

Instituto Politécnico de Coimbra  
Escola Superior Agrária de Coimbra



Licenciatura Em Engenharia Tecnica Florestal

Utilização de Bioimpedância na deteção  
de árvores infetadas com  
escolítideos (*Tomicus destruens*.  
*Wollaston*) e com nemátode  
(*Bursaphelenchus xylophilus*. *Nickel*) da  
madeira de pinheiro

Local de Estágio:

ESAC COIMBRA PORTUGAL

Trabalho elaborado por:

Miguel Mas Martinez

Orientador:

Teresa Vasconcelos

Olga Mayoral García-Berlanga

Coimbra 2012

INDICE	
1)RESUMO	3
• Palavras-chave	3
• Abstract	3
2)INTRODUÇÃO	4
3)MATERIAL E MÉTODOS	7
• Trabalho de campo	7
□ Caracterização climática	7
• Trabalho de laboratório	8
□ Sistema de rega	9
□ Inoculações de nematode	10
□ Obtenção de escolítideos para introduzir nas árvore e avaliação das emergências	16
□ Introdução do escolítideos	17
□ Introdução dos nemátodes e escolítideos	20
□ Monitorização da técnica da bioimpedância	21
4)RESULTADOS	22
• Escolítideos e emergências	22
• Mortalidade das árvores inoculadas com escolítideos	23
• Mortalidade das árvores inoculadas com escolítideos e nematodes	24
• Mortalidade das árvores inoculadas com nematodes	24
• Mobilidade de Nemátodo dentro dos pinheiros	24
• Aplicação da bioimpedância	25
• Árvores mortos no experimento	27
5)Discussão	28
6)Bibliografia	30
7)Anexos	31
• Anexo 1.-Nascência escolítidos	32
• Anexo 2.-Estação meteorologica mes de Março	40
• Anexo 3.-Rega pinheiros e castanheiros	41
• Anexo 4.-Bioimpedancia	54
• Anexo fotografic I.-Fotos inoculações nematodes	56
• Anexo fotografic II.-Fotos efeitos das doenças	58
• Anexo fotografic III.-Fotos bioimpedância e solta de escolítidos	59

## 1) RESUMO

Neste relatório visa-se em determinar como se influenciam as relações de agentes causais no pinheiro bravo. Descreve-se como pode atuar a praga, *T. destruens* e o nematode *B. xylophilus* e os dois em conjunto, no pinheiro para além duma determinação da doença por meio da bioimpedância, assim como os estudos dos seus efeitos e analisar a doença em conjunto e avaliar a aplicabilidade da técnica da bioimpedância como ferramenta de apoio à gestão floresta.

O estágio tem ainda por objectivo determinar a deslocação dos nematodos dentro do pinheiro e validar a utilização de técnica da bioimpedância como ferramenta de apoio ao diagnóstico em Sanidade Florestal.

- **Palavras-chave**

Nematode da madeira de pinheiro  
Escolítideos  
Bioimpedância  
Sanidade florestal  
Diagnóstico

- **Abstract**

In this report we aim to test the potential use of the bioimpedance technique as a tool for forest health diagnosis. Furthermore, we aim to highlight the biotic relations into maritime pine tree and contribute for a better knowledge of larval development and the causal agents studied.

## 2) INTRODUÇÃO

Desde 27 junho de 2008, Portugal Continental está definido o seu território como área afetada pela presença e de restrição do nemátodo da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*. Steiner et Buhner). De acordo com a EPPO (Environmental Protection Plant Organisation) trata-se de uma doença de quarentena que impede a comercialização internacional de produtos derivados de floresta das zonas onde encontra-se presente e que causa uma importante mortalidade e perda de biodiversidade no território português por causa de sua distribuição rápida e eficiente no momento de matar as árvores.

Destaca-se ao pinheiro bravo, *Pinus pinaster Aiton*, por ser o mais importante da economia nacional e que devido às suas características pioneiras, os pinheiros formam frequentemente o coberto vegetal dominante da região, conferindo-lhe características ecológicas específicas (Vasconcelos et al.,2008).

Como espécie nativa da península ibérica, o pinheiro bravo apresenta, em Portugal, uma entofauna associada diversificada, capaz de explorar os recursos ecológicos do pinhal.

O stress hídrico é igualmente um fator de risco para a sanidade dos povoamentos florestais, por diminuir a resistência do arvoredo ao ataque dos agentes bióticos.

Há que fazer referência aos insetos que atacam ao pinheiro e que se alimentam, reproduzem e constroem galerias debaixo da casca no tronco, como são os escolitídeos (Coleoptera, Scolytinae), as que perfuram o tronco (Coleoptera, Curculionidae, Lepidoptera: Pyralidae) e as que se alimentam do suco celular da planta (Hemiptera: Matsucoccidae) (Vasconcelos et al.,2008).

Neste relatório refere-se ao nemátode do pinheiro bravo, *B. xylophilus*, que têm uma dinâmica perceptível só com o seu inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis Oliver* (Coleopter: Cerambycidae) (Vasconcelos et al.,2008).

A área atual do nemátodo do pinheiro inclui a área da origem da praga (América do Norte) e as áreas onde foi introduzida posteriormente (Japão, China, Coreia e Portugal). Enquanto o efeito negativo na área de origem é baixa, os efeitos negativos em outras partes da área atual são enormes. Na área nativa, uma baixa quantidade de árvores hospedeiras é afetada pela doença, mas o impacto nos mercados de exportação é substancial. (EPPO, 2009)

Na América do Norte, as condições ambientais são geralmente inadequadas para expressão da doença da murchidão dos pinheiros principalmente na fase saprófita (Evans et al. 1996 citado por EPPO, 2009).

O nemátode do pinheiro, atinge um grande número de coníferas, os mais suscetíveis são aqueles do género *Pinus* são os da espécie pinheiro bravo, em Portugal mais afetado. De acordo com a legislação vigente específica, é definido como qualquer material suscetível de madeira e casca isolada de coníferas (exceto *Thuja.sp*) e as plantas sensíveis (exceto frutos e sementes) dos *Abies* e *Cedrus Trew*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* e *Tsuga*. (CE, 2006)

O nemátodo é dispersado através de um vetor. Em Portugal o vetor é um cerambicido, o longicorínio ou capricornio do pinheiro, (*Monochamus galloprovincialis*. Olivier) (Naves, 2007 *in*. Filipa, 2011).

Este insecto vetor necessita de árvores mortas ou muito debilitadas para fazer a oviposição e ramos jovens para o pasto de maturação. Em Portugal, apresenta um ciclo biológico que começa pela emergência dos adultos, entre Maio e Agosto, atingindo valores máximos entre Junho e Julho (INRB, 2008 *in*. Filipa C. M., 2011). Estes insetos, voam até árvores saudáveis onde se alimentam de ramos jovens, pasto de maturação (Naves, 2007 *in*. Filipa C. M., 2011).

Ambos sexos são atraídos por árvores debilitadas ou recentemente mortas onde acasalam e as fêmeas põem os ovos através de um orifício na casca, denominadas feridas de oviposição. A oviposição coincide com o período de voo do inseto, Maio a Outubro (Naves, 2007 *in*. Filipa C. M., 2011).

O nematode tem várias estágios no seu ciclo de vida e evolui de acordo com o ambiente onde se encontra, adaptando-se às circunstâncias do local onde vive. Assim, a sua alimentação altera-se podendo passar de fitófago a micófago.

O ciclo biológico do nematode da madeira de pinheiro desenrola-se no interior do pinheiro. O insecto vetor do nematode realiza pasto de maturação sexual e introduz os nematodes que transporta nas traqueias (infecção primaria). O nematode entra pelos ramos tenros e começa o processo invasivo da árvore (Fig.1)

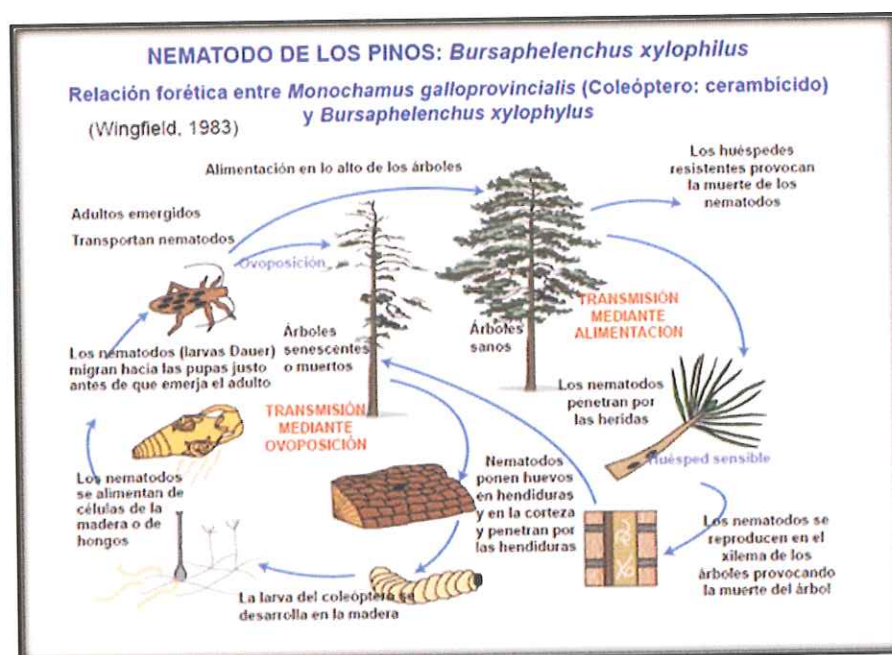


Fig.1 Ciclo biológico do nematode do pinheiro e do seu vetor

(<http://silvicultor.blogspot.com/2010/11/el-nematodo-de-la-madera-del-pino.html>)

Os estudos realizados anteriormente, não tiveram em conta os efeitos de outras pragas na mortalidade atribuída ao nematode e as interações estabelecidas pelo complexo biótico estabelecido no interior do pinheiro nunca foi aprofundado.

Alguns insectos secundários como os escolítideos *Tomicus destruens*, *T. piniperda* e *T. minor*, *Orthotomicus erosus* e *Ips sedentatus* podem afectar o sucesso na

instalação do nematode porque providenciam a existência de elevado número de ,arvores enfraquecidas na mata, obrigatórias para a sobrevivência do nematode (Vasconcelos et al.,2008).

O insecto tratado no relatorio não é o insecto vetor, mas este insecto é uma das mais importantes pragas secundarias que temos e é preciso saber como é e como é o seu ciclo de vida.

O nome comun é Hilésina mediterrânica (*Tomiscus destruens* Woll.) e o seu ciclo esta relacionado com o nematodo pela posível infeção dos dois em no mesmo tempo.(Fig.2)(Vasconcelos T.)

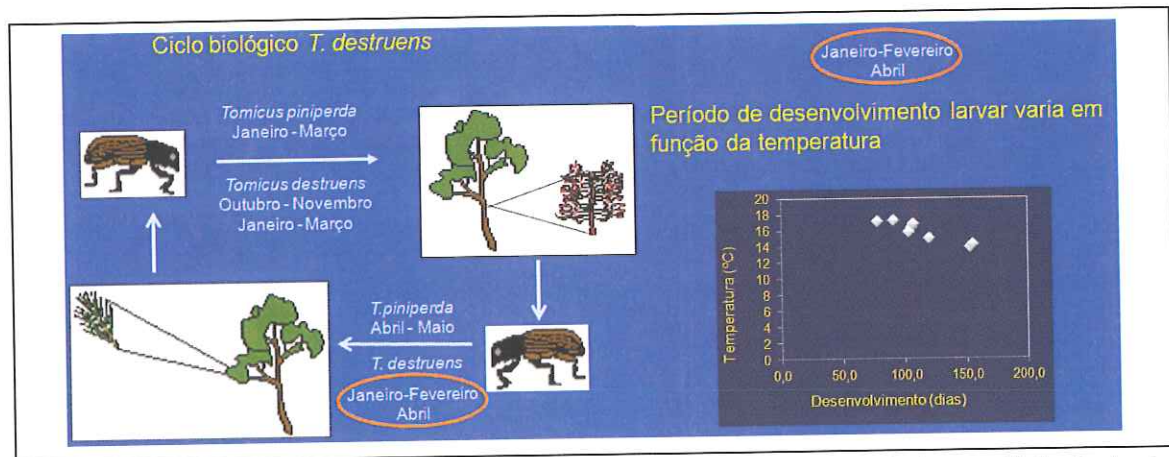


Fig.2 Ciclo biológico do *T. Destruens* e periodo de desenvolvimento larvar (Adaptado de Vasconcelos, 2006)

No Centro de instrumentação da facultade de Ciências da Universidade de Coimbra têm vindo a ser desenvolvidos instrumentos, baseados na técnica da impedância para diagnóstico em Medicina.

A bioimpedância é uma técnica utilizada para transmitir electricidade com uma frequência determinada por dentro de um corpo vivo e determinar o tempo que demora em recorrer desde um ponto ao outro do circuito. Assim pois mediante esta técnica e a sua monitorização, podemos determinar quanto tarda em recorrer uma certa espécie e observar se há alguma anomalia.

Para ver como troca temos que fixar com dois parâmetros que são:

Reactância: oposição de um corpo a uma corrente determinada, parte imaginária de la impedância (medida e graduação em que um circuito resiste o fluxo duma corrente eclética).

Resistência: oposição de um corpo a uma corrente determinada.

Sua medida é influenciada por variáveis como: frequência do sinal elétrico, processos eletroquímicos, temperatura, potencial de hidrogênio (pH), estado de hidratação e a viscosidade do fluido ou tecido biológico em questão. Do ponto de vista elétrico, os tecidos biológicos podem ser interpretados como um circuito complexo formado por resistores e capacitores dispostos tanto em série, quanto em paralelo, e que agem como condutores ou dielétricos, no qual o fluxo de corrente seguirá o caminho de menor oposição (Neves *et al.*, 2009).

Com o presente estudo pretende-se avaliar a susceptibilidade de plantas sem stress e com stress hídrico e sem insectos e com insectos ao ataque de nematode utilizando a técnica da bioimpedância.

Como objetivos pretende-se compreender se a mortalidade dos pinheiros é superior na presença de escolitidos, de namatodes, e/ ou de ambos. Pretende-se avaliar as emergências de *T. destruens* e analisar a dispersão do nemátode no pinheiro e avaliar a aplicabilidade da técnica como ferramenta de apoio à gestão floresta.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

- **Trabalho de campo**
- **Caracterização climática**

A área específica para a experimentação nas árvores bioimpedância são artificiais, mas a área é a zona do clima de Coimbra, onde os pinos são isolados em uma estufa, onde permaneceram algumas plantas ao stress e outras plantas com água, sem stress.

Estes dados climáticos foram utilizados são os da estação de clima:

Para o estágio não precisamos de dados climáticos, por que as plantas estão em uma estufa e as variações climáticas controladas, mas como os toros estiveram no campo muito tempo, era preciso fornecer informação climática de qualidade, pra determinar o secesso da curva do voo e a obtenção das emergências.

Os dados relatados pela estação meteorológica: 85480

Latitude: 40,12 | Duração: -8,25 | Altitude: 141

(ANEXO III)

- **Trabalho de laboratório**

Na estufa da esac motarm-se duas estufas N e T.

Na sala "N" tinhamos dispostos os pinheiros com diferentes doenças e com dois tipos de rega diferentes (parte direita sem rega e parte esquerda com rega).

