



Estudo da microbiota associada ao lenho de *Pinus pinaster* afetado pelo nemátode-da-madeira-do-pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) em Portugal

Manuel Joaquim Fonseca Trindade

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Manuel Galvão de Melo e Mota
Arlindo Lima

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Simões Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel Galvão de Melo e Mota, Professor Associado com Agregação da Universidade de Évora

Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

AOS MEUS PAIS

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- ao INIAV, I.P., nas pessoas da Diretora da UEISSAFSV (Amélia Lopes) e da Responsável Técnica pelo Laboratório de Micologia (Helena Bragança) pela autorização e disponibilização dos meios e material necessário para a execução do trabalho.
- ao conjunto de Investigadores que auxiliaram, ou na fase experimental ou no tratamento da informação:
Ana Magro, Arlindo Lima, Eugénio Diogo (Micologia)
Filomena Nóbrega e Eugénio Diogo (Biologia Molecular)
Jorge Cadima (Estatística)
- aos Orientadores deste trabalho pelo contributo para que o mesmo se tornasse possível.

Este Trabalho teve contributo em consumíveis de laboratório ou suporte financeiro para a sua aquisição, proveniente:

- do Projeto FCT PTDC/BIA-MIC/3768/2012, MicroNema – “Análise espacial e temporal das comunidades microbianas na doença do pinheiro”;
- dos Laboratório de Micologia e de Genética Molecular – INIAV, IP;
- do laboratório de Micologia dos Produtos Armazenados – ISA/UL;
- do próprio autor.

...agradeço ainda a um conjunto de AMIGOS, que por o serem, não requerem que aqui seja descrita a sua importância, o que tornaria a minha tarefa difícil, por ter que expressar em palavras, toda a minha gratidão...

“Our lives are not our own. We are bound to others, past and present, and by each crime and every kindness, we birth our future.”

David Mitchell, Cloud Atlas

RESUMO

O pinheiro bravo, *Pinus pinaster*, constitui uma das principais espécies florestais em Portugal ocupando uma área com cerca de 700 mil hectares, valor apenas ultrapassado pelas áreas ocupadas pelo sobreiro e pelo eucalipto, e representa uma elevada importância económica.

A doença da murchidão do pinheiro (DMP), detetada pela primeira vez em Portugal em 1999, é considerada uma das principais doenças que ameaçam o setor florestal, em Portugal e nos países onde foi identificada, pela sua severidade e repercussões económicas e ambientais dela resultantes e, particularmente no nosso país, por *P. pinaster* ser o mais abundante dos hospedeiros suscetíveis à DMP em território nacional.

Várias tem sido as estratégias de investigação adotadas para tentar compreender os mecanismos subjacentes a esta doença e formas de a combater.

A doença envolve um conjunto de interações entre organismos, 3 deles obrigatórios – o nemátode, o seu inseto vetor e a árvore hospedeira e é unânime que bactérias e fungos, apesar de assumirem papel secundário, constituem importantes intervenientes na etiologia da DMP justificando-se a atenção dada a estes dois grupos de microrganismos na investigação da doença.

Serão abordados os aspetos mais importantes relacionados com o endofitismo nomeadamente a definição de endófito, diversidade em *Pinus* spp. bem como a sua importância.

Serão igualmente discutidos os estatutos de endófito, patogénico e saprófita dado que no seu conjunto abarcam a maioria das espécies em comunidades florestais. Será dada especial atenção às espécies de fungos de alguma forma envolvidas na DMP.

Com este trabalho pretende-se conhecer a composição da comunidade de fungos associada a ao lenho de *P. pinaster* bem como a sua possível variação na presença da doença.

Este tema assume particular importância sobretudo por ainda não ter sido objeto de estudo em Portugal.

Palavras-chave: fungos endófitos, microbiota, nemátode da madeira do pinheiro, NMP, doença da murchidão dos pinheiros

ABSTRACT

Pinus pinaster is one of the most important forest species in Portugal with about 700 thousand hectares of national territory which corresponds to the third position after cork oak and eucalyptus.

Pine wilt disease (PWD) was firstly detected in Portugal in 1999 and is well known as one of the most serious forest diseases and represents an important threat to forest considering its economic and environmental disturbances, particularly in Portugal, once *P. pinaster* is a susceptible species.

Different research fields have been explored along the years to understand the underlying interactions of PWD and to establish the suitable strategies of control and management.

Although the well known PWD three interactions – between the nematode, the vector and the host – the contribution of other organisms, namely bacteria and fungi species is clear proved.

Despite their secondary role in PWD, these groups of microorganisms seem to have a pretty clear contribution on PWD ethiology which justifies their study.

A brief exposition about endophytic microorganisms, namely endophytic fungi, will be presented, as well as its definition, importance, and diversity on *Pinus* spp.

Endophyte, pathogenic and saprophytic fungi roles will be discussed once they cover the majority of fungi species on forest communities and a special attention will be given to species which interact on PWD.

This study aims to clarify the mycobiota composition on wood of *Pinus pinaster* and its possible difference when trees are affected by PWD.

The work is particularly important once this major has not been yet under study in the PWD Portuguese scenario.

Key-words: endophytic fungi, mycobiota, pine wood nematode, PWN, pine wilt disease

	pág.
Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Índice de Quadros	vii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	x
Lista de nomes científicos de plantas referidos neste trabalho	xi
Lista de nomes científicos de insetos referidos neste trabalho	xii
1. Introdução	1
Os principais problemas fitossanitários em <i>Pinus</i> spp., a nível mundial	1
Os principais problemas fitossanitários em <i>Pinus</i> spp., em Portugal	2
2. A comunidade micobiológica associada a <i>Pinus pinaster</i> e a DMP	6
2.1. Fungos patogénicos e fungos saprófitas	6
2.1.1. Definição de endófito	7
2.1.2. O interesse prático dos endófitos	8
2.1.3. Fatores que influenciam as populações de endófitos	9
2.2. Isolamento de microrganismos endófitos	9
2.3. A diversidade dos fungos endófitos	10
2.4. A DMP	14
2.4.1. Breve sequência histórica da distribuição geográfica do NMP	14
2.4.2. O ciclo de vida do NMP. O Hospedeiro.	16
2.4.3. O vetor do NMP	17
2.5. Outros organismos envolvidos na DMP (Insetos, Fungos e Bactérias)	19
2.5.1. As interações entre Insetos, Fungos e Hospedeiro na DMP	21
2.5.2. A importância dos compostos voláteis	23
2.5.3. A doença do azulado da madeira e o declínio do pinheiro	28
2.5.4. As bactérias e a DMP	30
3. Material e Métodos	32
3.1. Prospeção, processamento das amostras e delineamento do ensaio	32
3.2. Isolamento de fungos	33
3.3. Obtenção de culturas puras: isolamento por esporo único e hifa única	33
3.4. Identificação taxonómica com base nas características morfológicas, culturais e biométricas dos isolados	35
3.4.1. Estudo dos isolados pertencentes à família <i>Botryosphaeriaceae</i>	36
3.4.2. Estudo dos isolados pertencentes aos géneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	37
3.4.3. Estudo dos isolados pertencentes ao género <i>Trichoderma</i>	38

3.5. Identificação através de técnicas da biologia molecular	38
3.5.1. Extração de DNA	38
3.5.2. Amplificação por reação de PCR	39
3.5.3. Caso particular da família Botryosphaeriaceae: análise de perfis de MSP-PCR	40
3.5.4. Sequenciação e caracterização filogenética	41
3.5.5. Tratamento estatístico	42
4. Resultados e discussão	44
4.1. Identificação taxonómica	44
4.1.1 Isolados pertencentes à família Botryosphaeriaceae	44
4.1.2. Isolados pertencentes aos géneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	50
4.1.3. Isolados pertencentes ao género <i>Trichoderma</i>	58
4.1.4. Isolados pertencentes à família Ophiostomataceae	62
4.1.5. Isolados pertencentes ao filo <i>Basidiomycota</i>	64
4.1.6. Isolados pertencentes ao género <i>Fusarium</i>	67
4.1.7. Restantes isolados	68
4.2. Tratamento estatístico	80
5. Conclusões	83
Referências Bibliográficas	86
ANEXOS	

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Agentes responsáveis por doenças em <i>Pinus</i> spp., em Portugal, de acordo com Azevedo, N. (1971).	3
Quadro 2 – Síntese da informação apresentada no Anexo 1: lista de géneros de fungos isolados em 33 espécies de pinheiro, em 16 países, e o respetivo número de referências relativas a cada estatuto atribuído pelos vários autores – Endófito (E); Patogénico (P); Saprófita (S).	11
Quadro 3 – Exemplos de espécies de fungos endófitos com referência a algum tipo de ação sobre <i>B. xylophilus</i> (BX) ou <i>M. galloprovincialis</i> (MG).	20
Quadro 4 – Espécies de fungos isolados em <i>Pinus</i> spp. (ou em insetos associados) com sintomatologia (se referida) de declínio (Dec), Doença do Azulado da Madeira (DAM), Doença da Murchidão do Pinheiro (DMP) ou Doença Radicular (DR).	24
Quadro 5 – Exemplos organismos procarióticos em estudo para obtenção de produtos a utilizar em luta biológica contra o NMP.	31
Quadro 6 – Técnica utilizada na obtenção de culturas puras dos diferentes <i>taxa</i> – isolamento por esporo único (IEU) e por hifa única (IHU).	35
Quadro 7 – Características biométricas avaliadas nas espécies de <i>Penicillium</i> spp. e <i>Aspergillus</i> spp. (medições (comprimento e largura) produzidos em MEA, à temperatura de 24±1°C, para identificação das respetivas espécies.	37
Quadro 8 – <i>Primers</i> usados na amplificação das regiões ITS e Fator de Alongamento dos isolados em estudo, e respetivas sequências.	39
Quadro 9 – Composição das misturas usadas na amplificação das regiões ITS e EF1-α do DNA por PCR.	39
Quadro 10 – Programas utilizados no termociclador para amplificação por PCR de duas regiões do DNA – ITS e EF1-α.	40
Quadro 11 – Composição da mistura usada na amplificação de DNA dos isolados de Botryosphaeriaceae spp., por MSP-PCR.	41
Quadro 12 – Culturas dos isolados de Botryosphaeriaceae spp. (frente e verso das colónias), ao fim de 7 e de 21 dias de crescimento em PDA (24±1°C). Fotos: MTrindade	46
Quadro 13 – Características biométricas dos conídios nos 32 isolados de Botryosphaeriaceae spp. cultivados em AA a 2%, à temperatura de 24±1°C, e relação comprimento/largura (c/l) (valores obtidos a partir de 30 conídios por isolado).	48
Quadro 14 – Resultados da medição de características biométricas em estruturas (30 medições por estrutura) de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp., ao fim de 7 dias de crescimento em MAE (24±1°C). Imagens de cabeças conidiogénicas de <i>Aspergillus</i> spp. e de conidióforos de <i>Penicillium</i> spp. Fotos: MTrindade	51
Quadro 15 – Resultado da identificação dos isolados de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Referência dos códigos das sequências homólogas e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (T: Material Tipo) Fotos: MTrindade	54
Quadro 16 – Resultados da medição de características biométricas em <i>Trichoderma</i> spp., ao fim de 7 de crescimento em PDA (24±1°C) (valores obtidos a partir de 30 conídios por isolado).	58
Quadro 17 – Aspeto das colónias dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (frente e verso) ao fim de 7 dias de crescimento em PDA, CMD e SNA – 24±1°C). Pústulas e conídios (em CMD). Fotos: MTrindade	59
Quadro 18 – Caracterização cultural dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., ao fim de 7 dias de crescimento (24±1°C) em três meios de cultura (PDA, CMD e SNA).	60
Quadro 19 – Resultado da identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Referência dos códigos das sequências homólogas e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) Fotos: MTrindade	61
Quadro 20 – Resultado da medição de características biométricas em Ophiostomataceae spp. (valores obtidos a partir de 30 esporos por isolado).	62
Quadro 21 – Resultado da identificação dos isolados de Ophiostomataceae spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado) Fotos: MTrindade	63

Quadro 22 – Resultado da identificação dos isolados de <i>Basidiomycota</i> spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado) Fotos: MTrindade	65
Quadro 23 – Resultado da identificação dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado) Fotos: MTrindade	67
Quadro 24 – Resultado da identificação de isolados com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado; T: Material Tipo) Fotos: MTrindade	68
Quadro 25 – Matriz de probabilidades associadas à variável “presença da espécie <i>Ophiostoma ips</i> ”, de acordo com o modelo ajustado (sem interação e sem o fator “meio de cultura”).	80
Quadro 26 – Matriz de frequências esperadas, associadas à variável “abundância de fungos”, de acordo com o modelo ajustado (sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”).	82

