

**Crescimento do sobreiro e pinheiro manso inoculados com
Phytophthora cinnamomi: estudo em vaso combinando
misturas intraespecíficas e interespecíficas**

Joana de Carvalho Martins

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais

Orientadores: Alexandra Cristina Pires Correia

Maria Helena Neves Machado

Júri:

Presidente: Doutora Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira, Professora auxiliar,
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Teresa Moreira Valdivieso Spínola, Investigadora Auxiliar,
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Doutora Alexandra Cristina Pires Correia, Investigadora, Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Esta tese foi parcialmente financiada por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto PCIF/MOS/0012/2019 - CORKNUT Florestas mistas de sobreiro e pinheiro manso: gestão para valorização dos produtos, promoção da biodiversidade e prevenção de fogos florestais.

Resumo

O sobreiro (*Quercus suber*) é, em Portugal, uma árvore de importante valor económico, social e ambiental, surgindo frequentemente em sistemas mistos com pinheiro manso (*Pinus pinea*) nas regiões sul de Portugal. Tem-se verificado o declínio acentuado dos sobreiros, sendo o oomiceta *Phytophthora cinnamomi*, aliado a má gestão e às alterações climáticas, uma das causas apontadas.

Este trabalho teve como objetivo estudar as interações ecológicas entre o sobreiro e o pinheiro manso quando infetados por *P. cinnamomi*. Questionamos se os sobreiros infetados seriam mais afetados por *P. cinnamomi* em combinação intraespecífica, em combinação interespecífica ou crescendo isolados. Foi realizado um ensaio experimental em vaso durante 18 meses com dois tratamentos e cinco combinações das duas espécies. Também construímos um modelo para avaliar indiretamente a área foliar de plantas jovens usando fotografias de perfil simples.

Não foram encontrados sintomas ou mortes associadas à infeção das plantas por *P. cinnamomi*. Porém, as plantas inoculadas apresentaram maior biomassa de raiz total, maior biomassa de raízes finas e maior número de ramificações em comparação às plantas controlo, embora estas diferenças não tenham sido significativas. Provavelmente ocorreu infeção, mas as condições ambientais ótimas de crescimento permitiram que as plantas recuperassem. Além do estudo de inoculação, comprovamos o forte impacto das misturas de espécies na repartição de biomassa entre as partes aérea e radicular. Ambas as espécies preferem crescer isoladas. Porém, o sobreiro tende a competir fortemente com indivíduos da mesma espécie sendo expressivamente dominado pelo pinheiro muito provavelmente devido à competição pela luz. Os sobreiros crescendo com pinheiros mansos apresentaram, no entanto, um rácio raiz/parte aérea significativamente superior, indicando que provavelmente teriam um melhor desempenho no campo em condições de seca.

Requerem-se mais estudos relacionados com a mistura destas espécies, com *P. cinnamomi*, combinando também stress hídrico. Assim, apresentamos recomendações para melhor implementar e monitorizar futuros trabalhos.

Palavras-chave: *Quercus suber*; *Pinus pinea*; declínio; agente patogénico; interações ecológicas.

Summary

Cork oak (*Quercus suber*), an important national tree species, frequently appears mixed with stone pine (*Pinus pinea*) in south Portugal regions. Cork oaks dieback and mortality has been reported since the beginning of last century. *Phytophthora cinnamomi*, combined with damaging management practices and climate change, are reported as causes for such phenomenon.

This work aimed to study the ecological interactions between cork oak and stone pine when infected with *P. cinnamomi*. We questioned if infected cork oaks would be more affected by *P. cinnamomi* with the presence of stone pine growing nearby, with siblings or growing isolated. A pot experiment was carried for 18 months with two treatments and five combinations of the two species. We also build a model to assess indirectly the leaf area of small plants using simple profile photographs.

No symptoms or deaths associated to *P. cinnamomi* plant infections were found. However, inoculated plants showed higher total root biomass, greater thin root biomass and greater number of branches than control plants, although these differences were not significant. Plants may have been infected but the optimum environmental growth conditions allowed them to recover. Apart from the inoculation study, we prove the strong impact of species mixture on biomass partitioning between above and belowground parts. Both species prefer to grow isolated. However, cork oak competes severely with siblings and is significantly dominated when growing with stone pine probably due to light competition. Cork oaks growing with stone pines show, nonetheless, a significant higher root/shoot which means they probably would perform better in field under drought stress condition. It is possible to determine accurately the leaf area of plants growing in pots using simple calibrated profile photographs.

Further studies are needed relating *P. cinnamomi* presence combined with drought stress and using these species mixture, so we provide recommendations to improve future works.

Keywords: *Quercus suber*; *Pinus pinea*; dieback; pathogen; ecological interactions.

ÍNDICE

Introdução	10
Distribuição do pinheiro manso e do sobreiro em Portugal em povoamentos puros e mistos dominantes.....	10
Consociação de dois produtos não lenhosos economicamente rentáveis em Portugal: pinha e cortiça.....	12
Características morfológicas do sobreiro e do pinheiro manso.....	13
<i>Phytophthora cinnamomi</i> no sobreiro e pinheiro manso	14
Interações ecológicas entre espécies e impacte na incidência de <i>P. cinnamomi</i>	16
Objetivos do trabalho.....	17
Materiais e métodos	19
Colheita das sementes	19
Tratamento das sementes e pré-germinação	19
Preparação e acondicionamento dos vasos na estufa	20
Delineamento experimental	20
Inoculações dos vasos com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	21
Condições ambientais na estufa	22
Medições não destrutivas das plantas	24
Colheita de fotografias de perfil para determinação da área foliar de forma indireta e avaliação de danos nas raízes	24
Medições destrutivas	25
Análise estatística.....	27
Resultados	28
Avaliação visual de danos e mortalidade das plantas inoculadas ao longo do período experimental	28
Teor de água no solo	28
Crescimento em altura.....	29
Amostragem destrutiva.....	30

Biomassa total	31
Biomassa aérea	31
Biomassa total de folhas	31
Folhas novas	32
Proporção de folhas novas em relação ao total.....	33
Número de ramificações	34
Biomassa radicular	35
Raiz total.....	35
Raiz principal	36
Raízes finas	37
Razão Raízes finas/Raiz principal.....	37
Razão Parte radicular/Parte aérea	38
Modelo para determinação da área foliar baseado em amostras não destrutivas.....	39
Discussão de resultados	42
Que características morfológicas distinguem o sobreiro do pinheiro manso?.....	42
Qual o impacte da fitóftora no crescimento das plantas?	42
Que interações ecológicas predominam entre o sobreiro e o pinheiro manso?.....	44
Maior raiz/parte aérea no sobreiro misturado com o pinheiro manso. Quais as vantagens?	45
Podemos misturar as duas espécies? Sugestão de gestão no terreno	45
Aplicabilidade do método indireto para a medição da área foliar	46
Recomendações para futuros trabalhos	47
Conclusões.....	48
Referências bibliográficas.....	49

Lista de figuras

Figura 1 - Carta de aptidão bioclimática do pinheiro manso (à esquerda) e do sobreiro (à direita) em Portugal. Fonte: EPIC WebGIS Portugal.	10
Figura 2 - Povoamento misto de sobreiro e pinheiro manso localizado numa herdade em Coruche, Santarém.	13
Figura 3 - Ciclo de vida do agente patogénico <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Diagram Professor A Hardham, The Australian National University, Canberra, A.C.T.).	14
Figura 4 - <i>Phlomis purpurea</i> em floração de cor violeta/rosado. Fonte: flora-on.pt	16
Figura 5 - Germinação de semente de sobreiro (à esquerda) e de semente de pinheiro manso (à direita).	19
Figura 6 - Sistema de rega do ensaio na estufa.....	20
Figura 7 - Esquema do delineamento experimental na estufa. A vermelho encontram-se os blocos utilizados como controlo e a amarelo encontram-se os blocos submetidos ao tratamento com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	21
Figura 8 - Temperatura do ar máxima, média e mínima diária medida a 1,5m de altura na estação meteorológica automática Lisboa/Tapada da Ajuda	23
Figura 9 - Teor de água no solo no vaso, em m ³ /m ³	23
Figura 10 - Imagens recolhidas de perfil da parte aérea e radicular.....	24
Figura 11 - Manuseamento de material inoculado com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	26
Figura 12 - Volume de água médio no solo (%) por combinação, em julho de 2019.	28
Figura 13 - – Acréscimo em altura diário (em cm) do sobreiro e do pinheiro manso, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	29
Figura 14 - Altura média dos pinheiros mansos e dos sobreiros nas várias combinações.	30
Figura 15 - Biomassa média total (em gramas) dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	31
Figura 16 - Peso seco médio das folhas totais dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	32
Figura 17 - Peso seco médio das folhas novas dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	33
Figura 18 - Média da razão entre o peso seco das folhas novas e o peso seco das folhas totais dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	33
Figura 19 - Número de ramificações dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	34

Figura 20 - Peso seco médio da raiz total dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	35
Figura 21 - Peso seco médio da raiz principal dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	36
Figura 22 - Peso seco médio das raízes finas dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	37
Figura 23 - Média da razão entre o peso seco das raízes finas e o peso seco da raiz principal dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	38
Figura 24 - Média da razão entre o peso seco da parte radicular e a parte aérea dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	39
Figura 25 - Gráfico de dispersão entre área foliar obtida por amostragem destrutiva e área foliar obtida com as fotografias de perfil + <i>software</i> WINSCANOPY (método indireto), no pinheiro manso.	40
Figura 26 - Gráfico de dispersão entre área foliar obtida por amostragem destrutiva e área foliar obtida com as fotografias de perfil + <i>software</i> WINSCANOPY (método indireto), no sobreiro.	41
Figura 27 - Média da área foliar total dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem <i>P. cinnamomi</i>	41

Lista de tabelas

Tabela 1 – Área total floresal. Adaptado do INF 6 – ICNF 2019.	11
Tabela 2 - Áreas por espécie segundo a composição. Adaptado do INF 6 – ICNF 2019.	11

Introdução

DISTRIBUIÇÃO DO PINHEIRO MANSO E DO SOBREIRO EM PORTUGAL EM POVOAMENTOS PUROS E MISTOS DOMINANTES

A distribuição geográfica do pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) ocorre maioritariamente na zona sul do país, nomeadamente na península de Setúbal, Vale do Tejo e no interior do Baixo Alentejo e do Algarve (Silvestres, 2016). A área de sobreiro (*Quercus suber* L.), ainda que com uma distribuição mais alargada em território continental do que a de pinheiro manso, ocorre também a sul do Tejo sobretudo no litoral. As duas espécies partilham as mesmas regiões ecológicas e com frequência surgem em sistema mistos, sobretudo por regeneração natural (Figura 1).

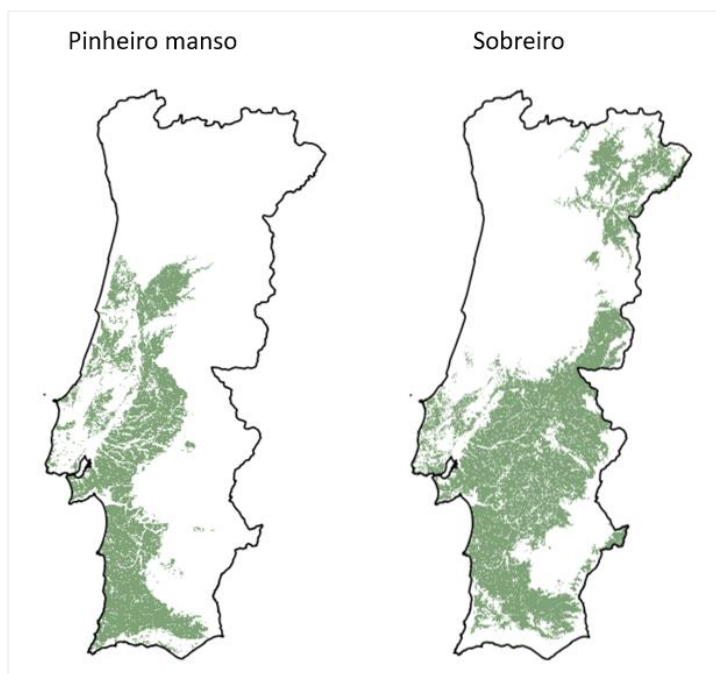


Figura 1 – Carta de aptidão bioclimática do pinheiro manso (à esquerda) e do sobreiro (à direita) em Portugal. Fonte: EPIC WebGIS Portugal (consultado em março de 2021).

Segundo os dados do 6º Inventário Florestal Nacional (IFN 6), onde consta informação das áreas ocupadas por floresta no ano de 2015, a área ocupada pelo sobreiro tem vindo a decrescer nos últimos 20 anos, embora com um ligeiro aumento no último inventário (IFN 6). Em 2015, em Portugal continental, existiam 719,9 mil hectares de povoamentos puros e mistos dominantes de sobreiro (ou seja, 22,3 % do total de povoamentos florestais puros e mistos dominantes no país).

Quanto ao pinheiro manso, a área ocupada tem vindo a aumentar nos últimos 20 anos. Em 2015, em Portugal continental, existiam 193,6 mil hectares de povoamentos puros e mistos

dominantes de pinheiro manso (6% do total de povoamentos florestais puros e mistos dominantes) (ver Tabela 1).

Tabela 1 – Área total florestal. UT – unidade territorial. Δ – variação. Adaptado do INF 6 – ICNF 2019.

Área total florestal							
	1995	2005	2010	2015		Δ [2005-2015]	
	Mil ha	Mil ha	Mil ha	Mil ha	%UT	Erro%	Mil ha
Portugal continental	3305,6	3215,9	3164,2	3224,2	100,0	±0,4	+8,3
Sobreiro	749,8	731,2	717,4	719,9	22,3	±1,1	-11,3
Pinheiro manso	120,2	172,9	184,6	193,6	6,0	±2,2	+20,7

De acordo com os dados do inventário florestal, em 2015 existiam 47 mil hectares de povoamentos mistos dominantes de sobreiro e 38,5 mil hectares de mistos dominados. A área destes tem aumentado ao longo do tempo, e entre os anos de 2005 e 2015, a variação mais significativa verificou-se nos povoamentos mistos dominados de sobreiro.

Em relação ao pinheiro manso, existiam no mesmo ano 29,2 mil hectares de povoamentos mistos dominantes e 26,4 mil hectares mistos dominados. A área de pinheiro manso aumentou em todas as classes: povoamentos puros, mistos dominantes e mistos dominados. Os povoamentos puros de pinheiro manso foram os que mais aumentaram entre os anos de 2005 e 2015, quando comparados com os povoamentos mistos dominantes e mistos dominados (ver Tabela 2).

Tabela 2 - Áreas por espécie segundo a composição. Adaptado do INF 6 – ICNF 2019.

