



# O NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO: NOVAS ABORDAGENS DE CONTROLO E MONITORIZAÇÃO

O nemátode da madeira do pinheiro é a maior ameaça para os povoamentos de pinheiro-bravo em Portugal. A investigação no INIAV aposta no desenvolvimento de novas estratégias de monitorização e biopesticidas para a sua contenção. O recurso a compostos naturais e a organismos antagonistas é o alvo de estudo de vários projetos de investigação no INIAV, por poder vir a ser uma estratégia de luta inovadora e um importante contributo nos atuais meios de controlo deste organismo.

Jorge M.S. Faria<sup>1</sup>, Tomás Cavaco<sup>1</sup>, João C. Nunes<sup>1</sup>, Diogo Gonçalves<sup>1</sup>, Cláudia S.L. Vicente<sup>2,1</sup>, David Pires<sup>1</sup>, Luís Bonifácio<sup>1,3</sup>, Maria Lurdes Inácio<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



<sup>2</sup> MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora



<sup>3</sup> GREEN-IT Bioresources for Sustainability, ITQB NOVA, Oeiras



O nemátode da madeira do pinheiro (NMP) é um animal microscópico, vermiforme, cujo nome científico é *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1981, e que causa a doença da murchidão do pinheiro (DMP). Os nemátodes são um grupo de animais extremamente abundantes, dispersos por quase todos os habitats do planeta, existindo nemátodes de vida livre, parasitas de animais e de plantas. O NMP pertence ao grupo de nemátodes fitoparasitas, podendo alimentar-se de fungos (micetófago) e de tecidos vegetais vivos (fitófago), essencialmente de espécies do género *Pinus*, os pinheiros.

Em Portugal, o NMP é uma espécie invasora, não havendo registo da sua presença antes da deteção na Marateca (Setúbal), em 1999 (Mota *et al.*, 1999). A via de entrada mais provável terá sido pela importação de materiais embalados em madeira infetada não tratada (paletes, caixas, etc.), de origem asiática, zona onde este organismo causava já então elevada mortalidade de pinheiros. Com efeito, a DMP foi detetada pela primeira vez no Japão no início do séc. XX, mas só na década de 1970 foi associada a elevados efetivos populacionais do NMP no lenho dos pinheiros afetados. Em poucas décadas, o NMP dispersou-se pelos países adjacentes – China, Coreia do Sul e Taiwan. O NMP é originário da América do Norte, onde não afeta os pinheiros autóctones. No entanto, em espécies de *Pinus* exóticas pode causar sintomas da DMP, como o amarelecimento e murchidão das agulhas, levando em muitos casos à sua morte. A sua deteção em Portugal marcou a entrada deste organismo de quarentena no continente europeu e, por consequência, à adoção de fortes medidas de regulamentação e monitorização de entrada de material de madeira no país e estritas imposições na exportação desta matéria-prima (Figura 1).

Os laboratórios de Nematologia e Entomologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) acompanharam este problema fitossanitário desde a sua identificação no país, quer por intensos esforços de monitorização da doença, recolhendo e/ou processando uma quantidade crescente de amostras de material sinalizado, quer



pelo contributo no desenvolvimento de políticas e regulamentos que visam a contenção da doença ou ainda na realização de bioensaios em laboratório e no campo de novos fitofármacos para o controlo químico do NMP, como o nematocida de prevenção Pursue® (Syngenta) ou o fumigante ProFume® (Douglas Products), incluído nas normas mundiais ISPM para tratamento de madeira destinada a embalagem (Bonifácio *et al.*, 2014).

### Medidas de controlo

O controlo da DMP pode ser alcançado de várias formas. Por um lado, investindo no melhoramento do pinheiro-bravo, pela despistagem de fatores de resistência em linhas genéticas de árvores que não

evidenciam sintomas em locais com forte incidência da DMP. Esta linha de investigação decorre já há alguns anos no INIAV, em colaboração com outras instituições nacionais e internacionais. No entanto, esta estratégia será apenas bem-sucedida a longo prazo, pelas características do programa de melhoramento clássico e porque envolverá fortes alterações à gestão florestal atual. As estratégias de controlo mais imediato recorrem à eliminação do NMP ou do seu inseto-vetor, o longicórnio do pinheiro (*Monochamus galloprovincialis*), pela erradicação de árvores sintomáticas e/ou de madeira infetada, e à forte regulamentação do movimento de madeira no país e para fora do país. Após a identificação de um foco de infeção, é esta-



**Figura 1** – Pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) com e sem a sintomatologia característica da doença da murchidão do pinheiro (DMP) (A), abate de árvores doentes (B) e recolha de material para análises laboratoriais (C).