	pág.
Figura 1 – Imagens (a. – d.) de secções de madeira com sintomatologia da DAM e câmaras pupais de <i>Monochamus galloprovincialis</i> . Fotos: MTrindade	29
Figura 2 – Aspeto dos dois grupos de árvores selecionadas para o trabalho de isolamento. (a. e b.: árvores sãs; c. e d.: árvores com sintomatologia da DMP) (Fotos cedidas por JHenriques)	32
Figura 3 – Processamento das secções dos troncos. (a.; b.) para obtenção de pedaços de madeira (c.; d.; e.) para isolamento de fungos. Fotos: MTrindade	34
Figura 4 – Material utilizado no isolamento. (a.); aspeto da evolução de uma placa de Petri de onde se procedeu ao isolamento do fungo X (b.; c.; d.) (Fotos: MTrindade)	34
Figura 5 – Estruturas de Botryosphaeriaceae. A) Microscópio estereoscópico binocular: picnídio de Botryosphaeriaceae numa secção de agulha de pinheiro; B) Microscópio ótico: Conídios de Botryosphaeriaceae B) Microscópio ótico: i. Picnídios de <i>Botryosphaeriaceae</i> maduros; ii. Conídios de <i>Botryosphaeriaceae</i> . Fotos: MTrindade	37
Figura 6 – Dendrograma resultante da análise pela técnica MSP-PCR, e perfis de bandas do conjunto dos isolados de Botryosphaeriaceae, obtido em NTSYSpc2 usando o coeficiente de correlação de DICE. A barra de escala representa a percentagem de similaridade.	49
Figura 7 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências concatenadas correspondentes às regiões ITS (456 pb) e EF1- α (250 pb) (Botriosphaeriaceae spp.), onde se incluem 13 isolados em <i>Pinus pinaster</i> (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES. À esquerda apresenta-se o cladograma resultante da mesma análise para melhor visualização da variabilidade intraespecífica dos isolados.	50
Figura 8 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (634 pb) e de 97 sequências (<i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp.), onde se incluem 17 isolados em <i>Pinus pinaster</i> (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.	57
Figura 9 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (832 pb.) e de 43 sequências (<i>Trichoderma</i> spp.), onde se incluem 5 isolados em <i>Pinus pinaster</i> (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.	62
Figura 10 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (832 pb) e de 43 sequências (Ophiostomataceae spp.), onde se incluem 4 isolados em <i>Pinus pinaster</i> (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.	64
Figura 11 – Aspetos morfológicos presentes em algumas espécies de <i>Basidiomycota</i> . A: grampos de conexão; B: cistidea observados em <i>Trichaptum abietinum</i>	64
Figura 12 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (917 pb) e de 59 sequências (isolados deste trabalho) como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.	77
Figura 13 – Árvore filogenética – agrupamento por Classes e Filos – representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (917 pb) e de 59 sequências (isolados deste trabalho) como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.	78
Figura 14 – Conjunto dos taxa identificados no lenho de <i>Pinus pinaster</i> proveniente dos três locais de amostragem (Góis, Comporta e ilha da Madeira) e estado sanitário das árvores relativamente à DMP. (árvores doentes: D; árvores sãs: S).	79
Figura 15 – <i>Output</i> do Modelo de Regressão Logística ajustado aos dados do ensaio para estudo da variável “presença da espécie <i>Ophiostoma ips</i> ” (Modelo sem interação e sem o fator “Meio de cultura”).	81
Figura 16 – <i>Output</i> do Modelo Log-linear ajustado aos dados do ensaio para estudo da variável “abundância de fungos isolados” (Modelo sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”).	82
Figura 17 – Diagramas de extremos e quartis relativos ao modelo ajustado para o estudo da variável “abundância de fungos isolados” (Modelo Log-linear sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”).	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Agar-Água
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BX	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures – actual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
CMD	Cornmeal Dextrose medium
dH ₂ O	distilled water
DAM	Doença do Azulado da Madeira
DMP	Doença da Madeira do Pinheiro
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotides
DP	Desvio Padrão
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
ITS-rDNA	Internal Transcribed Spacers of rDNA
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
MAE	Malt Extract Agar
MEGA	Molecular Evolutionary Genetic Analysis
MI	Michigan
ML	Maximum Likelihood
MO	Missouri
MSP-PCR	Microsatellite-Primed PCR
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Version 2.02h
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato-dextrose Agar
RCP	Representative Concentration Pathways
SNA	Spezieller Nährstoffarmer Agar
TBE	Tris-Borate-EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)
USA	United States of America
\bar{x}	Média
∅	diâmetro
°C	graus Celsius

LISTA DE NOMES CIENTÍFICOS DE PLANTAS REFERIDOS NESTE TRABALHO ⁽¹⁾

Pinus albicaulis Engelm.
Pinus banksiana Lamb.
Pinus canariensis C. Sm.
Pinus contorta Douglas ex Loudon
Pinus contorta var. *latifolia* Engelm.
Pinus densiflora Siebold & Zucc.
Pinus eldarica Medw.
Pinus elliotii Engelm.
Pinus flexilis E. James
Pinus halepensis Mill.
Pinus koraiensis Siebold & Zucc.
Pinus massoniana Lamb.
Pinus maximinoi H. E. Moore
Pinus montana Hoffm.
Pinus montezumae Lamb.
Pinus monticola Dougl. ex D. Don
Pinus mugo Turra
Pinus nigra J. F. Arnold
Pinus patula Schiede ex Schtdl. & Cham.
Pinus peuce Griseb.
Pinus pinaster Aiton
Pinus ponderosa Douglas ex C. Lawson
Pinus pseudostrobus Gordon
Pinus pumila (Pall.) Regel
Pinus radiata D. Don
Pinus resinosa Aiton
Pinus rigida Mill.
Pinus roxburghii Sarg.
Pinus sibirica Du Tour
Pinus strobus L.
Pinus sylvestris L.
Pinus tabuliformis Carrière
Pinus taeda L.
Pinus thunbergii Parl.
Pinus torreyana Parry ex Carrière
Pinus wallichiana A.B. Jacks.

1 – Ruskov *et al.* (2013) <http://www.catalogueoflife.org>

LISTA DE NOMES CIENTÍFICOS DE INSETOS REFERIDOS NESTE TRABALHO ⁽¹⁾

Cinara pinimaritimae (Dufour, 1833) (Hemiptera, Aphididae)
Dendroctonus mexicanus Hopkins 1905b (Coleoptera, Scolytidae)
Dendroctonus ponderosae Hopkins, 1902c (Coleoptera, Scolytidae)
Dioryctria mendacella Staudinger, 1859 (Lepidoptera, Pyralidae)
Hylastes ater Erichson, 1836 (Coleoptera, Curculionidae)
Hylastes opacus Erichson, 1836 (Coleoptera, Curculionidae)
Hylastes salebrosus Eichhoff, 1868c (Coleoptera, Curculionidae)
Hylastes tenuis Eichhoff, 1868c (Coleoptera, Curculionidae)
Hylurgus ligniperda (Fabricius, J. C., 1787) (Coleoptera, Scolytidae)
Ips calligraphus Wood & Bright, 1992 (Coleoptera, Scolytidae)
Ips schmutzenhoferi Holzschuh, 1988 (Coleoptera, Scolytidae)
Ips sexdentatus (Boerner, I. C. H., 1767) (Coleoptera, Scolytidae)
Matsucoccus feytaudi Ducasse, 1941 (Hemiptera, Margarodidae)
Monochamus alternatus Hope, 1843 (Coleoptera Cerambycidae)
Monochamus galloprovincialis (Olivier, 1795) (Coleoptera Cerambycidae)
Monochamus sartor (Fabricius, 1787) (Coleoptera Cerambycidae)
Monochamus_sutor (Linné, 1758) (Coleoptera Cerambycidae)
Neodiprion sertifer (Geoffroy) (Hymenoptera, Diprionidae)
Orthotomicus erosus Bright & Skidmore, 1997 (Coleoptera, Scolytidae)
Pineus pini (Koch, C.L., 1857) (Hemiptera, Adelgidae)
Pissodes castaneus (DeGeer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae)
Pissodes validirostris Gyllenhal, 1835 (Coleoptera, Curculionidae)
Rhyacionia buoliana Schiffermüller, 1775 (Lepidoptera, Tortricidae)
Sirex noctilio Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Siricidae)
Thaumetopoea pityocampa Schiffermüller, 1776 (Lepidoptera, Notodontidae)
Tomicus destruens Wood & Bright, 1992 (Coleoptera: Scolytidae)
Tomicus minor Wood & Bright, 1992 (Coleoptera, Scolytidae)
Tomicus piniperda (Linnaeus, C., 1758) (Coleoptera, Scolytidae)

1 – Ruskov *et al.* (2013) <http://www.catalogueoflife.org>

1. Introdução

De entre as espécies florestais presentes no território português algumas delas tornam o género *Pinus* num dos mais importantes. Cinco das cerca de 120 espécies que compõem este género (The Plant List, 2018), *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. radiata* e *P. sylvestris*, estão presentes em Portugal, sendo as maiores manchas ocupadas por *P. pinaster* e *P. pinea*, vulgarmente designados de pinheiro bravo e manso, respetivamente. De acordo com o 6º Inventário Florestal Nacional relativo ao ano de 2010, *P. pinaster*, ocupa uma área com cerca de 714 mil hectares correspondendo à terceira posição em termos de representatividade de entre as espécies florestais presentes em território português (posição que é precedida pelo eucalipto e sobreiro) (ICNF, 2013). O pinheiro-bravo constitui a base de uma importante sub-fileira florestal cujo VAB – considerando a agregação às fileiras da pasta, papel, pinho, cortiça e outras – representa 2% do PIB nacional, sendo este valor apenas ultrapassado na Europa pela Finlândia e Suécia (Rodrigues *et al.*, 2013).

1.1. Os principais problemas fitossanitários em *Pinus* spp., a nível mundial

A nível mundial são vários os organismos responsáveis por graves problemas fitossanitários em espécies pertencentes ao género *Pinus*, nomeadamente espécies pertencentes ao grupo dos insetos, dos fungos e dos nemátodes. Mead (2013) apresenta os principais problemas causados por insetos em *Pinus* spp, onde se incluem espécies que atacam a madeira (tronco e ramos), espécies desfolhadoras, desvitalizadoras (sugadoras) e algumas são inclusivamente consideradas importantes vetores de doenças.

Referem-se, como exemplo:

- *Sirex noctilio*, a vespa da madeira, espécie endémica na Europa, algumas regiões da Ásia e Norte de África mas já presente na Austrália e Nova Zelândia, Tasmânia e América do Sul (Chile e Argentina);
- Algumas espécies do género *Ips* causadores de graves prejuízos na Europa, EUA, Austrália, Nova Zelândia e África do Sul;
- *Hylastes ater* e *Hylurgus ligniperda*, ambos originários da Europa mas já presentes no Chile e Nova Zelândia;
- *Orthotomicus erosus*, originário da região Mediterrânica mas já presente no Chile, EUA e África do Sul;
- *Rhyacionia buoliana*, registada como de praga grave em Espanha, Turquia e no Chile;
- *Pineus pini*, uma praga importante na África do Sul;
- *Thaumatopoeae pityocampa*, com registo de praga importante em Espanha.

Os fungos constituem um importante grupo de agentes causadores de doenças na madeira, podridões das raízes, doenças na parte aérea, doenças associadas a viveiros, etc. (Brown & Macaskill, 2005; Mead, 2013; Tainter & Baker, 1996). Os prejuízos económicos consequentes destes agentes são consideráveis e dependendo da região e da espécie hospedeira em causa os autores atrás referidos mencionam como mais importantes, os responsáveis por:

- **Doenças no tronco e ramos (cancros):** *Brunchorstia pinea*, *Fusarium* sp., *Sphaeropsis sapinea*;
- **Doenças nas raízes:** *Heterobasidium annosum*; *Phaeolus schweinitzii*, *Phymatotrichum omnivorum*; *Rhizoctonia* sp.;
- **Doenças na parte aérea:** *Coleosporium* sp; *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum*; *Lophodermium pinastri*, *Ramichloridium pini*;
- **Doenças em viveiros:** *Cylindrocladium* sp.; *Fusarium* sp.; *Sclerotium* sp.; *Rhizoctonia* sp.

Relativamente a doenças causadas por nemátodes destaca-se a doença da murchidão do pinheiro (DMP) cujo agente causal é o nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970 (Kiyohara & Tokushige, 1971).

Esta doença envolve a interação entre o nemátode, o seu inseto vetor (*Monochamus* spp.) (Mamiya, 1972; Kobayashi *et al.*, 1984) e o hospedeiro – espécies de coníferas suscetíveis, na sua maioria pertencentes ao género *Pinus* mas também espécies dos géneros *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* e *Pseudotsuga* (Evans *et al.*, 1996). Nesta interação é obrigatória a existência do vetor, sem o qual o nemátode não abandona a planta hospedeira mas como resultado de existirem quer várias espécies hospedeiras suscetíveis quer várias espécies de vetores, e dependendo da área geográfica considerada, observam-se múltiplas combinações desta interação onde apenas o nemátode *B. xylophilus* constitui elemento comum.

Atualmente, de acordo com o registo na OEPP (EPPO, 2019), o NMP foi isolado nos Estados Unidos, Canadá, México, Japão, China, Taiwan, Coreia do Sul, Portugal (continental e ilha da Madeira) e Espanha. A nível global os maiores prejuízos registam-se com *P. densiflora* e *P. thunbergii*. Considerada uma das mais devastadoras doenças florestais tem sido responsável por irreparáveis perturbações nos ecossistemas e por elevados prejuízos para indústria. No Japão, no período 1978-1979, e devido às condições atmosféricas particulares observadas, favoráveis à doença (altas temperaturas e tempo seco), registaram-se perdas de mais de 2 milhões de metros cúbicos de madeira (Nose & Shiraishi, 2007). Também no Japão e como resultado desta doença, mais de 600 mil metros cúbicos de madeira são destruídos anualmente originando perdas estimadas em 10 milhões de dólares (Wang, 2009).

Dado o seu elevado poder destrutivo a Organização Europeia e Mediterrânica para Proteção das Plantas (OEPP) classificou-o como organismo de quarentena (Lista A2 da OEPP).

1.2. Os principais problemas fitossanitários em *Pinus* spp., em Portugal

Em Portugal, os principais problemas fitossanitários associados ao género *Pinus* são igualmente causados por organismos pertencentes aos três grupos mencionados a nível mundial (insetos, fungos e nemátodes). Branco *et al.* (2014) apresentam as principais espécies de insetos que, no nosso país, constituem importantes pragas:

- na **madeira de pinheiro**: *Pissodes castaneus*, *Ips sexdentatus*, *Orthotomicus erosus*, *Tomicus piniperda*, *Tomicus destruens*;
- **desfolhadores** (*Thaumetopoea pityocampa*, *Neodiprion sertifer*);
- **sugadores** (*Cinara pinimaritimae*, *Pineus pini*, *Matsucoccus feytaudi*);
- e em **pinhas e sementes** (*Pissodes validirostris*, *Dyorictria mendacella*).

As doenças representam outro problema fitossanitário em *Pinus* sp. sendo maioritariamente causadas por fungos (Azevedo, 1971). Por ser o objeto principal deste trabalho apresenta-se no Quadro 1, uma referência mais exhaustiva a este grupo, mencionando-se, para além das espécies, a sua posição sistemática no Reino Fungi e a sua gravidade enquanto agentes causais de doença.

Quadro 1 – Agentes responsáveis por doenças em *Pinus* sp., em Portugal, de acordo com Azevedo, N. (1971).

