM F-20483 18S r...	1338	0.0
gb DQ247809.1 <i>Dermea</i> <i>acerina</i> strain CBS 161.38 18S small rib...	1338	0.0
gb DQ002903.1 <i>Cryptosporiopsis</i> <i>radicicola</i> small subunit ribo...	1338	0.0
gb AY204631.1 <i>Tricladium</i> <i>splendens</i> strain ccm-F16599 18S rib...	1338	0.0

> *Trichoderma* sp.

Sequences producing significant alignments:		E value	Score (Bits)
gb AF455511.1 	Hypocrea schweinitzii isolate wb246 small subu...	<u>1096</u>	0.0
gb AF455469.1 	Hypocrea schweinitzii isolate wb339 small subu...	<u>1096</u>	0.0
gb AF362103.1 	Trichoderma citrinoviride strain T7 18S riboso...	<u>1096</u>	0.0
gb AF359401.1 	Trichoderma citrinoviride strain T118 18S ribo...	<u>1096</u>	0.0
gb AF359396.1 	Trichoderma citrinoviride strain T3 18S riboso...	<u>1096</u>	0.0
emb X93962.1 HSRRNA931	H.schweinitzii rRNA genes and ITS1 and...	<u>1096</u>	0.0
emb X93960.1 HSRR81791	H.schweinitzii rRNA genes and ITS1 and...	<u>1096</u>	0.0
emb Z31013.1 HSITSRR1	H.schweinitzii (CBS 818.91) rRNA genes and	<u>1096</u>	0.0
emb Z48949.1 TVITS12RR	T.virgatum (T.citrinoviride) (ATCC 249...	<u>1096</u>	0.0
emb X93963.1 HSRRNA928	H.schweinitzii rRNA genes and ITS1 and...	<u>1096</u>	0.0

> *Gliocladium* sp.

Sequences producing significant alignments:		E value	Score (Bits)
gb AF193238.1 AF193238	Nectria grammicospora large subunit ri...	<u>776</u>	0.0
gb AF210677.1 	Clonostachys divergens strain CBS 967.73b inte...	<u>776</u>	0.0
gb AY489716.1 	Bionectria ochroleuca strain GJS90-227 28S rib...	<u>776</u>	0.0
gb DQ862027.1 	Bionectria ochroleuca isolate AFTOL-ID #187 28...	<u>771</u>	0.0
gb AF193227.1 AF193227	Bionectria cf. aureofulva large subuni...	<u>771</u>	0.0
gb AF210690.1 	Bionectria compactiuscula strain CBS 919.97 in...	<u>771</u>	0.0
gb AF210676.1 	Bionectria ralfsii strain CBS 129.87 internal ...	<u>771</u>	0.0
gb AF210674.1 	Clonostachys miodochialis strain CBS 997.69 in...	<u>771</u>	0.0
emb AJ301998.1 MSP301998	Myrothecium sp. BBA69174 18S rRNA ge...	<u>771</u>	0.0
gb AY686634.1 	Bionectria ochroleuca 28S ribosomal RNA gene, par	<u>767</u>	0.0

ANEXO 3

Registos dos resultados dos testes de antagonismo (D - “deathlock”; S -.sobrepõe; I.- invade; NS – sobreposto; IN – invadido).

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Raffaelea</i> B6	D	D

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	I	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	S	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	I	S

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	S	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	I	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	I	I
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	I	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	I
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	I
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	I	IN
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	D	S
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	I
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	I
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	I
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	D	I

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	I	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	I
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	S	S
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Raffaelea</i> B5	D	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B5	IN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B5	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Acremonium</i> sp.	IN	D

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Nodulisporium</i> sp.	SN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Raffaelea</i> B6	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	D
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Raffaelea</i> B6	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	D	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	SN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	SN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	SN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	IN	IN
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	D
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	IN
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	IN
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	D
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Nodulisporium</i> sp.	IN	D

Fungo referência		Inoculação simultânea	Inoculação faseada
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	D
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	IN	I
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	SN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	SN
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	D	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	D
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Scytalidium</i> sp.	D	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	IN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	SN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	SN
<i>Scytalidium</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	IN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	IN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	SN	SN

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Edmundo Sousa da Estação Florestal Nacional, a quem se deve a sugestão do tema estudado e orientação deste trabalho, por ter concedido todas as facilidades para a sua realização. Pelas suas palavras incentivadoras e confiança que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Ivone Clara da Universidade de Évora, pela revisão crítica do manuscrito e suas valiosas sugestões e, também, pela simpatia, compreensão e estímulo que sempre manifestou.

Ao Professor Doutor Arlindo Lima do Instituto Superior de Agronomia, por toda a sua disponibilidade, apoio e interesse.

Ao Doutor Pedro Talhinhos do Instituto Superior de Agronomia pela disponibilidade com que nos recebeu e pelos esclarecimentos prestados sobre a análise dos resultados obtidos nos estudos de biologia molecular.

À Doutora Solange Oliveira da Universidade de Évora, pelas sugestões concedidas relativamente à interpretação dos resultados biomoleculares.

Ao Sr. Otávio Chaveiro e à Eng^a. Arminda Cecílio da Estação Agronómica Nacional que, gentilmente, possibilitaram a realização das observações em Microscopia Electrónica de Varrimento.

À Eng^a. Carla Clemente da empresa Stabvida por todas as facilidades concedidas e esclarecimentos relativos às metodologias da análise molecular dos fungos.

À Doutora Cristina Lopes Martins da Estação Agronómica Nacional, por toda a amizade e incentivo que sempre manifestou e pela facilidade no acesso a bibliografia da especialidade.

A todos os funcionários e bolsheiros do Departamento de Protecção Florestal da Estação Florestal Nacional, Adérito Matos, Ana Bela Carvalho, Doutor Edmundo Sousa, Eng^a Fátima Achando, Florinda Medeiros, Eng^a Helena Bragança, Eng^a Helena Machado, Dr. Luís Bonifácio, Eng^a Lurdes Inácio, Eng^a Marta Ferreira, Dr^a Natércia Santos, Dr. Pedro Naves, Eng^a Sofia Basto e Victor Gonçalves, pela colaboração prestada, amizade e simpatia desde sempre.

À minha “desorientadora” Maria de Lurdes Inácio, pela orientação, todos os conselhos e discussões, e pelas revisões deste manuscrito. Teremos sempre a nossa dupla!...

A Helena Machado, sempre pronta a resolver-me as “melguices”!.....

A Florinda Medeiros, pela sua preciosa ajuda no laboratório.

A Marta Ferreira, a futuros serões!...

À estagiária Susana Pires, companheira nesta jornada... a seguir és tu!...

Aos meninos e meninas do Mestrado, que, desde o início, lhe deram outro prazer!

À minha família e amigos, por toda a compreensão, apoio e paciência ao longo de todo este tempo, finalmente!...

Ao Tiago, por tudo...

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o mais profundo obrigada!