Na sala "T" tinhamos a parte do controlo da rega onde tinhamos pinheiros e castanheiros e onde se pode ver que as plantas estavam a ter um certo nivel de stress, para depois aplicar o mesmo tipo da rega nos pinheiros da sala N, pero só o maximo e o minimo dos tempos de rega. No experimento se han feito duas parcelas, uma com rega e outra com stress, e com diferentes doenças.

SALA N:

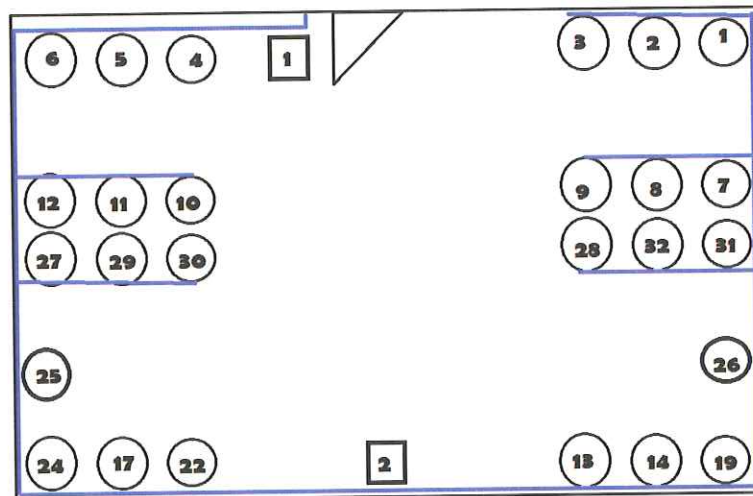


Fig.3 Desenho da rega na sala N

SALA T:

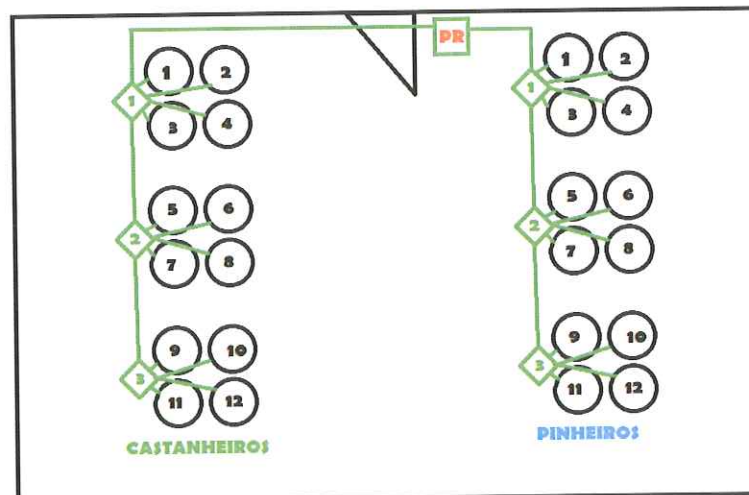


Fig.4 Desenho da rega na sala T



- **Sistema de rega**

O sistema de rega foi instalado em colaboração com o Engenheiro Expedito da ESAC.

Os vasos onde foram transplantados os pinheiros tinham uma superfície de uns 50cm de diâmetro e 40cm de alto, onde se teve que fazer uma saída para o drenagem com mangueira do esgoto, para poder fazer a cotagem das perdas por drenagem.

Na base de cada vaso colocou se uma tela de fibra geotêxtil cheia de areia para que o drenagem não se estraga-se e tivéssemos vasos entupidos.

Em cada sala realizou-se uma disposição da rega diferente.

#### Sala N

Na sala N a rega estava controlada por um programador e duas electroválvulas que tinham diferentes tempos de rega, sendo a electroválvula numero 1 a de rega ótima (parte esquerda) e a electroválvula 2 a de stress (parte direita).

A evapotranspiração foi controlada com com a rega da sala T.

$ET=R-D$
----------

ET= Evapotranspiração

R= Rega

D= Drenagem

#### Sala T

Na sala T a rega estava controlada por um programador e 6 electroválvulas (3 para pinheiros e 3 mais para castanheiros) as quais tinham tempos diferentes de rega, sendo a electroválvula 1 a de rega ótima, electroválvula 2 com a rega a 80% e á electroválvula 3 com a rega a 60%. Desta sala foram apanhados os dados da rega para saber a evapotranspiração das plantas e assim comprovar que tinham stress.

Em base aos experimentos realizados com os pinheiros e castanheiros, decidimos um máximo da rega e um mínimo por planta, com o que os pinheiros que tinham rega foram regados 5 min/dia (133,37ml/dia),i os que tinham de ter stress com 2 min/dia (66,67ml/dia).

Os dados recolhidos na sala T expressam que a rega foi bem realizada e que os pinheiros tinham certo grado do stress, como se pode perceber no ANEXO V.

- **Inoculações de nematode**

Foi necessário proceder à cultura de nematodes para proceder à sua inoculação nas árvores.

Os nematodes, já no laboratório, são conservados numa placa de Petri que contem um meio que tem o nome de MEA (meio de extrato de Malta e Agar) e é mantido a uma temperatura entre 23 e 25°C, faz com que tenhamos um bom crescimento da *Botrytis cinerea*, que é um fungo, do qual se alimentam os nematodes na fase mictófaga e que pode demorar umas três semanas a completar o seu crescimento e poder obter um número suficiente deles.

Para fazer a inoculação foi necessário obter uma suspensão concentrada, para incluir em cada inoculação aproximadamente cerca de 2000 nemátodes ( Akiba M. e Nakamura K., 2005).

A preparação destas amostras é um trabalho muito delicado e moroso.

Existem duas maneiras de proceder a extração dos nematodes e obter uma concentração conhecida com que poderemos trabalhar.

- a) Com um funil Buechner, com um tubo de silicone colocado na saída do funil e fechado com uma mola na extremidade, o funil estará fixo num tripé com papel de filtro, com uma espessura mínima, e é colocado por cima do papel o conteúdo da placa de Petri, com a *Botrytis cinerea Pers.* e o nematode de cabeça para baixo. Por fim recolhe-se água a partir da torneira, deixando que corra água durante 5 minutos com objetivo de evitar os metais pesados que se encontram na canalização, de seguida colocamos a água recolhida no funil enchendo até amostra estar parcialmente tapada.

Após 48 horas procede se à recolha do conteúdo do tubo de silicone, em diferentes tubos de ensaio. Estes tubos de ensaio, tem de se deixar em repouso cerca de 45 minutos para que os nematodes depositem no fundo do tubo devido ao efeito da gravidade. Desta forma conseguimos fazer com que a concentração de nematodes aumente no fundo do tubo de ensaio:

Na primeira preparação colocamos duas placas de Petri em dois funis.

Um número total de oito tubos de ensaio.

Um número total de onze tubos de ensaio.

Deixamos estes tubos repousar durante 45 minutos e depois de extrair o máximo de água até cerca de dois centímetros de amostra do fundo e depois decanta se o conteúdo até se alcançar o mínimo de tubos de ensaio nos quais se vai ter uma maior concentração de nematodes.

Ao ter um volume tão grande de água o que se pretende é tirar a água por decantação e posteriormente juntar o decantado todo no mínimo possível de tubos de ensaio.

Um número total de dois tubos de ensaio

Um número total de um tubo de ensaio.

Com esta decantação nós conseguimos uma maior concentração de nemátodes que na primeira decantação, assim pois, procede-se á extração duma alíquota de 0,05ml e fez-se uma contagem ao microscópio para poder

saber qual é a concentração em cada uma das amostras. De seguida dividem-se entre os gobelés necessários para conter o líquido dos tubos de ensaio. Com a micropipeta retira 3 amostras e voltamos a colocá-las no gobelé, de seguida retiramos mais uma amostra que será a definitiva para realizar a contagem de nematodes de forma a podermos saber a concentração.

Os resultados desta contagem são os seguintes:

Na primeira amostra temos dois gobelés:

No primeiro gobelé 1.1 temos uma concentração de 815 nematodes/0.05ml=16300 nem/ml.(Fig. 5A)

No segundo gobelé 1.2 há uma concentração de 94 nematodes/0.05ml=1880 nem/ml.(Fig. 5B)

Na segunda amostra temos dois gobelés:

No primeiro gobelé 2.1 temos uma concentração de 467 nematodes/0.05ml=9340 nem/ml.(Fig. 5C)

No segundo gobelé 2.2 temos uma concentração de 391 nematodes/0.01ml=39100 nem/ml.(Fig. 5D)

A contagem foi realizada através de um microscópio e se fez uma sondagem de um volume conhecido de cada um dos tubos para se poder aferir qual era a concentração de nematodes que tínhamos.

A amostra 2.2 é a amostra com o melhor resultado para proceder a experiência já que tínhamos de utilizar uma concentração de 2000 nematodes em 0,05ml e com esta amostra se consegue sem que se tenhas de fazer alguma diluição ou novo procedimento para procurar aumentar a concentração de nematodes.

- b) O segundo tipo de extração realiza-se com as placas de Petri que tem botridis e nematode mas este método é muito mais rápido e eficaz para ter concentrações altas de nematodes.

Neste método só se utiliza as tampas das placas de Petri, onde há grandes quantidades do nematode e como quase não apresenta perdas é suficiente para ter uma elevada concentração. Devemos apanhar uma garrafa de água destilada e fazer um esguicho contra a tampa, onde ficam os nematodes e depois apanhar a amostra resultante desta prática com um gobelé. Uma vez cheio o gobelé cheio de amostra, recolhem-se amostras em número par em tubos de eppendorf e leva-se à centrifuga durante menos de 10 segundos a 14000 rotações para se poder concentrar os nemátodos no fundo dos tubos de eppendorf.

Com uma micropipeta temos pipetar todos os eppendorf mas só do depósito de nematodes, temos de pipetar cerca de 20 µl até que temos dois tubos de eppendorf que apresentam uma elevada concentração de nematodes. Neste caso o que queremos de 2000 nematodes/0,05 ml e como os tubos de eppendorf tem uma maior quantidade, o que temos de fazer é uma redução

do volume para ter uma quantidade exata, voltamos a proceder a contagem de nematodes através do microscópio com uma alíquota de 0,05 ml.

### CONTAGEM DAS AMOSTRAS DOS NEMATODOS

A contagem das amostras foi realizado ao microscópio com uma placa circular que tinha uma quadrícula que nos permitiu ter um volume e uma superfície ótima para proceder a contagem dos nematodes.

1.1					2
0,05ml					13
					34
					44
					72
					85
					85
					105
					101
					73
					82
					59
					44
					16
TOTAL NEMATODOS AMOSTRA					815

Fig. 5A

1.2					1
0,05ml					4
					7
					5
					12
					11
					15
					12
					7
					7
					1
					3
					4
					5
TOTAL NEMATODOS AMOSTRA					94

Fig. 5B

2.1					1
0,05ml					6
					21
					32
					44
					41
					65
					77
					43
					46
					33
					25
					20
					13
TOTAL NEMATODOS AMOSTRA					467

Fig. 5C

2.2					0
0,01ml					10
					16
					35
					38
					38
					41
					42
					45
					44
					41
					21
					15
					5
TOTAL NEMATODOS AMOSTRA					391

Fig. 5D

Uma vez obtida a concentração necessária de nematode, procede-se as inoculações. No processo de inoculação, abrimos uma ferida nas árvores com um bisturi de cerca de 10X30mm e danificamos as células interiores da mesma com recurso a uma lima, de forma a facilitar a infeção com o nematode, e aplicamos 0,05 ml ou 2000 nematodes com uma micropipeta diretamente na ferida que foi aberta por nós e por fim fechamos a ferida com o súber que foi retirado durante a abertura da ferida, e revestimos esta ferida com parafilme de forma a evitar a contaminação desta quer por fungos ou bactérias.(Fig. 5)



Fig. 5 Realização da ferida para a inoculação do nematode do pinheiro

As feridas realizadas fecharam optimamente e os pinheiros não tiveram problemas em cicatrizar.(Fig. 6)



Fig.6 Feridas realizadas para as inoculações As nossas medidas de mortalidade das árvores com o nematode, foram feitas mediante descrição visual dos efeitos produzidos às nossas árvores experimentais.

Estas árvores tem uma data de inoculação do pinheiro, uma da presença da doença e outra data da morte do pinheiro determinada por a seca total das folhas do árvore.

As árvores determinadas com a presença do nematode, todos os inoculados, sofreram as mesmas sintomatologias.

Estos sintomas são (Fig.7):

- Segregação abundante de resina.
- Seca do pinheiro da parte baixa ate a parte alta da árvore.
- Ramilhos apicais murchos.
- Aumento abundante das segundas plagas, sobre todo dípteros e afídios.



Fig.7 Efeitos nocivos detetados nos pinheiros com nematodes.

As amostras foram introduzidas imediatamente depois de serem extraídas do medio do cultivo, porque o nematode perde eficácia quanto mais tempo passa no ar. Realizaram-se duas introduções do nematode por pinheiro, uns 4000 nem/arvore.

As inoculações vão ser realizadas no dia 1 de março e depois se fizeram mais duas a dois pinheiros para mostrar o tempo que demora em atuar a enfermidade.

Estos dois pinheiros foram inoculados no dia 30 de março.

Destes 12 pinheiros inoculados, só trocamos para seguir o experimento 6 deles, e pusemos 6 mais para poder continuar o experimento.

Estes 6 foram inoculados o dia 30/05/12 e são estes (Fig.8):

SALA N EXPERIENCIA	SEM REGA 2 min/dia (não ao fim-de-semana)						COM REGA 4 min/dia (não ao fim-de-semana)					
BLANCO	1		2		3		4		5		6	Presencia da sequeira o dia 10/04/12 Morto o dia 21/05/12
BLANCO	7		8		9		10		11		12	
NEMATODO	13	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 06 22/05/12	14	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 22/05/12	15	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 16/05/12	16	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 15/05/12	17	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 08 28/05/12	18	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 15/05/12
NEMATODO	19	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 08 28/08/12	20	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 14/05/12	21	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 14/05/12	22	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 24/05/12	23	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 25 /05/12	24	Presencia da doença o dia 10/04/12 Morto o dia 28/05/12
NEMATODO DURAÇÃO DOS PINHEIROS	25	Presencia da doença o dia 21/05/12 Morto o dia 22/06/12	26	Presencia da doença o dia 21/05/12 Morto o dia 20/06/12	Os números 25 e 26 só têm 300 ml/dia (não ao fim-de-semana)							
Depois de sacar os pinheiros mortos a sala N fico assim												
SALA N EXPERIENCIA	SEM REGA 2 min/dia (não ao fim-de-semana)						COM REGA 4 min/dia (não ao fim-de-semana)					
BLANCO	1	Tem muita sequeira	2		3		4		5		6	Tem muita sequeira
NEM/ESCOLITIDO	7	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12	8	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12	9	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12	10	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12	11	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12	12	Pinheiros inoculados o dia 30/03/12
ESCOLITIDO	31	Pinyers inocula el dia 30/03/12	32	Pinyers inocula el dia 30/03/12	28	Pinyers inocula el dia 30/03/12	30	Pinyers inocula el dia 30/03/12	29	Pinyers inocula el dia 30/03/12	27	Pinyers inocula el dia 30/03/12
NEMATODO	19	Pinheiros cortados o dia 6/05/12	14	Pinheiros cortados o dia 6/05/12	13	Pinheiros cortados o dia 6/05/12	22	Pinheiros cortados o dia 8/05/12	17	Pinheiros cortados o dia 8/05/12	24	Pinheiros cortados o dia 8/05/12
NEMATODO DURAÇÃO DOS PINHEIROS	25	21/05/12 Começam a aparecer	26	21/05/12 Começam a aparecer	Os números 25 e 26 só têm 300 ml/dia (não ao fim-de-semana)							

Fig.8 Controlo da sala N

- **Obtenção de escolítideos para introduzir nas árvores e avaliação das emergências**

- 1) Os árvores foram cortados no mes de outubro em Penela o dia 30/04/12 e foram deixados lá ate o dia 10/02/12.
- 2) Os escolítideos ficaram dentro dos toros para desenvolverem-se ate o dia 02/05/12.
- 3) Os escolítideos foram introducidos nos árvores da estufa o dia 04/05/12.