Áreas por espécie segundo a composição							
Espécie	Composição	1995	2005	2010	2015		Δ [2005-2015]
		Mil ha	Mil ha	Mil ha	Mil ha	Erro%	Mil ha
Sobreiro	Povoamentos						
	Puro	648,5	668,8	653,2	658,1	±1,1	-10,6
	Misto dominante	36,9	41,8	42,7	47,0	±4,5	+5,2
	Misto dominado	27,4	30,5	31,9	38,5	±5	+8,0
Pinheiro manso	Povoamentos						
	Puro	92,1	136,6	152,0	160,0	±2,4	+23,4
	Misto dominante	19,7	24,5	26,0	29,2	±5,7	+4,7
	Misto dominado	22,8	25,7	25,1	26,4	±6,0	+0,8

Apesar destas variações importantes na composição das florestas de sobreiro, o inventário florestal não especifica as espécies com a qual ele existe em consociação. Dados de observação conjugados com informação sobre a distribuição geográfica levam a crer que na faixa litoral do Alentejo e também na região centro, o sobreiro coexiste com o pinheiro manso, em densidades e proporções variáveis. Esta é uma das misturas de espécies que mais interesse tem suscitado entre proprietários florestais, pela possibilidade de conjugar duas produções economicamente importantes: a pinha e a cortiça.

CONSOCIAÇÃO DE DOIS PRODUTOS NÃO LENHOSOS ECONOMICAMENTE RENTÁVEIS EM PORTUGAL: PINHA E CORTIÇA

A espécie *Pinus pinea* oferece vários produtos e serviços tais como: a resina, a casca, a madeira, a proteção contra a erosão dos solos, entre outros serviços de ecossistema, mas a pinha e o pinhão são os produtos com maior importância económica. Os maiores produtores de pinhão são Espanha, Portugal, Itália, Tunísia e Turquia (Viñas *et al.*, 2016).

Segundo Mutke *et al.* (2019), as áreas aproximadas de pinheiro manso estão atualmente distribuídas da seguinte forma: 490 mil hectares em Espanha, 195 mil hectares na Turquia, 175 mil hectares em Portugal, 46 mil hectares em Itália, 35 mil hectares na Tunísia, 13,5 mil hectares em França, 12,7 mil hectares no Líbano, e áreas menores em Marrocos, Grécia, Síria, Israel, Croácia ou Albânia.

Os produtos e serviços prestados pelo montado, além da cortiça que tem o valor económico mais importante, estão associados ao sequestro de carbono, a atividades de cinegética, à produção de mel, à produção de cogumelos e ao pastoreio (Pereira *et al.*, 2008). Mais de metade de toda a cortiça produzida no mundo é originária de Portugal (Correia *et al.*, 2018).

Embora seja um produto bastante valorizado, a cortiça de maior valor comercial só acontece quando a árvore tem aproximadamente 40 anos de idade. A primeira extração realiza-se quando a árvore atinge 70 centímetros de diâmetro à altura do peito e possui um valor comercial reduzido, pois ainda não possui as características desejadas para ser rolhável, o que só acontece na 3ª extração (chamada cortiça amadia). Dado o intervalo de tempo de 9 anos entre cada extração, é necessário esperar muito tempo para que haja alguma rentabilidade proveniente da cortiça.

Os produtores florestais encontraram no pinheiro manso uma forma de rentabilidade anual através do pinhão, um produto florestal não lenhoso, muito valorizado economicamente pelas suas propriedades nutritivas. O pinheiro manso começa a produzir pinha de forma rentável entre os quinze e os vinte anos. Porém o processo de enxertia permite que tal ocorra mais cedo, antecipando a produção de pinha de forma rentável entre os oito e os dez anos (Carneiro *et al.*, 2007).

A distribuição geográfica do sobreiro e do pinheiro manso sobrepõe-se parcialmente, surgindo estas espécies frequentemente em consociação (Figura 2). Esta mistura é de todo vantajosa para o proprietário florestal porque permite a combinação de duas produções economicamente rentáveis. Porém, desconhece-se se a mistura é benéfica ou não para a produtividade e bom estado vegetativo das árvores. Este conhecimento é especialmente importante no caso dos povoamentos de sobreiro doentes e decrépitos, afetados por mortalidade. Uma das causas apontadas para esta mortalidade é a espécie *Phytophthora cinnamomi*.



Figura 2 - Povoamento misto de sobreiro e pinheiro manso localizado numa herdade em Coruche, Santarém.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO SOBREIRO E DO PINHEIRO MANSO

O sobreiro possui folhas verdes e perenes que são reativas à secura. Estas reagem ao stress hídrico fechando os estomas, o que lhes permite reduzir as perdas de água por transpiração. Adicionalmente, o sobreiro possui um sistema radicular horizontalmente extenso e que pode atingir vários metros de profundidade, o que lhe permite extrair água do subsolo e de lençóis freáticos. Também estabelece associações micorrízicas, através das quais consegue absorver com maior

abundância/facilidade minerais que se encontrem escassos no solo. A casca do sobreiro, denominada cortiça, tem propriedades únicas que fazem dela um bom isolante térmico (Pereira *et al.*, 2008).

O pinheiro manso é uma resinosa de folha persistente e acicular. As suas folhas são denominadas de agulhas e encontram-se em fascículos de duas. A raiz principal desta espécie aborta precocemente, porém formam-se numerosas raízes secundárias que se estendem horizontalmente. Formam-se também ramificações terciárias capazes de explorar as camadas mais profundas do solo. Tal como o sobreiro, o pinheiro manso estabelece associações micorrízicas, o que lhe permite uma maior área para a absorção de água e nutrientes. É uma espécie monoica, ou seja, cada indivíduo apresenta estruturas reprodutoras do sexo masculino e feminino. A disseminação do pólen é feita através do vento, sendo por isso designadas anemófilas. Desde a polinização até que ocorra a abertura da pinha são necessários três anos (Mutke *et al.*, 2012).

PHYTOPHTHORA CINNAMOMI NO SOBREIRO E PINHEIRO MANSO

A espécie *Phytophthora cinnamomi* é um oomiceta, que provoca a destruição dos tecidos do sistema radicular, impedindo a absorção de água e nutrientes, e conseqüentemente causa o emurchecimento da parte aérea da planta (Moreira *et al.*, 2018). É um agente patogénico generalista, que afeta um abrangente leque de hospedeiros.

O seu ciclo de vida ocorre inteiramente no solo, sendo a humidade um fator imprescindível para o seu desenvolvimento e propagação. Quando se encontram as condições ideais de água livre e temperatura, são produzidos esporângios, que são estruturas assexuadas que dão origem a zoósporos. São estes os responsáveis pela disseminação do oomiceta no solo e pelas infeções primárias nas raízes jovens da planta. Estas raízes atraem os zoósporos, nas quais eles enquistam e germinam, provocando a destruição dos tecidos

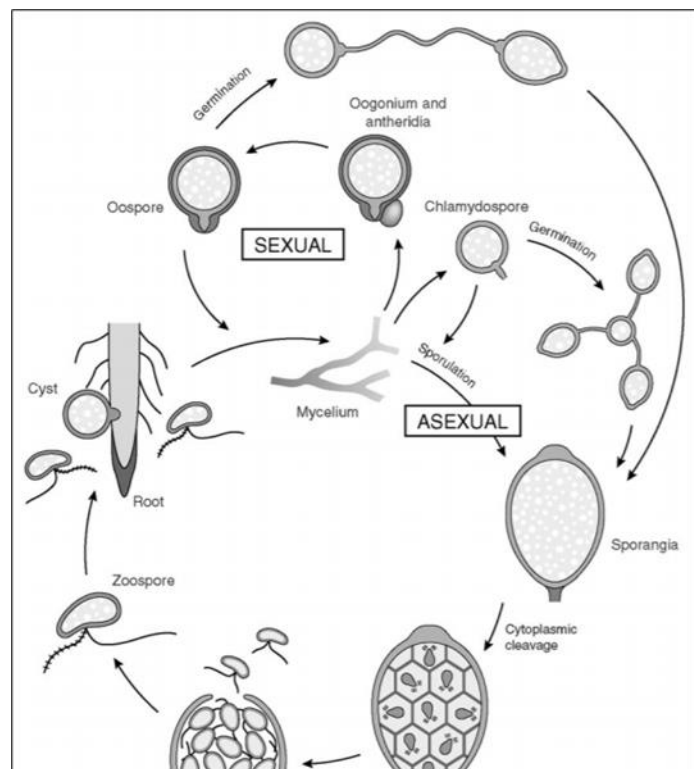


Figura 3 - Ciclo de vida do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* (Diagram Professor A Hardham, The Australian National University, Canberra, A.C.T.).

radiculares. Como consequência, a absorção e o transporte de água e nutrientes são afetados, provocando o emurchecimento da estrutura aérea da planta. Cerca de dois ou três dias depois da infecção do hospedeiro, podem ser produzidos pelo agente patogénico novos esporângios, causando deste modo um novo ciclo de inóculo (Figura 3). Deste modo, poderão surgir situações de epidemia.

Por norma, nas estações do verão e do inverno, quando as condições não se encontram adequadas ao seu desenvolvimento, a espécie *Phytophthora cinnamomi* pode permanecer latente no solo, até que as condições voltem a ser favoráveis, sob duas formas: sob a forma de hifas dilatadas em resíduos de matéria orgânica ou em raízes das plantas hospedeiras durante períodos de tempo menores, ou sob a forma de clamidósporos durante períodos de tempo mais alargados, que podem ir desde meses até anos (Trindade *et al.*, 2019).

Os sintomas apresentados pela planta infetada não são fáceis de ser observados, pois podem ser similares aos provocados por outros agentes patogénicos e/ou problemas fisiológicos.

Nas plantas mais jovens, pode causar *damping off*, começando por infetar as extremidades do sistema radicular e invadindo os tecidos muito rapidamente, provocando a mortalidade da planta num reduzido período de tempo.

Nas plantas menos jovens, a estrutura aérea apresenta sintomas idênticos aos provocados em contexto de carência de água ou nutrientes. Ou seja, é possível observar o emurchecimento das folhas, desfoliação e cloroses, que ocorre devido à incapacidade de absorção de água e nutrientes.

Até à data não foram encontradas medidas capazes de eliminar eficazmente *Phytophthora cinnamomi* das áreas infetadas. Um dos métodos mais eficaz de tentar controlar este agente patogénico consiste na remoção do hospedeiro, fumigação e aplicação de fungicida. Este método foi considerado útil por Dunstan *et al.* (2010) na erradicação de infestações localizadas, apropriado para limitar a dispersão em áreas de dimensões demasiado extensas para a erradicação e para proteger populações suscetíveis de serem contaminadas. No entanto, em Portugal, o processo de fumigação anteriormente referido, apenas é permitido em ambiente controlado, isto é, em viveiros.

Num estudo que visava avaliar a suscetibilidade de diversas árvores da península ibérica à *Phytophthora ramorum* e à *Phytophthora cinnamomi*, verificou-se que a espécie *Pinus pinea* sofreu lesões maiores quando inoculada com *Phytophthora cinnamomi* do que quando inoculada com outras espécies de *Phytophthora* spp. No entanto, estes resultados não foram estatisticamente significativos (Moralejo *et al.*, 2009).

O declínio do sobreiro em Portugal foi descrito e observado desde os finais do século XIX. Nos finais do século XX, a elevada proporção de árvores mortas no país, desencadeou elevados níveis de

preocupação quanto ao futuro da produção de cortiça, especialmente nas regiões centro e sul. O declínio na região sul é mais acentuado, possivelmente devido à influência das características ambientais do local. Estudos demonstram que existe uma maior ocorrência de *Phytophthora cinnamomi* nas encostas que se encontram expostas a sul, vales e solos delgados (leptosolos e luvisolos). A infecção aparenta ser favorecida nos solos de baixa fertilidade, e com níveis baixos de nutrientes minerais, sobretudo o fósforo (Moreira and Martins, 2005).

As alterações climáticas, e o consequente aumento de temperatura, poderão potenciar a atividade do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* em determinadas zonas, tais como, no oeste do Mediterrâneo ou noroeste da Europa. Tal poderá não ocorrer noutros locais com invernos frios, como no centro e este da Europa (Brasier, 1996).

INTERAÇÕES ECOLÓGICAS ENTRE ESPÉCIES E IMPACTE NA INCIDÊNCIA DE *P. CINNAMOMI*

Algumas plantas podem produzir compostos naturais que atuam eficazmente contra determinadas pragas ou doenças que afetam espécies de plantas economicamente importantes. Muitas vezes as interações entre plantas são controladas por exsudados das raízes. Estes exudatos produzidos pelas plantas podem interferir com a microbiologia do solo podendo provocar efeitos positivos ou negativos nas plantas vizinhas (Neves *et al.*, 2014).

A espécie *Phlomis purpurea* é um arbusto espontâneo, nativo da península ibérica e Marrocos (Mateus *et al.*, 2016) (Figura 4). É uma espécie que, em Portugal continental, ocorre na região sul, e existe em consociação com o sobreiro. Num ensaio realizado por Neves *et al.* (2014), foi avaliado o efeito do extrato bruto de etanol das raízes desta espécie no crescimento do micélio, na produção de esporângios, na libertação e germinação de zoósporos, e na produção e viabilidade de clamidósporos em *Phytophthora cinnamomi*. Também foi avaliada a proteção do sobreiro contra o agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*. A inibição das estruturas patogénicas, *in vitro*, foi de 85% a 100%. Observou-se



Figura 4 - *Phlomis purpurea* em floração de cor violeta/rosado. Fonte: flora-on.pt

que a planta *Phlomis purpurea* protegeu o sobreiro e a azinheira da infecção do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* e reduziu o potencial inóculo em ensaios de estufa. Os resultados obtidos do ensaio mencionado, indicam que existe na espécie *Phlomis purpurea* potencial para reduzir a infecção e a disseminação do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*. O seu controlo poderia ser conseguido através de substâncias fornecidas pelos extratos das raízes de *Phlomis purpurea*.

Outro estudo realizado por Ríos *et al.* (2016) avaliou o impacto da biofumigação no ciclo de vida do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*. Os testes foram realizados *in vitro*, em solos infetados sob condições de laboratório, e *in planta*. Foram recolhidos em distintos estados fenológicos diferentes genótipos de *Brassica carinata*, *Brassica juncea* e *Brassica napus*, três espécies de planta com potencial de biofumigação. Os seus conteúdos de glucosinolato foram analisados e testados. Os genótipos mais eficazes contra o crescimento do micélio e a produção de esporângios foram testados na viabilidade de clamidósporos, em solos naturais, artificialmente infetados, e *in planta*, em *Lupinus luteus*, uma planta altamente suscetível ao ataque do agente patogénico em causa. Os genótipos das espécies *Brassica carinata* e *Brassica juncea* inibiram o crescimento do micélio, diminuíram a produção de esporângios e a viabilidade de clamidósporos foi inibida no solo. No entanto, apenas *Brassica carinata* provocou a diminuição dos sintomas da doença nas plantas. Os genótipos eficazes de *Brassica* apresentavam elevados níveis de glucosinolato sinigrina. Assim, a biofumigação com espécies de *Brassica* ricas em sinigrina poderia ser um método adequado para o controlo do declínio do sobreiro provocado pelo agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*.