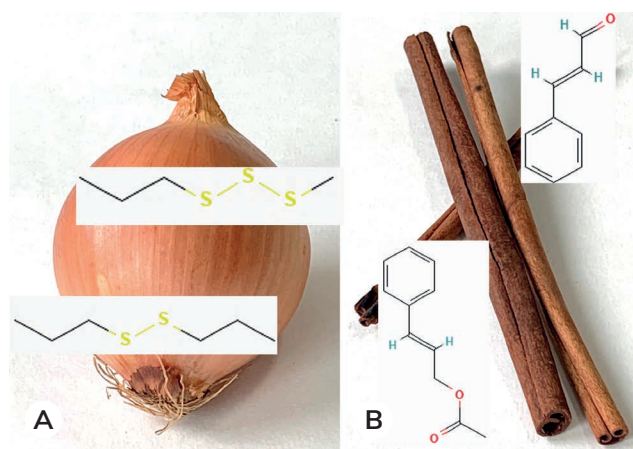


belecionada uma zona de intervenção onde são eliminadas árvores mortas ou com sintomas de declínio, numa tentativa de reduzir a sua dispersão. Os pinheiros afetados, com deteção positiva para o NMP, são imediatamente eliminados, sendo qualquer material de madeira estilhaçado a dimensões inferiores a 3 cm, enterrado ou queimado, para eliminar o NMP e as larvas do inseto-vetor. Toda a madeira para fins comerciais ou de exportação tem de passar por um processo de descontaminação por fumigação com ProFume® ou tratamento térmico, a temperaturas de 56 °C no interior da madeira, durante meia hora. De modo complementar, são usadas armadilhas com um conjunto de compostos químicos atrativos, entre os quais a feromona específica do longicórneo, para reduzir as suas populações em zonas críticas. Em áreas habitacionais, em parques ou em árvores com elevado valor social ou cultural pode recorrer-se à injeção de Pursue® no tronco. Esta técnica é aplicada em pinheiros saudáveis e permite uma eficiente proteção contra infeções por NMP durante cerca de quatro anos. Adicionalmente, tem menores impactos ecológicos quando comparado com a aplicação de inseticidas e as suas consequências ambientais.

### Novos potenciais biopesticidas

Nos últimos anos, os esforços de investigação direcionam-se no sentido das alternativas mais sustentáveis baseadas em produtos naturais e/ou agentes biológicos. No caso do desenvolvimento de nematocidas bioquímicos, os óleos essenciais e os seus voláteis ativos têm demonstrado atividades biológicas consideráveis contra o NMP, por vezes suplantando a atividade nematocida dos seus equivalentes comerciais de uso corrente, químicos de síntese. Os óleos essenciais são misturas complexas de produtos naturais obtidos de plantas, fundamentalmente por hidrodestilação. Os voláteis que os constituem podem pertencer ao grupo dos terpenos, principalmente mono-, sesqui-, e alguns diterpenos, e ao grupo dos fenóis, nomeadamente fenilpropanóides, embora possam ocorrer compostos de outros grupos em elevadas

proporções. Até ao momento, os óleos essenciais que demonstraram maior atividade contra o NMP foram extraídos de plantas de uso comum, como a cebola, *Allium cepa*, muito rico em sulfuretos, compostos com enxofre (S), na sua composição, ou a canela, *Cinnamomum verum*, óleo muito rico em fenilpropanóides, compostos com oxigénio (O) na sua composição (Figura 2). Considerando o grupo dos óleos essenciais mais ativos contra o NMP, a presença de compostos com elementos eletronegativos, como S ou O, parece ser uma propriedade transversal. Quando testados isoladamente, estes compostos parecem ser os responsáveis pelas propriedades nematocidas dos óleos essenciais (Faria *et al.*, 2021).



**Figura 2** – Exemplo de compostos nos óleos essenciais de cebola (*Allium cepa*) (A) e de canela (*Cinnamomum verum*) (B), com elevada atividade contra o nemátode da madeira do pinheiro.

O projeto NemAct, em curso no INIAV, pretende aprofundar a relação estrutura-atividade de um grupo particular de compostos com O, os compostos alifáticos oxigenados, voláteis que muitas vezes ocorrem nos óleos essenciais (Cavaco *et al.*, 2022). Estes compostos parecem ser responsáveis por um mecanismo de ação característico, através do qual a atividade contra o NMP está diretamente relacionada com o tamanho da cadeia de carbonos que os constituem. O sucesso deste projeto pode direcionar-nos na identificação de um bionematocida de ação rápida com baixo impacto ambiental.

Os bionematocidas microbiológicos focam-se na atividade biológica de organismos antagonistas. A despistagem de organismos antagonistas contra o NMP envolve fundamentalmente a utilização de bactérias ou fungos. No caso das bactérias, os géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Pantoea* são indicados como potenciais agentes nematocidas contra os nemátodes fitoparasitas, pela produção direta e indireta de compostos nematotóxicos. Em parceria com investigadores da Universidade de Salamanca, foram testados cerca de 15 isolados de bactérias do solo com ação validada como promotores de crescimento de plantas, dos quais um isolado de *Phyllobacterium* induziu 89% de mortalidade no NMP, após 48 h de contacto (Vicente *et al.*, 2022). Dos antagonistas fúngicos, destacam-se as espécies do género *Esteya*, que demonstram atividade contra o NMP. Estes fungos estão descritos como produtores de voláteis que simulam os emitidos por pinheiros suscetíveis, atraindo o NMP. Uma vez em contacto com o hospedeiro, o fungo liberta esporos que aderem à superfície do nemátode e rapidamente germinam para o seu interior, matando-o. Estes antagonistas estão já a ser aplicados no campo com sucesso, em florestas experimentais de áreas protegidas da Coreia do Sul (Pires *et al.*, 2022).