Os toros ficaram protegidos com sacos de redes de fios milimétricas com as que os escolítideos não poderiam passar, para poder saber quantos havia por toro e quando estavam a sair. Estos foram depositados em uma oficina e os toros foram numerados e classificados, à espera do nascimento dos escolítideos.

Os toros foram revisados aproximadamente cada 2 dias, a partir do dia 30/04/12, fazendo o comtagem por toro e assim poder determinar a sua curva de voo (ANEXE II).

Os toros do Castelo Germanelo foram os únicos em emergir e de onde se fizeram as extrações das emergências. (Fig. 9)

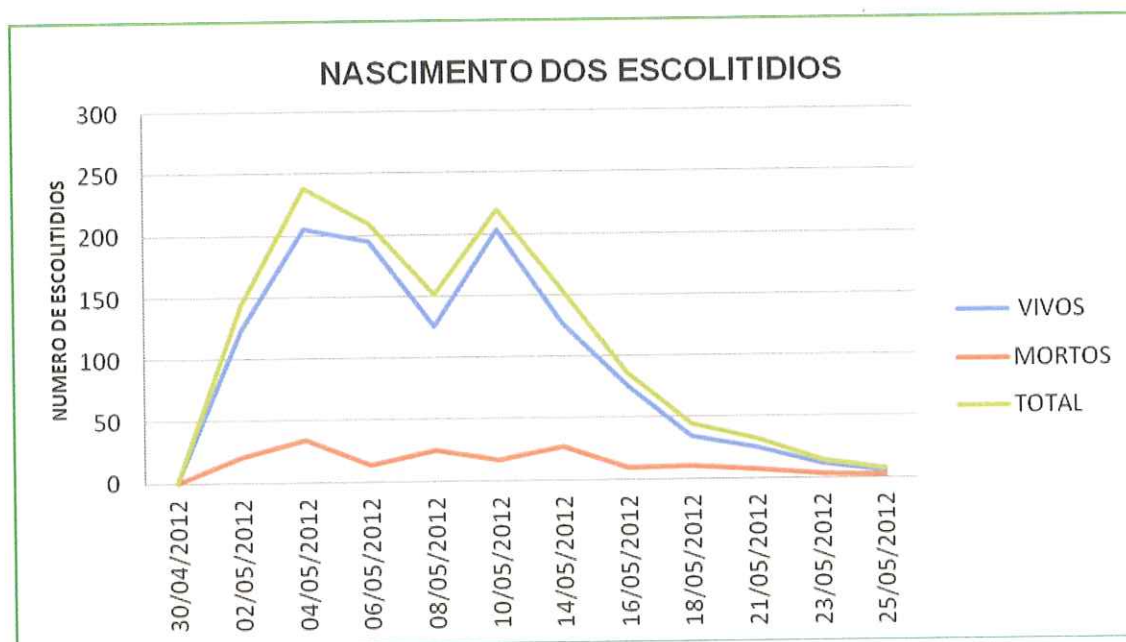


Fig.9 Curva de voo dos escolítideos.

O 15% dos toros não apresentaram nenhum tipo de presença e tiveram na corva do voo uma clara baixada de nascimentos nos dias 7, 8 e 9 de julho respetivamente.(Fig. 10)



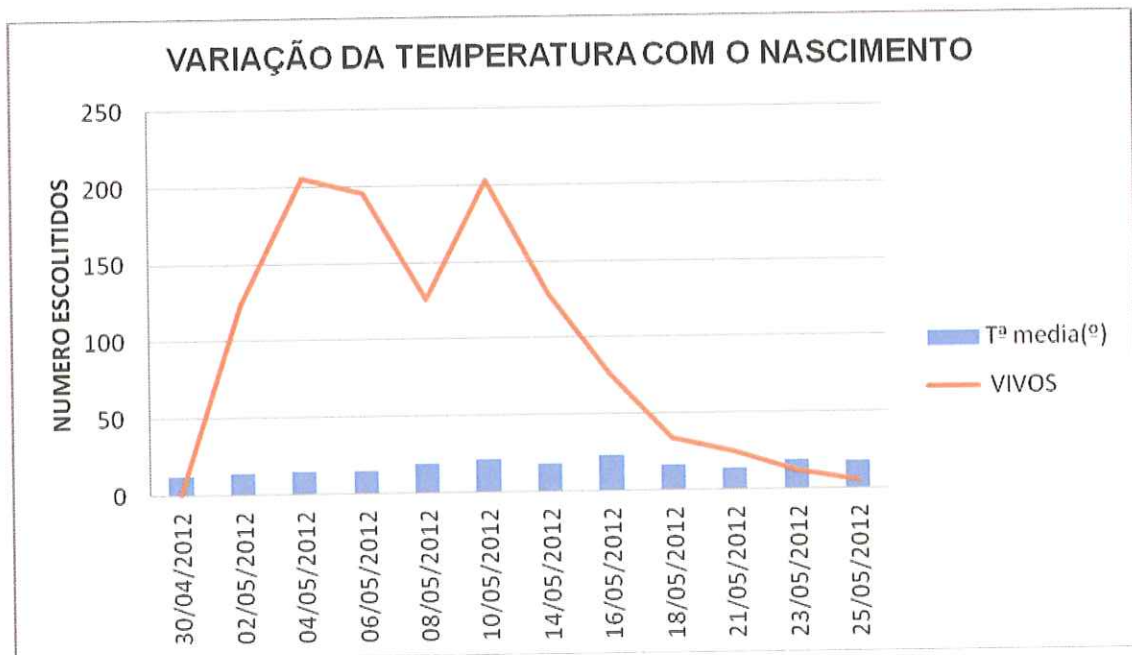


Fig. 10 Variação dos nascimentos com a temperatura.

- **Introdução do escoltideo**

A preparação das amostras fueram realizadas apanhando os toros dos pinheiros cortados em Penela, meses antes e deixamos no seu habitat ate a data de recollida dos arvores, depois seriam introducidos nos sacos para não perder ningum escoltideo.

#### PENELA - ZONA DE CASTELO

- Data da corta do arvore 23/10/2011
- Data recolhida dos toros 10/02/2012
- Início da data de emergência dos escoltideos 02/05/2012
- Inoculação dos escoltideos nos pinheiros 04/05/2012

Sacaram um total de 15 escoltideos por arvore, para a realização das inoculações e o numero total de escoltideos fue de  $15 \times 12 = 180$  escoltideos.

Os arvores fueram envoltos por uma tela chamada LUTRASIL, que faze de barrera frente ao vô dos escoltideos, assim pois poemos ter o tempo que queremos no arvore sem causar danos a ningum arvor da volta.(Fig. 11)

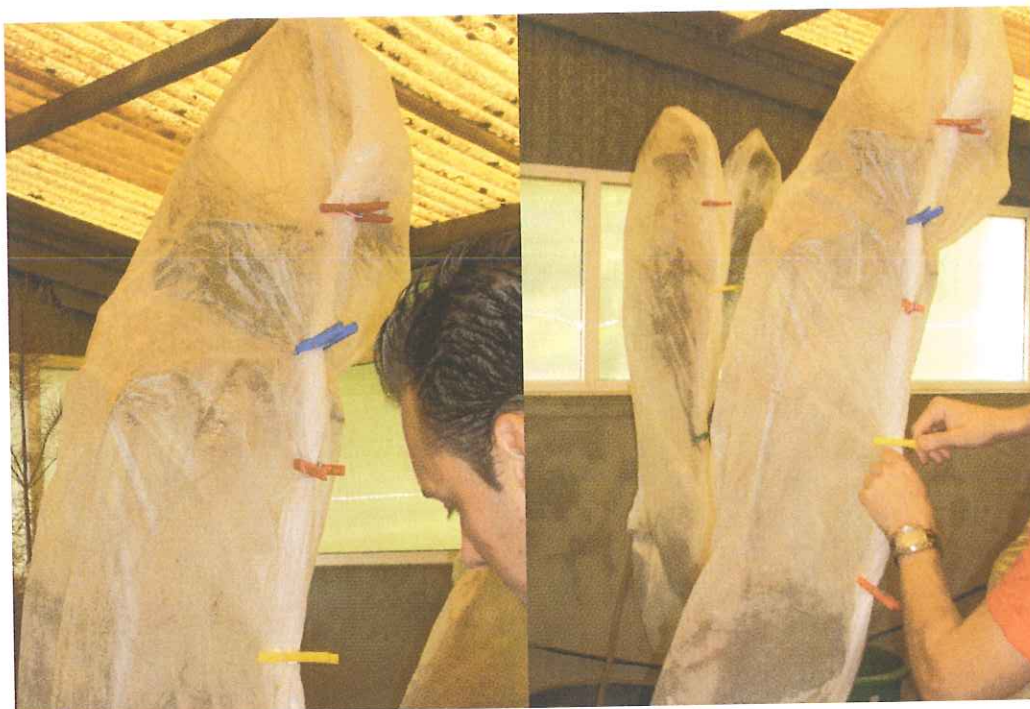


Fig.11 Introdução dos escolitídeos na estufa.

Foram inoculados no dia 04/05/12 e fizeram amostragens para ver si há escolitídeos dentro das árvores, dois semanas depois de ser inoculados, o dia 22/05/12, com as seguintes conclusões (Fig. 12):

Aumento abundante das segundas plagas, sob todos dípteros e afídios.

Entradas múltiplos nas árvores.

Não á presença do nemátodo.

NUMERO ARVORE	TOMICUS MORTOS	TOMICUS VIVOS	TOMICUS NO LUTRASIL	DESAPARECIDOS	OBSEVAÇÕES	DENSIDADE DOS INSETOS NO LUTRASIL (insetos/30cm <sup>2</sup> )
7	0	0	8	7	Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).	6/30
8	0	0	2	13	Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).	10/30
9	1	0	1	13	Não têm muitos insetos e não apresentam doença dos nemátodos. Dois ataques no ápice.	20/30
10	2	0	4	9	Observação de seca por nemátodo nos ramiños inferiores segregação de resina.	120/30
11	3	1	0	11	Muito verde na copa e tronco castanho (carumas).	70/30
12	3	0	0	12	Poucos insetos na tela. Presença de aranha.	8/30
32	0	0	1	14	Dois ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom.	15/30
31	0	0	5	10	Muitos insetos e verde até o fim.	160/30
28	0	0	3	12	Muitos insetos e 3 ataques dos escolitídeos.	140/30
30	1	2	2	10	Estado do pinheiro é bom.	100/30
29	0	0	5	10	3 Ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom. Poucos insetos.	50/30
27	3	0	3	9	Têm muita resina mais não apresenta doença do nemátodo, poucos insetos.	150/30

Fig.12 Numero dos arvores inoculados com escolitidos e observações

Depois da realização das amostragens os árvores foram volto a tapar com o LUTRASIL para controlo por si porque ficam lá escolitídeos vivos dentro.

Foi feita uma amostragem do LUTRASIL retirado das árvores mediante a cotagem dos insetos da zona mais populosa de insetos (densidade dos insetos no LUTRASIL)(Fig.13)





Fig.13 Amostras dos insetos no lutrasil retirado

SALA N EXPERIENCIA	SEM REGA 2 min/dia (não ao fim-de-semana)						COM REGA 4 min/dia (não ao fim-de-semana)					
	31	Pinyers inocula el dia 30/03/12	32	Pinyers inocula el dia 30/03/12	28	Pinyers inocula el dia 30/03/12	30	Pinyers inocula el dia 30/03/12	29	Pinyers inocula el dia 30/03/12	27	Pinyers inocula el dia 30/03/12
NUMERO ARVORE	TOMICUS MORTOS	TOMICUS VIVOS	TOMICUS NO LUTRASIL	DESAPARECIDOS		OBSEVAÇÕES		DENSIDADE DOS INSETOS NO LUTRASIL (insetos/30cm <sup>2</sup> )				
32	0	0	1	14		Dois ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom.		15/30				
31	0	0	5	10		Muitos insetos e verde até fim.		160/30				
28	0	0	3	12		Muitos insetos e 3 ataques dos escolitideos.		140/30				
30	1	2	2	10		Estado do pinheiro é bom.		100/30				
29	0	0	5	10		3 Ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom. Poucos insetos.		50/30				
27	3	0	3	9		Têm muita resina mais não apresenta doença do nemátodo, poucos insetos.		150/30				

Fig.14 O quadro representa os pinheiros inoculados só com o escolítido.

- **Introdução dos nemátodes e escolitideos**

Na parte dos nemátodes e escolitideos, estes foram inoculados nas mesmas datas que os escolitideos para a solta e na mesma data para os nemátodes para as inoculações e da mesma forma que estos.

As provas foram finalizadas o dia 06/06/12.

SALA N EXPERIENCIA	SEM REGA 2 min/dia (não ao fim-de-semana)						COM REGA 4 min/dia (não ao fim-de-semana)										
	7	Pinyers inocula el dia 30/03/12		8	Pinyers inocula el dia 30/03/12		9	Pinyers inocula el dia 30/03/12		10	Pinyers inocula el dia 30/03/12		11	Pinyers inocula el dia 30/03/12		12	Pinyers inocula el dia 30/03/12
NUMERO ARVORE	TOMICUS MORTOS	TOMICUS VIVOS	TOMICUS NO LUTRASIL	DESAPARECIDOS		OBSEVAÇÕES		DENSIDADE DOS INSETOS NO LUTRASIL (insetos/30cm <sup>2</sup> )									
7	0	0	8	7		Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).		6/30									
8	0	0	2	13		Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).		10/30									
9	1	0	1	13		Não têm muitos insetos e não apresentam doença dos nemátodos. Dois ataques no ápice.		20/30									
10	2	0	4	9		Observação de seca por nemátodo nos ramiños inferiores segregação de resina.		120/30									
11	3	1	0	11		Muito verde na copa e tronco castanho (carumas).		70/30									
12	3	0	0	12		Poucos insetos na tela. Presença de aranha.		8/30									

Fig.15 Representa os pinheiros inoculados com o nematode e o escoltído.

Como pode-se observar na tabela no há ninguém morto pero se há presença da doença nas inoculações feitas nos arvores com escolitideos e nemátodo.