Num estudo realizado por Gómez *et al.* (2020) concluiu-se que a infetividade e sobrevivência do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi* é mais estimulada em povoamentos mistos de *Quercus suber* e *Quercus canariensis* do que em povoamentos monoespecíficos. No caso de se verificarem condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças radiculares, a coexistência de ambas as espécies pode agravar o declínio do sobreiro na região mediterrânica.

OBJETIVOS DO TRABALHO

O ensaio experimental que se segue teve como objetivo estudar não só as interações ecológicas entre o sobreiro e o pinheiro manso em combinações intraespecíficas e interespecíficas, mas também o impacto das interações ecológicas entre espécies na incidência de *Phytophthora cinnamomi*, nomeadamente verificar se a presença do pinheiro manso teria algum efeito positivo na resistência do sobreiro ao ataque de *P. cinnamomi*. Perante um cenário de alterações climáticas capaz de tornar as árvores mais suscetíveis a pragas e doenças e, tendo em conta que o sobreiro e o pinheiro

manso partilham as mesmas regiões ecológicas e surgem em sistemas mistos, considerou-se que este estudo seria relevante.

Este ensaio visou também testar a aplicabilidade de um método indireto para avaliar a área foliar da planta em vaso, utilizando um *software* de análise de imagem. A área foliar é um importante indicador da produtividade e este método permite a sua avaliação sem implicar uma amostragem destrutiva da planta.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLHEITA DAS SEMENTES

As bolotas e pinhões foram recolhidos na Herdade da Abegoaria em Vendas Novas, em dezembro de 2017 de árvores saudáveis e sem sinais aparentes ou sintomas de doença. As sementes recolhidas são provenientes da mesma árvore, no caso das bolotas, e da mesma pinha, no caso dos pinhões, reduzindo assim a variabilidade de resposta das plantas devido a fatores genéticos.

TRATAMENTO DAS SEMENTES E PRÉ-GERMINAÇÃO

As bolotas, no próprio dia da colheita na árvore, foram imersas durante 48 horas em água para distinguir as que se encontravam viáveis das não viáveis. Foram utilizadas as sementes que afundaram por serem as potencialmente viáveis. Foram selecionadas sementes de tamanho idêntico entre si.

A pinha selecionada foi colocada numa estufa a 55 °C durante uma semana, permitindo a abertura das escamas e a recolha dos pinhões. Os pinhões foram depois imersos em água e rejeitados os que flutuavam.

Até ao começo do ensaio experimental, as sementes de ambas as espécies foram mantidas num frigorífico convencional à temperatura de 4 °C.



Figura 5 - Germinação de semente de sobreiro (à esquerda) e de semente de pinheiro manso (à direita).

Aproximadamente um mês antes do início do ensaio, as sementes foram colocadas num substrato humedecido e mantidos em estufa a 25 °C para pré-germinar. Após a observação da formação de uma pequena radícula com cerca de 1 a 3 cm de comprimento, as sementes foram transplantadas para vasos de 7,5 dm³ (32 cm de altura e 18,5 cm de diâmetro) num substrato composto por uma mistura de turfa e areia (4:1, v/v) (Figura 5).

PREPARAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DOS VASOS NA ESTUFA

O ensaio teve início em março de 2018 e terminou em junho de 2019, englobando pelo menos um período de maior crescimento vegetativo. O ensaio foi instalado numa estufa aberta que se encontra no terraço do Departamento de Recursos Naturais, Ambiente e Território do Instituto Superior de Agronomia, em Lisboa (Figura 6). A estufa é composta por um teto de vidro que intercepta 30% da radiação incidente e exclui a precipitação natural.



Figura 6 - Sistema de rega do ensaio na estufa.

Cada vaso foi regado à capacidade de campo uma vez por semana. A capacidade de campo foi calculada através da diferença entre a água adicionada ao vaso e a água escoada pela ação da gravidade. A água retida no vaso encontra-se nos macroporos do solo e corresponde à água disponível para a planta. Foi realizada uma fertirrega no dia 7 de setembro de 2018 com 2 g de fertilizante NPK (14-7-14) diluído em água por vaso.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental consistiu em 2 blocos casualizados, cada um com 2 tratamentos (com *Phytophthora cinnamomi* e Controlo). Em cada tratamento existem 10 réplicas da combinação de espécies deste estudo. As 5 combinações de vasos com as duas espécies de *Pinus pinea* (Pm) e *Quercus suber* (Sb) foram: uma planta de Pm por vaso, uma planta de Sb por vaso, duas plantas de Pm

preparados sacos com vermiculite humedecida com meio de V8 na mesma proporção, não inoculados, para aplicação nos vasos testemunha (sem *P. cinnamomi*).

A inoculação das plantas foi realizada no dia 20 de novembro de 2018. Foram aplicados 225 mililitros da mistura de vermiculite inoculada com *Phytophthora cinnamomi* a cada um dos 50 vasos tratamento (amarelo, Figura 7). Nos vasos testemunha foi aplicada a mesma quantidade de mistura de vermiculite sem *P. cinnamomi* (vermelho, Figura 7). A mistura foi colocada num buraco no centro de cada vaso e depois coberta com substrato. De seguida, os vasos foram regados por excesso diretamente no local de inoculação. Os vasos foram deixados com excesso de água por um período de 24 horas tendo-se depois aplicado a rega à capacidade de campo uma vez por semana até ao fim do ensaio.

Cada vaso inoculado foi devidamente isolado com 3 sacos de plástico reforçado até ao topo de modo a impedir a contaminação dos vasos adjacentes. Todo o material utilizado nas medições foi devidamente desinfetado.

CONDIÇÕES AMBIENTAIS NA ESTUFA

Foi instalado um sistema de rega gota a gota para controlar a quantidade de água adicionada a cada vaso. Sensores de monitorização da temperatura do ar foram instalados dentro da estufa com registo horário. A temperatura máxima registada durante o ensaio experimental foi de 53,35 °C (em agosto de 2018) e a temperatura mínima foi 4,50 °C (em fevereiro de 2019). A temperatura máxima atingiu valores superiores a 50 °C em 4 dias seguidos, aproximadamente 3 meses antes da inoculação. Após a inoculação, a temperatura máxima registada foi 44,95 °C no final de maio. As temperaturas mínimas verificaram-se na primeira quinzena de janeiro, com 3 dias de temperaturas iguais ou inferiores a 5 °C. A média da temperatura máxima foi 31,08 °C (SE=±0,28), e da temperatura mínima foi 14,12 °C (SE=±0,20). Durante a inoculação as temperaturas médias observadas foram ótimas para a produção de zoósporos (Figura 8).

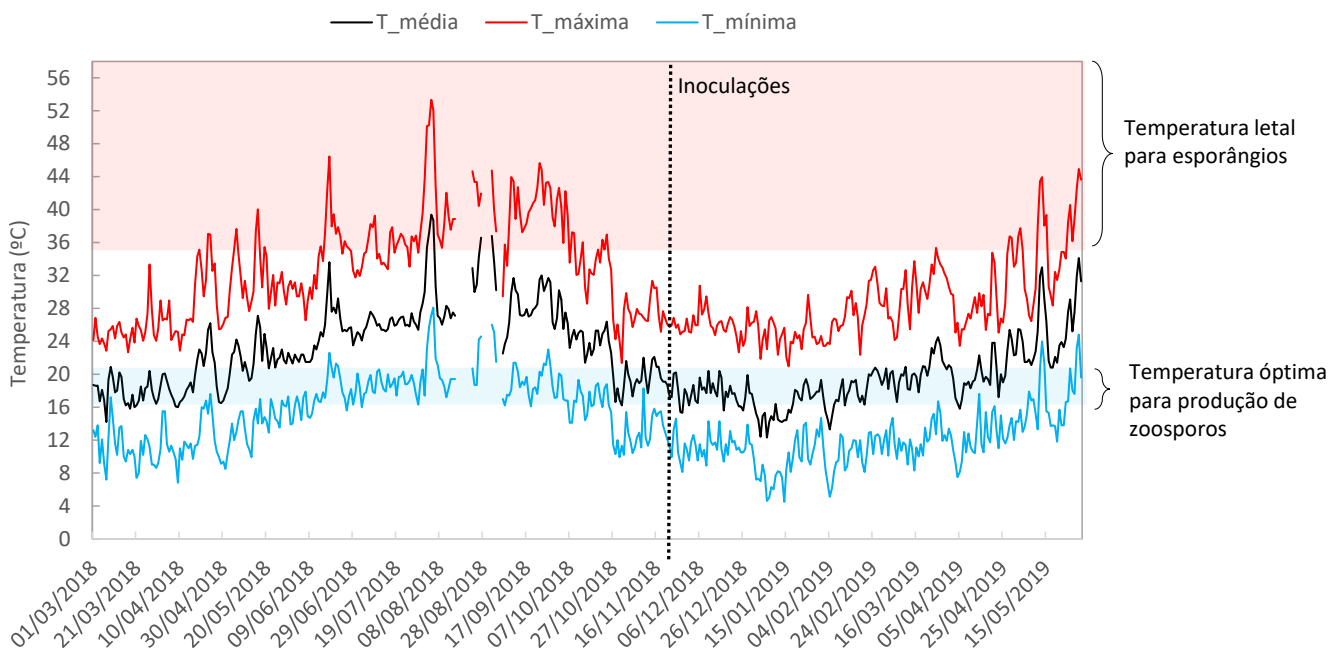


Figura 8 - Temperatura do ar máxima, média e mínima diária medida a 1,5m de altura na estação meteorológica automática Lisboa/ Tapada da Ajuda

O teor de água no solo foi monitorizado durante 3 meses utilizando sensores de humidade do solo em contínuo (EC-5 da marca Decagon, METER Group, Inc. USA) a vários níveis de profundidade num vaso sem plantas. Na Figura 9 está representado um mês que corresponde a um período padrão de estabilização dos sensores. As regas foram semanais adicionando água até atingir a capacidade de campo. Os teores de água mantiveram-se muito baixos à superfície (0-10cm), sem resposta à rega, e ciclos de perdas e ganhos no perfil de 10 a 30 cm. Estes resultados estão de acordo com o esperado para um solo tipicamente de areia. Os teores de água foram substancialmente superiores na base do vaso, a 25-30 cm garantindo assim a manutenção de condições ideais de dispersão e crescimento da fitóftora.

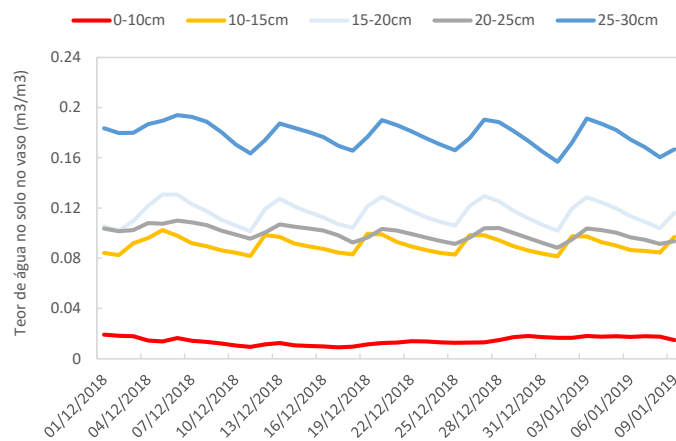


Figura 9 - Teor de água no solo no vaso, em m^3/m^3 .

Imediatamente antes do abate foram recolhidos dados pontuais do teor de água em cada vaso utilizando um TDR (TDR100, marca FieldScout, Enviromonitors) com o sensor de 20 cm.

MEDIÇÕES NÃO DESTRUTIVAS DAS PLANTAS

Durante o decorrer do estudo foram realizadas medições mensais da altura total e do número e comprimento das ramificações das plantas nos dias 03/05/2018, 01/06/2018, 10/07/2018, 01/08/2018, 05/09/2018, 10/10/2018, 6/11/2018, 04/02/2019, 20/03/2019 e 17/05/2019 com o objetivo de avaliar a evolução do crescimento ao longo do tempo. Nas combinações intraespecíficas de sobreiro e pinheiro manso, foram identificados em Sb1 e Pm1, respetivamente os indivíduos considerados dominantes, ou seja, os que apresentaram maior altura total na primeira medição. Em 5 de Setembro de 2018 foram também contadas todas as folhas dos sobreiros e a 20 de março de 2019 foi avaliada qualitativamente a proporção de folhas novas no caso do sobreiro e agulhas novas no caso do pinheiro manso (doravante designado folhas para ambas as espécies).

Foram também realizadas mensalmente observações visuais da presença ou ausência de danos foliares e mortalidade.

Colheita de fotografias de perfil para determinação da área foliar de forma indireta e avaliação de danos nas raízes

Na altura dos abates, em junho de 2019, todas as plantas foram fotografadas de perfil (2 fotografias perpendiculares por planta) para a parte aérea em condições de luminosidade controlada com o objetivo de encontrar um modelo que permitisse determinar a área foliar utilizando um método não destrutivo. O sistema radicular foi também fotografado intacto e depois de limpo, nas mesmas



Figura 10 - Imagens recolhidas de perfil da parte aérea e radicular.

condições com o objetivo de avaliar, à posteriori, danos provocados por fitófтора no sistema radicular (Figura 10).

As fotografias foram analisadas com o software de análise de imagem WinSCANOPY (da marca Regent Instruments Inc.) que inclui uma subrotina de análise de plantas individuais.

As fotografias foram tiradas nas seguintes condições:

1 - Luzes colocadas simetricamente por forma a conseguir uma iluminação homogénea e sem sombras. Cabeças de flash equipadas com caixa de luz por forma a difundir um pouco mais a luz facilitando também a homogeneidade da iluminação pretendida

2 - Ambiente do estúdio com ausência de luz parasita (janelas tapadas), por forma a conseguir-se manter a iluminação controlada, a mesma luz em qualquer hora do dia.

3 - Fotografou-se com a sensibilidade de 640 ISO, Diafragma 16/22 e velocidade 15/30. Com o objetivo de se obter uma boa profundidade de campo. Por forma a conseguir ter os objetos focados, com definição e contraste.