Espécies responsáveis por:	Div./Classe ¹	Gravidade ²
Doenças de sementes		
<i>Alternaria</i> spp. Nees, <i>System der Pilze und Schwämme</i> : 72 (1817)	A/D	+
<i>Botrytis cinerea</i> Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 126, t. 3:9 (1794)	A/Lt	+
<i>Fusarium</i> sp. Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 3 (1): 10 (1809)	A/S	+
<i>Pythium debaryanum</i> R. Hesse, <i>Pythium debaryanum: ein endophytischer Schmarotzer in den Geweben der Keimlinge der Leindotter, der Rüben, der Spergels und einiger anderer landwirtschaftlichen Kulturpflanzen</i> : 14 (1874)	O/O	++
<i>Thelephora terrestris</i> Ehrh., <i>Pl. crypt. exsicc.</i> , no 178: no. 178 (1787)	B/Ag	+
Doenças das raízes		
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm., <i>Der Führer in die Pilzkunde</i> : 134 (1871)	B/Ag	++
<i>Armillaria tabescens</i> (Scop.) Emel, <i>Le Genre Armillaria, Fr., Sa Suppression de la Systématique Botanique. Thèse, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg</i> : 50 (1921)	B/Ag	+
<i>Corticium lactescens</i> Berk., <i>Outlines of British Fungology</i> : 274 (1860)	B/Ag	–
<i>Corticium serum</i> (Pers.) Fr., <i>Hymenomyces europaei</i> : 659 (1874)	B/Ag	–
<i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref., <i>Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie</i> 8: 154 (1889)	B/Ag	+++
<i>Hyphoderma pallidum</i> (Bres.) Donk, <i>Fungus</i> 27: 15 (1957)	B/Ag	–
<i>Phaeolus schweinitzii</i> (Fr.) Pat., <i>Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hyménomycètes</i> : 86 (1900)	B/Ag	+
<i>Sparassis brevipes</i> Krombh., <i>Naturgetreue Abbildungen und Beschreibungen der Schwämme</i> 3: 36, tab. 22 (1834)	B/Ag	+
Doenças do caule		
<i>Cenangium ferruginosum</i> Fr., <i>Kongliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar</i> 39: 361 (1818)	A/Lt	++
<i>Cytospora pinastri</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 2: 544	A/S	+
<i>Diplodia pinastri</i> Grove, <i>Journal of Botany, British and Foreign</i> 54: 193 (1916)	A/D	+
<i>Dothiorella pinea</i> (Pass.) Petr. & Syd., <i>Annales Mycologici</i> 23: 240 (1925)	A/D	–
<i>Neonectria ditissima</i> (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman, <i>Hypocreales of the Southeastern United States: an Identification Guide</i> : 134 (2006)	A/S	–
<i>Ophiostomella rostellata</i> (Grove) Petr. & Syd., <i>Annales Mycologici</i> 23: 238 (1925)	A/S	–
<i>Phoma piresii</i> Gonz. Frag., <i>Congr. Coimbra Cienc, Nat. Assoc. Espan. Progr. Ciencias</i> : 19 (1925)	A/D	–
<i>Phomopsis conorum</i> (Sacc.) Died., <i>Annales Mycologici</i> 9: 22 (1911)	A/S	–
<i>Phomopsis occulta</i> Traverso, <i>Flora Italica Cryptogama. Pars 1: Fungi. Pyrenomycetae. Xylariaceae, Valsaceae, Ceratostomataceae</i> 1(1): 221 (1906)	A/S	–
<i>Rhabdospora pini</i> (Berk. & M.A. Curtis) Sacc., <i>Sylloge Fungorum</i> 3: 585 (1884)	A/D	–
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton, <i>The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata</i> : 120 (1980)	A/D	+
<i>Tympanis pinastri</i> Rehm, <i>Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, Pilze - Ascomyceten</i> 1(3): 272 (1888)	A/Lt	+
<i>Valsa ceratophora</i> Tul. & C. Tul., <i>Selecta Fungorum Carpologia, Tomus Secundus. Xylariei - Valsei - Sphaeriei</i> 2: 191 (1863)	A/S	+
<i>Valsa pini</i> (Alb. & Schwein.) Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2: 412 (1849)	A/S	+
<i>Valsa strobiligena</i> Sacc. & Roum., <i>Michelia</i> 2 (8): 606 (1882)	A/S	+
Ferrugens		
<i>Cronartium flaccidum</i> (Alb. & Schwein.) G. Winter, <i>Hedwigia</i> 19: 55 (1880)	A/Pc	++
<i>Cronartium quercuum</i> (Berk.) Miyabe ex Shirai, <i>Bot. Mag., Tokyo</i> : 74 (1899)	A/Pc	++

(cont.)

Espécies responsáveis por:	Div./Classe ¹	Gravidade ²
Doenças do caule (cont.)		
Podridões		
<i>Abortiporus biennis</i> (Bull.) Singer, <i>Mycologia</i> 36 (1): 68 (1944)	B/Ag	+
<i>Ceratocystis major</i> (J.F.H. Beyma) C. Moreau, <i>Revue de Mycologie (Paris)</i> 17 (Suppl. Col. No. 1): 18 (1952)	A/S	+
<i>Ceratocystis montium</i> (Rumbold) J. Hunt, <i>Lloydia</i> 19: 45 (1956)	A/S	+
<i>Coniophora fusispora</i> (Cooke & Ellis) Sacc., <i>Sylloge Fungorum</i> 6: 650 (1888)	B/Ag	-
<i>Coniophora olivacea</i> (Fr.) P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 37: 162 (1882)	B/Ag	-
<i>Coriolus versicolor</i> (L.) Quél., <i>Enchiridion Fungorum in Europa media et praesertim in Gallia Vigentium</i> : 175 (1886)	B/Ag	+
<i>Corticium lactescens</i> Berk., <i>Outlines of British Fungology</i> : 274 (1860)	B/Ag	-
<i>Corticium laeve</i> Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 110 (1794)	B/Ag	-
<i>Corticium ochroleucum</i> (Fr.) Fr., <i>Epicrisis Systematis Mycologici</i> : 557 (1838)	B/Ag	-
<i>Corticium serum</i> (Pers.) Fr., <i>Hymenomyces europaei</i> : 659 (1874)	B/Ag	-
<i>Dichomitus squalens</i> (P. Karst.) D.A. Reid, <i>Revista Biol. (Lisbon)</i> : 149 (1965)	B/Ag	+
<i>Diplomitoporus flavescens</i> (Bres.) Domanski, <i>Acta Societatis Botanicorum Poloniae</i> 39: 191 (1970)	B/Ag	-
<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2: 237 (1849)	B/Ag	+
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst., <i>Meddelanden af Societas pro Fauna et Flora Fennica</i> 6: 9 (1881)	B/Ag	+
<i>Ganoderma lipsiense</i> (Batsch) G.F. Atk., <i>Annales Mycologici</i> 6: 189 (1908)	B/Ag	+
<i>Hyphoderma pallidum</i> (Bres.) Donk, <i>Fungus</i> 27: 15 (1957)	B/Ag	-
<i>Leucogyrophana pinastri</i> (Fr.) Ginns & Weresub, <i>Memoirs of the New York Botanical Garden</i> 28: 96 (1976)	B/Ag	-
<i>Meripilus giganteus</i> (Pers.) P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 37: 33 (1882)	B/Ag	-
<i>Peniophora incarnata</i> (Pers.) P. Karst., <i>Hedwigia</i> 28: 27 (1889)	B/Ag	-
<i>Peniophora pini</i> (Schleich.) Boidin, <i>Revue de Mycologie (Paris)</i> 21: 123 (1956)	B/Ag	+
<i>Phellinus torulosus</i> (Pers.) Bourdot & Galzin, <i>Bulletin de la Société Mycologique de France</i> 41: 191 (1925)	B/Ag	+
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich, <i>Persoonia</i> 10 (1): 137 (1978)	B/Ag	-
<i>Polyporus floccopus</i> Rostk. (?)	B/Ag	-
<i>Polyporus unicolor</i> (Schwein.) Fr., <i>Epicrisis Systematis Mycologici</i> : 458 (1838)	B/Ag	-
<i>Porodaedalea pini</i> (Brot.) Murrill, <i>Bulletin of the Torrey Botanical Club</i> 32 (7): 367 (1905)	B/Ag	++
<i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schwein.) Fr., <i>Epicrisis Systematis Mycologici</i> : 549 (1838)	B/Ag	+
<i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát, <i>Atlas Champ. Eur., Polypor., B</i> : 265 (1939)	B/Ag	-
Doenças das folhas		
<i>Libertella pini</i> A.C. Santos & Sousa da Câmara, <i>Agronomia Lusitana</i> 16 (3): 189 (1954)	A/S	+
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chevall., <i>Flore Générale des Environs de Paris</i> 1: 436 (1826)	A/Lt	+++
<i>Macrophoma strobili</i> (Berk. & Broome) Berl. & Voglino, <i>Atti della Società Veneziana-Trentina-Istriana di Scienze Naturali</i> 10 (1): 191 (1886)	A/D	-
<i>Phoma pinicola</i> (Zopf) Sacc., <i>Sylloge Fungorum</i> 3: 100 (1884)b	A/D	-
<i>Phomopsis occulta</i> Traverso, <i>Flora Italica Cryptogama. Pars 1: Fungi. Pyrenomycetae. Xylariaceae, Valsaceae, Ceratostomataceae</i> 1(1): 221 (1906)	A/S	-
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton, <i>The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata</i> : 120 (1980)	A/D	+

Espécies responsáveis por:	Div./Classe ¹	Gravidade ²
Doenças das folhas (cont.)		
<u>Ferrugens</u>		
<i>Coleosporium senecionis</i> (Pers.) Fr., <i>Flora Crypt. Flandres</i> : 53 (1867)	A/Pc	+++
<i>Coleosporium solidaginis</i> (Schwein.) Thüm., <i>Bulletin of the Torrey Botanical Club</i> 6 (39): 216 (1878)	A/Pc	+++
Doenças da pinha		
<i>Diplodia pinastri</i> Grove, <i>Journal of Botany, British and Foreign</i> 54: 193 (1916)	A/D	–
<i>Phoma strobiligena</i> Desm., <i>Annales des Sciences Naturelles Botanique</i> 11: 280 (1849)	A/D	–
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton, <i>The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata</i> : 120 (1980)	A/D	–

¹ Divisão/Classe	
Ascomycota/Dothideomycetes	A/D
Ascomycota/Leotiomycetes	A/Lt
Ascomycota/Pucciniomycetes	A/Pc
Ascomycota/Sordariomycetes	A/S
Basidiomycota/Agaricomycetes	B/A
Oomycota/Oomycetes	O/O

² Grau de gravidade(importância) da doença	
+++	muito grave
++	alguma gravidade
+	menos grave
–	sem gravidade

Para além das espécies referidas no Quadro 1, de onde se destacam, pela sua importância, *Heterobasidion annosum*, *Cenangium ferruginosum*, *Lophodermium pinastri* e o oomycete *Pythium debaryanum*, – responsáveis pelas doenças mais graves em raízes, caule, folhas e em sementes, respetivamente – mais recentemente, Branco *et al.* (2014) referem *Fusarium circinatum* como sendo o fungo mais agressivo para várias espécies do género *Pinus* (entre as quais *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. radiata* e *P. halepensis*) podendo infetar órgãos reprodutivos e vegetativos durante todo o período de vida dos hospedeiros.

Em 1999 foi detetado em Portugal continental, por Mota *et al.*, o NMP, constituindo a partir de então um dos mais graves problemas fitossanitários no nosso país, afetando o território continental e na ilha da Madeira, com especial gravidade, *Pinus pinaster*. De acordo com Rodrigues *et al.* (2013), até 2012, foram eliminadas pelo Estado Português cerca de 5 milhões de árvores com sintomas de declínio relacionado com esta doença.

Na Introdução apresentada, onde se fez o enquadramento dos principais problemas fitossanitários em *Pinus* sp., a nível mundial e em Portugal, deu-se particular ênfase às doenças causadas por fungos culminando na DMP que constituem duas temáticas envolvidas nesta Tese.

Neste trabalho ir-se-á estudar a composição da microbiota associada ao lenho de *P. pinaster* em Portugal. O isolamento de fungos, realizado em árvores sãs e em árvores afetadas pela DMP, permitirá clarificar a possível influência desta doença na composição desta micoflora. A abordagem destas duas situações justifica-se por:

- estar envolvida uma das mais importantes espécies florestais do país, suscetível a uma doença que constitui um grave problema fitossanitário;
- haver clara evidência do envolvimento de fungos no mecanismo da doença;
- e por esta temática nunca ter sido objeto de estudo no nosso país – ao contrário dos EUA, Japão China e Coreia do Sul, por exemplo, onde já há claras referências, nomeadamente de espécies pertencentes à família Ophiostomataceae (Zhao *et al.*, 2014).

Apresenta-se a seguir uma breve exposição sobre a definição e importância dos organismos endófitos, saprófitos e patogénicos bem como o resultado da recolha bibliográfica acerca das espécies associadas a *Pinus* sp. em trabalhos semelhantes levados a cabo em 16 países e relativos a 33 espécies pertencentes ao género *Pinus*.

Serão igualmente abordados os aspetos mais relevantes da DMP, apresentando-se uma breve sequência histórica da distribuição da doença, o ciclo de vida do NMP e as diversas interações estabelecidas com fungos, com particular relevo a espécies da família Ophiostomataceae mas também com outros organismos, como insetos e bactérias.

Após a revisão bibliográfica descreve-se a metodologia seguida na elaboração do trabalho, apresentam-se os resultados, o seu tratamento estatístico e procede-se à discussão dos mesmos.

2. A comunidade micobiológica associada a *Pinus pinaster* e a DMP

Os estudos de diversidade das várias comunidades e a sua comparação quer ao longo do tempo quer perante variações ambientais ou outras de natureza abiótica tornam-se fundamentais para a compreensão da manutenção dos ciclos biogeoquímicos nos ecossistemas (Grünig *et al.*, 2011). No entanto nem todas as comunidades de seres vivos têm sido objeto deste tipo de estudos de maneira significativa, ou pelo menos não tanto como as comunidades animais e vegetais. Por isso os micobiotas em ecossistemas florestais, no geral, e em sistemas florestais específicos, em particular, ainda constituem uma enorme fonte de conhecimento a explorar.

As árvores albergam um importante conjunto de espécies de fungos que, desde o sistema radicular até à copa, ocupam e exploram tecidos internos e externos do hospedeiro vegetal bem como outros organismos a ele associados como é o caso dos artrópodes. Os fungos desempenham diversas funções e, de uma forma geral, são designados por endófitos, parasitas ou saprófitos – ou podem ainda acumular múltiplas designações.

2.1. Fungos patogénicos e fungos saprófitas

Os fungos patogénicos estabelecem uma associação em que o parasita interfere nas funções normais da planta e conseqüentemente origina a doença.