- **Monitorização da técnica da bioimpedância**

Foi feito pela Engenheira Elisabeht Borges da facultade de fisica mediante os elementos a seguir:

O dispositivo de aquisição esta formado por ums electrodos (foto superior esquerda), um sistema de aquisição de dados (Picoscope 3250) (foto superior direita), um sistema de espectroscopia de impedância eléctrica (laptop+picoscope+eléctrodos+bioimpedancímetro) (foto inferior esquerda) e bioimpedancímetro desenhado e elaborado no GEI ( Grupo de Electrónica e Instrumentação, Dep. Física, FCTUC + eléctrodos) (foto inferior direita).(Fig. 18)

O processo demora muito porque, como ja diz-se antes, a bioimpedância varia ao longo do dia e se tem de fazer uma aquisição cada duas horas para ter uma perspectiva optima dos resultados.



Fig.18 Elementos utilizados na monitorização dos pinheiros

#### 4) RESULTADOS

##### • Escolitideos e emergências

Nas emergências dos escolitideos tinham uma curva de voo com uma baixada das nascências, na qual o escolítido não nascio de forma pgressiva.

Esta variação na curva de voo pode ter acontecido por dois motivos (Fig.19 e 20):

- Porque tiveram uma subida das temperaturas no intervalo da emergência. O facto é que a temperatura é um factor biotico muito importante nestes insectos e com uma variação de quatro ou cinco grados pode fazer que os escolítidios não saigam.
- Porque o escolítidio que põe os ovos no tronco não faz a posta seguida e pode acontecer que estes ainda não estiveram boms para nascer. Ao ser postos na árvore em intervalos diferentes os ovos podem sofrer um feedback e estar mais tempo no tronco para o seu desenvolvimento.

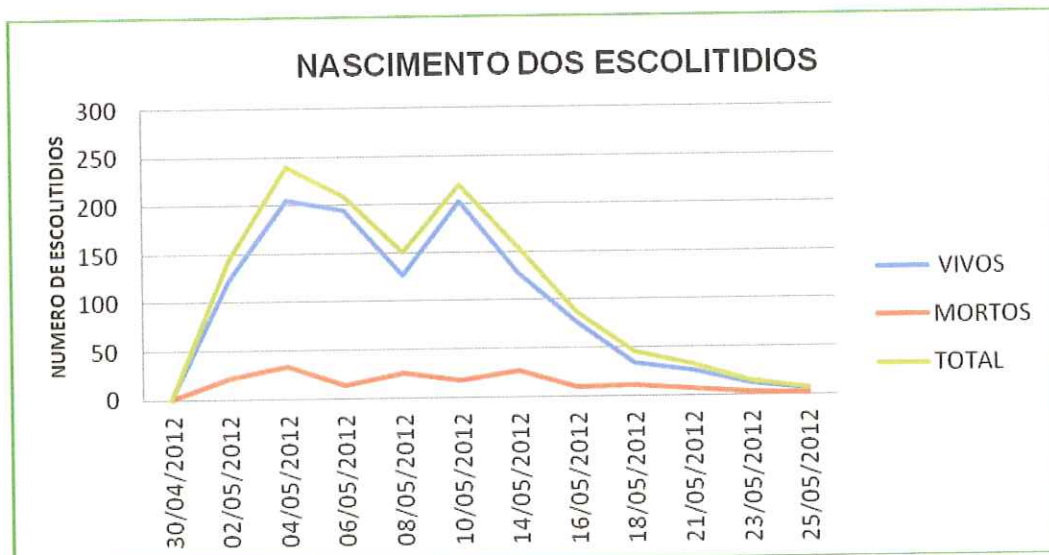


Fig.19 Curva de voo dos escolítideos.

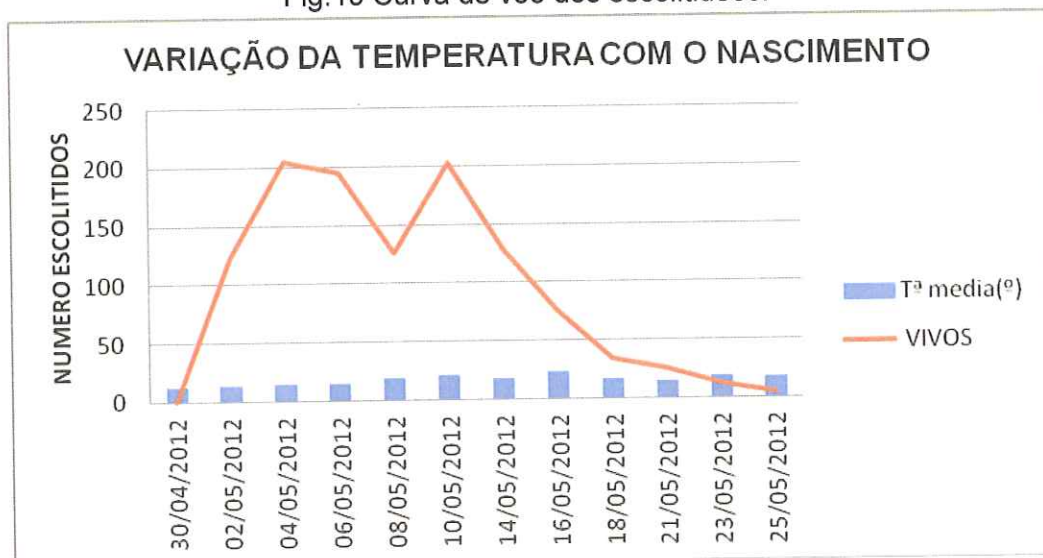


Fig.20 Variação dos nascimentos com a temperatura.

- Mortalidade das árvores inoculadas com escolítideos**

Não tínhamos mortos destas árvores, os pinheiros são devilitados pela presença dos escolítideos mas este não é capaz de matar os pinheiros com a quantidade de escolítideos inoculados nas árvores.

O pinheiro oferece resistência aos escolítideos segregando resinas nos buracos que estes fazem para entrar no tronco e tivemos um percentagem alto dos que estavam nas entradas pero mortos (Fig.21).

NUMERO ARVORE	TOMICUS MORTOS	TOMICUS VIVOS	TOMICUS NO LUTRASIL	DESAPARECIDOS	OBSEVAÇÕES	DENSIDADE DOS INSETOS NO LUTRASIL (insetos/30cm <sup>2</sup> )
32	0	0	1	14	Dois ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom.	15/30
31	0	0	5	10	Muitos insetos e verde até o fim.	160/30
28	0	0	3	12	Muitos insetos e 3 ataques dos escolítideos.	140/30
30	1	2	2	10	Estado do pinheiro é bom.	100/30
29	0	0	5	10	3 Ataques no ápice. Estado do pinheiro é bom. Poucos insetos.	50/30
27	3	0	3	9	Têm muita resina mais não apresenta doença do nemátodo, poucos insetos.	150/30

Fig.21 Numero dos arvores inoculados com escolítideos e observações

- **Mortalidade das árvores inoculadas com escolitídeos e nematodes**

O experimento que foi realizado com estas árvores foi até o dia 06/06/12 quando concluído ainda não tínhamos nenhuma árvore morta, mas já tinham sintomas nas folhas e as árvores estavam muito mais debilitadas que as que tinham só escolitido, assim pois, pode-se dizer que os pinheiros com nematodes são mais susceptíveis à invasão por outras pragas e que as duas, em conjunto, podem estragar com mais facilidade a resistência da árvore e fazer que morra mais depressa (Fig.22).

NUMERO ARVORE	TOMICUS MORTOS	TOMICUS VIVOS	TOMICUS NO LUTRASIL	DESAPARECIDOS	OBSEVAÇÕES	DENSIDADE DOS INSETOS NO LUTRASIL (Insetos/30cm <sup>2</sup> )
7	0	0	8	7	Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).	6/30
8	0	0	2	13	Carumas verdes na copa e castanhas no tronco (clorose e segregação de resina).	10/30
9	1	0	1	13	Não têm muitos insetos e não apresentam doença dos nemátodos. Dois ataques no ápice.	20/30
10	2	0	4	9	Observação de seca por nemátodo nos ramiños inferiores segregação de resina.	120/30
11	3	1	0	11	Muito verde na copa e tronco castanho (carumas).	70/30
12	3	0	0	12	Poucos insetos na tela. Presença de aranha.	8/30

Fig.22 Numero dos arvores inoculados com escolitidos, nematodes e observações

- **Mortalidade das árvores inoculadas com nematodes**

As árvores foram identificadas visualmente como mortas, ou moribundas. Contudo a aplicação da técnica da bioimpedância revelou que os pinheiros ainda estavam vivos.

ARVORE	PRESENCIA	MORTO	ARVORE	PRESENCIA	MORTO
13	10/04/12	22/05/12	19	10/04/12	28/05/12
14	10/04/12	22/05/12	20	10/04/12	14/05/12
15	10/04/12	16/05/12	21	10/04/12	14/05/12
16	10/04/12	15/05/12	22	10/04/12	24/05/12
17	10/04/12	28/05/12	23	10/04/12	25/05/12
18	10/04/12	15/05/12	24	10/04/12	28/05/12

As inoculações vão ser realizadas no dia 1 de março e depois se fizeram mais duas a dois pinheiros para mostrar o tempo que demora em atuar a enfermidade.

Estos dois pinheiros foram inoculados no dia 30 de março.

ARBRE	PRESENCIA	MORT	ARBRE	PRESENCIA	MORT
25	21/05/12	22/06/12	26	21/05/12	22/06/12

- **Mobilidade de Nemátodo dentro dos pinheiros**

Destas arvores inoculados fizeram provas, para saber o contido do nemátodo no interior deles, mas estes foram inoculados em 1 de março.

Cada árvore foi cortada em três partes diferentes, com um comprimento de 15 cm e que foram tomadas a parte 1 e 2 em baixo das feridas feitas na introdução dos



nemátodes e na parte 3 foi a 30 cm do solo, para comprovar que havia nemátodo em toda a parte aérea da árvore (Fig.23).

NUMERO ARVORE	NUMERO PARTE	PESO (g)	NUMERO DE NEMATODOS EM 0.05 ml		
19	1	7.47	0	0	1
	2	2.59	0	1	0
	3	4.55	4	7	133
13	1	8.76	0	1	0
	2	13.6	43	1	24
	3	44.31	1	3	3
14	1	6.59	0	0	0
	2	2.19	0	0	0
	3	22.14	112	29	23
17	1	7.93	0	4	0
	2	25.46	5	20	5
	3	24.15	1	0	5
22	1	6.97	0	0	0
	2	10.95	28	17	0
	3	22.46	0	0	2
24	1	8.33	0	0	0
	2	10.01	0	0	0
	3	22.4	8	14	20

Fig.23 representa os diâmetros dos troncos cortados e o número de nematodes nas três aliquotas.

Como pode-se observar há muitos nematodes nas partes inferiores do arvore, já que, o nematode busca zonas onde á maior quantidade de agua e por isso desloca-se em direção ao solo, pode-se dizer que o nemátodo alcance cerca de 50 centímetros ao longo do tronco na direcção do chão.

Tambem podemos dizer que o nematode desloca-se em maior quantidade em direção ao solo quanta menor seja a quantidade de agua no arbol.

#### • Aplicação da bioimpedância

Aquisições Realizadas nos dias 6 e 11 de Junho de 2012

O perfil de bioimpedância de cada indivíduo foi analisado. De entre as várias representações possíveis foram escolhidas as que seguem por serem as que melhor evidenciam os os aspetos estudar.

Os gráficos abaixo são uma representação do quociente de impedância 1kHz/50KHz, descrito na literatura como um dos parâmetros de impedância mais relevantes em estudos e aplicações biológicas. Cada ponto, no gráfico, é respeitante a um indivíduo.

O grafico da fig.5 é da aquisição feita o dia 06/06/12 e os resultados do grafico da fig.6 da aquisição feita no dia 11/06/12, descrevem como conduce-se a electricidade por dentro do corpo vivo e a resistencia que opone o corpo a uma corrente.

Pode-se observar como os que não tinham nematodes oferecem uma maior resistencia dos que si tinham e que os que tinham, tinham uma maior reactivancia com valores muito desiguales.

Os pinheiros inoculados com nemátodes 1 mês mais tarde e os pinheiros inoculados simultaneamente com nemátodes e escolitídeos, sobrepõem-se na mesma região do gráfico, diferente dos pinheiros não inoculados. Os pinheiros inoculados apresentam uma maior reactivância relativamente aos saudáveis(Fig.16 e 17).

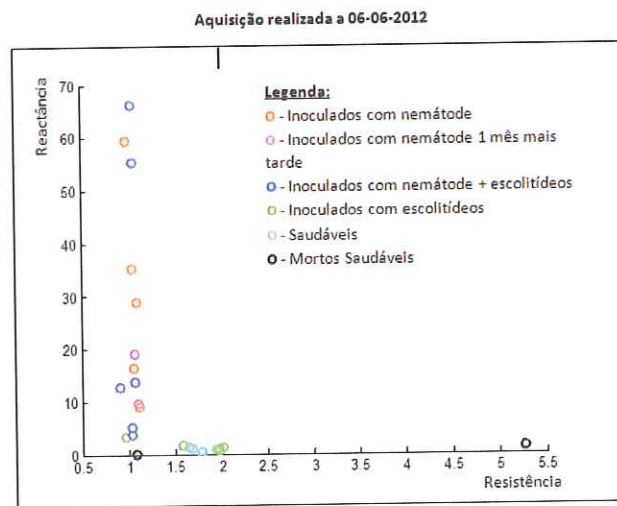


Fig.16 Quociente de impedância 1kHz/50kHz para todos os pinheiros em estudo.

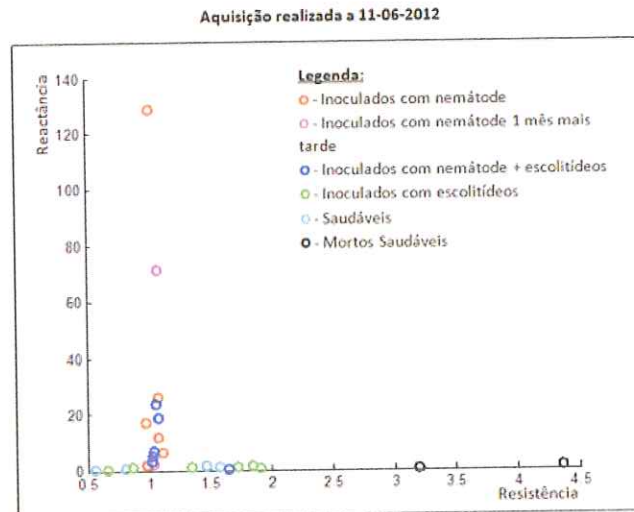


Fig. 17. Quociente de impedância 1kHz/50kHz para todos os pinheiros em estudo.