4 - Utilizou-se o tripé de máquina para que o enquadramento se mantivesse sempre o mesmo, garantindo assim as condições de luz inalteráveis.

5 – Utilizou-se uma escala de dimensão conhecida para tratamento posterior das fotografias no software.

MEDIÇÕES DESTRUTIVAS

As plantas foram desmanchadas durante o mês de julho de 2019. Cada planta foi medida para os seguintes parâmetros: altura da parte aérea, diâmetro na base do caule, número de ramificações e comprimento das ramificações. As folhas foram agrupadas em novas e velhas e uma amostra de cada componente foi recolhida para determinação da área foliar específica para determinação da área foliar multiplicando a biomassa de folhas em peso seco pela área foliar. No final foi determinado o peso seco de cada uma das frações da parte aérea: folhas novas e velhas, caule e ramificações. No que respeita à parte radicular, para além das imagens obtidas em ambiente de estúdio, foi recolhida uma amostra para digitalização num scanner de elevada resolução para determinação do comprimento, área e volume das raízes e identificação de micorrizas e danos nas raízes. O peso seco foi obtido após colocação do material numa estufa de secagem a 65 °C durante dois dias.

Para confirmar a presença de *P. cinnamomi* nas raízes foram recolhidas amostras com 3-5 cm e acondicionadas em água destilada esterilizada. Os pedaços de raiz foram seccionados em pequenos fragmentos, mergulhados em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) durante 10 segundos, passados por água destilada esterilizada, colocados em meio seletivo P5ARPH (composição por litro: Farinha de milho e agar (CMA da Difco) 17 g, 5 mg piramicina, 250 mg ampicilina, 10 mg rifampicina, 100 mg PCNB e 50 mg himexazol) e incubados em estufa a 25°C. Após 2, 4 e 7 dias de incubação as placas de Petri foram observadas para verificar a presença de *P. cinnamomi* ⁽²⁾.

Foram também recolhidas amostras de solo para confirmação da presença do agente patogénico no solo. As amostras de solo foram colocadas em contentores e cobertas com água destilada em excesso. Foram colocadas armadilhas vegetais (pedaços de folhas frescas de várias espécies) a flutuar e incubadas em estufa a 25°C com luz ambiente. As armadilhas vegetais foram observadas em lupa binocular para pesquisa da formação de esporângios ⁽³⁾.

O manuseamento do material em contacto com *Phytophthora cinnamomi* foi realizado com especial precaução, de modo a não haver contaminação do local onde foram realizados os abates (Figura 11).



Figura 11 - Manuseamento de material inoculado com *Phytophthora cinnamomi*.

² Ensaio efetuado nos laboratórios do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

³ Ensaio efetuado nos laboratórios do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise exploratória dos dados foi utilizada a média e o erro padrão em todas as variáveis, e para as diferentes combinações e tratamentos. Análises de variância foram realizadas para testar o efeito do bloco, a existência de diferenças significativas entre as médias das várias combinações de cada espécie, e entre tratamentos. Nas combinações que apresentaram diferenças significativas, realizou-se o teste de *Tukey* para duas amostras com variâncias desiguais. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para níveis de significância $\alpha=0,05$. Os dados foram trabalhados usando a extensão *Data Analysis* da Microsoft Excel.

Na construção dos modelos de determinação de área foliar foram utilizadas correlações lineares. O coeficiente de Determinação, R^2 , mede a proporção da variabilidade total da variável resposta Y que é explicada pela regressão. Quanto maior o ajustamento da regressão linear simples aos valores observados de uma variável aleatória melhor. Numa regressão linear simples, $R^2=r_{xy}^2$, sendo r_{xy} o coeficiente de correlação linear entre x e y. Um coeficiente de correlação igual a ± 1 significa uma relação perfeita entre as variáveis.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO VISUAL DE DANOS E MORTALIDADE DAS PLANTAS INOCULADAS AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL

As observações visuais realizadas mensalmente permitem concluir que a presença da *P. cinnamomi* no solo não conduziu a manifestações visíveis de danos foliares ou de mortalidade das plantas. Em apenas um vaso inoculado a planta (sobreiro) morreu.

Nas amostras de raízes recolhidas no final do ensaio não foi possível confirmar a presença de *P. cinnamomi*.

No entanto, as análises efetuadas em amostras de solo recolhidas no final do ensaio confirmaram a presença do agente patogénico no solo.

TEOR DE ÁGUA NO SOLO

Verificaram-se diferenças significativas no teor de água no solo entre combinações de espécies (Figura 12). Assim, os vasos nos quais se observa um maior teor de água no solo são os de sobreiro e os com menos água os de pinheiro. Os vasos com mistura de sobreiro e pinheiro estão numa situação intermédia e não se verificaram diferenças significativas entre o teor de água no solo destes e os das restantes combinações.

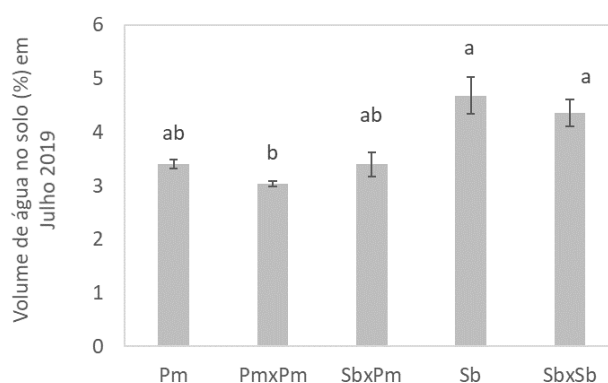


Figura 12 - Volume de água médio no solo (%) por combinação, em julho de 2019. As diferenças significativas são representadas pelas letras diferentes. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

CRESCIMENTO EM ALTURA

Durante os primeiros 5 meses, isto é, de março a julho de 2018, não se observaram diferenças significativas entre sobreiro e pinheiro manso para a altura. A diferença entre sobreiro e pinheiro manso acentuou-se nos meses de agosto (Sb sem Fitóftora: $0,23 \pm 0,031$ cm.dia⁻¹; Sb com Fitóftora: $0,25 \pm 0,032$ cm.dia⁻¹; Pm sem Fitóftora: $0,10 \pm 0,005$ cm.dia⁻¹; Pm com Fitóftora: $0,09 \pm 0,005$ cm.dia⁻¹) e setembro (Sb sem Fitóftora: $0,35 \pm 0,031$ cm.dia⁻¹; Sb com Fitóftora: $0,33 \pm 0,030$ cm.dia⁻¹; Pm sem Fitóftora: $0,17 \pm 0,005$ cm.dia⁻¹; Pm com Fitóftora: $0,16 \pm 0,005$ cm.dia⁻¹), altura em que o sobreiro apresenta um acréscimo em altura exuberante e significativamente superior ao do pinheiro manso. A medição de fevereiro de 2019 mostra que as plantas praticamente não alongaram de novembro a fevereiro (Sb sem Fitóftora: $0,02 \pm 0,003$ cm.dia⁻¹; Sb com Fitóftora: $0,02 \pm 0,003$ cm.dia⁻¹; Pm sem Fitóftora: $0,02 \pm 0,001$ cm.dia⁻¹; Pm com Fitóftora: $0,02 \pm 0,002$ cm.dia⁻¹), muito provavelmente relacionado com a diminuição gradual da temperatura do ar e do fotoperíodo. Na primavera de 2019, ambas as espécies iniciam o crescimento, mais proeminente no caso do pinheiro manso do que no sobreiro e com diferenças significativas entre as duas espécies em maio de 2019 (Sb sem Fitóftora: $0,05 \pm 0,008$ cm.dia⁻¹; Sb com Fitóftora: $0,05 \pm 0,014$ cm.dia⁻¹; Pm sem Fitóftora: $0,11 \pm 0,006$ cm.dia⁻¹; Pm com Fitóftora: $0,09 \pm 0,006$ cm.dia⁻¹) (Figura 13).

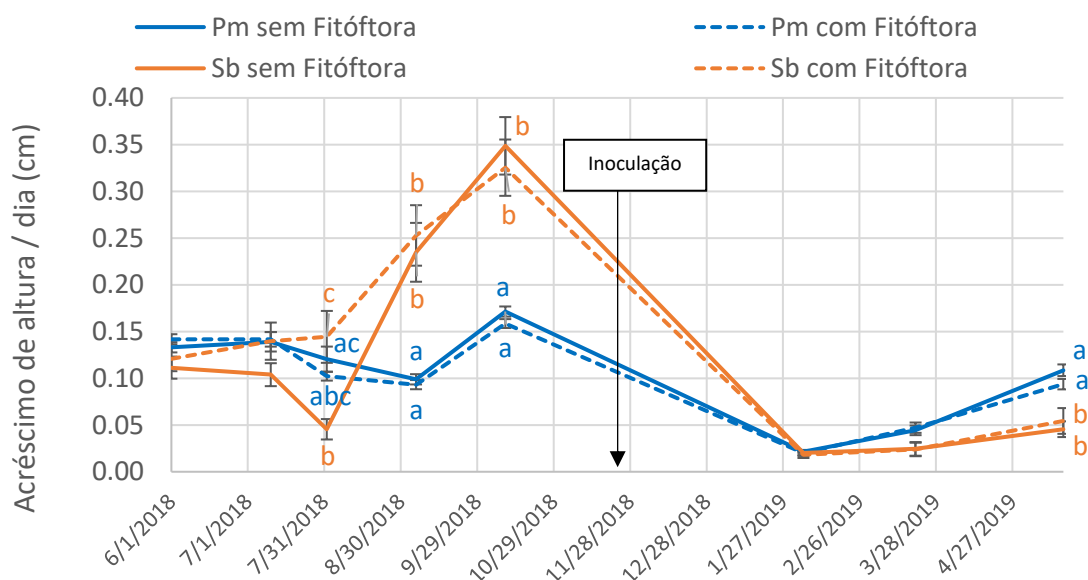


Figura 13 -- Acréscimo em altura diário (em cm) do sobreiro e do pinheiro manso, com e sem *P. cinnamomi*. As diferentes letras representam diferenças significativas entre espécie e tratamento, em cada medição. As barras verticais representam os respetivos erros padrão.

Após a inoculação, ou seja, nas medições depois de novembro de 2018, não se observaram diferenças significativas para a altura entre sobreiro e pinheiro manso com ou sem fitoftóra.

Uma vez que não se observaram diferenças significativas para os acréscimos em altura por dia entre as plantas controlo e as plantas inoculadas, podemos agregar os dados e analisar a altura média das plantas desta vez para averiguar a existência de diferenças entre as combinações de espécies.

Na Figura 14 podemos observar a evolução, ao longo do tempo, da altura média do pinheiro manso e do sobreiro nas várias combinações, respetivamente. Verifica-se que não existem diferenças significativas entre a altura do pinheiro manso sozinho, do pinheiro manso dominante (Pm1), do pinheiro manso dominado (Pm2) e do pinheiro manso em mistura com sobreiro (PmxSb).

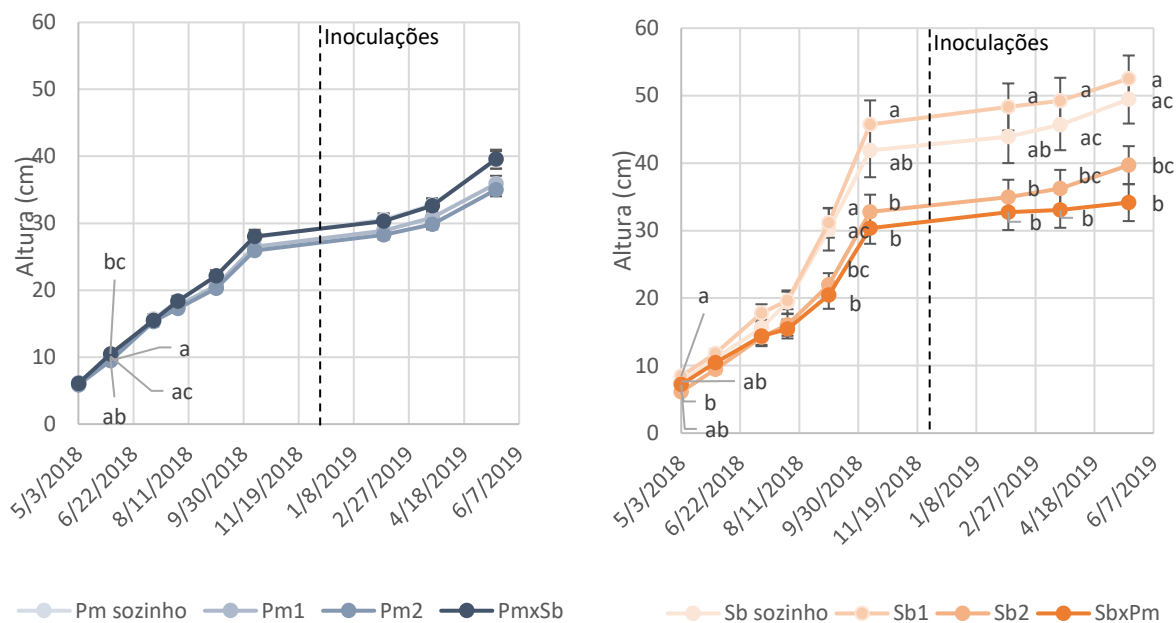


Figura 14 - Altura média dos pinheiros mansos e dos sobreiros nas várias combinações. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Quanto ao sobreiro, verifica-se que existe uma diferença de altura significativa dependendo da espécie que está presente no vaso. Assim o sobreiro isolado e o dominante na mistura intraespecífica foram os que apresentaram maior altura sendo a altura dos sobreiros isolados significativamente maior do que os sobreiros das outras combinações em praticamente todas as datas.

AMOSTRAGEM DESTRUTIVA

Apresentam-se em seguida os resultados da biomassa resultante das amostragens destrutivas realizadas em julho de 2019, no final do ensaio, para a parte aérea e radicular do sobreiro e do pinheiro manso nos tratamentos com e sem fitóftora e também para as combinações de espécies.

Biomassa total

Através da Figura 15 verifica-se que o pinheiro manso sozinho apresenta valores de biomassa superiores aos das restantes combinações de pinheiro manso. Os pinheiros mansos da combinação intraespecífica (Pm1 e Pm2) apresentam os valores de biomassa mais baixos e não diferem entre si. Porém, os pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica, diferem significativamente entre tratamentos. Ou seja, os que foram tratados com fitóftora possuem mais biomassa do que os não foram inoculados com o agente patogénico.