Quando o fungo é isolado de uma parte saudável da planta após o procedimento de esterilização superficial, geralmente é considerado como endófito. Mas pode-se tratar de um fungo patogénico latente isto é, ser inativo nos estágios iniciais do crescimento da planta e causar doenças mais tardiamente. Além disso, os fungos

patogénicos específicos de um determinado hospedeiro não causam doenças a plantas não-hospedeiras e podem ser isolados como endófitos.

Os fungos saprófitas constituem o maior grupo de fungos e estão envolvidos em diferentes funções ecológicas. Desempenham um papel importante na decomposição de matéria orgânica, através de enzimas que “digerem” a celulose e a lenhina, bem como nos ciclos biogeoquímicos, especialmente no ciclo do azoto (Hobbie *et al.*, 1999; Baldrian & Valaskova, 2008; Dinis *et al.*, 2009; Carris *et al.*, 2012).

Ganley (2004), a propósito da dificuldade que por vezes existe em atribuir um destes dois estatutos (endófito/patogénico) afirma ser questionável que muitos fungos isolados em plantas sejam classificados como patogénicos sem que se tenham verificado os postulados de Koch.

Relativamente a *P. pinaster* e com base nos trabalhos consultados referem-se como exemplos de fungos que tipicamente atuam como patogénicos, espécies pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Stemphylium*, *Sphaeropsis*, etc. traduzindo-se a sua presença através da sintomatologia característica das doenças que originam. Espécies dos géneros *Aspergillus*, *Epicocum*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, etc. são, a este respeito, comumente classificadas como saprófitas.

2.1.1. Definição de endófito

O termo endófito foi estabelecido pelo cientista alemão Heinrich Anton De Bary (1884) para qualquer organismo que viva no interior dos tecidos das plantas. De então para cá outros autores contribuíram para reformulação/evolução do conceito estando subjacente a todas as versões a presença do agente (fungo ou bactéria) sem a manifestação de sintomas de doença associados.

Em 1986, Carrol definiu endófitos como sendo mutualistas colonizadores de tecidos da parte aérea de plantas vivas sem conduzir a sintomas de doenças, excluindo-se fungos patogénicos e micorrizas. No entanto, autores como Bills (1996) não consideram haver qualquer distinção entre endófitos e as ectendomicorrizas, as micorrizas ericóides e as pseudomicorrizas.

A definição proposta por Petrini (1991) – parece ser a mais consensualmente usada nos trabalhos sobre endófitos – constitui uma extensão à de Carrol, referindo tratar-se de todos os microrganismos presentes nos órgãos das plantas que, em determinado momento, podem colonizar os tecidos internos das plantas sem lhes causar prejuízo.

Wilson (1995) apresenta uma definição semelhante à anterior diferindo apenas no aspeto de especificar “fungos e bactérias” e não a expressão generalista “todos os microrganismos” tendo Mostert *et al.* (2000) introduzido o termo “verdadeiros endófitos” para se referir a fungos cuja colonização nunca conduz a sintomas visíveis.

As portas de entrada para endófitos numa planta são habitualmente aberturas naturais (ex.: estomas, hidátodos) e feridas. As raízes constituem uma das portas mais utilizadas pelos endófitos – o crescimento das raízes e a emergência de raízes secundárias laterais geram abrasões que facilitam a entrada de microrganismos. Outros exemplos são as aberturas causadas por insetos e mesmo causadas por estruturas de fungos patogénicos como é o caso dos apressórios. Alguns endófitos são transmitidos via semente ou através das técnicas de propagação vegetativa.

Duma forma geral, endófitos são colonizadores assintomáticos (maioritariamente fungos e bactérias) que vivem nos espaços intercelulares de tecidos do seu hospedeiro – podendo mesmo penetrar as células (Strobel, 2003). Alguns são potencialmente patogénicos ocorrendo a doença apenas perante a presença de fatores que a favoreçam (Sieber, 2007), nomeadamente, de acordo com Firáková *et al.* (2007), situações de *stress*.

Por sua vez, Sun & Guo (2012) referem que fungos patogénicos latentes vivendo, assintomáticos, no interior de tecidos do hospedeiro com uma fase epifítica no seu ciclo de vida são também considerados endófitos.

2.1.2. O interesse prático dos endófitos

Permaneceram praticamente esquecidos até finais dos anos 70 quando, por várias razões, começaram a chamar à atenção deixando de ser encarados apenas como meros habitantes do interior das plantas e a despertar interesse por possuírem propriedades importantes.

Entre outras, são-lhes atribuídas as seguintes propriedades:

- produção de compostos químicos bioativos:
 - que conferem proteção contra insetos/pragas, contra outros microrganismos patogénicos e mesmo contra herbívoros (ex: alcalóides produzidos em plantas herbáceas que dissuadem ou envenenam herbívoros) (Bhardwaj *et al.*, 2015; Braun, K.R. *et al.*, 2003; Breen, 1994). Yu *et al.* (2010) identificaram um largo grupo de metabolitos com atividade anti-microbiana – alcaloides, péptidos, esteroides, terpenóides, fenóis, quinonas, compostos alifáticos flavonoides, etc.; McMullin *et al.* (2018) testaram quatro toxinas produzidas por fungos endófitos isolados em *Pinus strobus* e *Picea glauca* (*Phialocephala* spp., *Xylaria* spp. e *Lophodermium* spp.) com atividade tóxica relativamente a pragas e a fungos patogénicos.
 - toxinas, antibióticos (Radic & Strukelj, 2012; Selim *et al.*, 2012) e outros compostos de aplicação farmacológica como anticancerígenos, antivirais, produtos com potencial interesse biotecnológico (Azevedo, 1998);
 - com ação de proteção contra nemátodes parasitas de plantas (West *et al.*, 1988; Elmi *et al.*, 2000) e outros agentes patogénicos de plantas (Dingle & McGee, 2003; Wicklow *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010) – assumindo particular destaque os géneros que incluem espécies entomopatogénicas como é o caso de *Beauveria*, *Cladosporium*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Trichothecium* e *Verticillium*;
- promoção do crescimento dos hospedeiros (Ernest, 2003; Liu *et al.*, 2009; Shah & Pell, 2003; Siddiqui & Mahmood, 1996; Vega *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010) e
- indução de resistência a stress de origem biótica e abiótica (Rodriguez, R.J. *et al.*, 2009) – exs.: termotolerância de plantas adaptadas a solos geotermiais (Ganley *et al.*, 2004) e tolerância de *Pinus thunbergii* a solos salinos (Min *et al.*, 2014)

A respeito das interações nos micobiotas de espécies florestais, e numa forma muito resumida, Sieber (2007) conclui que os fungos estabelecem associações simbióticas e que de uma forma geral as comunidades que se estabelecem caracterizam-se por incluir um pequeno número de espécies que exibem especificidade face à árvore hospedeira co-evoluindo ao longo do tempo. A maioria dos endófitos não causa qualquer prejuízo ao hospedeiro e os que se consideram potencialmente patogénicos assumem esse estatuto perante a combinação de estímulos que em grande parte se desconhecem. O mesmo autor refere ainda que a prova da relação de mutualismo nas relações simbióticas endófito-hospedeiro tem sido inconclusiva na maioria dos casos, mas que as comunidades vegetais certamente não sobreviveriam a muitas situações de *stress* na ausência destas simbioses.

2.1.3. Fatores que influenciam as populações de endófitos

Foi observado por Kowalski & Zich (2002) e por Walski & Stanczykiewicz (2000) que a frequência de endófitos em *P. nigra* e em *P. sylvestris* varia em função da idade da planta, do local da árvore e do tipo de tecido sendo sugerindo que pequenas diferenças na estrutura dos tecidos, na sua composição bioquímica ou na temperatura em pequenos nichos da superfície do hospedeiro possam explicar aquela observação.

Alguns endófitos de espécies florestais são potencialmente patogênicos de acordo com condições perturbadoras, ou não, do equilíbrio entre fungo e hospedeiro (Sieber, 2007). Outros endófitos, por sua vez, são considerados mutualistas por exercerem uma ação de proteção perante herbívoros e outros ainda exibem as duas formas de atuação. Os fatores que condicionam esses múltiplos estatutos poderão ser de natureza biótica ou abiótica. Kowalski & Zych (2002) referem que fatores como condições de crescimento das árvores, a elevação do povoamento, tipo de coberto vegetal, a altura da cobertura de neve, a disponibilidade de nutrientes bem como a presença de sintomas de declínio afetam claramente a composição das comunidades de endófitos. Os mesmos autores ao citarem trabalhos de Kowalski & Gajosek (1998) e de Kowalski & Stanczykiewicz (2000) mencionam o facto de vários níveis de poluição associados a emissões industriais poderem ter influenciado a composição do grupo de endófitos nos trabalhos que efetuaram em *P. nigra* nomeadamente o efeito pernicioso de determinadas concentrações de SO₃. Nesse sentido, Helander *et al.* (2011) dão conta de ter sido observado que alguns endófitos de folhas reagem negativamente à exposição a ácido sulfúrico e à deposição de metais pesados enquanto outras espécies de hospedeiros manifestam adaptação a ambientes tóxicos perante longas exposições a ambientes poluídos.

2.2. Isolamento de microrganismos endófitos

Embora os microrganismos endófitos possam ser detetados no interior de tecidos vegetais recorrendo à microscopia ótica e eletrónica (Bernstein & Carrol, 1977; Maheshwari, R., 2006) o seu isolamento envolve cuidados especiais para que os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro (os epífitos) sejam eliminados.

Existem vários obstáculos metodológicos nos estudos relacionados com endófitos incluindo o intervalo de tempo requerido no isolamento (Hyde & Soyong, 2008; Sun & Guo, 2012). O método convencional de isolamento envolve a esterilização da superfície da amostra (ex.: folhas, caules, raízes) para subsequente cultura e isolamento dos endófitos em meio artificial de cultura (Greenfield, 2015). A mesma autora refere que a análise de um conjunto de artigos de 2014, no âmbito do estudo de endófitos revela que, de um modo geral, a esterilização da superfície externa ocorre num intervalo de tempo correspondente a 4-6 minutos (ou, por vezes, até 15) por unidade de amostragem e que tal facto constitui um potencial fator de influência na intensidade da amostragem e nas estimativas dos níveis de colonização. Este tempo de esterilização das amostras da planta hospedeira constitui uma componente fundamental em trabalhos com fungos endófitos e permite a remoção de fungos epifíticos e outros microrganismos presentes na superfície dos tecidos das plantas.

No processo de esterilização recorre-se habitualmente ao hipoclorito de sódio diluído e ao etanol. Os tempos de esterilização adequados para cada um destes produtos dependem do tecido do hospedeiro, idade, sensibilidade e espessura (Hyde & Soyong, 2008; Schulz & Boyle, 2005) e requerem um intervalo suficiente para esterilizar a superfície sem destruir o tecido (Schulz & Boyle, 2005). Por sua vez Ali-Shtayeh *et al.* (1998) referem o uso de hipoclorito de sódio (5,75%, 30 – 120”), etanol (95%, 3” ou mais), cloreto de mercúrio (1:1000 em etanol a 50%).

Na etapa seguinte procede-se à transferência do material para meios apropriados, de acordo com o tipo de microrganismo em estudo variando também a temperatura e o tempo de incubação de acordo com as finalidades e o tipo de endófito. A este respeito, e relacionando com “a definição” de endófito, Azevedo (1998) afirma ser a recorrência no isolamento de uma espécie de microrganismo que revela a sua verdadeira natureza de endófito.

2.3. A diversidade dos fungos endófitos

Os fungos endófitos estão associados às plantas desde há mais de 400 milhões de anos e tem sido objeto de estudo nas mais variadas zonas geográficas e climáticas. São ubíquos (Yan *et al*, 2015), vivendo em todos os tipos de plantas num largo leque de *taxa*, nos mais diversos ecossistemas desde musgos, fetos, arbustos a árvores. Consistem maioritariamente em membros das divisões *Ascomycota*, alguns *taxa* da Divisão *Basidiomycota*, *Zygomycota* e *Oomycota* (Sun & Guo, 2012). Estima-se que existam na Terra 1.5 milhões de espécies de fungos, valor baseado no rácio de plantas vasculares para espécies de fungos de 1:6 (Sun, & Guo, 2012) e Petrini (1991) sugere que existam mais de um milhão de espécies de endófitos com base nos rácios de plantas vasculares para espécies de fungos de 1:4 ou 1:5. Schmit & Mueller (2007) apresentam valores diferentes estimando existirem entre 500.000 a 600.000 espécies de fungos endófitos e Sieber (2007) estima que cerca de 465.000 (de entre o valor atrás referido) ainda não foram descritos.

O que é conhecido, sem haver margem para dúvida, é que existem fungos endófitos em todos tecidos de plantas saudáveis. A diversidade deste grupo de organismos é em parte elucidada pelo Anexo I que resulta do levantamento das espécies de fungos endófitos em *Pinus* spp. No seu conjunto, esta listagem, provém de trabalhos de isolamento em 33 espécies de pinheiro (*P. albicaulis*, *P. banksiana*, *P. canariensis*, *P. contorta*, *P. contorta* var. *latifolia*, *P. densiflora*, *P. eldarica*, *P. elliotii*, *P. flexilis*, *P. halepensis*, *P. koraiensis*, *P. montana*, *P. montezumae*, *P. monticola*, *P. mugo*, *P. nigra*, *P. patula*, *P. peuce*, *P. pinaster*, *P. ponderosa*, *P. pumila*, *P. radiata*, *Pinus resinosa*, *P. rigida*, *P. roxburghii*, *P. sibirica*, *P. strobus*, *P. sylvestris*, *P. tabulaeformis*, *P. taeda*, *P. thunbergii*, *P. torreyana* e *P. wallichiana*) em 16 países (Alemanha, Austrália, Brasil, China, Coreia do Sul, Espanha, EUA, Finlândia, Índia, Itália, Japão, Polónia, República Checa, Rússia e Nova Zelândia). Julgou-se também oportuno incluir neste Anexo informação sobre o grau de suscetibilidade da espécie hospedeira ao NMP, de acordo com Evans *et al.* (1996). Da análise da bibliografia que permitiu elaborar o Anexo I conclui-se que:

- nos trabalhos em que se procede à análise da abundância das espécies isoladas, há géneros quase sempre presentes e com abundância significativamente superior aos restantes (exs.: *Alternaria*, *Lophodermium*, *Penicillium* e *Trichoderma*);
- grande parte dos trabalhos apresentam a listagem das espécies identificadas atribuindo-lhe, clara ou implicitamente, apenas o estatuto de endófito;
- alguns trabalhos classificam, de entre as espécies isoladas, as que a bibliografia especializada considera como patogénicos e/ou saprófitas;
- outros ainda procedem ao isolamento em material já com sintomatologia de alguma doença.