Em colaboração com entidades florestais e empresas de biopesticidas coreanas e alemãs, o INIAV tem em curso o projeto PineProtect que incide na prospeção de espécies de *Esteya* nacionais e na determinação do seu modo de ação específico, visando a aplicação deste meio de controlo biológico nas florestas portuguesas.

### **Modernização da monitorização**

No que diz respeito à monitorização do NMP, que inclui não só a despistagem de materiais de madeira que chegam de outros países aos portos nacionais (essencialmente paletes de transporte), e as resultantes dos tratamentos térmicos nas unidades destinadas a esse fim, mas também o acompanhamento dos focos de infeção já estabelecidos e de novos focos nos nossos pinhais, o laboratório de Nematologia do INIAV processa milhares

de amostras (madeira e insetos) por ano. Os nemátodes são extraídos das amostras por imersão em água e recolhidos da suspensão por crivagem para posterior observação à lupa e microscópio, visando a sua identificação através das características morfológicas. Em caso de dúvida, segue-se a confirmação do resultado por biologia molecular (Inácio *et al.*, 2015).

O projeto internacional PURPEST, do qual o INIAV é um de 18 parceiros europeus, propõe um salto revolucionário na forma como é realizada a monitorização de “pestes” agronómicas e florestais. A investigação proposta baseia-se na identificação de uma “impressão digital” volátil da presença de material infetado/infestado pelo NMP com recurso aos mais recentes avanços tecnológicos na construção de um protótipo de sensor de voláteis. A utilização deste novo método tem o potencial de diminuir o tempo de análise de uma amostra para cerca de 30 minutos e pode também ser levada a cabo *in loco* por pessoal não especializado. Esta nova ferramenta de monitorização permitirá processar até cerca de 80% do material que chega aos nossos portos de entrada e despistar eficientemente a presença do NMP. O sistema sensor pode vir a ser adotado pelos estados-membros europeus e, desta forma, prevenir o livre-trânsito e entrada de graves pragas e doenças agronómicas e florestais dos países afetados para os isentos.

### **Nota conclusiva**

O problema do NMP está longe de estar resolvido. Em Portugal, a DMP persiste e sucedem-se novos focos de infeção, assim como em Espanha, de difícil controlo, e que são preocupantes vias de dispersão deste parasita para as florestas de coníferas europeias. A investigação realizada pelo INIAV, alicerçada na sua colaboração com instituições académicas nacionais, e as suas parcerias com importantes instituições de investigação europeias, norte-americanas e asiáticas, visa traçar um caminho mais rápido em direção a uma resolução ou mitigação deste problema. Nos anos vindouros, este percurso deve passar pela introdução de inovação, pela eficiente monitorização do NMP e por um controlo

mais sustentável da doença, baseado em biopesticidas e organismos antagonistas com impactos ecológicos mais reduzidos. 🌱

### Agradecimentos

Os autores desejam agradecer a Ana Margarida Fontes, Nídia Laureano e Marina Cardoso pela sua assistência técnica. Esta investigação foi parcialmente financiada pelos projetos NemaACT (2022.00359.CEECIND) e Pine-Protect (2021.08030.BD), através de fundos da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT/MCTES), e pelo projeto PURPEST (Grant agreement ID: 101060634) financiado pela Comissão Europeia.

### Bibliografia

- Bonifácio, L.F. et al. (2014). Efficacy of sulfurlyl fluoride against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchidae), in *Pinus pinaster* boards. *Pest Management Science*, **70**:6–13.
- Cavaco, T. et al. (2022). Nematicidal activity of oxygen-containing aliphatic compounds on *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus*. *Chem. Proc.*, **12**:55.
- Faria, J.M.S. et al. (2021). Phytochemicals as biopesticides against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*: A review on essential oils and their volatiles. *Plants*, **10**(12):2614.
- Inácio, M.L. et al. (2015). First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *For. Path.*, **45**(3):235–238.
- Mota, M. et al. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**(7):727–734.
- Pires, D. et al. (2022). Pinhal sustentável: O combate ao nemátode da madeira do pinheiro com fungos antagonistas. *Vida Rural*, **1877**:72–77.
- Vicente, C.S.L. et al. (2022). Exploring soil plant growth promoting rhizobacteria potential to control plant-parasitic nematodes: the case of *Phyllobacterium* and *Paenibacillus* against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BeMiPlant – Beneficial Plant-Microbe Interactions*, 17-19 outubro, Oeiras, pp 46.

# VIDA RURAL

by ABILWAYS  
PORTUGAL



## VAMOS PUXAR PELO ORGULHO DOS AGRICULTORES?

#AGRICULTARCOMORGULHO

SIGA-NOS