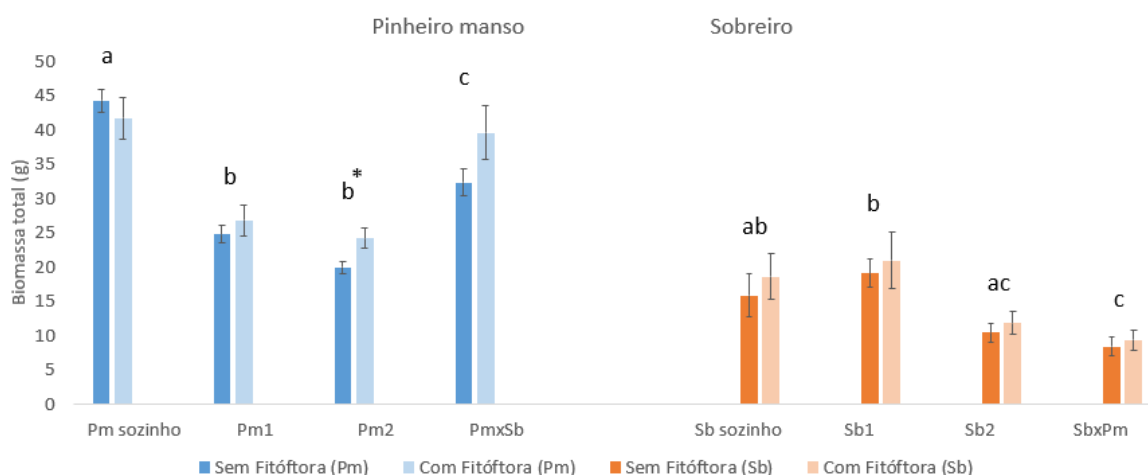


Figura 15 - Biomassa média total (em gramas) dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros da combinação intraespecífica diferem significativamente entre si. Os sobreiros sozinhos diferem significativamente dos sobreiros da combinação interespecífica, mas não diferem dos sobreiros da combinação intraespecífica. Os sobreiros da mistura interespecífica diferem significativamente dos sobreiros dominantes, mas não diferem dos sobreiros dominados da combinação intraespecífica. Em seguida vamos analisar a contribuição da parte aérea e radicular na biomassa total.

Biomassa aérea

Biomassa total de folhas

Não existe diferença significativa entre a massa de folhas total dos pinheiros mansos sozinhos e a dos pinheiros mansos da combinação interespecífica (Figura 16). Ambas são significativamente maiores do que as dos pinheiros mansos da combinação intraespecífica. A massa de folhas total de

ambos os pinheiros mansos da combinação intraespecífica não diferem entre si. Porém, existe diferença significativa entre tratamentos no pinheiro manso dominado da combinação intraespecífica (Pm2). Os pinheiros mansos, anteriormente referidos, tratados com fitóftora apresentam valores de massa de folhas total superiores aos dos pinheiros mansos que não foram inoculados com o agente patogénico.

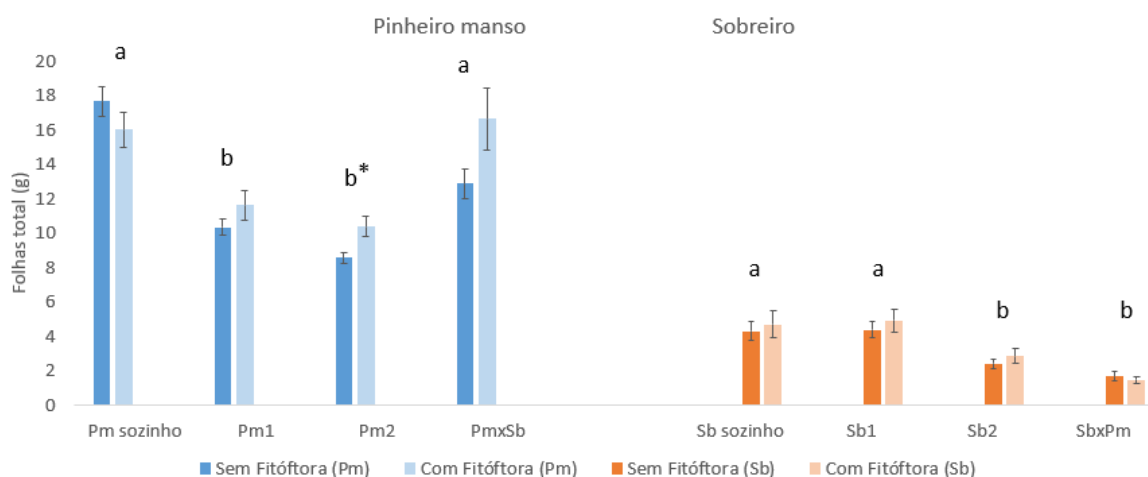


Figura 16 - Peso seco médio das folhas totais dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros sozinhos e os sobreiros dominantes da combinação intraespecífica não apresentam massa de folhas total significativamente diferentes entre si. Os sobreiros dominados da combinação intraespecífica e os sobreiros da combinação interespecífica também não apresentam massa de folhas total significativamente diferentes entre si. No entanto, estas são significativamente menores do que as anteriores.

Folhas novas

Pela Figura 17 é possível observar que a massa de folhas novas dos pinheiros mansos sozinhos e dos da combinação interespecífica não diferem significativamente entre si. A massa de folhas novas dos pinheiros mansos da combinação intraespecífica também não diferem entre si. Porém, estes são significativamente menores que os anteriores.

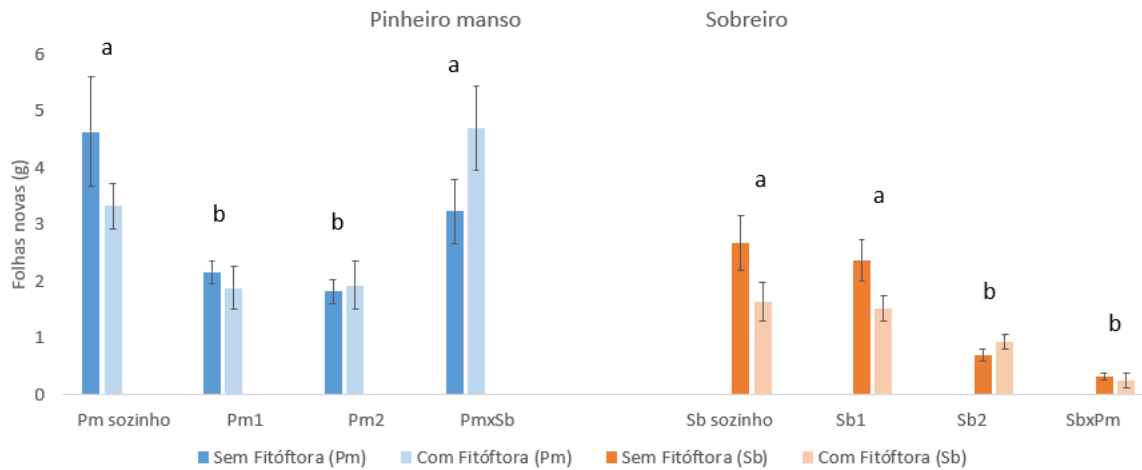


Figura 17 - Peso seco médio das folhas novas dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros sozinhos e os sobreiros dominantes da combinação intraespecífica não diferem significativamente entre si quanto à massa de folhas novas e são significativamente maiores do que os sobreiros dominados da combinação intraespecífica e os sobreiros da combinação interespecífica. A massa de folhas novas destes dois últimos sobreiros referidos não diferem significativamente entre si.

Proporção de folhas novas em relação ao total

Através da Figura 18 observa-se que as várias combinações de pinheiro manso não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à proporção de folhas novas em relação à massa de folhas total.

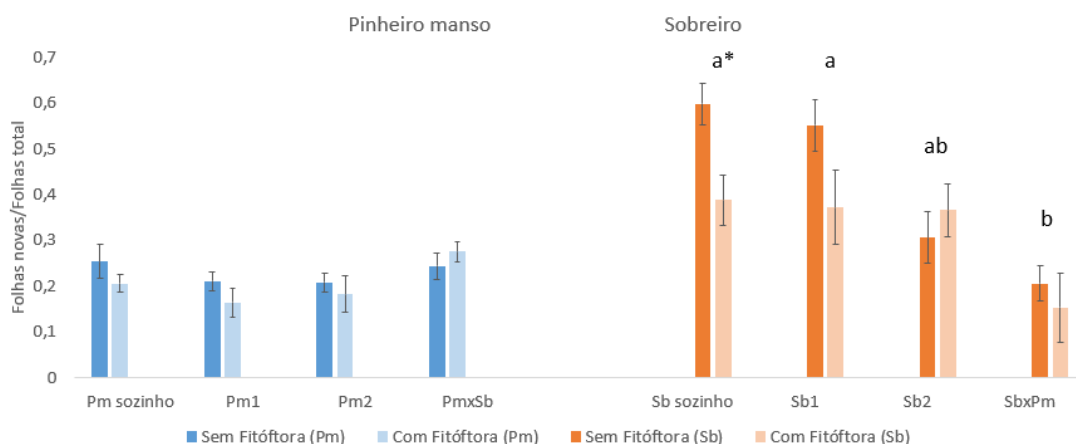


Figura 18 - Média da razão entre o peso seco das folhas novas e o peso seco das folhas totais dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Existem diferenças significativas entre os sobreiros sozinhos com e sem tratamento. A proporção de folhas novas é significativamente maior nos sobreiros sozinhos sem tratamento quando comparada com a dos sobreiros sozinhos com tratamento.

Os sobreiros sozinhos não apresentam diferenças significativas com os sobreiros da combinação intraespecífica, porém, apresentam diferenças significativas com os sobreiros da mistura interespecífica.

Número de ramificações

Não existe diferenças significativas entre o número de ramificações dos pinheiros mansos sozinhos e dos pinheiros mansos da combinação interespecífica (Figura 19). Também não existe diferenças significativas entre os pinheiros mansos da combinação intraespecífica. O número de ramificações dos pinheiros mansos sozinhos é significativamente superior ao dos pinheiros mansos da combinação intraespecífica. O número de ramificações dos pinheiros mansos da combinação interespecífica não difere significativamente dos pinheiros mansos dominantes da combinação intraespecífica, mas difere significativamente dos pinheiros mansos dominados. O número de ramificações dos pinheiros mansos da combinação interespecífica tratados com fitóftora são significativamente superiores aos não inoculados com o agente patogénico.

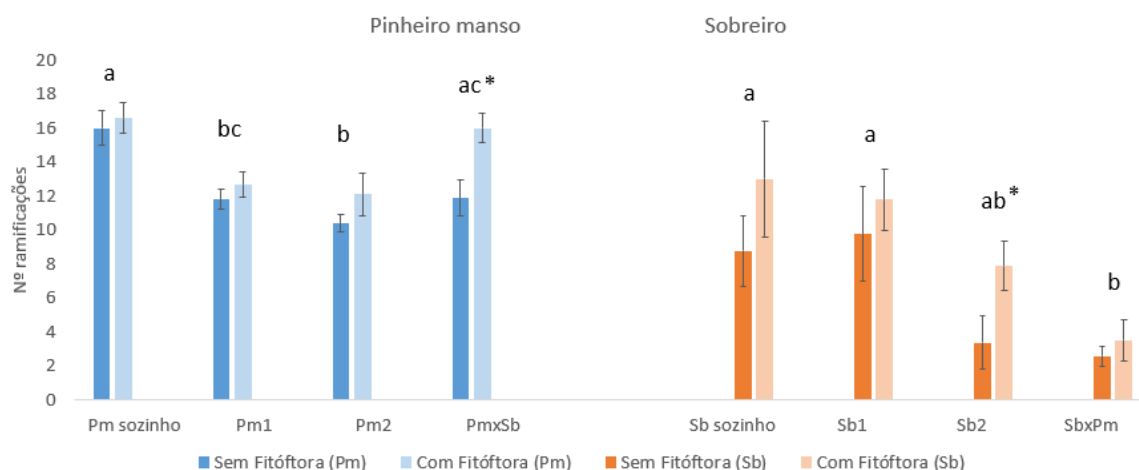


Figura 19 - Número de ramificações dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros sozinhos apresentam número de ramificações significativamente maiores do que os dos sobreiros da combinação interespecífica. Não existe diferença significativa entre o número de ramificações de ambos os sobreiros da combinação intraespecífica nem entre estes e os dos sobreiros

sozinhos. O número de ramificações dos sobreiros da combinação interespecífica difere significativamente dos sobreiros dominantes da combinação intraespecífica, mas não dos sobreiros dominados. O número de ramificações dos sobreiros dominados da combinação intraespecífica tratados com fitóftora são significativamente superiores aos não inoculados com o agente patogénico.

Biomassa radicular

Raiz total

Os pinheiros mansos sozinhos são os que apresentam o maior valor de peso seco da raiz total, e são significativamente maiores do que as restantes combinações de pinheiro manso (Figura 20). Os valores de peso seco da raiz total de ambos os pinheiros mansos da combinação intraespecífica não diferem entre si, e são significativamente inferiores aos das restantes combinações. Os pinheiros mansos da combinação interespecífica apresentam valores de peso seco da raiz total significativamente inferiores aos dos pinheiros mansos sozinhos e, significativamente superiores aos pinheiros mansos da combinação intraespecífica. Existe diferença significativa entre tratamentos nos pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica. Os que foram tratados com fitóftora apresentam peso seco da raiz total significativamente maior do que os que não foram inoculados com o agente patogénico.

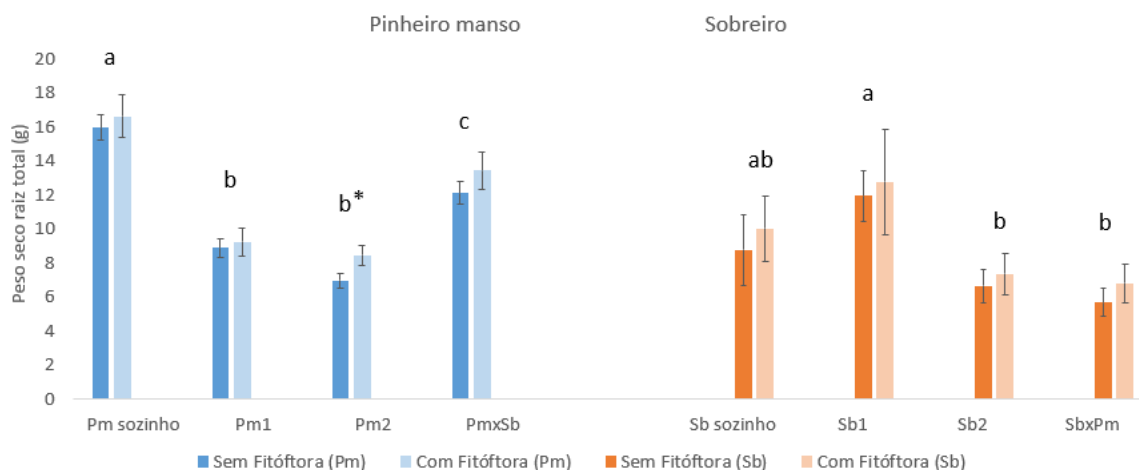


Figura 20 - Peso seco médio da raiz total dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Não existe diferença significativa entre o peso seco da raiz total dos sobreiros sozinhos e o das restantes combinações de sobreiro. O peso seco da raiz total dos sobreiros dominantes da combinação

intraespecífica é significativamente maior do que o dos sobreiros dominados da combinação intraespecífica e o dos sobreiros da combinação interespecífica. Os sobreiros dominados da combinação intraespecífica e os sobreiros da combinação interespecífica não apresentam peso seco da raiz total significativamente diferentes entre si.