Será também de ter em conta, de acordo com Chapela (1989) e Rodriguez *et al.* (2012), que é comum uma mesma espécie ser patogénico para um determinado hospedeiro e assumir o estatuto de endófito para outros. Esta situação também foi constatada através da pesquisa que permitiu elaborar o Anexo I. No Quadro 2 apresenta-se um resumo da informação extraída do Anexo I fazendo-se referência aos diferentes géneros de fungos e à contabilização

de cada estatuto associado bem como aos somatórios parciais obtidos nas três divisões (*Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mucoromycota*). Do total dos 501 registos, 303 referem-se a Endófitos, 108 a Patogénicos e 80 a Saprófitas. A divisão *Ascomycota* é sem dúvida a mais representada, nomeadamente por 6 géneros (*Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lophodermium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Trichoderma*) destacando-se *Fusarium*, *Lophodermium* e *Penicillium*. As divisões *Basidiomycota* e *Mucoromycota* assumem menor expressão com totais de 41 e 12 referências, respetivamente.

Quadro 2 – Síntese da informação apresentada no Anexo I: lista de géneros de fungos isolados em 33 espécies de pinheiro, em 16 países, e o respetivo número de referências relativas a cada estatuto atribuído pelos vários autores – Endófito (E); Patogénico (P); Saprófita (S).

Género	Divisão/ Classe	Estatuto		
		E	P	S
<i>Acremonium</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> , 3 (1): 15 (1809)	A/S	1	1	1
<i>Alternaria</i> Nees, <i>System der Pilze und Schwämme</i> : 72 (1817)	A/D	9	2	1
<i>Amphisphaeria</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> , 1 (4): 223 (1863)	A/S	1		
<i>Annulohyphoxylon</i> Y.M. Ju, J.D. Rogers & H.M. Hsieh, <i>Mycologia</i> , 97 (4): 855 (2005)	A/S	2		
<i>Anthostomella</i> Sacc., <i>Atti della Società Veneziana-Trentina-Istria di Scienze Naturali</i> , 4: 84 (1875)	A/S	1		1
<i>Armillaria</i> (Fr.) Staudé, <i>Die Schwämme Mitteldeutschlands, in besondere des Herzogthums</i> , 130 (1857)	A/S		1	
<i>Aspergillus</i> P. Micheli ex Haller, <i>Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata</i> , 113 (1768)	A/E	6		3
<i>Asterosporium</i> Kunze, <i>Flora</i> , 225 (1819)	A/-	1		
<i>Aureobasidium</i> Viala & G. Boyer, <i>Revue Générale de Botanique</i> 3, 371 (1891)	A/D	2		2
<i>Beauveria</i> Vuill., <i>Bulletin de la Société Botanique de France</i> 59, 40 (1912)	A/S	4		
<i>Beltrania</i> Penz., <i>Nuovo Giornale Botanico Italiano</i> 16, 72 (1882)	A/S		1	
<i>Bifusella</i> Höhn., <i>Annales Mycologici</i> 15 (5), 318 (1917)	A/Lt	1	2	
<i>Bionectria</i> Speg., <i>Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba</i> 579, 563 (1919)	A/S	1		
<i>Biscogniauxia</i> Kuntze, <i>Revisio generum plantarum</i> 2, 398 (1891)	A/S	5	1	
<i>Botrytis</i> P. Micheli, <i>Nova Plantarum Genera</i> : 212, t. 91 (1729)	A/Lt		2	1
<i>Borchorstia</i> Erikss., <i>Botanisches Centralblatt</i> 47, 298 (1891)	A/Lt		2	
<i>Camarosporium</i> Schulzer, <i>Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft Wien</i> 20, 641 (1870)	A/D	1	1	1
<i>Camillea</i> Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2, 382 (1849)	A/S	1		
<i>Cenangium</i> Fr., <i>Kongliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar</i> 39, 360 (1818)	A/Lt		1	1
<i>Cephalosporium</i> Corda, <i>Icones fungorum hucusque cognitorum</i> 3, 11 (1839)	A/S	1		
<i>Ceratocystis</i> Ellis & Halst., <i>Sth. Coop. Series Bull.</i> , 14 (1890)	A/S			1
<i>Chaetomium</i> Kunze, <i>Mykologische Hefte</i> , 1: 15 (1817)	A/S	2		
<i>Chalastospora</i> E.G. Simmons, <i>CBS Biodiversity Series</i> 6, 668 (2007)	A/D	1		
<i>Chaunopycnis</i> W. Gams, <i>Persoonia</i> 11 (1), 75 (1979)	A/S	1		
<i>Cladosporium</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 8, 37 (1816)	A/D	5		2
<i>Coelomycetes</i> Grove, <i>British Stem- and Leaf-Fungi (Coelomycetes)</i> 1, xiii (1935)	A/Co	1		
<i>Cochliobolus</i> Drechsler, <i>Phytopathology</i> 24: 973 (1934)	A/D	1		
<i>Colletotrichum</i> Corda, <i>Deutschl. Flora, III (Pilze)</i> : >t. 21<, 41 (1831)	A/S	1		
<i>Colpoma</i> Wallr., <i>Flora Cryptogamica Germaniae</i> 2, 422 (1833)	A/Lt	1		
<i>Coniochaeta</i> (Sacc.) Cooke, <i>Grevillea</i> 16 (77), 16 (1887)	A/S	2		
<i>Coniothyrium</i> Corda, <i>Icones fungorum hucusque cognitorum</i> 4: 38 (1840)	A/D	2		1
<i>Cryptosporiopsis</i> Bubák & Kabát, <i>Hedwigia</i> 52: 360 (1912)	A/Lt	1		
<i>Cyclaneusma</i> DiCosmo, Peredo & Minter, <i>European Journal of Forest Pathology</i> 13 (4): 208 (1983)	A/Lt	3	3	2
<i>Cylindrocarpon</i> Wollenw., <i>Phytopathology</i> 1: 225 (1913)	A/S		1	
<i>Cytospora</i> Ehrenb., <i>Sylvae mycologicae Berolinenses</i> : 28 (1818)	A/S		1	1
<i>Daldinia</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 197 (1863)	A/S	6		
<i>Davidiella</i> Crous & U. Braun, <i>Mycological Progress</i> 2 (1): 8 (2003)	A/S	1		
<i>Davisomycella</i> Darker, <i>Canadian Journal of Botany</i> 45 (8): 1423 (1967)	A/Lt	1	1	
<i>Dendrodochium</i> Bonord., <i>Handbuch der allgemeinen Mykologie</i> : 135 (1851)	A/S			1
<i>Dermea</i> Fr., <i>Systema Orbis Vegetabilis</i> 1: 114 (1825)	A/Lt	1		
<i>Diaporthe</i> Nitschke, <i>Pyrenomyces Germanici</i> 2: 240 (1870)	A/S	1		
<i>Diplodia</i> Fr., <i>Annales des Sciences Naturelles Botanique</i> 1: 302 (1834)	A/D	1		
<i>Discostroma</i> Clem., <i>The genera of Fungi</i> : 50, 173 (1909)	A/S	1		
<i>Dothideomyces</i> O.E. Erikss. & Winka, <i>Myconet</i> 1: 5 (1997)	A/D	1		
<i>Dothichiza</i> Lib., <i>Fungi Selecti Galliae Exs.</i> : no. 627 (1880)	A/D		1	
<i>Dothistroma</i> Hulbary, <i>Illinois Natural History Survey Bulletin</i> 21: 235 (1941)	A/D		2	
<i>Dothioraceae</i> Theiss. & P. Syd., <i>Annales Mycologici</i> 15 (6): 444 (1918)	A/D	1		
<i>Drechslera</i> S. Ito, <i>Proceedings of the Imperial Academy Japan</i> 6 (8): 355 (1930)	A/D	1		
<i>Drechslerella</i> Subram., <i>Journal of the Indian Botanical Society</i> 42: 299 (1963)	A/O			1
<i>Elytroderma</i> Darker, <i>Contributions from the Arnold Arboretum of Harvard University</i> 1:62 (1932)	A/Lt	2	1	
<i>Entoleuca</i> Syd., <i>Annales Mycologici</i> 20: 186 (1922)	A/S	1		
<i>Epicoccum</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 8: 32 (1815)	A/D	5		5
<i>Eupenicillium</i> F. Ludw., <i>Lehrbuch der Niederen Kryptogamen</i> : 256, 257, 263 (1892)	A/E	3		
<i>Fimetariella</i> N. Lundq., <i>Botaniska Notiser</i> 117: 239 (1964)	A/S	2		
<i>Fusarium</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 3 (1): 10 (1809)	A/S	6	11	1

(cont.)

Género	Divisão/ Classe	Estatuto		
		E	P	S
<i>Geomyces</i> Traaen, <i>Nytt Magazin for Naturvidenskapene</i> 52: 28 (1914)	A/L	1		
<i>Geopyxis</i> (Pers.) Sacc., <i>Sylloge Fungorum</i> 8: 63 (1889)	A/P	1		
<i>Geotrichum</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 3 (1): 17 (1809)	A/S	1		
<i>Gibberella</i> Sacc., <i>Michelia</i> 1 (1): 43 (1877)	A/S	1	1	
<i>Gliocladium</i> Corda, <i>Icones fungorum hucusque cognitorum</i> 4: 30 (1840)	A/S	2		
<i>Glomerella</i> Spauld. & H. Schrenk, <i>Science New York</i> 17: 751 (1903)	A/S	1		
<i>Gremmeniella</i> M. Morelet, <i>Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et d'Archéologie de Toulon et du Var</i> 183: 9 (1969)	A/Lt	1	2	
<i>Hansfordia</i> S. Hughes, <i>Mycological Papers</i> 43: 15 (1951)	A/S	1		
<i>Hemiphacidium</i> Korf, <i>Mycologia</i> 54: 26 (1962)	A/Lt		1	
<i>Hendersonia</i> Berk., <i>Annals and Magazine of Natural History</i> 6: 430 (1841)	A/D		1	1
<i>Herpotrichia</i> Fuckel, <i>Fungi Rhenani Exsiccati Cent. XXII</i> 22: Fung. Rhen. no 2171 (1868)	A/D		1	
<i>Hormonema</i> Lagerb. & Melin, <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 2 (2-4): 219 (1927)	A/D	2		
<i>Hypocrea</i> Fr., <i>Systema Orbis Vegetabilis</i> 1: 104 (1825)	A/S	4	2	
<i>Hypoxylon</i> Bull., <i>Histoire des champignons de la France</i> . I: 168 (1791)	A/S	7		
<i>Ilyonectria</i> P. Chaverri & C. Salgado, <i>Studies in Mycology</i> 68: 69 (2011)	A/S	1		
<i>Juxtiphoma</i> Valenzuela-Lopez, Cano, Crous, Guarro & Stchigel, <i>Studies in Mycology</i> 90: 40 (2017)	A/D		1	
<i>Khuskia</i> H.J. Huds., <i>Transactions of the British Mycological Society</i> 46 (3): 358 (1963)	A/S	1		
<i>Kretzschmaria</i> Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2: 409 (1849)	A/S	2		
<i>Lachnellula</i> P. Karst., <i>Meddelanden af Societas pro Fauna et Flora Fennica</i> 11: 138 (1884)	A/Lt		2	
<i>Lachnum</i> Retz., <i>Floræ Scandinaviæ prodromus; enumerans: plantas Sveciæ, Lapponiæ, Finlandiæ, Pomeraniæ, Daniæ, Norvegiæ, Holsatiæ, Islandiæ & Groenlandiæ</i> : 256 (1779)	A/Lt			1
<i>Lecanosticta</i> Syd., <i>Annales Mycologici</i> 20: 211 (1922)	A/D		2	
<i>Lecythophora</i> Nannf., <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 32: 435 (1934)	A/S	1		
<i>Lepteutypa</i> Petr., <i>Annales Mycologici</i> 21 (3-4): 276 (1923)	A/S	1		
<i>Leptomelanconium</i> Petr., <i>Annales Mycologici</i> 21 (3-4): 179 (1923)	A/-	1	1	
<i>Leptosphaeria</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 234 (1863)	A/D	1	1	
<i>Leptostroma</i> Fr., <i>Observationes mycologicae</i> 1: 196 (1815)	A/Lt	1	1	
<i>Lindochium</i> Höhn., <i>Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Math.-naturw. Klasse Abt. I</i> 118: 1239 (1909)	A/-	1	1	
<i>Lirula</i> Darker, <i>Canadian Journal of Botany</i> 45 (8): 1420 (1967)	A/Lt	1		
<i>Lophiostoma</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 219 (1863)	A/D	1		
<i>Lophium</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 2: 345 (1823)	A/D			1
<i>Lophodermella</i> Höhn., <i>Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft</i> 35: 247 (1917)	A/Lt	1	2	
<i>Lophodermium</i> Chevall., <i>Flore Générale des Environs de Paris</i> 1: 435 (1826)	A/Lt	15	8	3
<i>Meloderma</i> Darker, <i>Canadian Journal of Botany</i> 45 (8): 1429 (1967)	A/Lt	2	1	
<i>Microdiplozia</i> Allesch., <i>Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, Pilze - Fungi Imperfecti</i> 1(7): 78 (1901)	A/D	1		
<i>Microthyrium</i> Desm., <i>Annales des Sciences Naturelles Botanique</i> 15: 137 (1841)	A/D			1
<i>Monocillium</i> S.B. Saksena, <i>Indian Phytopathology</i> 8: 9 (1955)	A/S	1		
<i>Mycosphaerella</i> Johanson, <i>Öfvers. K. VetenskAkad. Förh.</i> 41 (9): 163 (1884)	A/D	1	2	
<i>Myxotrichum</i> Kunze, <i>Mykologische Hefte</i> : 108 (1823)	A/D	1		
<i>Nectria</i> (Fr.) Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2: 387 (1849)	A/D			1
<i>Nemania</i> Gray, <i>A natural arrangement of British plants</i> 1: 516 (1821)	A/S	5		
<i>Neofabraea</i> H.S. Jacks., <i>Rep. Oregon Exp. Sta.</i> : 187 (1913)	A/Lt	1		
<i>Naemacyclus</i> Fuckel, <i>Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde</i> 27-28: 49 (1874)	A/Lt	1		
<i>Neurospora</i> Shear & B.O. Dodge, <i>Journal of Agricultural Research</i> 34 (11): 1025 (1927)	A/S	1		
<i>Nigrospora</i> Zimm., <i>Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde</i> 8: 220 (1902)	A/S	1	1	
<i>Nodulisporium</i> Preuss, <i>Klotzschii Herbarium Vivum Mycologicum, Editio novo. Century</i> : no. 1272 (1849)	A/S	1		
<i>Ophiostoma</i> Syd. & P. Syd., <i>Annales Mycologici</i> 17 (1): 43 (1919)	A/S	1		
<i>Paecilomyces</i> Bainier, <i>Bulletin de la Société Mycologique de France</i> 23: 27 (1907)	A/E			2
<i>Papulaspora</i> Preuss, <i>Linnaea</i> 24: 112 (1851)	A/S	1		
<i>Paraconiothyrium</i> Verkley, <i>Studies in Mycology</i> 50 (2): 327 (2004)	A/D	2		
<i>Penicillium</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 3 (1): 16 (1809)	A/E	35		4
<i>Pestalotiopsis</i> Steyaert, <i>Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles</i> 19 (3): 300 (1949)	A/S	6	1	1
<i>Pezizula</i> Tul. & C. Tul., <i>Selecta Fungorum Carpologia: Nectriei- Phacidiei- Pezizei</i> 3: 182 (1865)	A/L	4		
<i>Peziza</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 2: 40 (1822)	A/P	1		
<i>Pezizella</i> P., <i>Karst.</i> : 231 (1872)	A/Lt			1
<i>Phacidium</i> Fr., <i>Observationes mycologicae</i> 1: 167 (1815)	A/Lt	1		4
<i>Phaeomoniella</i> Crous & W. Gams, <i>Phytopathologia Mediterranea</i> 39: 113 (2000)	A/E	2		
<i>Phaeosphaeria</i> I. Miyake, <i>Botanical Magazine Tokyo</i> 23: 93 (1909)	A/D	1		
<i>Phialocephala</i> W.B. Kendr., <i>Canadian Journal of Botany</i> 39 (5): 1079 (1961)	A/L	2		
<i>Phialophora</i> Medlar, <i>Mycologia</i> 7 (4): 202 (1915)	A/E	1		
<i>Phoma</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 1: LII (1821)	A/D	8	2	2
<i>Phomopsis</i> Sacc. & Roum., <i>Revue Mycologique Toulouse</i> 6: 32 (1884)	A/S	3	3	1
<i>Pithomyces</i> Berk. & Broome, <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> 14: 100 (1873)	A/D	1		
<i>Plectania</i> Fuckel, <i>Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde</i> 23-24: 323 (1870)	A/P	1		
<i>Pleospora</i> Rabenh. ex Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 217 (1863)	A/P	1		
<i>Preussia</i> Fuckel, <i>Fungi Rhenani Exsiccati Cent. XVI-XVIII</i> 17-18: 175 (1866)	A/P	2		