- **Árvores mortas no experimento**

Os árvores foram inoculados em diferentes datas pero os resultados obtidos das recolhidas de dados indicam que os nematodos aos 77 dias temem que o 40% dos pinheiros ainda esta vivo e que a os 84 dias passa a ser o 84%, sendo aos 91 dias ja para o 100% dos mortos. (Fig.24A e 24B)

% DE MORTOS NOS ARVORES DO EXPERIMENTO									
ÁRVORES	EM 7 DIAS (% DE MORTOS)	EM 14 DIAS (% DE MORTOS)	EM 21 DIAS (% DE MORTOS)	EM 28 DIAS (% DE MORTOS)	EM 35 DIAS (% DE MORTOS)	EM 42 DIAS (% DE MORTOS)	EM 49 DIAS (% DE MORTOS)	EM 56 DIAS (% DE MORTOS)	EM 63 DIAS (% DE MORTOS)
BRANCOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NEMATODE	Inoculação dos pinheiros	0	0	0	0	Presência	0	0	0
ESCOLITIDIO									
NEMATODE E ESCOLITIDEO									

5) Fig.24A Mortalidade dos pinheiros

% DE MORTOS NOS ARVORES DO EXPERIMENTO								
ÁRVORES	EM 70 DIAS (% DE MORTOS)	EM 77 DIAS (% DE MORTOS)	EM 84 DIAS (% DE MORTOS)	EM 91 DIAS (% DE MORTOS)	EM 98 DIAS (% DE MORTOS)	EM 105 DIAS (% DE MORTOS)	EM 112 DIAS (% DE MORTOS)	EM 119 DIAS (% DE MORTOS)
BRANCOS	0	0	0	0	0	0	0	83.33
NEMATODE	0	40% dos pinheiros mortos em 77 dias	84% dos pinheiros mortos em 84 dias	100% dos pinheiros mortos em 91 dias	100	100	100	100
ESCOLITIDIO	Inoculação dos escolitidos	0	0	0	0	0	0	0
NEMATODE E ESCOLITIDEO	Inoculação nem/escoli	0	0	0	0	0	0	0

6) Fig.24B Mortalidade dos pinheiros

Os que foram inoculados aos 70 dias, no dia das aquisições da bioimpedância ainda não haviam morto, mas dentro das duas semanas depois morreram de forma muito mais rapida que os pinheiros inoculados só pelos nematodos, podemos dizer que o escolitidio interfere provocando uma morte mais rapida. Nos resultados dos dois pinheiros inoculados, depois da realização do estudo no que morreram todos ao passo dos três meses, murriendo estes dois inoculados aos 89 dias (Fig.25A e 25B).

% DE MORTOS NOS ARVORES DO EXPERIMENTO									
ÁRVORES	EM 7 DIAS (% DE MORTOS)	EM 14 DIAS (% DE MORTOS)	EM 21 DIAS (% DE MORTOS)	EM 28 DIAS (% DE MORTOS)	EM 35 DIAS (% DE MORTOS)	EM 42 DIAS (% DE MORTOS)	EM 49 DIAS (% DE MORTOS)	EM 56 DIAS (% DE MORTOS)	EM 63 DIAS (% DE MORTOS)
Dois pinheiros inoculados dia 30/05/12					0 Inoculação dois pinheiros dia 30/03/12	0	0	0	0

7) Fig.25A Mortalidade dos dois pinheiros

% DE MORTOS NOS ARVORES DO EXPERIMENTO								
ÁRVORES	EM 70 DIAS (% DE MORTOS)	EM 77 DIAS (% DE MORTOS)	EM 84 DIAS (% DE MORTOS)	EM 91 DIAS (% DE MORTOS)	EM 98 DIAS (% DE MORTOS)	EM 105 DIAS (% DE MORTOS)	EM 112 DIAS (% DE MORTOS)	EM 119 DIAS (% DE MORTOS)
Dois pinheiros inoculados dia 30/05/12	0	0	Presença	0	0	0	0	100% dos pinheiros mortos em 89 dias

8) Fig. 25B Mortalidade dos dois pinheiros

## 5) Discussão

Os pinheiros inoculados com escolitidos não morreram mas foi por falta de tempo no experimento. Poso dizer que os árvores infetados com escolitidos ainda estão vivos e não temem porque morrer.

Os árvores inoculados com nematode foram inoculadas em diferentes datas pero todos morreram pasados os três meses.

A disposição de nematodos dentro do árvore e diferente dos arvores com rega e sim rega, pode ser por que em os de rega os nematodes buscam mais o agua e baixam mais para baixo pero há menos quantidade destes e nos sem rega os pinheiros tinham mais nematodos na segunda ferida que em baixo, mas com maior quantidade.

O facto de ter inoculado as dois doenças produce um incremento na reação do nematodo que faz que o pinheiro fique morto com maior rapidez.

Verifica-se que os indivíduos inoculados com nemátodes e também os indivíduos inoculados com nemátodes e escolitideos, a utilização da bioimpedância discriminou entre os indivíduos saudáveis e os doentes.

A explicação para a variação de comportamento pode assentar na variação de impedância de um indivíduo ao longo do dia, que, como já é sabido de estudos prévios, está dependente da temperatura, humidade relativa e luminosidade. Para confirmar esta observação e perceber o comportamento diário de variação de impedância de um indivíduo, estão atualmente a decorrer monitorizações a dois indivíduos saudáveis que foram inoculados com nemátodes.

Contudo, apesar da variação verificada, as observações e conclusões tiradas em ambas as figuras mantêm-se válidas: é possível discriminar entre indivíduos são e indivíduos inoculados com nemátodo.

Não se verificou relação com o nível de stress hídrico. Talvez, tendo em conta que se trata de uma espécie resistente, a variação de stress hídrico induzida é pouco relevante. Desta forma, as dispersões existentes podem dever-se à quantidade de nemátodes em cada indivíduo, ou simplesmente a oscilações diárias de impedância.

A bioimpedância pode ser uma ferramenta optima para a sua utilização nas explorações florestais, em casos como é a determinação da doença ates de que

poda afetar a toda o árvore, já que como indicamos anteriormente o nematodo recorre um percurso no qual o árvore não tem porque estar todo afeitado e pode estar só parcialmente.

Tambem pode ser util para poer o estado da floresta saudável, porque agora não existe metodo algum que poda determinar in situ se um arvore esta ou não infetado, assim pois, quando fazem trabalhos de limpeza da floresta, o nematode pode passar por as ferramentas utilizadas na limpeza e contaminar outros arvores.

Em estudos posteriores se pode realizar mais exhaustivamente um estudo referido ao stress do pinheiro com a bioimpêdancia, já que, não tivemos tempo e pode-se realizar um analise mais fino e determinar melhor as diferências nos graficos da bioimpeância.

## 6) Bibliografia

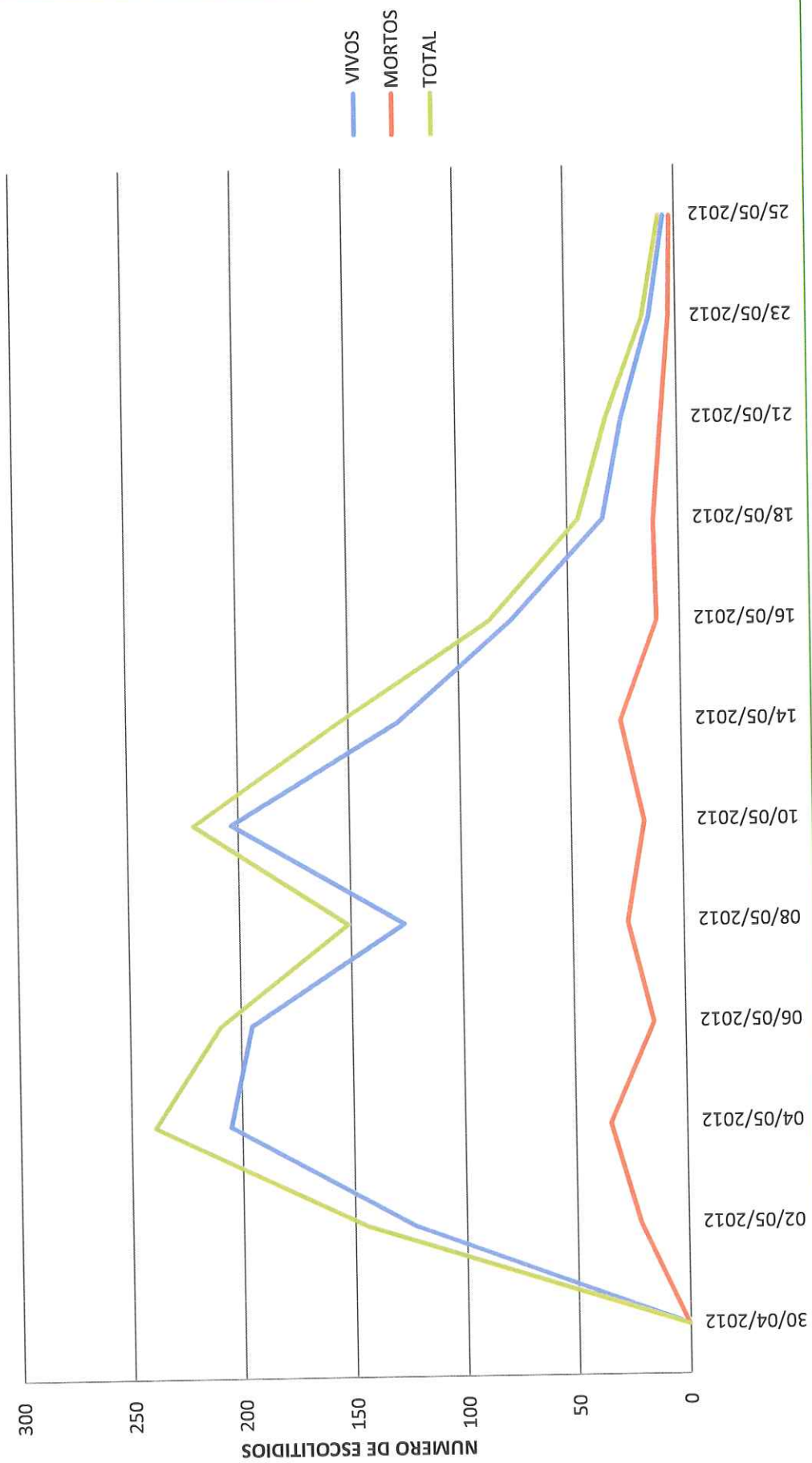
- Comissão E., 2006 - Decisão da Comissão Europeia 2006/133/CE, de 13 de Fevereiro de 2006.[em linha]  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:052:0034:0038:PT:PDF>
- Cardoso F., INRB, 2008 in. *Efeito do nemátode do pinheiro no módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo*, Lisboa, 2011
- European and mediterranean plant protection organization. Report of a Pest Risk Analysis for *Bursaphelenchus xylophilus*, 2009.09-15450 [em linha][http://www.eppo.int/QUARANTINE/Pest\\_Risk\\_Analysis/PRA\\_intro.htm](http://www.eppo.int/QUARANTINE/Pest_Risk_Analysis/PRA_intro.htm)
- Mitsuteru A. ,Katsunori N. "Suscetibilidade de árvores adultas de espécies ameaçadas *Pinus armandii* var. de pinho amamiana traqueomicose no campo", artigo científico tirado © Os japoneses Floresta Sociedade e Springer-Verlag, Tóquio, 2005.
- Naves, 2007 in. *Efeito do nemátode do pinheiro no módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo*-Filipa Cardoso Morais de Almeida Pico, Lisboa, 2011
- Neves, E. B., Pino, A. V., Souza, M.N., 2009, "Comparison of Two Bioimpedance Spectroscopy Techniques in the Assessment of Body Fluid Volumes", Proceedings of the 31th Annual International IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference, pp. 853-856, Minneapolis, Minnesota, USA, 2009.
- Vasconcelos T.M. , 2006, Horn, A., Lieutier, F., Branco, M., Kerdelhué, C. Distribution and population genetic structure of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* in the Iberian Peninsula and Southern France.*Agricultural and Forest Entomology*, 8, 103-111.
- Vasconcelos T., Inácio L., Bonifácio L., Capítulo 1. Pragas e doenças dos pinheiros. Problemas fitossanitários em pinhal e eucaliptal em Portugal.Lisboa, 2008, Manuela Branco, Carlos Valente e Maria Rosa Paiva.