Raiz principal

Constata-se, através da Figura 21, que o peso seco de raiz principal dos pinheiros mansos sozinhos é significativamente maior do que o dos pinheiros mansos da combinação intraespecífica, mas não difere do peso seco dos pinheiros mansos da combinação interespecífica. Os pesos secos de raiz principal de ambos os pinheiros mansos da combinação intraespecífica não diferem entre si. Os pinheiros mansos da combinação interespecífica apresentam um peso seco de raiz principal significativamente maior do que o dos pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica, mas não diferem significativamente do peso seco dos pinheiros mansos dominantes. Os pinheiros mansos sozinhos não inoculados com fitóftora apresentam um peso seco de raiz principal significativamente maior do que os pinheiros mansos sozinhos tratados com fitóftora.

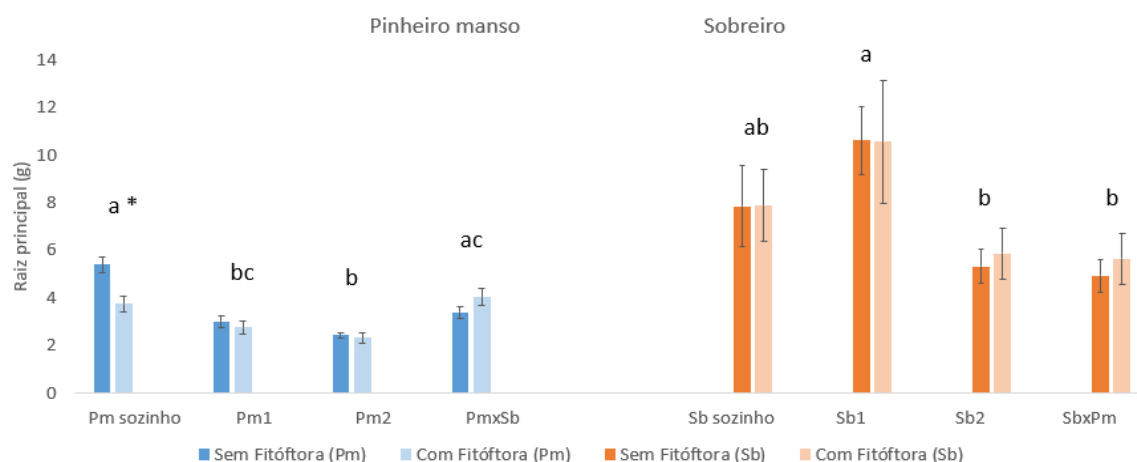


Figura 21 - Peso seco médio da raiz principal dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros sozinhos não apresentam diferenças significativas entre pesos secos de raiz principal com as restantes combinações de sobreiro. O peso seco de raiz principal dos sobreiros dominantes da combinação intraespecífica é significativamente maior do que o dos sobreiros dominados da combinação intraespecífica e o dos sobreiros da combinação interespecífica. Os sobreiros dominados da combinação intraespecífica e os sobreiros da combinação interespecífica não apresentam pesos secos de raiz principal significativamente diferentes entre si.

Raízes finas

Os pinheiros mansos sozinhos apresentam um peso seco de raízes finas significativamente maior do que as restantes combinações de pinheiro manso (Figura 22). O peso seco de raízes finas de ambos os pinheiros mansos da combinação intraespecífica não apresentam diferenças significativas entre si e são os que apresentam os valores mais baixos. Existe uma diferença significativa entre tratamentos nos pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica. Os que foram tratados com fitóftora apresentam um peso seco de raízes finas significativamente maior do que os que não foram inoculados com o agente patogénico. Os pinheiros mansos da combinação interespecífica apresentam peso seco de raízes finas significativamente inferior ao dos pinheiros mansos sozinhos, e significativamente superior ao dos pinheiros mansos da combinação intraespecífica.

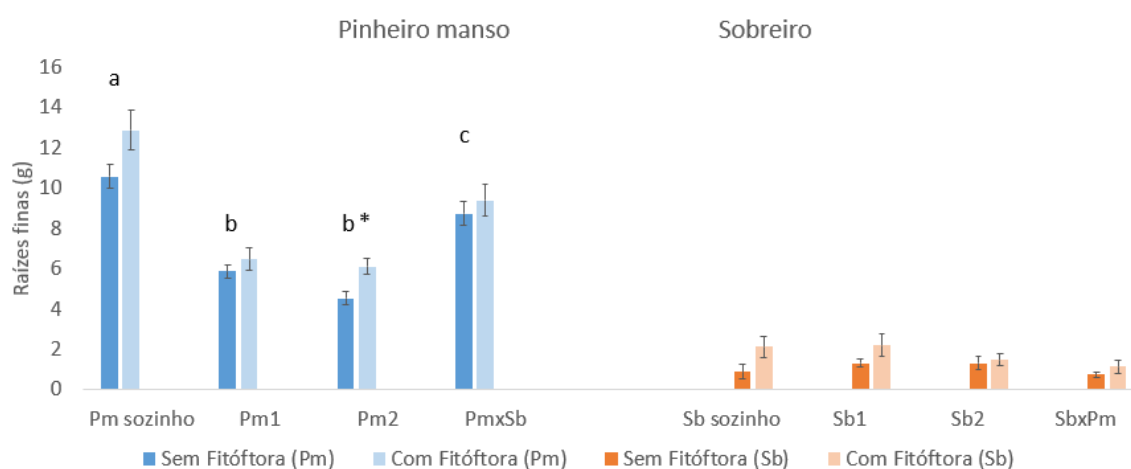


Figura 22 - Peso seco médio das raízes finas dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Os sobreiros não apresentaram quaisquer diferenças significativas entre si para todas as combinações. Os seus valores de peso seco de raízes finas são sempre menores do que os dos pinheiros mansos.

Razão Raízes finas/Raiz principal

Observa-se através da Figura 23 que tanto os pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica como os pinheiros mansos da combinação interespecífica, não diferem significativamente entre si, nem com as restantes combinações de pinheiro manso, quanto à proporção entre raízes finas e raiz principal. No entanto, existe diferença significativa na razão entre

raízes finas e raiz principal dos pinheiros mansos sozinhos, que é maior, e dos pinheiros mansos dominantes da combinação intraespecífica, que é logicamente menor. Existem diferenças significativas entre tratamentos nos pinheiros mansos sozinhos e nos pinheiros mansos dominados da combinação intraespecífica, nos quais os pinheiros mansos tratados com fitóftora apresentam um maior valor na razão entre raízes finas e raiz principal do que os pinheiros mansos que não foram inoculados com o agente patogénico.

Não se verificam quaisquer diferenças significativas entre as várias combinações de sobreiro.

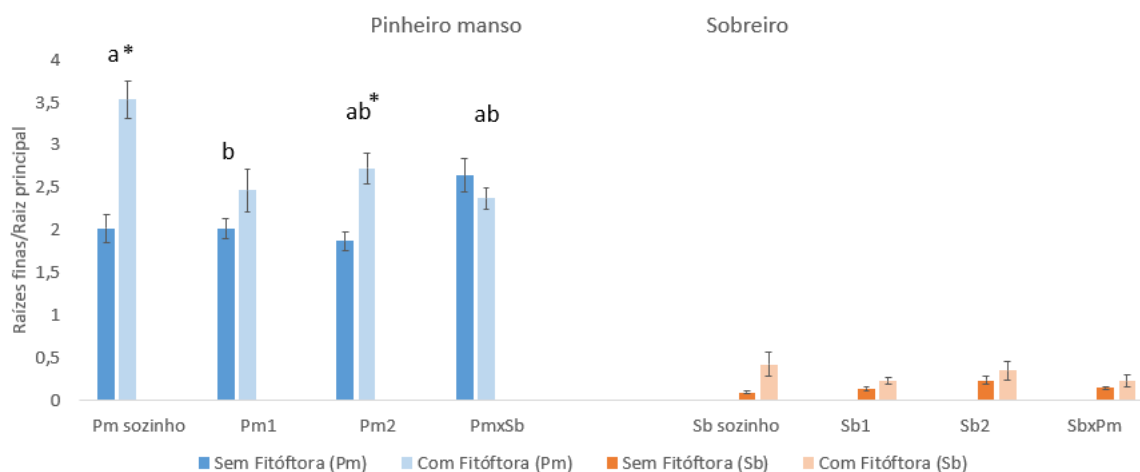


Figura 23 - Média da razão entre o peso seco das raízes finas e o peso seco da raiz principal dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Observa-se que os sobreiros apresentam uma razão entre raízes finas e raiz principal inferior a 1, ao contrário dos pinheiros mansos que apresentam uma razão superior a 1. Ou seja, os sobreiros têm uma maior proporção de raiz principal, e os pinheiros mansos uma maior proporção de raízes finas.

Razão Parte radicular/Parte aérea

Na Figura 24 observa-se, em todas as combinações, que os pinheiros mansos investiram maioritariamente na produção de biomassa da parte aérea (root/shoot < 1), ao contrário dos sobreiros, que investiram maioritariamente na produção de biomassa da parte radicular (root/shoot > 1).

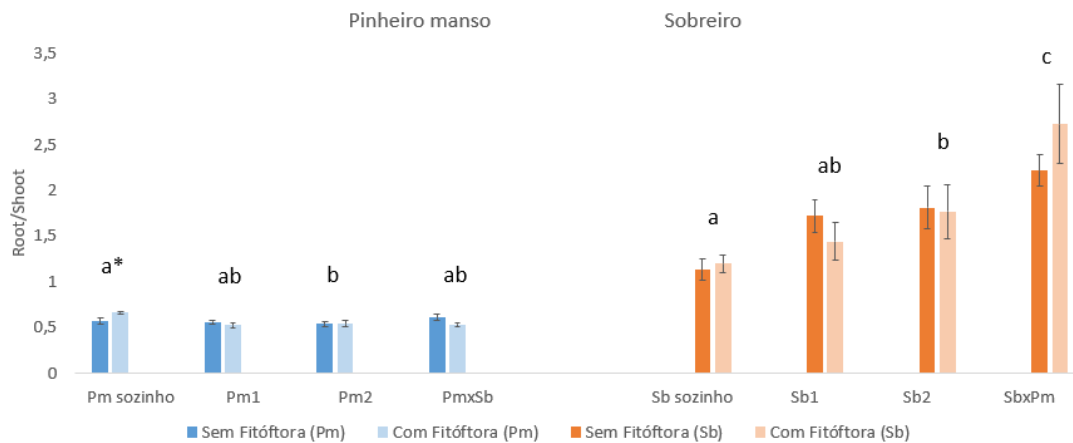


Figura 24 - Média da razão entre o peso seco da parte radicular e a parte aérea dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

Existe diferença significativa entre os pinheiros mansos sozinhos e os pinheiros dominados da combinação intraespecífica. Os pinheiros mansos sozinhos tratados com fitóftora apresentam uma razão parte radicular/parte aérea significativamente maior do que os pinheiros mansos sozinhos não inoculados com fitóftora.

A proporção entre a parte radicular e parte aérea, no sobreiro da mistura interespecífica, é significativamente maior relativamente à das restantes combinações de sobreiro.

MODELO PARA DETERMINAÇÃO DA ÁREA FOLIAR BASEADO EM AMOSTRAS NÃO DESTRUTIVAS

O abate das plantas no final da experiência constituiu uma oportunidade de trabalhar, no âmbito desta tese, um modelo para determinação da área foliar baseado em amostras não destrutivas. Neste estudo foi testada a possibilidade de utilizar fotografias de perfil, recolhidas imediatamente antes do abate, e o seu processamento num *software* de análise de imagem (Winscanopy, Regent Ca). Os dados da área foliar calculados por amostragem destrutiva e usando o método indireto encontram-se nas Figura 25 e Figura 26 para o pinheiro manso e sobreiro, respetivamente. Obtiveram-se os dados da área foliar pelo método direto multiplicando a área foliar específica (AFE) pela biomassa de folhas total. A AFE foi calculada através da razão entre a área da amostra de folhas novas e a biomassa da amostra de folhas novas.

Em traços gerais observa-se que valores de área foliar obtidos por amostragem destrutiva

foram superiores aos obtidos pelo método indireto. Isto prende-se com o facto das folhas estarem sobrepostas na fotografia e, por conseguinte, a quantidade de massa medida ser inferior àquela que se mede de forma destrutiva. Ultrapassa-se esta questão realizando várias fotografias de perfil, tendo-se neste caso utilizado duas, o recomendado pelo *software*.

Por exemplo, no caso do pinheiro manso, o valor de área foliar obtido por amostragem destrutiva é, em média, cerca de 1,4 vezes superior ao do valor obtido pelo método indireto e no caso do sobreiro de 1,7. Tendo em consideração o formato das folhas de cada espécie, e a orientação destas, seria expectável que o valor de área foliar obtido por amostragem destrutiva relativamente ao valor de área foliar obtido pelo método indireto do sobreiro fosse maior que o do pinheiro manso.

Obeve-se, para o pinheiro manso, $R^2 = 0,7595$, ou seja, cerca de 76% da variabilidade observada na área foliar da amostragem destrutiva é explicada pela reta de regressão (Figura 25). A área foliar específica (AFE) para esta espécie foi $35,23 \pm 0,44 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ sem diferenças entre combinações de espécies.