Género	Divisão/ Classe	Estatuto		
		E	P	S
<i>Pseudoplectania</i> Fuckel, <i>Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde</i> 23-24: 324 (1870)	A/P	1		
<i>Pyronema</i> Carus, <i>Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum</i> 17: 370 (1835)	A/P	1		
<i>Rachicladosporium</i> Crous, U. Braun & C.F. Hill, <i>Studies in Mycology</i> 58: 38 (2007)	A/D	1		
<i>Pachyramichloridium</i> Videira & Crous, <i>Studies in Mycology</i> 87: 371 (2017)	A/D		1	
<i>Rhabdocline</i> Syd., <i>Annales Mycologici</i> 20: 194 (1922)	A/Lt	3		
<i>Rhinoctadiella</i> Nannf., <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 32: 461 (1934)	A/E		1	
<i>Rhinoctadiella</i> Kamyschko, <i>Notul. Syst. Inst. cryptog. Horti bot. Petropol.</i> : 165 (1960)	A/E			
<i>Rhizosphaera</i> L. Mangin & Har., <i>Bull. Soc. mycol. Fr.</i> : 56 (1907)	A/D	1	2	1
<i>Rosellinia</i> De Not., <i>Giornale Botanico Italiano</i> 1: 334 (1844)	A/S	3		3
<i>Sarea</i> Fr., <i>Systema Orbis Vegetabilis</i> 1: 86 (1825)	A/Lc	1		
<i>Sarocladium</i> W. Gams & D. Hawksw., <i>Kavaka</i> 3: 57 (1976)	A/S	1		
<i>Sclerostagonospora</i> Höhn., <i>Hedwigia</i> 59: 252 (1917)	A/D	1		
<i>Seimatosporium</i> Corda, <i>Deutschlands Flora, Abt. III. Die Pilze Deutschlands</i> 3-13: 79 (1833)	A/S	1		
<i>Septoria</i> Fr., <i>Systema Orbis Vegetabilis</i> 1: 119 (1825)	A/D	1		
<i>Septorioides</i> Quaedvlieg, Verkley & Crous, <i>Studies in Mycology</i> 75: 383 (2013)	A/D		1	
<i>Simplificillium</i> Zare & W. Gams, <i>Nova Hedwigia</i> 73 (1-2): 38 (2001)	A/S	1		
<i>Sirococcus</i> Preuss, <i>Linnaea</i> 26 (6): 716 (1855)	A/S		1	
<i>Sordaria</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 225 (1863)	A/S	3		
<i>Sphaeridium</i> Fresen., <i>Beiträge zur Mykologie</i> 2: 46 (1852)	A/-			1
<i>Sphaeropsis</i> Rafinesque-Schmalz: 207 (1815)	A/D	2	3	1
<i>Sordaria</i> Ces. & De Not., <i>Commentario della Società Crittogamologica Italiana</i> 1 (4): 225 (1863)	A/S			1
<i>Sporothrix</i> Hektoen & C.F. Perkins, <i>Journal of Experimental Medicine</i> 5: 80 (1900)	A/S	1		
<i>Sporormiella</i> Ellis & Everh., <i>The North American Pyrenomycetes</i> : 136 (1892)	A/D	2		
<i>Stemphylium</i> Wallr., <i>Flora Cryptogamica Germaniae</i> 2: 300 (1833)	A/D	1	1	
<i>Sydowia</i> Bres., <i>Hedwigia</i> : 66 (1895)	A/Lt		1	
<i>Therrya</i> Sacc., <i>Michelia</i> 2 (8): 604 (1882)	A/Lt		1	
<i>Thielavia</i> Zopf, <i>Verhandlungen des Botanischen Vereins der Provinz Brandenburg</i> 18: 101 (1876)	A/S	2		
<i>Thielaviopsis</i> Went, <i>Meded. Proefstat. Suikerriet W. Java</i> : 4 (1893)	A/S	1		
<i>Thyronectria</i> Sacc., <i>Grevillea</i> 4 (29): 21 (1875)	A/S		2	
<i>Tricharina</i> Eckblad, <i>Nytt Magazin for Botanik</i> 15 (1-2): 60 (1968)	A/P	1		
<i>Trichoderma</i> Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 92 (1794)	A/S	9		3
<i>Trichothecium</i> Link, <i>Neues Journal für die Botanik</i> 3 (1-2): 18 (1809)	A/S		1	2
<i>Truncatella</i> Steyaert, <i>Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles</i> 19 (3): 293 (1949)	A/S	2		1
<i>Trybliopsis</i> P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 19: 24, 262 (1871)	A/Lt	2		
<i>Tympanis</i> Tode, <i>Fungi Mecklenburgenses Selecti</i> 1: 24 (1790)	A/Lt			1
<i>Ulocladium</i> Preuss, <i>Linnaea</i> 24: 111 (1851)	A/P	1		
<i>Valsa</i> Adans., <i>Familles des plantes</i> 2: 9, 617 (1763)	A/S			1
<i>Whalleya</i> J.D. Rogers, Y.M. Ju & F. San Martín, <i>Mycotaxon</i> 64: 48 (1997)	A/S	2		
<i>Xylaria</i> Hill ex Schrank, <i>Baierische Flora</i> 1: 200 (1789)	A/S	14		
<i>Xylohypha</i> (Fr.) E.W. Mason, <i>The natural history of the Scarborough district</i> 1: 80 bis (1953)	A/-			1
∑ Ascomycota = 448		294	87	67
<i>Armillaria</i> (Fr.) Staude, <i>Die Schwämme Mitteldeutschlands, in besondere des Herzogthums</i> : 130 (1857)	B/A		1	
<i>Bjerkandera</i> P. Karst., <i>Meddelanden af Societas pro Fauna et Flora Fennica</i> 5, 38 (1879)	B/A	1		
<i>Chondrostereum</i> Pouzar, <i>Ceská Mykologie</i> 13 (1), 17 (1959)	B/A			1
<i>Coleosporium</i> Lév., <i>Annales des Sciences Naturelles Botanique</i> 8: 373 (1847)	B/P		2	
<i>Cronartium</i> Fr., <i>Observationes mycologicae</i> 1: 220 (1815)	B/P		2	
<i>Cylindrobasidium</i> Jülich, <i>Persoonia</i> 8 (1): 72 (1974)	B/A			1
<i>Fomitopsis</i> P. Karst., <i>Meddelanden af Societas pro Fauna et Flora Fennica</i> 6: 9 (1881)	B/A		2	
<i>Ganoderma</i> P. Karst., <i>Revue Mycologique Toulouse</i> 3 (9): 17 (1881)	B/A		1	
<i>Heterobasidium</i> Masee, <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> 25: 127 (1889)	B/A		3	
<i>Hypholoma</i> (Fr.) P. Kumm., <i>Der Führer in die Pilzkunde</i> : 21, 72 (1871)	B/A			1
<i>Irpex</i> Fr., <i>Systema Orbis Vegetabilis</i> 1: 81 (1825)	B/A	2		
<i>Laetiporus</i> Murrill, <i>Bulletin of the Torrey Botanical Club</i> 31 (11): 607 (1904)	B/A		1	
<i>Melampsora</i> Castagne, <i>Observations sur quelques plantes acotylédonnées de la famille des Urédinées et dans les sous-tribus des Nemasporées et des Aecidinées, recueillies dans le Dep. des Bouches-du-Rhône</i> 2: 18 (1843)	B/P		1	
<i>Merulius</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 1: 326 (1821)	B/A	1		
<i>Mucronella</i> Fr., <i>Hymenomycetes europaei</i> : 629 (1874)	B/A	1		
<i>Onnia</i> P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 48: 326 (1889)	B/A		1	
<i>Peniophora</i> Cooke, <i>Grevillea</i> 8 (45): 20 (1879)	B/A	1		
<i>Phaeolus</i> (Pat.) Pat., <i>Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hyménomycètes</i> : 86 (1900)	B/A		1	
<i>Phanerochaete</i> P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 48: 426 (1889)	B/A			1
<i>Phellinus</i> Quél., <i>Enchiridion Fungorum in Europa media et praesertim in Gallia Vigentium</i> : 172 (1886)	B/A		3	1
<i>Pholiota</i> (Fr.) P. Kumm., <i>Der Führer in die Pilzkunde</i> : 22, 83 (1871)	B/A		1	
<i>Phlebiopsis</i> Jülich, <i>Persoonia</i> 10 (1): 137 (1978)	B/A			1

Género	Divisão/ Classe	Estatuto		
		E	P	S
<i>Resinicium</i> Parmasto, <i>Conspectus Systematis Corticiacearum</i> : 97 (1968)	B/A			1
<i>Rhizoctonia</i> DC., <i>Flore française</i> 6: 110 (1815)	B/A	1	1	
<i>Rhodotorula</i> F.C. Harrison, <i>Transactions of the Royal Society of Canada</i> 21 (2): 349 (1927)	B/M	1		
<i>Schizophyllum</i> Fr., <i>Observationes mycologicae</i> 1: 103 (1815)	B/A	2		1
<i>Serpula</i> (Pers.) Gray, <i>A natural arrangement of British plants</i> 1: 637 (1821)	B/A			1
<i>Sistotrema</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 1: 426 (1821)	B/A			2
<i>Sistotrema</i> Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 108 (1794)	B/A			
<i>Stereum</i> Hill ex Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 110 (1794)	B/A	1		1
<i>Trametes</i> Fr., <i>Corpus Florarum provincialium suecicae I. Floram Scanicam</i> : 339 (1835)	B/A	1		
<i>Tritirachium</i> Limber, <i>Mycologia</i> 32: 26 (1940)	B	1		
Σ Basidiomycota = 41		11	20	10
<i>Gongronella</i> Ribaldi, <i>Rivista di Biologia</i> 49 (1): 164 (1952)	M/Mc	1		
<i>Mortierella</i> Coem., <i>Bulletin de l'Académie Royale des Sciences de Belgique Classe des Sciences</i> 15: 536 (1863)	M/Mt	1	1	
<i>Mucor</i> P. Micheli ex L., <i>Species Plantarum</i> : 1185 (1753)	M/Mc	3		1
<i>Rhizopus</i> Ehrenb., <i>Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldina-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum</i> 10: 198 (1820)	M/Mc			2
<i>Umbelopsis</i> Amos & H.L. Barnett, <i>Mycologia</i> 58: 807 (1966)	M/U	3		
Σ Mucoromycota = 12		8	1	3
LEVEDURA		2		

Divisão/Classe		Divisão/Classe	
<i>Ascomycota/Coelomycetes</i>	A/Co	<i>Basidiomycota/Agaricomycetes</i>	B/A
<i>Ascomycota/Dothideomycetes</i>	A/D	<i>Basidiomycota/Microbotryomycetes</i>	B/M
<i>Ascomycota/Eurotiomycetes</i>	A/E	<i>Basidiomycota/Pucciniomycetes</i>	B/P
<i>Ascomycota/Lecanoromycetes</i>	A/Lc	<i>Mucoromycota/Mucoromycetes</i>	M/Mc
<i>Ascomycota/Leotiomycetes</i>	A/Lt	<i>Mucoromycota/Mortierellomycetes</i>	M/Mt
<i>Ascomycota/Orbiliomycetes</i>	A/O	<i>Mucoromycota/Umbelopsidomycetes</i>	M/U
<i>Ascomycota/Pezizomycetes</i>	A/P		
<i>Ascomycota/Sordariomycetes</i>	A/S		

2.4. A DMP

2.4.1. Breve sequência histórica da distribuição geográfica do NMP

O NMP é considerado uma espécie originária da América do Norte (de Guiran & Bruguir, 1989) não constituindo ameaça para as espécies de coníferas endémicas quer devido à sua resistência à doença quer ao facto de o período de altas temperaturas no verão ser suficientemente curto para não favorecer o seu desenvolvimento.