## 7) Anexos



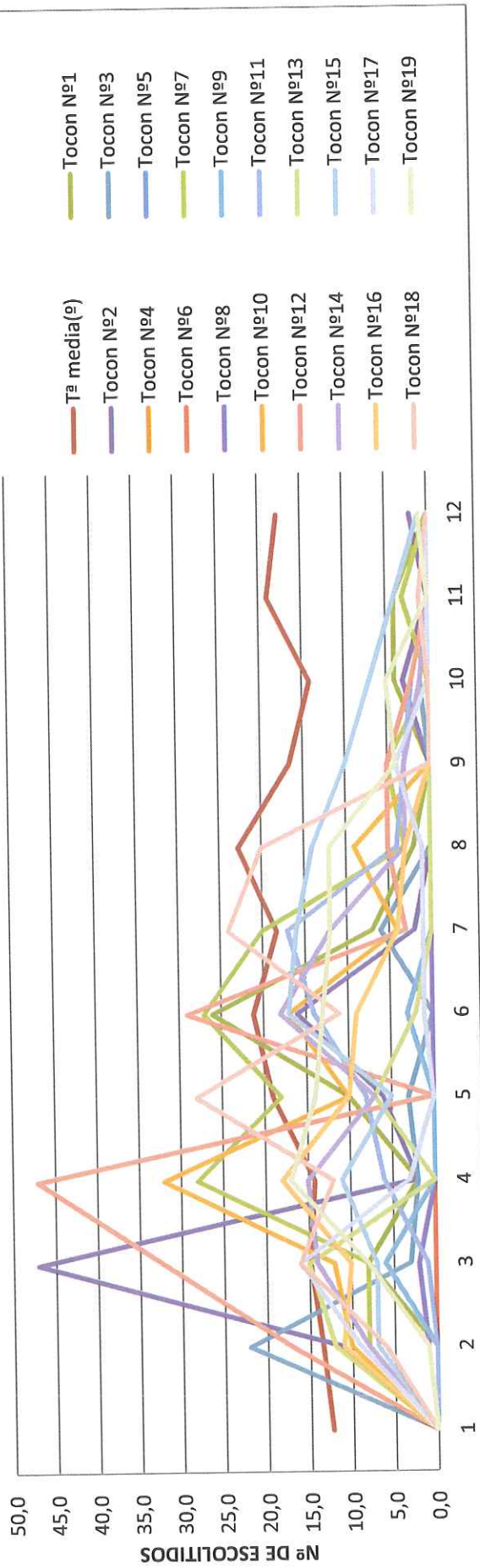


# NASCIMENTO DOS ESCOLITÍDIOS

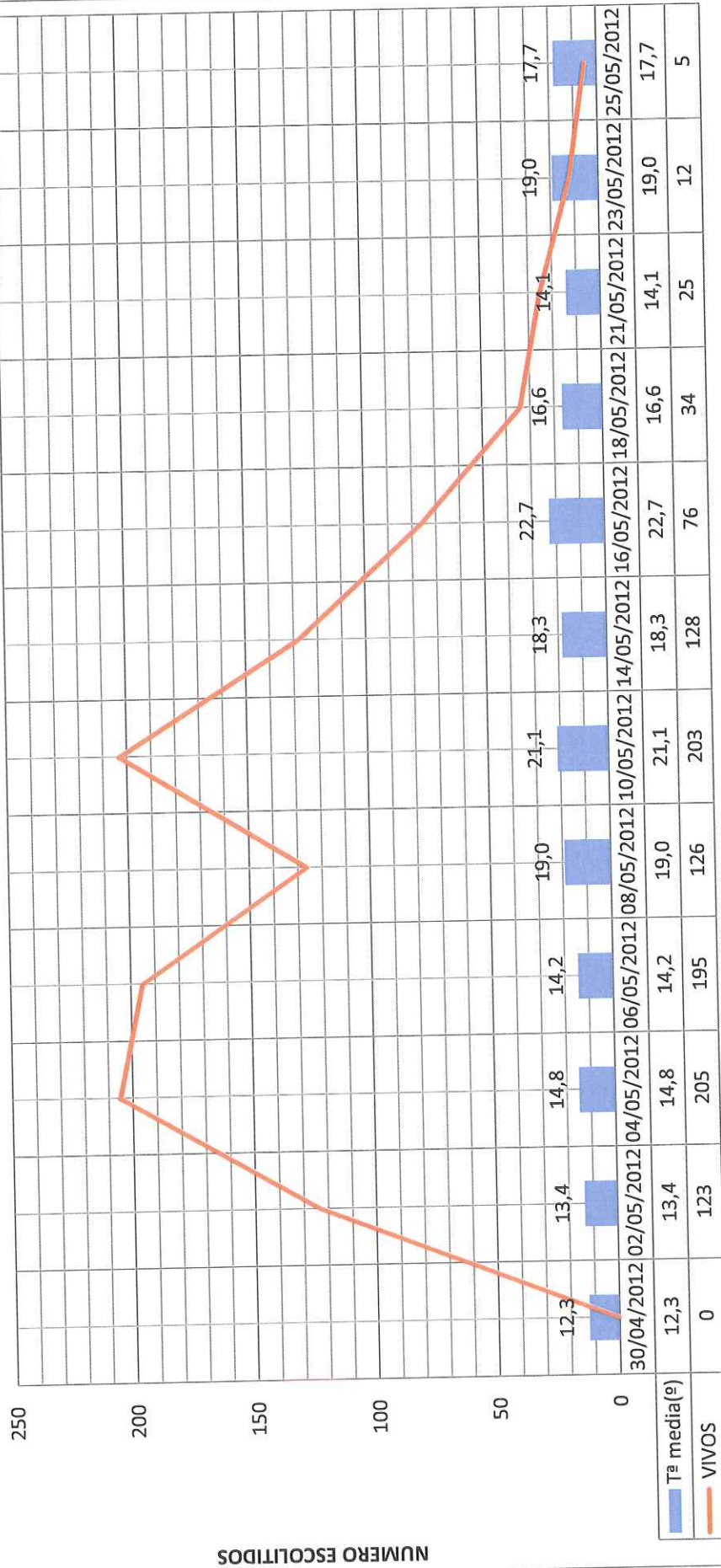


DI	Tª media(°)	Tocon Nº1	Tocon Nº2	Tocon Nº3	Tocon Nº4	Tocon Nº5	Tocon Nº6	Tocon Nº7	Tocon Nº8	Tocon Nº9	Tocon Nº10	Tocon Nº11	Tocon Nº12	Tocon Nº13	Tocon Nº14	Tocon Nº15	Tocon Nº16	Tocon Nº17	Tocon Nº18	Tocon Nº19
A	12,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13,4	0	11	22	0	0	0	8	1	0	10	0	17	12	8	7	11	9	6	1
2	14,8	8	47	3	0	0	0	8	2	6	12	1	32	15	14	7	10	16	16	8
3	14,2	2	2	2	0	0	0	28	0	0	32	6	47	0	15	11	18	3	12	17
4	19,0	10	6	3	0	0	0	18	0	0	10	8	0	7	7	5	10	0	28	14
5	21,1	26	16	0	0	0	0	27	0	3	17	14	29	2	18	17	9	1	11	13
6	18,3	7	2	6	0	0	0	20	0	0	4	17	3	0	12	16	4	1	24	12
7	22,7	2	0	0	0	0	0	3	0	0	9	4	5	0	3	14	3	1	20	12
8	16,6	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	3	5	0	3	10	0	4	0	4
9	14,1	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	7	0	0	0	5
10	19,0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0
11	17,7	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

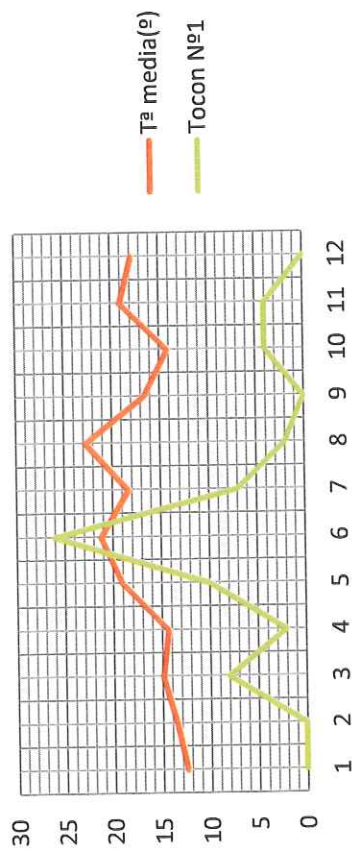
## Nº DE ESCOLITIDOS POR TORO SEGUM VARIAÇÃO DA TEMPERATURA



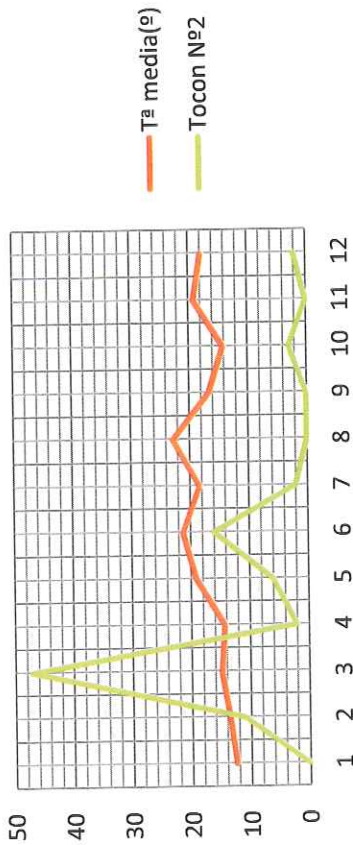
### VARIAÇÃO DA TEMPERATURA COM O NASCIMENTO



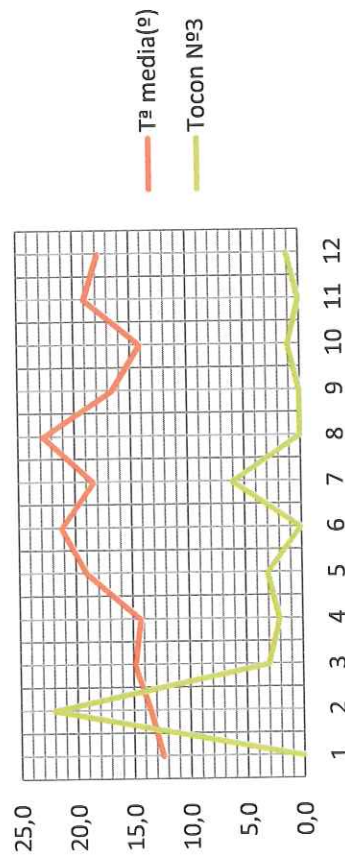
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº1 COM A TEMPERATURA



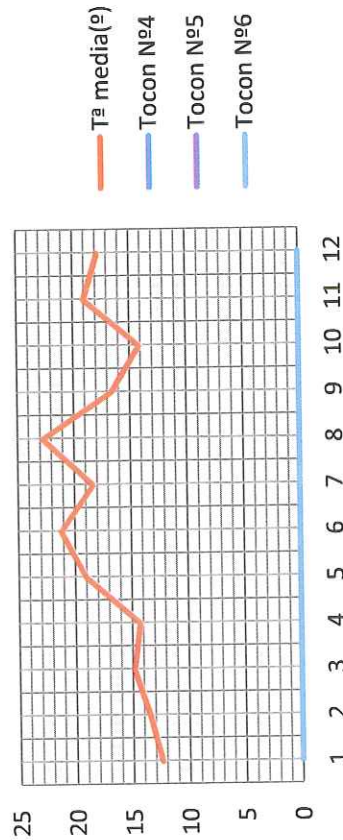
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº2 COM A TEMPERATURA



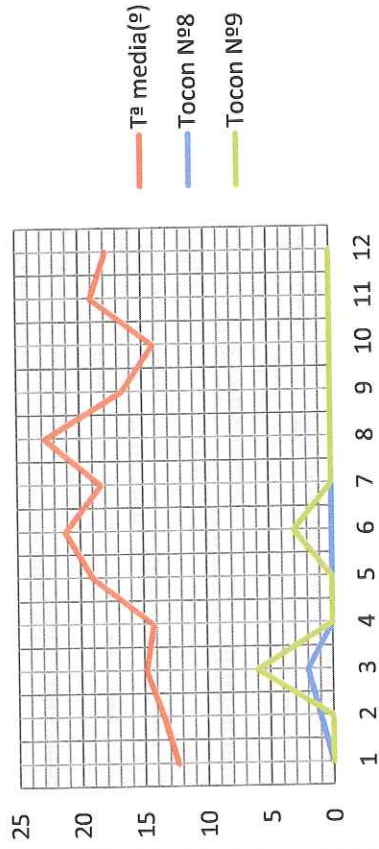
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº3 COM A TEMPERATURA



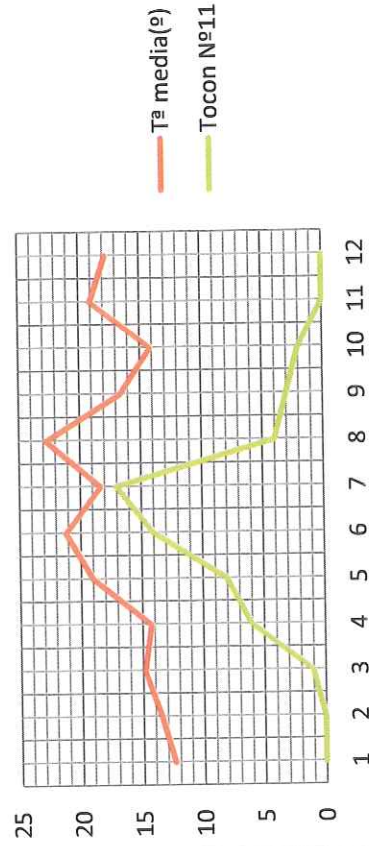
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº 4, 5 E 6 COM A TEMPERATURA



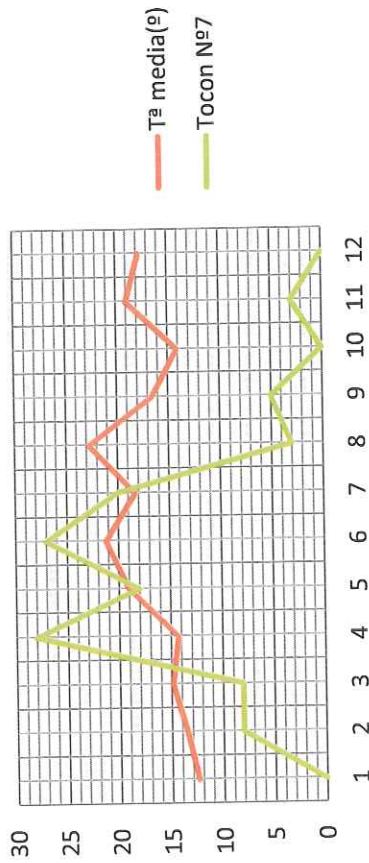
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº8, 9 COM A TEMPERATURA



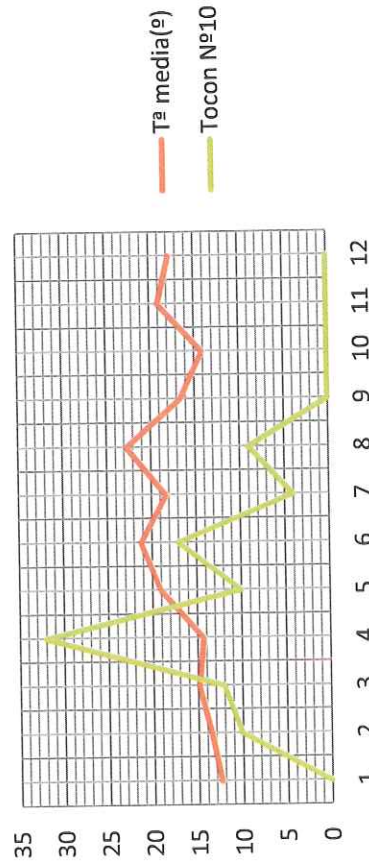
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº11 COM A TEMPERATURA



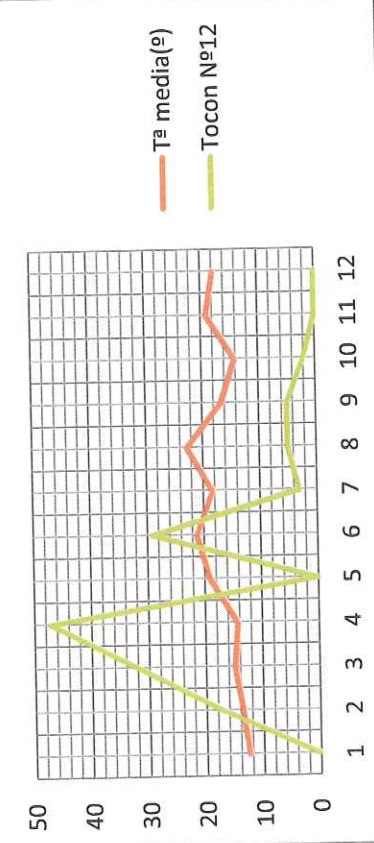
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº7 COM A TEMPERATURA



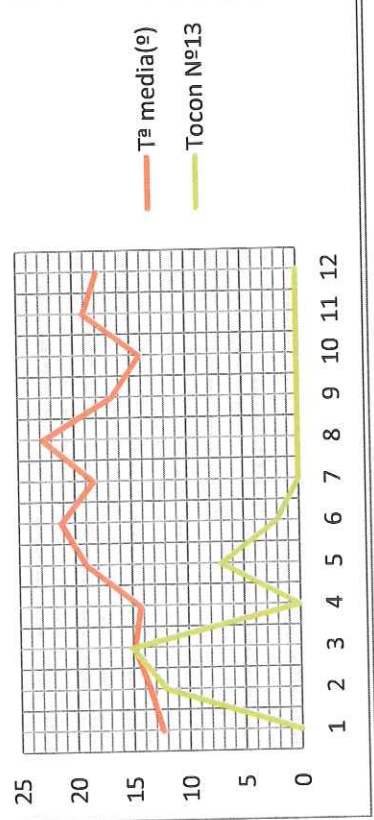
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº10 COM A TEMPERATURA



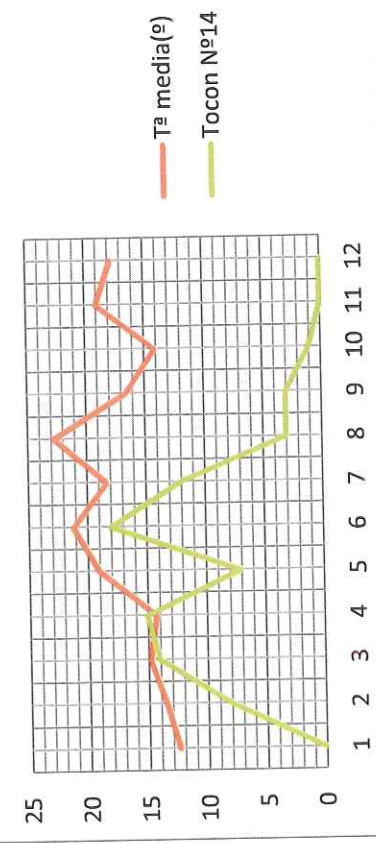
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº12 COM A TEMPERATURA