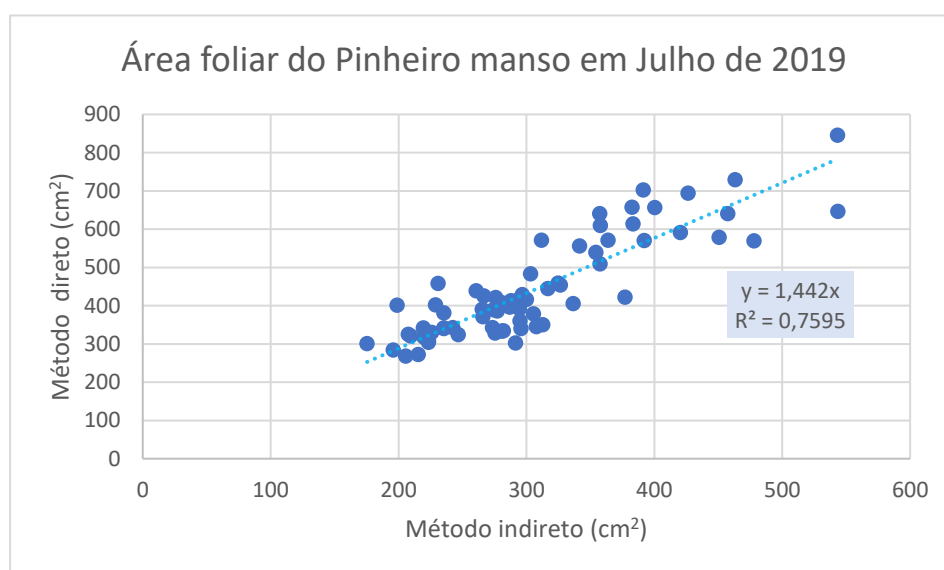


Figura 25 - Gráfico de dispersão entre área foliar obtida por amostragem destrutiva e área foliar obtida com as fotografias de perfil + *software* WINSCANOPY (método indireto), no pinheiro manso.

No caso do sobreiro, $R^2 = 0,8597$, ou seja, cerca de 86% da variabilidade observada na área foliar da amostragem destrutiva é explicada pela reta de regressão (Figura 26). A sua área foliar específica foi $67,11 \pm 1,54 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ sem diferenças entre combinações de espécies.

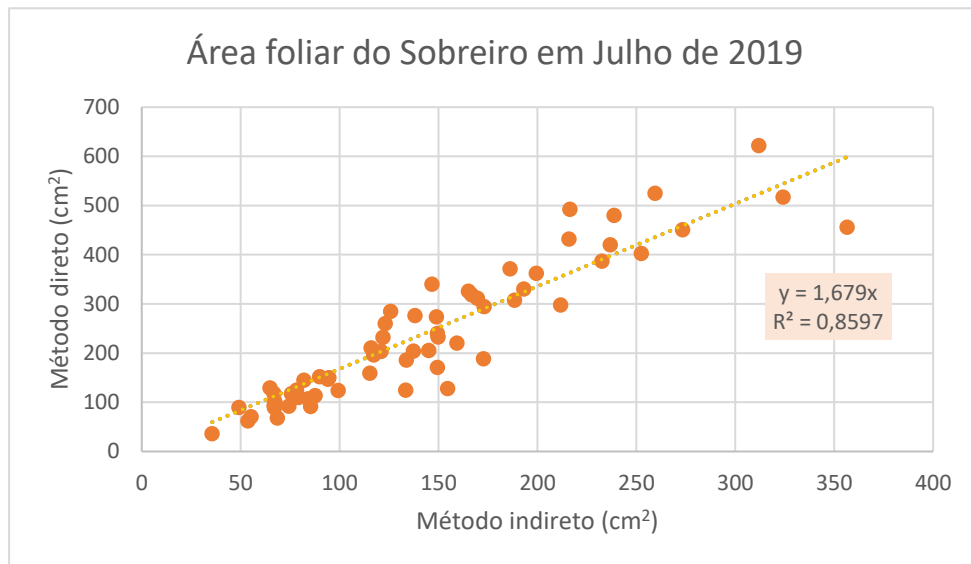


Figura 26 - Gráfico de dispersão entre área foliar obtida por amostragem destrutiva e área foliar obtida com as fotografias de perfil + *software* WINSCANOPY (método indireto), no sobreiro.

Quanto ao valor médio da área foliar total, existem diferenças significativas entre todas as combinações de pinheiro manso, enquanto nas combinações de sobreiro, não se verifica qualquer diferença significativa entre elas.

Os pinheiros manso sozinhos são os que apresentam maior área foliar total, seguidos dos pinheiros manso misturados com sobreiro, dos pinheiros manso dominantes em mistura intraespecífica e dos pinheiros manso dominados da mistura intraespecífica (Figura 27). Nos pinheiros manso dominados em mistura intraespecífica, verificou-se a existência de diferenças significativas entre tratamentos, sendo que nos vasos inoculados com *P. cinnamomi* a área foliar total é significativamente maior do que os vasos controlo.

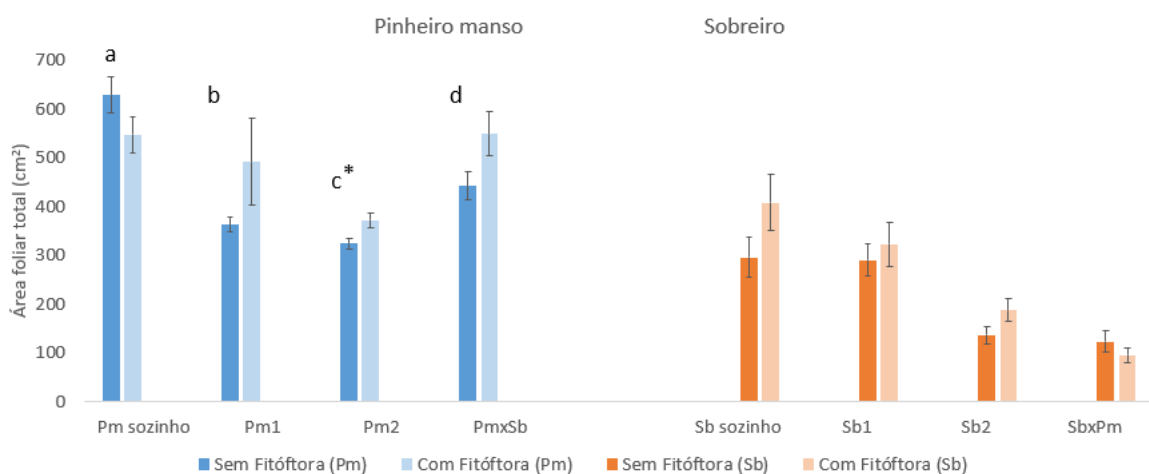


Figura 27 - Média da área foliar total dos pinheiros mansos, em azul, e dos sobreiros, em laranja, nas várias combinações, com e sem *P. cinnamomi*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre combinações. O asterisco indica diferenças significativas entre tratamentos. As linhas verticais pretas representam o respetivo erro padrão.

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

QUE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DISTINGUEM O SOBREIRO DO PINHEIRO MANSO?

O pinheiro manso e o sobreiro são duas espécies com estratégias de crescimento muito distintas. Uma das características mais evidentes é a formação, por parte do sobreiro, de uma raiz vertical lenhificada do tipo apumada (Correia *et al.*, 2018) bastante evidente logo nos estágios iniciais do desenvolvimento.

À custa das reservas existentes na bolota, o sobreiro investe inicialmente no desenvolvimento de um sistema radicular profundante mas produzindo poucas folhas daí o elevado rácio raiz/parte aérea. Isto confere-lhe capacidade para atingir rapidamente horizontes mais profundos do solo trazendo-lhe vantagem em condições de deficiência hídrica e quando a água no solo se encontra em horizontes mais profundos. Assim que a raiz do sobreiro atinge o lençol freático, em idades mais avançadas, este encontra-se em vantagem sobre outras espécies que não são capazes de obter uma fonte de água durante os períodos de verão, quando os níveis do lençol baixam consideravelmente.

O pinheiro manso caracteriza-se por desenvolver um sistema radicular do tipo apumado, mais ramificado lateralmente e bastante mais denso, com uma elevada quantidade de raízes finas (rácio raízes finas/raiz total de 0.662). Estas raízes finas são as que mais contribuem para a absorção de água e nutrientes e, por isso, nestes estágios iniciais de desenvolvimento claramente o pinheiro manso está em vantagem. Além disso, após o abate das plantas, observou-se que o pinheiro manso desenvolve associações micorrízicas muito facilmente visíveis a olho nu (devido à sua estrutura dicotómica) o que lhes confere maior vantagem face aos sobreiros. Os valores de biomassa de pinheiros mansos crescendo em vaso com um ano e meio são mais do dobro dos sobreiros (42.89g e 17.32g respetivamente, nos vasos individuais). Esta biomassa encontra-se sobretudo na parte aérea, nas agulhas, o que significa que o pinheiro manso rapidamente ensombrará outras plantas que se encontrem na sua vizinhança. Nos sobreiros a biomassa total encontra-se maioritariamente no sistema radicular, sobretudo na raiz principal.

QUAL O IMPACTE DA FITÓFTORA NO CRESCIMENTO DAS PLANTAS?

De um modo geral, não se observaram diferenças nos acréscimos em altura por dia entre as

plantas controle e as plantas inoculadas com fitóftora ao longo do tempo. Também não foram visíveis danos relevantes nas folhas, na vitalidade das plantas nem em mortalidade (apenas 1 sobreiro morreu em todo o ensaio). No final do estudo, e como resultados dos abates das plantas, a inoculação com o agente patogénico não causou qualquer efeito significativo nas biomassas aérea ou radicular.

Embora as diferenças significativas tenham ocorrido apenas em algumas combinações de sobreiro e pinheiro manso, observa-se em todas as combinações maior número de ramificações, biomassa de raiz total e biomassa de raízes finas nos vasos inoculados com fitóftora.

Quanto à biomassa de raízes finas, apenas nos pinheiros mansos dominados da mistura intraespecífica, se verificou diferenças significativas entre os vasos controle e os vasos inoculados com fitóftora, sendo que estes últimos apresentaram maior biomassa de raízes finas relativamente aos vasos controle. Os dados parecem indicar que as inoculações foram bem sucedidas e que o agente patogénico infetou as plantas, mas que estas recuperaram dessa infeção. Uma maior produção de raízes finas em resposta à destruição dos tecidos do sistema radicular é coerente com outros estudos realizados anteriormente (Hansen and Sutton, 1999; Camilo-Alves *et al.*, 2013). Os valores de biomassa de raiz total superiores nos vasos tratados com fitóftora devem-se à biomassa de raízes finas.

Quanto ao número de ramificações dos vasos inoculados com fitóftora, estes foram significativamente superiores aos dos vasos controle nos pinheiros mansos da combinação interespecífica e nos sobreiros dominados da mistura intraespecífica. Embora não tenha sido encontrada qualquer referência associada à *P. cinnamomi*, num artigo de revisão, Jung *et al.* (2018) menciona a proliferação de rebentação epicórnica em caules e ramos das espécies arbóreas *Nothofagus obliqua* e *N. aplina*, associados à desfolha da copa, emurchecimento e morte dos ramos provocados por *Phytophthora pseudosyringae*. O mesmo autor menciona ainda a morte dos ramos em sobreiros, provocados pela *P. cinnamomi*. Embora não se tenham observado os sintomas anteriormente descritos nos sobreiros e nos pinheiros mansos, similarmente ao que acontece com as raízes finas, as plantas poderão ter produzido um maior número de ramos novos como resposta à presença de *P. cinnamomi*.

Neste estudo verificou-se que o efeito da mistura entre espécies se sobrepôs claramente ao do tratamento com fitóftora, tema que a seguir se aprofunda para cada uma das combinações.

QUE INTERAÇÕES ECOLÓGICAS PREDOMINAM ENTRE O SOBREIRO E O PINHEIRO MANSO?

Os resultados da biomassa total, biomassa de folhas total, biomassa de folhas novas, biomassa de raiz total e biomassa de raiz principal sugerem que existe competição intraespecífica nos pinheiros mansos, uma vez que estas variáveis apresentam valores inferiores aos dos pinheiros mansos crescendo sozinhos. Não se verifica dominância de um pinheiro em relação ao outro.

Para as mesmas variáveis, mas para o sobreiro, nas misturas intraespecíficas parece haver um que se torna dominante em relação ao outro, indicando assim uma aparente relação de competição, na qual o sobreiro dominante parece ter um efeito inibidor sobre o sobreiro dominado. Este resultado já havia sido referenciado num trabalho anterior (Correia *et al.*, 2018).

De um modo geral, os resultados para a biomassa parecem indicar que não existem diferenças significativas entre os pinheiros mansos crescendo sozinhos e os pinheiros mansos misturados com sobreiro. Estes resultados parecem indicar que o sobreiro não exerceu qualquer influência sobre o crescimento do pinheiro manso. Porém, o sobreiro sofreu com a presença do pinheiro como veremos a seguir.

Os sobreiros sozinhos e os sobreiros dominantes não apresentam diferenças significativas entre si para a biomassa total, biomassa folhas total, biomassa de folhas novas, proporção de folhas novas em relação ao total, número de ramificações, biomassa de raiz total, biomassa de raiz principal, biomassa de raízes finas e proporção de raízes finas/raiz principal. Da mesma forma os sobreiros dominados e os sobreiros misturados com pinheiro manso não apresentam diferenças significativas entre si em todos os parâmetros analisados exceto no rácio raiz total/parte aérea, onde os sobreiros misturados com pinheiro manso apresentam um rácio maior.

Estes resultados parecem indicar que o sobreiro tem um melhor desempenho quando isolado, independentemente da espécie. Quer esteja na presença de um indivíduo da mesma espécie ou de um pinheiro manso, o sobreiro mostra-se menos desenvolvido (ao nível da produção de biomassa) do que quando se encontra isolado. No ensaio experimental realizado por Correia *et al.* (2018) onde foram realizados abates de plantas de sobreiro com 4, 8 e 11 meses, apenas nas de 11 meses se verificou que as plantas sozinhas foram mais produtivas do que nas restantes combinações.

MAIOR RAIZ/PARTE AÉREA NO SOBREIRO MISTURADO COM O PINHEIRO MANSO. QUAIS AS VANTAGENS?

O sobreiro é uma espécie que se caracteriza por investir maioritariamente no sistema radicular nas primeiras idades, tal como se pode observar na Figura 24. Nas quatro combinações, a biomassa da raiz de sobreiro foi sempre superior à da parte aérea. Muito embora a produção de biomassa do sobreiro seja muito inferior quando misturado com o pinheiro manso, a biomassa da raiz é cerca de duas vezes e meia superior à biomassa da parte aérea.

Embora não tenha sido possível investigar neste trabalho o mecanismo que está na origem desta resposta, levantam-se algumas hipóteses. A primeira poderá estar relacionada com a forte competição que o pinheiro exerce sobre o crescimento aéreo do sobreiro (competição pela luz), mais do que o radicular uma vez que as raízes das duas espécies exploram zonas diferentes no vaso (Kjær *et al.* 2013).

Porém, a manutenção de uma elevada proporção de biomassa radicular para uma tão reduzida biomassa foliar por parte do sobreiro, parece sugerir algum efeito positivo do pinheiro manso sobre a manutenção e produção de novas raízes eventualmente relacionado com a síntese de elementos químicos com características alelopáticas, ou exsudados radiculares produzidos pela exuberante micorrização do pinheiro eventualmente permitindo uma maior eficiência de conversão de fotoassimilados em matéria seca radicular (Fernandez *et al.*, 2016).