No início do Séc. XX observou-se a mortalidade crescente em pinheiros numa zona portuária perto Nagasaki assistindo-se nas décadas subsequentes à dispersão deste fenómeno para áreas vizinhas (Futai, 2008). Inicialmente atribui-se a causa desta mortalidade a insetos coleópteros das famílias *Cerambycidae*, *Curculionidae* e *Scolitydae*. No entanto foi demonstrado que a doença era provocada por um nemátode pertencente ao género *Bursaphelenchus* (Tokushige & Kiyohara, 1969; Kiyohara & Tokushige, 1971; Mamiya, 1988). Mamiya & Enda (1972) e Morimoto & Iwasaki, (1972) clarificaram que *Monochamus alternatus* constituía o único vetor do nemátode tendo o ciclo da doença sido descrito mais tarde por Mamiya (1975).

Além da presença do NMP na América do Norte (Canadá e EUA) (EPPO, 2019) e do registo primeira ocorrência da DMP, no Japão, em 1905 (Yano, 1913) assistiu-se posteriormente à dispersão da doença, numa primeira fase, em países orientais: China (Cheng, 1983), Taiwan (Tzannes & Jan, 1985) e Coreia do Sul (Yi *et al.*, 1989). Khan & Gbadegesin (1991) reportam a deteção do NMP na Nigéria, embora a EPPO (2019) considere este registo duvidoso não reconhecendo oficialmente a presença do NMP neste país.

A deteção no México é atribuída a Dwinell (1993) e o primeiro registo na Europa, em 1999, ocorreu em Portugal continental (Mota *et al.*, 1999) e na ilha da Madeira em 2009 (Fonseca *et al.*, 2012), sendo posteriormente detetado, em 2008, em Espanha (Abelleira *et al.*, 2011).

Em Portugal, além da sua distribuição se ter estendido à ilha da Madeira, assistiu-se igualmente a uma evolução da mancha florestal do território continental atingida por esta doença. Inicialmente detetado na Península de Setúbal a zona afetada expandiu-se inicialmente para Sul e em 2007 ocupava cerca de 1 milhão de hectares, valor bastante superior aos cerca de 300000 ha que inicialmente correspondia à zona de restrição (ZR) (1999-2000). Considera-se a ZR como a área afetada (ZA) propriamente dita, envolvida por uma faixa de segurança com cerca de 20Km de largura – Zona Tampão (ZT). Apesar de imposições de ordem legislativa, por parte da União Europeia, no sentido de travar ou minimizar a expansão da doença para o restante território – Zona Isenta (ZI) – registaram-se em 2008 novos focos na região Centro do país (zona da Lousã) e posteriormente, por a disseminação ter evoluído para vários outros locais, todo o território continental foi declarado como ZR.

A ameaça da expansão da doença para o restante território do continente Europeu é bastante preocupante tendo em conta que além da presença de quatro espécies de pinheiro muito suscetíveis – *P. mugo*, *P. nigra*, *P. pinaster* e sobretudo *P. sylvestris*, dada a dimensão da área que ocupa – se registam mais três espécies do género *Monochamus*, em áreas consideravelmente extensas – *M. rosenmuelleri*, *M. sutor* e *M. sutor* – além de *M. galloprovincialis* que ocupa praticamente a totalidade do território europeu e a única registada na Península Ibérica.

Por se considerar que a distribuição a nível mundial da doença resulta em grande parte da circulação de material lenhoso infetado tem-se igualmente verificado evolução crescente de medidas de exigência impostas à exploração e transformação industrial de coníferas.

Num trabalho de Hirata *et al.* (2017) avaliou-se o impacto das alterações climáticas na distribuição de 18 espécies de pinheiro suscetíveis ao NMP para dois horizontes temporais (2050 e 2070) com base na adaptação de um índice (MB Index) já proposto para explicar a distribuição das áreas afetadas pela DMP no Japão. Os autores procederam à comparação de entre 4 RCPs¹ para os dois futuros horizontes temporais (2050 e 2070) calculando 8 valores de MBindex (para cada região vulnerável ao NMP) com 19 variáveis bioclimáticas do WorldClim. Considerando, como exemplo, a Europa, em que perante as atuais condições climáticas apenas as regiões do Sul do Continente se consideram vulneráveis à DMP, perante os cenários de alterações climáticas modeladas (com as 4 RCPs) são previstas consideráveis aumentos das áreas de degradação do habitat bem como aumento das manchas com risco de DMP (sendo os cenários previsivelmente mais favoráveis à expansão da doença para RCPs superiores, nomeadamente para RCP8.5). Dum modo geral o estudo prevê a expansão da região vulnerável à doença para o Norte dos três Continentes (Europa, Ásia e América) dependendo a expansão da área, como atrás referido, do nível de emissões de gases com efeito de estufa. Os autores salvaguardam o facto de a expansão da área afetada pela doença não depender

¹ RCP – Representative Concentration Pathways – foram adoptados pelo IPCC os valores de RCP2.6; RCP4.5; RCP 6.0 e RCP8.5 Intergovernmental Panel on Climate Change (colocar na lista)

exclusivamente de fatores climáticos mas também da capacidade de dispersão dos insetos vetores e da suscetibilidade dos hospedeiros considerados. Por sua vez, Calvão *et al.* (2019) ao estudarem os efeitos na paisagem causados pela DMP em Portugal alertam que o estudo do impacto da invasão de uma doença não pode ser dissociado dos efeitos da diversidade climática associada.

2.4.2. O ciclo de vida do NMP. O Hospedeiro.

O ciclo de vida do NMP compreende quatro estádios juvenis, e adultos, com dimorfismo sexual e designadas por formas propagativas. O 1.º estágio juvenil (J_1) desenvolve-se dentro do ovo e após a 1.ª muda, ainda dentro do ovo, o 2.º estágio (J_2) eclode e origina os 3.º e 4.º estádios juvenis (J_3 , J_4) e adultos. Em condições laboratoriais o ciclo de vida completa-se entre 4 a 6 dias (Mamiya, 1983; Hasegawa & Miwa, 2008; Vicente *et al.*, 2012), sendo cultivado em meio inoculado com o fungo *Botrytis cinerea* a 25°C.

O ciclo de vida pode ocorrer em duas fases, designadas de fitófaga e micófaga. Na fase fitófaga o NMP alimenta-se de células vivas de árvores sãs e na fase micófaga recorre a fungos das árvores em declínio como alimento sendo estes transmitidos por insetos também eles colonizadores do mesmo hospedeiro.

Perante condições desfavoráveis, os jovens J_2 sofrem alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se nos designados estádios juvenis de dispersão – J_{III} e J_{IV} – conhecidos como jovem pré-*dauer* e jovem *dauer*, respetivamente. J_{IV} está especialmente adaptado a ser transportado pelo inseto vetor uma vez que o seu corpo se encontra revestido por uma substância adesiva protetora ocorrendo a sua transmissão para novas plantas ou durante a alimentação do inseto – transmissão primária – ou aquando da ovoposição – transmissão secundária.

Após a 4.ª muda de J_{IV} surgem os adultos que migram através do sistema vascular das árvores invadindo os vasos condutores através dos quais circula a seiva bruta. Por se alimentarem das células do parênquima e das células epiteliais dos canais de resina originam a cavitação e a embolia dos traqueídeos e desta forma impedem a circulação da seiva e a diminuição da circulação da resina até à sua cessação devido à rutura dos canais resiníferos e à difusão de oleorosinas para os traqueídeos adjacentes.

Uma vez que a sintomatologia exibida pelas plantas infetadas por *B. xylophilus* não é específica da DMP torna-se necessária a recolha de amostras para confirmação laboratorial da presença do nemátode.

Em árvores infetadas observa-se a murchidão e descoloração das agulhas (desde o amarelecimento inicial até tonalidades acastanhadas) e, conseqüentemente, secura parcial ou total da copa até à existência de ramos quebradiços. Na presença de temperaturas superiores a 20°C ocorre a paragem da transpiração foliar ao fim de 20 a 30 dias e a conseqüente a morte da árvore. Zhao *et al.* (2009) e Proença *et al.* (2010) sugerem escalas com 5 e 6 graus de intensidade, respetivamente, associados à evolução da sintomatologia desde a ausência de sintomas até à generalização da infeção.

Apesar da clareza do ciclo atrás descrito e da sintomatologia típica da doença, observa-se uma grande variação da patogenicidade associada aos diferentes isolados de *B. xylophilus* (Fonseca *et al.*, 2013) podendo contribuir para essa variação não só a planta (diferente grau de resistência das plantas hospedeiras – entre diferentes espécies e entre diferentes indivíduos) mas também o isolamento geográfico ou o *stress* ambiental.

Outros aspetos relacionados com o ciclo da doença continuam ainda por clarificar como a origem da patogenicidade e o mecanismo de seleção do vetor pelas larvas *dauer*, nomeadamente o sinal de indução específico dessa associação. No entanto também estes aspetos considerados menos claros no contexto do ciclo da doença têm sido objeto de avanços em termos de conhecimento. Zhao *et al.* (2014) referem um conjunto de

resultados relativos: à influência que diferentes proporções de terpenos voláteis assumem em fases concretas das várias interações intervenientes no ciclo da doença; à influência de compostos orgânicos secretados pela superfície do corpo das larvas de *Monochamus* spp., nomeadamente durante a eclosão; ao contributo de mediadores químicos (fatores de crescimento) na formação das larvas *dauer*; etc. No seu conjunto estas informações constituem importantes pistas para a compreensão de todas as fases do ciclo da doença.

As principais espécies de plantas hospedeiras de *B. xylophilus* pertencem ao género *Pinus* sendo *P. sylvestris* a principal espécie europeia suscetível ao NMP com uma distribuição muito ampla na Europa. *P. pinaster*, *P. mugo* e *P. nigra* são exemplos de espécies suscetíveis com relevância comercial e ambiental no continente europeu sendo *P. pinaster* a espécie com maior importância em Portugal. Outras espécies como *P. halepensis* e *P. pinea* são consideradas como moderadamente suscetíveis (Evans *et al.*). No entanto, e como já atrás foi referido, os mesmos autores apontam outros géneros passíveis de constituírem hospedeiros do NMP (*Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* e *Pseudotsuga*).

A distribuição do nemátode no interior da árvore hospedeira é heterogénea estando associada aos diferentes graus de sintomatologia e características específicas das árvores. Fonseca *et al.* (2013) referem que em *P. massoniana* e *P. thunbergii* a distribuição radial dos nemátodes está relacionada com o diâmetro dos pinheiros e que a distribuição axial depende do estágio de desenvolvimento da doença. No estudo referido pelos anteriores autores, em troncos com diâmetro à altura do peito (DAP) com 6 a 11 cm a maioria dos nemátodes encontrava-se na zona mais interna do borne e, por sua vez, em troncos com DAP superior a 11 cm, a zona mais externa do borne concentrava maior número de NMP. Relativamente à distribuição axial constatou-se ser maior a concentração de nemátodes nas zonas mais altas de árvores com pouca sintomatologia da DMP e que para situações com crescente visibilidade de sintomas se verificou maior concentração em ramos de maior diâmetro e nos ramos mais próximos do tronco. Zhao *et al.* (2009) registaram maior número de nemátodes no tronco de árvores com maior grau de sintomatologia. Trabalhos de Lopes *et al.* (2011) permitiram observar maior abundância do NMP no tronco de árvores com sintomatologia mais avançada, contrastando com situações de árvores com sintomas iniciais da doença em que se verificou maior abundância do NMP em ramos da copa. Por sua vez, Nakajima *et al.* (2019) observaram uma variação espaço temporal da distribuição do NMP num clone resistente de *P. thunbergii* com observações a 7 e 19 meses após a inoculação. Observou-se que a migração e propagação do nemátode não ocorreu nos ramos, restringindo-se apenas ao eixo vertical correspondente ao porta-enxerto e garfo e apenas na observação efetuada 7 meses após a inoculação.

2.4.3. O vetor do NMP

O vetor constitui uma componente fundamental de uma doença. No caso particular da DMP é só através de um vetor que o seu agente causal, o NMP, consegue abandonar um hospedeiro infetado e colonizar outro hospedeiro, saudável. Sem o vetor as populações de *B. xylophilus* tenderiam a diminuir no interior do hospedeiro até à sua extinção. Em Portugal é o longicórnio do pinheiro, *Monochamus galloprovincialis* o inseto vetor que oferece o meio de transporte ao nemátode para outras plantas ultrapassando assim a impossibilidade de este, só por si, o conseguir, bem como assegurar a inoculação nesses hospedeiros. Embora em Portugal o género *Monochamus* esteja apenas representado por esta espécie, já foram identificadas 7 espécies comprovadamente passíveis de constituir vetores do NMP (Evans *et al.*, 1996), conhecendo-se igualmente outras que provavelmente possam desempenhar este papel e outras consideradas improváveis de o fazer (Naves *et al.*, 2013).

Os mesmos autores clarificam também a possibilidade de insetos deste género poderem estar associados a outras do género *Bursaphelenchus*.

Para que a DMP se possa manifestar e causar a morte dos hospedeiros são obrigatórias três ocorrências na interação inseto-vetor: a entrada do NMP no corpo do vetor; o transporte para outras plantas pelo vetor e a saída do NMP do corpo do vetor para a planta hospedeira.

A espécie *Monochamus galloprovincialis* pode ser encontrada em praticamente todas as áreas ocupadas de Portugal continental e ilha da Madeira ocupadas com *P. pinaster* tratando-se ou não de povoamentos infetados por *B. xylophilus*. No mecanismo de entrada do NMP no corpo do vetor têm influência fatores como as condições climatéricas, a localização geográfica, características do povoamento e do hospedeiro bem como da abundância populacional do vetor e do nemátode.

A densidade populacional do NMP depende em grande parte da diversidade e abundância de fungos mas também do teor de água da madeira. Como consequência da infeção assiste-se ao declínio progressivo até à morte do hospedeiro passando o NMP, nestas circunstâncias, a exibir um comportamento micófago, alimentando-se de fungos que colonizam a madeira, tendo sido constatado por Maehara (2008) que se observa a preferência pelas espécies dos géneros *Ophiostoma* e *Ceratocystis*. Apesar de haver evidência de os adultos de *M. galloprovincialis* transportarem fungos responsáveis pelo azulado da madeira (onde se incluem fungos Ophiostomaceae) considera-se que são os insetos xilófagos e sub-corticais que contribuem consideravelmente no papel de transporte destes fungos e no sucesso e da colonização e enfraquecimento da planta hospedeira.