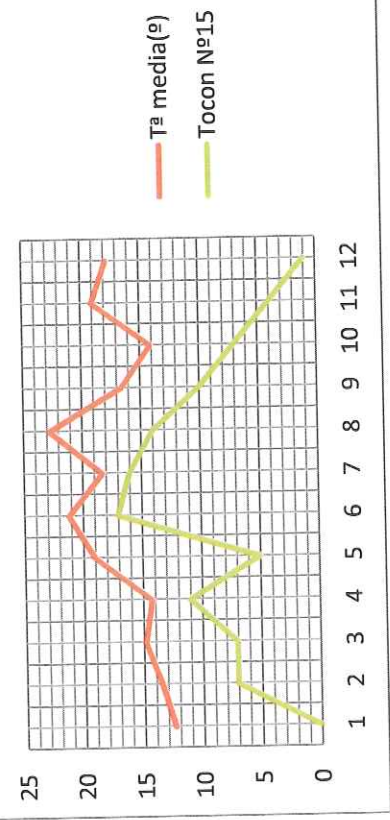
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº13 COM A TEMPERATURA



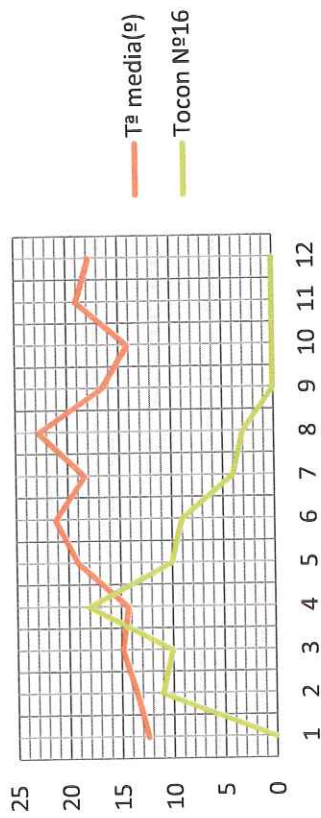
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº14 COM A TEMPERATURA



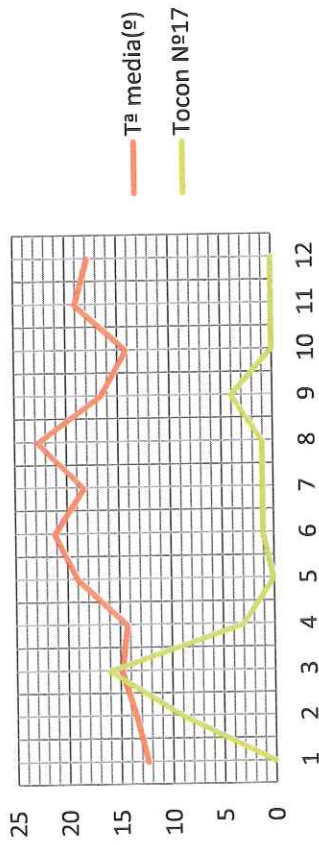
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº15 COM A TEMPERATURA



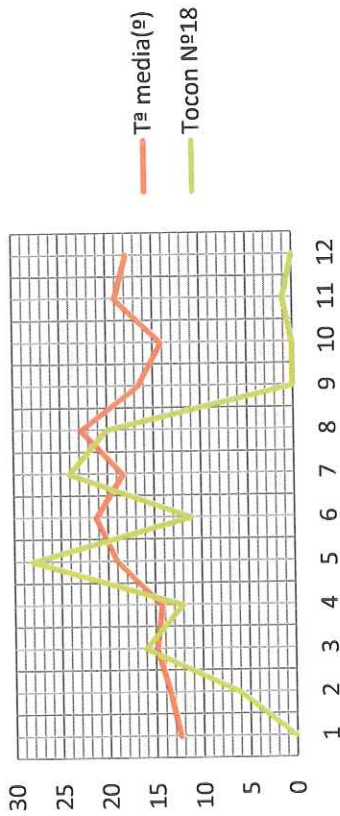
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº16 COM A TEMPERATURA



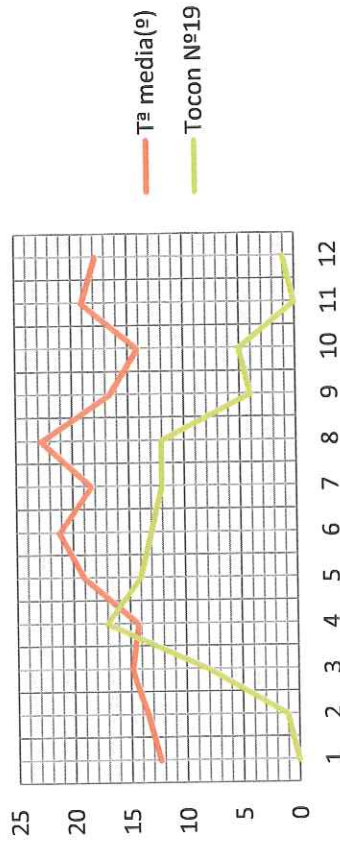
VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº17 COM A TEMPERATURA



VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº18 COM A TEMPERATURA



VARIAÇÃO CURVA DO TORO Nº19 COM A TEMPERATURA



## Anexo 2.-Estação meteorologica mes de Março

ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DA ESAC

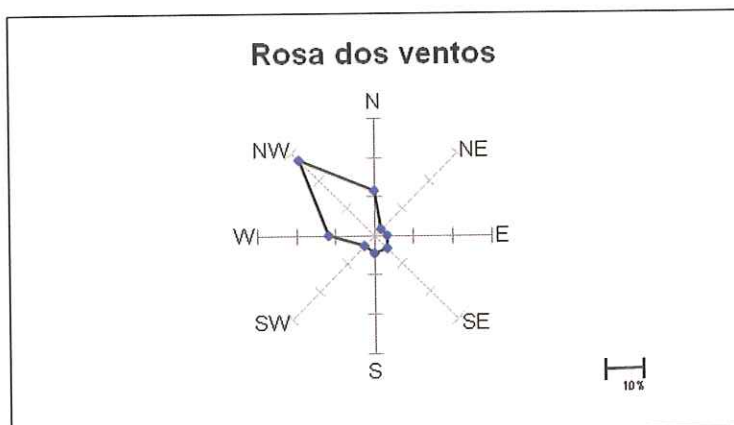
MÊS: Março

ANO 2012

DIA	TEMPERATURA				HUMIDADE RELATIVA (%)	RADIÇÃO SOLAR GLOBAL (MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	Vento		PLUVIOSIDADE (mm)	ETo (mm)
	média (°)	máxima (°)	mínima (°)	min_relva (°)			Velocidade media (km/h)	DIRECÇÃO		
1	12,3	16,7	8,3	9,6	76,5	15,2	6,0	S	0,6	2,6
2	13,4	16,0	12,1	11,2	83,1	5,7	6,2	S	27,2	1,5
3	14,9	18,2	11,3	12,2	80,4	14,5	7,1	S	9,6	2,6
4	14,8	18,0	12,2	12,6	78,3	20,6	7,9	S	6,8	3,2
5	14,8	18,5	11,6	13,1	80,3	21,0	4,3	NW	0,4	3,3
6	14,2	19,3	10,2	11,7	80,2	23,7	4,1	W	0,0	3,6
7	15,3	19,1	10,9	12,3	86,8	11,1	6,9	S	9,4	2,1
8	19,0	23,5	16,6	16,8	84,4	22,7	5,8	W	14,6	4,0
9	19,8	28,5	13,7	14,7	76,1	28,9	4,0	S	0,0	5,3
10	21,1	30,5	12,8	14,3	73,1	29,6	2,3	NW	0,0	5,2
11	20,8	30,2	14,9	16,7	73,9	18,7	2,0	N	0,0	3,7
12	22,1	30,8	14,7	15,6	71,6	21,8	1,7	NW	0,0	4,1
13	19,7	28,0	13,1	14,8	78,9	21,3	2,3	NW	0,0	3,9
14	18,3	24,1	14,2	15,8	83,7	27,6	3,8	NW	0,0	4,5
15	20,8	29,5	15,4	17,5	70,8	31,1	2,8	N	0,0	5,5
16	22,7	34,9	13,4	15,2	59,4	30,9	3,4	SE	0,0	6,1
17	18,8	23,5	14,7	16,6	75,5	26,6	4,9	NW	0,0	4,5
18	16,6	21,5	11,3	14,2	77,6	16,9	3,3	NW	0,0	3,0
19	14,5	18,5	12,2	15,8	79,4	21,1	4,3	NW	1,8	3,4
20	12,4	15,7	9,5	13,5	83,0	18,4	3,7	NW	6,2	2,7
21	14,1	18,9	9,3	12,6	80,0	17,1	3,2	NW	0,2	2,8
22	17,9	24,0	13,6	16,0	76,7	30,9	3,2	NW	0,0	4,9
23	19,0	29,4	10,3	13,4	74,8	32,7	2,4	NW	0,0	5,4
24	20,2	30,1	11,7	14,5	75,4	32,0	3,0	NW	0,0	5,5
25	17,7	22,5	15,2	17,3	76,4	25,6	4,6	W	0,0	4,3
26	15,9	21,2	10,8	13,9	75,1	24,0	3,8	NW	0,0	3,9
27	16,5	22,5	9,7	13,0	74,5	24,9	2,9	NW	0,0	4,0
28	17,1	25,1	9,3	12,3	73,4	32,5	3,1	NW	0,0	5,1
29	17,5	24,9	9,7	12,0	75,0	30,1	3,3	NW	0,0	4,8
30	20,0	25,4	15,7	15,2	73,7	32,8	4,1	N	0,0	5,5
31	23,1	37,3	11,9	10,8	66,5	29,9	1,1	N	0,0	5,3
<b>MÉDIA</b>	<b>17,6</b>	<b>24,1</b>	<b>12,3</b>	<b>14,0</b>	<b>76,6</b>	<b>23,9</b>	<b>3,9</b>	<b>NW</b>	<b>76,8</b>	<b>126,1</b>
<b>Max.ABS.</b>	<b>23,1</b>	<b>37,3</b>	<b>16,6</b>	<b>17,5</b>	<b>86,8</b>	<b>32,8</b>	<b>7,9</b>		<b>27,2</b>	<b>6,1</b>
<b>Min.ABS.</b>	<b>12,3</b>	<b>16,7</b>	<b>8,3</b>	<b>9,6</b>	<b>59,4</b>	<b>5,7</b>	<b>1,1</b>			<b>1,5</b>

ROSA DE VENTOS

CALMA  
(%) = 35,5





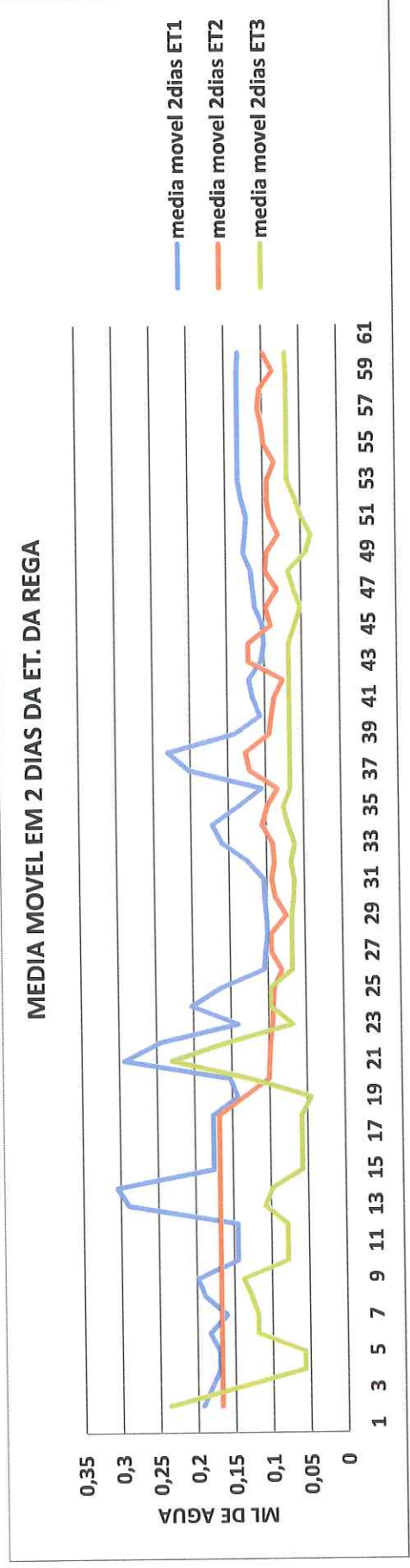
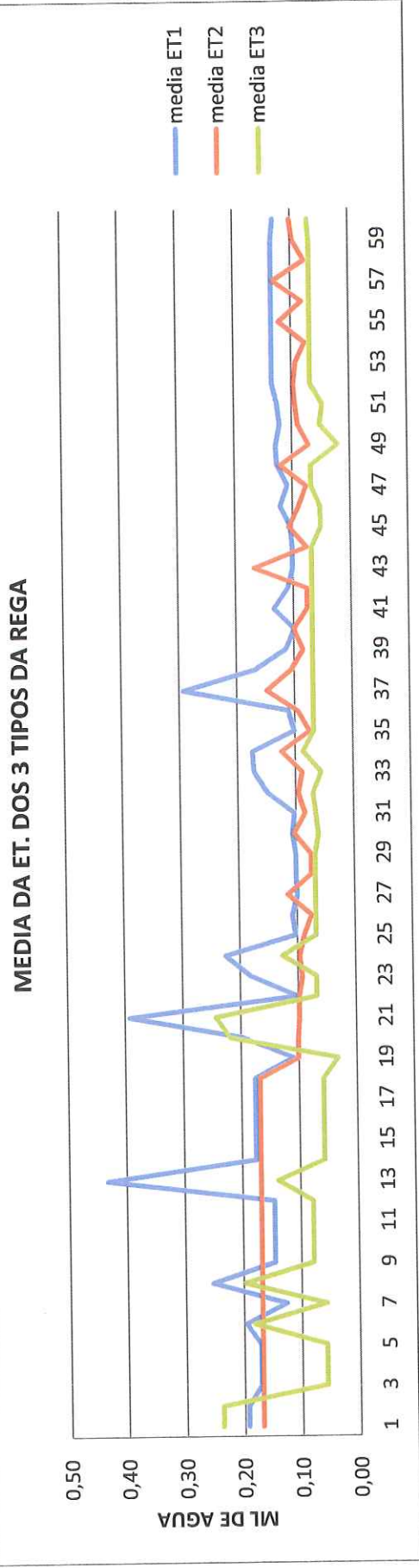


