A aparente competição que o pinheiro manso exerce sobre o sobreiro, com uma redução da biomassa aérea vs a radicular, poderá conferir-lhe vantagens em condições ambientais adversas. Ramírez-Valiente *et al.* (2018) sugere que um maior investimento relativo na parte radicular promove um bom estado fisiológico, aumentando assim a probabilidade de sobrevivência sob condições de *secura*.

PODEMOS MISTURAR AS DUAS ESPÉCIES? SUGESTÃO DE GESTÃO NO TERRENO

São reconhecidas diversas vantagens na condução de povoamentos mistos, nomeadamente, menor suscetibilidade a ataque de pragas ou doenças, maior capacidade de resiliência a situações adversas (por exemplo: ventos fortes ou fogos), diferentes produções e por isso fontes de rendimento

diferenciadas, entre outros (Jactel *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2018).

Numa hipotética aproximação para condições de campo, os sobreiros crescendo no sobcoberto de pinheiros mansos, poderão apresentar porte reduzido, pouca biomassa foliar, mas apresentar um sistema radicular bem desenvolvido e eficiente. Isto poderá traduzir-se num melhor estado fisiológico, o que poderá conferir-lhe maiores taxas de sobrevivência sob condições de stress hídrico (Ramírez-Valiente *et al.*, 2018). A evolução de um povoamento misto de sobreiro com pinheiro manso num sistema de elevada densidade, sugere que o sobreiro, numa fase inicial, poderá beneficiar da presença do pinheiro manso, do seu ensombramento e elevada capacidade de micorrização. Porém, o pinheiro manso é uma espécie que cresce significativamente mais rápido do que o sobreiro, sobrepondo-se rapidamente a este em termos de altura e volume. Numa fase posterior, conforme o sobreiro se vai desenvolvendo, as suas necessidades de água, luz e nutrientes aumentam. Consequentemente a fotossíntese e a sua capacidade de produção de fotoassimilados são afetados. A competição que se gera pelos recursos naturais disponíveis, não permitem ao sobreiro crescer plenamente e atingir o porte necessário para, por exemplo, produzir cortiça. Será necessária uma silvicultura muito atenta e realizar o desbaste do pinheiro manso assim que se observe competição aérea (mesmo que do radicular possa não existir), de forma a diminuir competição pelos recursos ambientais. Esta ação irá promover a produtividade e vigor das restantes árvores.

APLICABILIDADE DO MÉTODO INDIRETO PARA A MEDIÇÃO DA ÁREA FOLIAR

A área foliar é um parâmetro importante permitindo aferir o potencial de fotossíntese de uma planta, a sua produtividade e assim avaliar o crescimento e vigor da planta. Os elevados coeficientes de correlação dos modelos construídos para o sobreiro e pinheiro manso, indicam que as variáveis resposta (área foliar pelo método direto) e preditora (área foliar pelo método indireto) estão fortemente e positivamente correlacionadas. O modelo criado para cada uma das espécies permite calcular a área foliar das plantas sem que estas sejam destruídas.

Este método pode constituir uma mais valia em viveiros florestais, permitindo selecionar as plantas com maiores índices de área foliar e produtividade. Claro que teriam de ser construídos os respetivos modelos para cada espécie. Em povoamentos adultos, este método também poderia constituir uma mais valia, embora se reconheça a complexidade de criar um ambiente de luminosidade controlada. A avaliação do índice de área foliar e produtividade permitiria a realização de uma gestão

mais direcionada e adequada ao povoamento, por exemplo para avaliação de graus de desfolha. Embora este método não tenha sido projetado para árvores adultas, com as respectivas adaptações, o seu potencial deverá ser tido em consideração.

RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

De seguida compilam-se algumas notas que decorreram do trabalho realizado e resumem-se alguns apontamentos que deverão ser acautelados em futuros trabalhos que envolvam a mistura de espécies no mesmo vaso ou experiências com *P. cinnamomi*. Servem sobretudo de recomendação para futuros ensaios experimentais semelhantes:

- Ao longo do ensaio experimental surgiram afídeos. Estes insetos alimentam-se da seiva da planta e produzem uma substância (melada) que impede as trocas gasosas entre a planta e o meio exterior, e consequentemente a fotossíntese. De modo a diminuir o seu efeito, e durante as medições mensais nas quais se observou a presença desta praga, aplicou-se uma mistura de água e sabão nas folhas afetadas. Embora este não fosse um método definitivo, permitiu eliminar temporariamente os afídeos e a melada.
- O substrato utilizado no ensaio experimental não foi o mais indicado para esta experiência com fitóftora. A proporção de areia e turfa foi pensada de modo facilitar a observação do sistema radicular das plantas no final do ensaio. No entanto, a elevada percentagem de areia poderá não ter permitido que o teor de água fosse o suficiente para que a infeção das plantas ocorresse devido à elevada permeabilidade da areia. Existe um teor mínimo de humidade a partir do qual o agente patogénico não tem capacidade para causar danos (Homet *et al.*, 2019). A utilização de um substrato com um maior teor de argila, com maior capacidade de retenção da água poderá ser o mais indicado para uma mais eficiente infeção da fitóftora na planta. Porém, poderá perder-se rigor na amostragem radicular.
- Após a instalação da fitóftora e consequente destruição dos tecidos do sistema radicular, o sobreiro reage produzindo novas raízes. Geralmente, são necessários vários anos desde a infeção provocada pelo agente patogénico até que ocorra a morte dos sobreiros. Para controlar totalmente este processo teria de ser necessário considerar prolongar a duração do estudo, e consequentemente o tamanho dos vasos, de forma a ocorrer o período necessário para se observarem lesões nas plantas.

CONCLUSÕES

Este estudo não permitiu responder à questão inicialmente colocada: Qual a resposta do sobreiro e do pinheiro manso à infeção com fitóftora quando estes crescem em situação de competição intra e interespecífica? O facto de as plantas crescerem em condições ótimas (de água e nutrientes) deverão ter sido as causas da recuperação excelente das plantas pós-inoculação e consequentemente da ausência de resultados mais expressivos. Sumarizam-se por isso algumas sugestões para trabalhos futuros.

Foi, contudo, possível observar as interações ecológicas predominantes entre o sobreiro e o pinheiro manso crescendo em diversas combinações inter e intraespecíficas e em vaso durante 18 meses. Conseguiu-se também obter um modelo que permite aferir a área foliar das plantas através de um método indireto expedito que poderá ter várias aplicações no domínio dos estudos de crescimento de plantas em vaso.

Estudos que relacionem as interações ecológicas entre espécies sob ação de fatores bióticos e abióticos tornam-se cada vez mais importantes num contexto de alterações climáticas. Estes permitem suportar e apoiar a recomendação de medidas de gestão florestal mais adequadas para os diversos fins a que se propõem.

Referências bibliográficas

Brasier, C. M. (1996) '*Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change', *Annales des Sciences Forestieres*, 53(2–3), pp. 347–358. doi: 10.1051/forest:19960217.

Camilo-Alves, C. S. P., Clara, M. I. E., Ribeiro, N. M. C. A. (2013) 'Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: A review', *European Journal of Forest Research*, 132(3), pp. 411–432. doi: 10.1007/s10342-013-0688-z.

Carneiro, A., N., d'Alpuim, M. S. H., Carvalho, M. A. V. (2007) 'Manual Ilustrado de Enxertia do Pinheiro Manso'. Estação Florestal Nacional.

Correia, A. C., Galla, A., Nunes, A., Pereira, J. S. (2018) 'Ecological Interactions between Cork Oak (*Quercus suber* L.) and Stone Pine (*Pinus pinea* L.): Results from a Pot Experiment', *FORESTS*, 9(9). doi: 10.3390/f9090534.

Dunstan, W. A., Rudman, T., Shearer B. L., Moore, N. A., Paap, T., Calver, M. C., Dell, B., Hardy, G. E. S. J. (2010) 'Containment and spot eradication of a highly destructive, invasive plant pathogen (*Phytophthora cinnamomi*) in natural ecosystems', *Biological Invasions*, 12(4), pp. 913–925. doi: 10.1007/s10530-009-9512-6.

Fernandez, C., Monnier, Y., Santonja, M., Gallet, C., Weston, L. A., Prévosto, B., Saunier, A., Baldy, V., Bousquet-Mélou, A. (2016) 'The Impact of Competition and Allelopathy on the Trade-Off between Plant Defense and Growth in Two Contrasting Tree Species', *Frontiers in Plant Science*, 7(May), pp. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2016.00594.

Gómez, M. C., González, M., Gómez-Aparicio, L., Serrano, M. S. (2020) 'Coexistent Mediterranean woody species as a driving factor of *Phytophthora cinnamomi* infectivity and survival', *Annals of Applied Biology*, (April), pp. 1–10. doi: 10.1111/aab.12599.

Homet, P., González, M., Matías, L., Godoy, O., Pérez-Ramos, I. M., García, L. V., Gómez-Aparicio, L. (2019) 'Exploring interactive effects of climate change and exotic pathogens on *Quercus suber* performance: Damage caused by *Phytophthora cinnamomi* varies across contrasting scenarios of soil moisture', *Agricultural and Forest Meteorology*. Elsevier, 276–277(March), p. 107605. doi: 10.1016/j.agrformet.2019.06.004.

Jactel, H., Nicoll, B. C., Branco, M., Gonzalez-Olabarria, J. R., Grodzki, W., Långström, B., Moreira, F., Netherer, S., Orazio, C., Piou, D., Santos, H., Schelhaas, M. J., Tojic, K., Vodde, F. (2009) 'The influences

of forest stand management on biotic and abiotic risks of damage', *Annals of Forest Science*, 66(7), pp. 1–18. doi: 10.1051/forest/2009054.

Jung, T., Pérez-Sierra, A., Durán, A., Jung, M. H., Balci, Y., Scanu, B. (2018) 'Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands', *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40, pp. 182–220. doi: 10.3767/persoonia.2018.40.08.

Kiær, L. P., Weisbach, A. N., Weiner, J. (2013) 'Root and shoot competition: A meta-analysis', *Journal of Ecology*, 101(5), pp. 1298–1312. doi: 10.1111/1365-2745.12129.

Liu, C. L. C., Kuchma, O., Krutovsky, K. V. (2018) 'Mixed-species versus monocultures in plantation forestry: Development, benefits, ecosystem services and perspectives for the future', *Global Ecology and Conservation*. Elsevier Ltd, 15, p. e00419. doi: 10.1016/j.gecco.2018.e00419.

Mateus, M. C., Neves, D., Dacunha, B., Laczko, E., Maia, C., Teixeira, R., Cravador, A. (2016) 'Structure, anti-*Phytophthora* and anti-tumor activities of a nortriterpenoid from the rhizome of *Phlomis purpurea* (Lamiaceae)', *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 131, pp. 158–164. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.09.004.

Moralejo, E., García-Muñoz, J. A., Descals, E. (2009) 'Susceptibility of Iberian trees to *Phytophthora ramorum* and *P. cinnamomi*', *Plant Pathology*, 58(2), pp. 271–283. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01956.x.

Moreira, A. C., Martins, J. M. S. (2005) 'Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal', *Forest Pathology*, 35(3), pp. 145–162. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00397.x.

Moreira, A. C., Silva, F. C., Trindade, M., Gonçalves, M. C., David, T. S., Silva, C. S., Cardillo, E. (2018) 'Gestão e Prevenção de Áreas de Montado com Fitóftora', INIAV I. P., p. 13.

Moreira, A., Ferraz, J., Clegg, J., 1999. The involvement of *Phytophthora cinnamomi* incork and holm oak decline in Portugal. In: First Int. Meeting on *Phytophthoras* in Forest and Wildland Ecosystems Grand Pass, OR, USA

Mutke, S., Calama, R., González-Martínez S. C., Montero, G., Gordo, F.J., Bono, D. and Gil, L. (2012) 'Mediterranean stone pine: Botany and horticulture', in J. Janick (Ed.) *Horticultural Reviews*, vol 39. pp. 153-202. doi: 10.1002/9781118100592.ch4.

Mutke, S., Vendramin, G. G., Fady, B., Bagnoli, F., González-Martínez, S. C. (2019) 'Molecular and Quantitative Genetics of Stone Pine (*Pinus pinea*)', in Nandwani D. (ed.) *Genetic Diversity in Horticultural Plants. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 22. Springer, Cham, pp. 61–84. doi: 10.1007/978-3-319-96454-6_3.

Neves, D. Caetano, P., Oliveira, J., Maia, C., Horta, M., Sousa, N., Salgado, M., Dionísio, L., Magan, N., Cravador, A. (2014) 'Anti-*Phytophthora cinnamomi* activity of *Phlomis purpurea* plant and root extracts', *European Journal of Plant Pathology*, 138(4), pp. 835–846. doi: 10.1007/s10658-013-0357-6.

Pereira, J. S., Bugalho, N. M., Caldeira, M. C. (2008) 'Do sobreiro à cortiça Um sistema sustentável', *Management*, pp. 1–44. Available at: http://www.amorim.com/xms/files/CorticeiraAmorim/Noticias/Do_Sobreiro_a_cortica_um_sistema_sustentavel.pdf.

Ramírez-Valiente, J. A., Aranda, I., Sánchez-Gómez, D., Rodríguez-Calcerrada, J., Valladares, F., Robson, T. M. (2018) 'Increased root investment can explain the higher survival of seedlings of “mesic” *Quercus suber* than “xeric” *Quercus ilex* in sandy soils during a summer drought', *Tree Physiology*, 39(1), pp. 64–75. doi: 10.1093/treephys/tpy084.

Ríos, P., Obregón, S., Haro, A., Fernández-Rebollo, P., Serrano, M. S., Sánchez, M. E. (2016) 'Effect of *Brassica* Biofumigant Amendments on Different Stages of the Life Cycle of *Phytophthora cinnamomi*', *Journal of Phytopathology*, 164(9), pp. 582–594. doi: 10.1111/jph.12482.

Silvestres, D. A. P. F. V. R. (2016) *Regime Jurídico da pinha de pinheiro - manso*. Instituto da Conservação da Floresta e das Natureza.

Trindade, M., Silva, F. C., Moreira, A. C., Gonçalves, M. C., David, T. S., Rodríguez-Molina, M. C., Cardillo, E., Silva, C. S., Santos, G., Ribeiro, D. (2019) 'Prevenção e Gestão de Fitóftora em Viveiros Florestais'.

Viñas, R. A., Caudullo, G., Oliveira, S., Rigo, D. (2016) '*Pinus pinea* in europe: distribution, habitat, usage and threats', in *European Atlas of Forest Tree Species*, pp. 2014–2016.