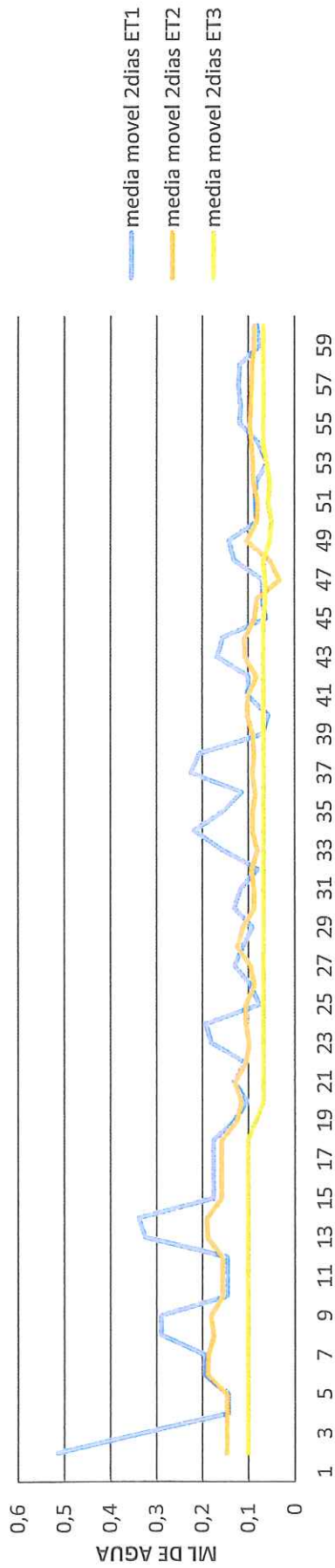


	ET1	ET2	ET3	ET4	media ET1	media movel 2dias ET1	media movel 3dias ET1	ET	ET	ET	ET	media ET2	media movel 2dias ET2	media movel 3dias ET2	ET	ET	ET	media ET3	media movel 2dias ET3	media movel 3dias ET3
30/03/2012	0,20	0,90	0,76	0,20	0,51			0,10	0,17	0,14	0,17	0,15			0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
31/03/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,51	0,51		0,10	0,17	0,14	0,17	0,15	0,15		0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
01/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,14	0,33	0,39	0,10	0,17	0,14	0,17	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
02/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,14	0,14	0,27	0,10	0,17	0,14	0,17	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
03/04/2012	0,20	0,30	0,28	0,20	0,14	0,14	0,14	0,32	0,17	0,27	0,17	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
04/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,24	0,19	0,18	0,07	0,17	0,17	0,17	0,23	0,19	0,17	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
05/04/2012	0,20	1,10	0,23	0,20	0,14	0,19	0,18	0,32	0,17	0,17	0,17	0,14	0,19	0,17	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
06/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,43	0,29	0,27	0,12	0,17	0,17	0,17	0,20	0,17	0,19	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
07/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,15	0,29	0,24	0,12	0,17	0,17	0,17	0,15	0,18	0,17	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
08/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,15	0,15	0,24	0,12	0,17	0,17	0,17	0,15	0,15	0,17	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
09/04/2012	0,20	0,00	0,18	0,20	0,15	0,15	0,15	0,38	0,17	0,17	0,17	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
10/04/2012	0,20	1,32	0,28	0,20	0,15	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,17	0,15	0,15	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
11/04/2012	0,20	0,12	0,18	0,20	0,50	0,32	0,26	0,13	0,17	0,17	0,17	0,22	0,19	0,18	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
12/04/2012	0,20	0,12	0,18	0,20	0,18	0,34	0,27	0,13	0,17	0,17	0,17	0,16	0,19	0,18	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
13/04/2012	0,20	0,12	0,18	0,20	0,18	0,18	0,28	0,13	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
14/04/2012	0,20	0,12	0,18	0,20	0,18	0,18	0,18	0,13	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
15/04/2012	0,20	0,12	0,18	0,20	0,18	0,18	0,18	0,13	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
16/04/2012	0,13	0,05	0,01	0,13	0,18	0,18	0,18	0,06	0,10	0,10	0,10	0,16	0,16	0,16	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
17/04/2012	0,13	0,15	0,07	0,13	0,08	0,13	0,14	0,25	0,10	0,10	0,10	0,09	0,12	0,14	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
18/04/2012	0,13	0,25	0,03	0,13	0,12	0,10	0,13	0,18	0,10	0,10	0,10	0,14	0,11	0,13	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
19/04/2012	0,13	0,00	0,03	0,13	0,14	0,13	0,11	0,06	0,10	0,10	0,10	0,12	0,13	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
20/04/2012	0,13	0,48	0,39	0,13	0,07	0,11	0,11	0,14	0,08	0,10	0,10	0,09	0,11	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
21/04/2012	0,00	0,24	0,15	0,00	0,28	0,18	0,17	0,13	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
22/04/2012	0,00	0,10	0,11	0,00	0,10	0,19	0,15	0,11	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
23/04/2012	0,13	0,00	0,27	0,13	0,05	0,08	0,15	0,02	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07

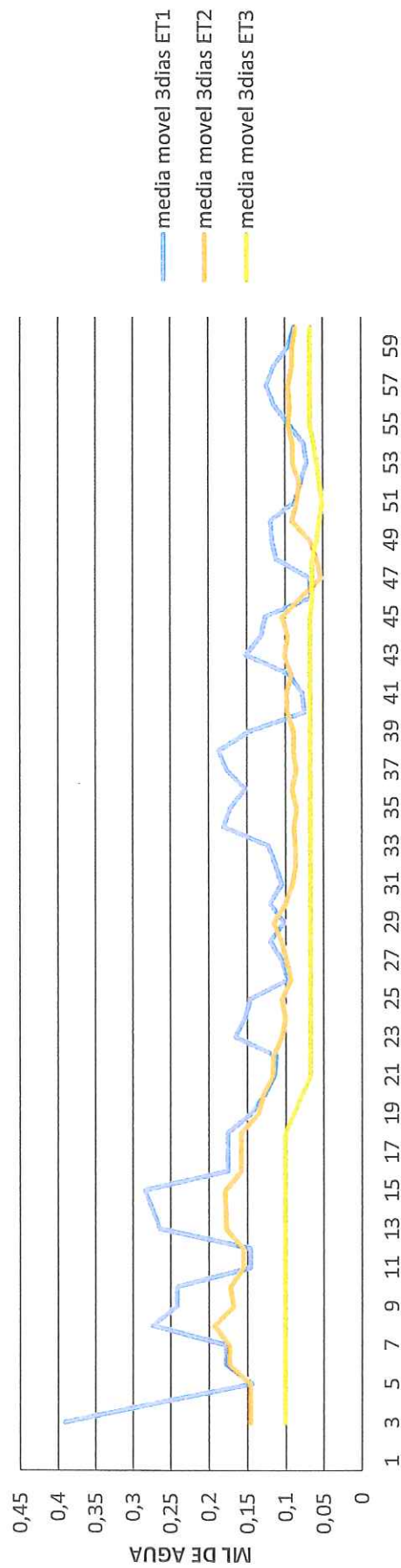




### MEDIA MOVEL 2 DIAS DA ET. DA REGA



### MEDIA MOVEL 3 DIAS DA ET. DA REGA



#### Anexo 4.-Bioimpedancia

##### Análise de Resultados – Comparação entre pinheiros sãos e pinheiros inoculados com nemátodes e escolitídeos

Aquisições Realizadas nos dias 6 e 11 de Junho de 2012

O perfil de bioimpedância de cada indivíduo foi analisado. De entre as várias representações possíveis foram escolhidas as seguintes por evidenciarem melhor os aspectos a estudar.

Os gráficos abaixo são uma representação do quociente de impedância 1kHz/50kHz, descrito na literatura como um dos parâmetros de impedância mais relevantes em estudos e aplicações biológicas. Cada ponto, no gráfico, é respeitante a um indivíduo.

- O perfil de distribuição para este parâmetro, respeitante a indivíduos saudáveis, ocorre numa região do gráfico onde os valores de reactância são reduzidos. Na mesma região, praticamente sobrepostos, distribuem-se os valores referentes a indivíduos inoculados com escolitídeos. Desta forma, há a inferir que esta inoculação pode não interferir a nível da estrutura interna dos pinheiros ou, pelo menos, não interfere ao nível do stress hídrico das árvores. Por outro lado, os pinheiros inoculados com nemátodes, os pinheiros inoculados com nemátodes 1 mês mais tarde e os pinheiros inoculados simultaneamente com nemátodes e escolitídeos, sobrepõem-se na mesma região do gráfico, diferente da primeira. Os pinheiros inoculados apresentam uma maior reactância relativamente aos saudáveis. A dispersão verificada nestes pode estar relacionada com a quantidade de nemátodes ou com o nível de stress hídrico. Em relação aos pinheiros dados como mortos, apenas um está de facto morto, apresentando elevados valores de resistência. O restante possui ainda valores de impedância semelhantes a um pinheiro saudável.(Fig.1)

Aquisição realizada a 06-06-2012

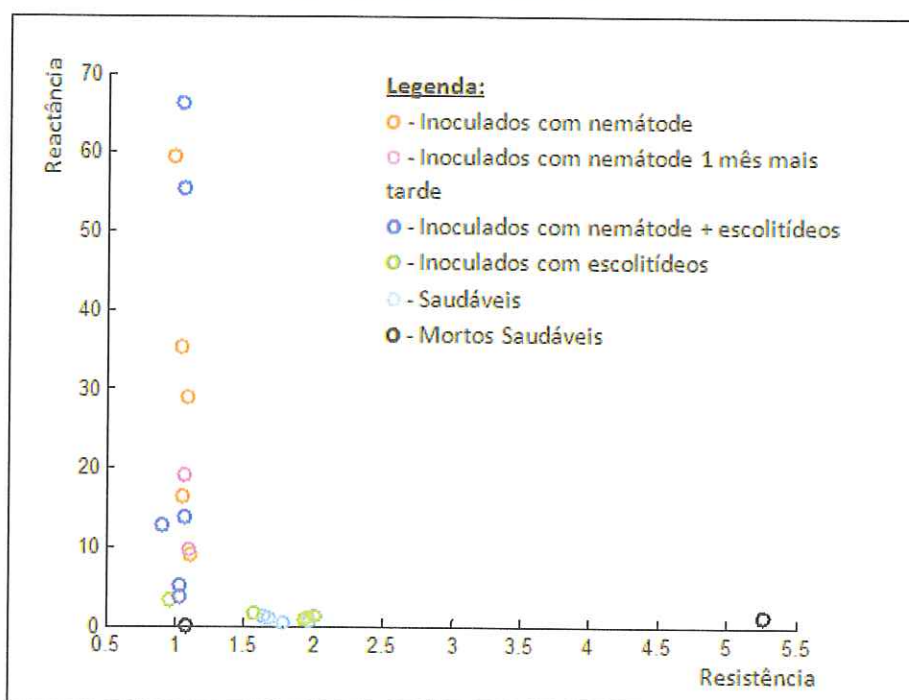


Figura 1. Quociente de impedância 1kHz/50kHz para todos os pinheiros em estudo.

- O perfil de distribuição para este parâmetro, respeitante a indivíduos saudáveis, ocorre numa região do gráfico onde os valores de reactância são reduzidos. Na mesma região, praticamente sobrepostos, distribuem-se os valores referentes a indivíduos inoculados com escolitídeos. Desta forma, há a inferir que esta inoculação pode não interferir a nível da estrutura interna dos pinheiros ou, pelo menos, não interfere ao nível do stress hídrico das árvores. Por outro lado, os pinheiros inoculados com nemátodes, os pinheiros inoculados com nemátodes 1 mês mais tarde e os pinheiros inoculados simultaneamente com nemátodes e escolitídeos, sobrepõem-se na mesma região do gráfico, diferente da primeira. Os pinheiros inoculados apresentam uma maior reactância relativamente aos saudáveis. A dispersão verificada nestes pode estar relacionada com a quantidade de nemátodes ou com o nível de stress hídrico. Em relação aos pinheiros dados como mortos, apenas um está de facto morto, apresentando elevados valores de resistência. O restante possui ainda valores de impedância semelhantes a um pinheiro saudável.

Aquisição realizada a 11-06-2012

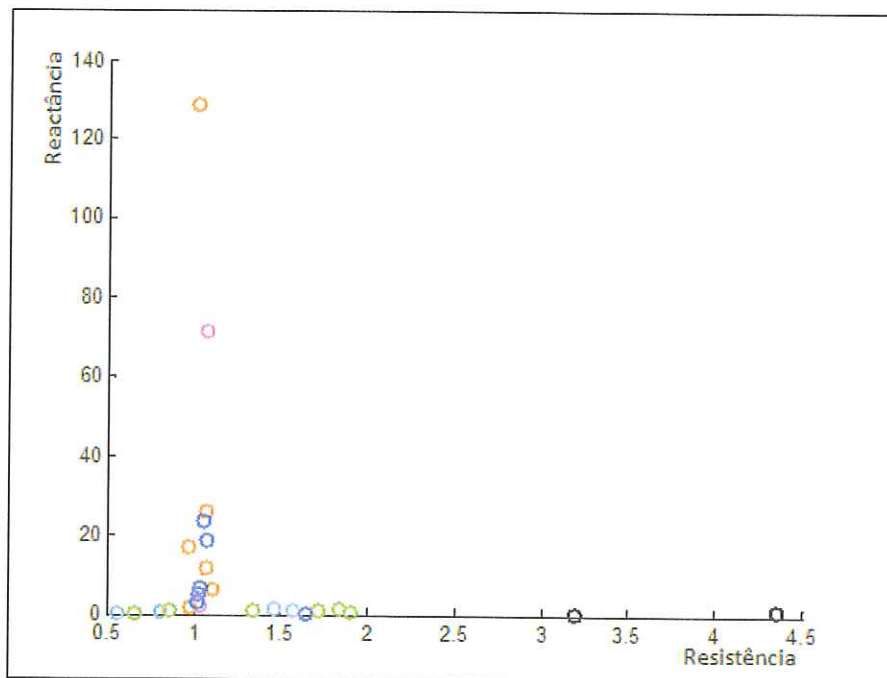


Figura 2. Quociente de impedância 1kHz/50kHz para todos os pinheiros em estudo.

## NOTAS

1. Ambos os gráficos expressam a mesma relação para os mesmos indivíduos. Contudo, verifica-se que no dia 11 ocorre uma maior dispersão em termos de resistência, relativamente aos indivíduos saudáveis e inoculados com escolitídeos. Para além disso, os indivíduos inoculados com nemátodes e também os indivíduos inoculados com nemátodes e escolitídeos, apresentam valores que se concentra mais no gráfico, não apresentando tanta dispersão em termos de reactância como se verificou no dia 6.

A explicação para a variação de comportamento pode acentar na variação de impedância de um indivíduo ao longo do dia, que, como já é sabido de estudos

prévios, está dependente da temperatura, humidade relativa e luminosidade. Para confirmar esta observação e perceber o comportamento diário de variação de impedância de um indivíduo, estão actualmente a decorrer monitorizações a dois indivíduos saudáveis que foram inoculados com nemátodes.

Contudo, apesar da variação verificada, as observações e conclusões tiradas em ambas as figuras mantêm-se válidas: é possível discriminar entre indivíduos sãos e indivíduos inoculados com nemátode.

2. Não se verificou relação com o nível de stress hídrico. Talvez, tendo em conta que se trata de uma espécie resistente, a variação de stress hídrico induzida é pouco relevante. Desta forma, as dispersões existentes podem dever-se à quantidade de nemátodes em cada indivíduo, ou simplesmente a oscilações diárias de impedância.

### Anexo fotografic I.-Fotos inoculações nematodes





## Anexo fotografic II.-Fotos efeitos das doenças



### Anexo fotografic III.-Fotos bioimpedância e solta de escolítidos