Sriwati *et al.* (2007) e Maehara (2008) observaram que outras espécies de fungos presentes na madeira (ex.: *Verticillium* spp. e *Trichoderma* spp. podem ter um efeito negativo nas populações de NMP e outras espécies como as pertencentes aos géneros *Rhizoctonia* e *Penicillium* parecem não ter qualquer influência nessas populações.

É de realçar a particular e exclusiva interação entre *M. galloprovincialis* e *B. xylophilus* observando-se que o NMP ignora câmaras pupais de outros insetos morfologicamente muito semelhantes como o caso de espécies dos géneros *Arhophalus* e *Acanthocinus* (também cerambicídeos) mesmo em situações de coabitação das mesmas secções de madeira.

Na presença de *Monochamus* spp. os nemátodes entram na câmara pupal e deslocam-se pelas extensões filamentosas emitidas pelos fungos que revestem a parede da câmara e entram em contacto com o corpo do inseto (Aikawa, 2008). A agregação dos nemátodes na câmara pupal (J_{III}) e a muda para J_{IV} – estágio que se caracteriza por ser resistente a condições ambientais adversas – precede a agregação dos nemátodes maioritariamente aos insetos adultos não esclerotizados (embora também seja possível a agregação a larvas e pupas).

O transporte do NMP para novas plantas hospedeiras pode ocorrer nas traqueias mas também no exterior do exoesqueleto e noutras partes do corpo como o abdómen e as patas podendo a saída do NMP do corpo do inseto para a planta ocorrer no pasto de maturação enquanto se alimenta ou quando a fêmea seleciona árvores em declínio, mortas ou recém-cortadas para efetuar a postura (Linit, 1988).

No nosso País as emergências de *M. galloprovincialis* ocorrem ao longo de um intervalo de tempo bem definido, que se inicia na primavera/início do verão prolongando-se por três ou mais meses tendo Naves *et al.*, (2013) observado que na zona de Tróia (Alentejo) as primeiras emergências ocorrem em maio e as últimas em agosto e início de setembro ocorrendo o pico em junho e julho. Tal como para outros insetos florestais o desenvolvimento desta espécie depende intimamente das variações de temperaturas que ocorrem no ambiente,

nomeadamente nas galerias larvares. O ciclo de vida, em geral, completa-se num ano (ciclo univoltino) havendo períodos passíveis de coexistirem vários estádios de desenvolvimento (Naves *et al.*, 2013).

A época do ano em que ocorre a emergência dos insetos e a localização e a profundidade da câmara pupais são considerados fatores importantes observando-se que a densidade populacional do NMP em regra é maior nos insetos que emergem mais cedo e de câmaras pupais mais profundas (Kobayachi *et al.*, 1984) e tendo em conta que o teor de humidade da madeira desempenha um importante fator a considerar bem como a sua influência na comunidade micófaga – em regra é menor o número de nemátodes transportados por insetos que emergem de madeira muito seca ou saturada de água.

2.5. Outros organismos envolvidos na DMP (Insetos, Fungos e Bactérias)

Para além da presença obrigatória dos três componentes já mencionados para a manifestação da DMP – nemátode, planta hospedeira e inseto vetor – é amplamente consensual que existem outros organismos que de alguma forma, direta ou indiretamente se relacionam com a DMP através das interações com um ou mais dos três organismos obrigatórios. De entre eles mencionam-se outras espécies de insetos além do vetor – os insetos subcorticais xilófagos – as bactérias e os fungos, objeto central deste trabalho aos quais se dará mais ênfase.

O Quadro 3 evidencia trabalhos já realizados, com referência à DMP e a espécies de fungos que atuam quer ao nível do NMP quer como entomopatogénicos relativamente a *M. galloprovincialis*. Quanto à ação sobre o NMP os exemplos considerados neste Quadro ilustram a contribuição dos fungos através de produtos do seu metabolismo, classificados como nematocidas (exs.: géneros *Fusarium*, *Geotrichum* e *Trichoderma*) ou pela ação designada “nematófaga” avaliada através da imobilização e/ou digestão do nemátode. Neste último caso realçam-se espécies pertencentes à divisão *Basidiomycota* que atuam como nematófagas, mediante células secretoras de compostos tóxicos e/ou pela própria disposição espacial do micélio que atua como armadilha para o nemátode (Ishizaki *et al.*, 2015).

Quadro 3 – Exemplos de espécies de fungos endófitos com referência a algum tipo de ação sobre *B. xylophilus* (BX) ou *M. galloprovincialis* (MG).

Espécie	Divisão/Classe*	Ação sobre BX	Ação sobre MG	Local	Isolamento	Referência
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	A/S		● entomopatogénica	Espanha	Madeira, larvas, pupas e adultos de <i>M. galloprovincialis</i>	Álvarez-Baz <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	● nematocida		Coreia do Sul	–	Kwon <i>et al.</i> , 2007
<i>Geotrichum. Sp AL4</i>	A/S	● nematocida		China	<i>Azadirachta indica</i>	Li, G.-H., 2007
<i>Isaria farinosa</i>	A/S		● entomopatogénica	Espanha	Madeira, larvas, pupas e adultos de <i>M. galloprovincialis</i>	Álvarez-Baz. <i>et al.</i> , 2015
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	A/A		● entomopatogénica	Espanha	Madeira, larvas, pupas e adultos de <i>M. galloprovincialis</i>	Álvarez-Baz <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichoderma</i> spp.	A/S	● redução de #J _{IV} em <i>Monochamus</i>		Japão	<i>Pinus densiflora</i> <i>Pinus thunbergii</i> × <i>Pinus massoniana</i>	Maehara, 2007
<i>Trichoderma</i> spp.	A/S	● nematocida		China	solo	Yang, Z. <i>et al.</i> , 2012
<i>Criptotrampa asprata</i>**	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Conocybe</i> sp.	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Hohenbuehelia petaloides</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Hohenbuehelia reniformis</i>**	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Hyphoderma rude</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Lentinula edodes</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Omphalotus quepiniformis</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Panellus stipticus</i>**	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>**	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015
<i>Resupinatus</i> sp.**	B/A	● nematófaga		Japão	–	Ishizaki <i>et al.</i> , 2015

* **Divisão/Classe**

A/A: Ascomycota/Ascomycetes

A/S: Ascomycota/Sordariomycetes

B/A: Basidiomycota/Agaricomycetes

– : sem informação

** **Ação nematófaga promissora** justificando-se aprofundar estudos de aplicação prática

2.5.1. As interações entre Insetos, Fungos e Hospedeiro na DMP

Além do inseto vetor *M. galloprovincialis*, já referido, existem outras espécies que apesar de não serem elementos obrigatórios do mecanismo da DMP a influenciam indiretamente. Salientam-se os insetos subcorticais xilófagos associados ao declínio do hospedeiro e, no que a este trabalho importa, assumem relevância por haver evidência, como adiante se clarificará, de também eles desempenharem a função de vetores de fungos e/ou deles se alimentarem.

Os insetos sub-corticais alimentam-se e reproduzem-se no tronco do hospedeiro, pertencem às famílias *Curculionidae*, *Scolitidae* e outros *Cerambycidae* (Kishi, 1995) e todos eles se alimentam de madeira da planta hospedeira.

Os escolitídeos constroem as galerias de postura no floema do hospedeiro onde as suas larvas se alimentam, dificultando a circulação dos fluidos orgânicos na planta e conduzindo à morte da árvore. Atacam principalmente árvores debilitadas sendo por isso abundantes após a ocorrência de fogos, ataques de desfolhadores e/ou sempre que as árvores sejam sujeitas a outro tipo de stress. São exemplos a mencionar, pelos danos que causam em *P. pinaster*, as espécies comumente designadas por bóstricos: o bóstrico grande, *Ips sexdentatus* e o bóstrico pequeno, *Orthotomicus erosus*; as helésinas: *Tomicus piniperda*, *T. destruens* e *T. minor* e o hilurgo, *Hylurgus ligniperda*. *Ips sexdentatus* coloniza preferencialmente os dois terços inferiores da árvore e *Orthotomicus erosus* na parte inicial da flecha e nos ramos do arvoredo (Vasconcelos & Duarte, 2013). Das três helésinas mencionadas *T. destruens* assume maior relevância, alimenta-se de floema e de fungos (Fernandez *et al.*, 1999) e, em igualdade de outras circunstâncias prefere *P. pinaster* para acasalamento e reprodução mas opta pelo pinheiro de Alepo para realizar o pasto de maturação sexual. As helésinas alojam-se sobretudo no terço intermédio da árvore. O hilurgo, *H. ligniperda*, parece não representar grande significado económico mas é bastante abundante nos pinhais ocupando a zona da base dos troncos ou nas raízes de árvores mortas ou em declínio acentuado ou em madeira em contacto com o solo.

De acordo com Krokene & Solheim (1998) os escolitídeos estabelecem associações complexas e especializadas com fungos patogénicos ou não, vantajosas para ambos (Kirisits, 2010; Persson *et al.*, 2011). Roskov *et al.*, (2013) referem que, de entre os fungos associados aos escolitídeos, se encontram espécies dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e fungos imperfeitos. Os géneros *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis* e *Ophiostoma* constituem os exemplos dos ascomycotas filamentosos mais importantes e conhecidos por serem agentes patogénicos e causadores do azulado da madeira (Jacobs & Wingfield, 2001). Algumas espécies do género *Leptographium*, habitualmente associado a *T. piniperda*, *Ambrosiella*, *Raffaelea* e *Fusarium* constituem exemplos de fungos imperfeitos associados a este grupo de insetos (Beaver, 1989; Romón *et al.*, 2007). O transporte destes fungos pelos escolitídeos pode ocorrer no intestino, no exoesqueleto ou nos micângios (localizados em diversas partes do corpo do inseto como nas maxilas, nas mandíbulas ou no tórax e, apesar de, na sua grande maioria, as espécies de escolitídeos não se alimentar diretamente dos fungos que transporta, estes constituem importante recurso como suplemento alimentar a larvas, insetos imaturos e adultos (Paine *et al.*, 1997; Six, 2003).

Fungos dos géneros *Ophiostoma* e *Ceratocystis* (Maehara *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005a), *Fusarium* (Zhao, 2008) e o fungo patogénico *Sphaeropsis sapinea* (Sriwati *et al.*, 2008) surgem muitas vezes após ataque de escolitídeos. Jankonwiak & Bilanski (2013) sugerem a importância de *Hylastes* spp. e de *H. ligniperda* como vetores de *S. sapinea* em *Pinus* spp.

Estes fungos ao serem inoculados em novos hospedeiros contribuem para o enfraquecimento das árvores, participam na decomposição dos tecidos da madeira facilitam a construção de novas galerias, favorecem a infecção uma vez que diminuem o vigor da árvore e servem de alimento aos insetos adultos e larvas.

Embora o NMP se alimente do conteúdo das células na fase inicial da infecção recorre aos fungos responsáveis pela DAM, nomeadamente a fungos da família Ophiostomataceae como fonte de alimento e quando tal acontece observa-se o aumento na reprodução de *B. xylophilus* (Zhao *et al.*, 2014). Existe também evidência de este grupo de fungos poder ser transportado por *M. alternatus* e assim ser possível a transmissão para árvores sãs (Suh *et al.*, 2013). Por sua vez autores como Maehara & Futai (2000) e Wang *et al.* (2005b) constataram alterações na micoflora existente em árvores mortas ao longo do tempo e, de entre o conjunto de espécies, algumas constituíam fontes preferenciais de alimento para o NMP (ex.: *Ceratocystis* sp., *Diplodia* sp. e *Pestalotia* sp.) ao contrário de *Trichoderma* spp., *Verticillium* spp. e *Cephalosporium* spp. (Kobayashi *et al.*, 1974; 1975; Fukushige, 1991). Em condições laboratoriais Maehara & Futai (1997) observaram que a proliferação das várias espécies de fungos em torno da câmara pupal de *M. alternatus* condicionava a multiplicação de NMP mas também o número nemátodes transportados pelo inseto.

Maehara & Futai (1997) e Zhao *et al.* (2013) exploraram a influência da composição da comunidade micófaga na população do NMP. Duma forma geral os estudos indicam que a presença de *Ophiostoma minus* e *Sporothrix* sp.1 influenciam fortemente o aumento da reprodução do nemátode – e conseqüentemente o número de nemátodes dispersos pelo vetor. Observou-se que os insetos provenientes de madeira inoculada primeiramente com *O. minus* e posteriormente com *Trichoderma* (O+T) transportaram um número de NMP muito superior quando comparado com madeira inoculada simultaneamente com *O. minus* e com *Trichoderma* (O, T, simultaneamente) ou primeiramente com *Trichoderma* e posteriormente com *O. minus* (T+O). Zhao *et al.* (2013) concluíram que *Sporothrix* sp.1 influencia positivamente a população do NMP e a manutenção da associação com o seu vetor. Estes trabalhos permitiram aos mesmos autores concluir que o composto álcool-diacetona (DAA) libertado pela madeira infetada com *Sporothrix* sp.1 promove a fecundidade do NMP e o crescimento e sobrevivência das larvas do inseto vetor.

Todas estas observações parecem indicar que a comunidade micobilógica residente na madeira morta constitui um dos fatores que mais condiciona a multiplicação e a distribuição de *B. xylophilus*.

Jankowiak *et al.* (2007) debruçaram-se sobre a interação entre três Ophiostomataceae (*O. minus*, *O. piceae* e *Leptographium procerum*), o inseto vetor do NMP, *M. galloprovincialis*, e o hospedeiro *P. sylvestris*. Existia a evidência prévia de que *O. minus* seria o principal colonizador do floema e da madeira de *P. sylvestris* (Jankowiak & Kurek, 2006), sendo esta observação sustentada por trabalhos de Solheim *et al.* (2001) que registam o rápido crescimento de *O. minus* em condições de escassez de oxigénio. Esta última observação vai de encontro à sugestão que Solheim apresentou em 1991 relativamente aos fungos patogénicos responsáveis pela DAM aos quais associou a capacidade de crescimento em condições com escassez de oxigénio. No entanto apesar de no trabalho de 2007, Jankowiak *et al.* terem confirmado a patogenicidade já observada dos três fungos em estudo, constataram que *O. minus*, apesar de considerado o principal patogénio de entre os três, não pode ser responsável pelo declínio e morte das árvores após a transmissão pelo vetor. Os autores concluíram que o reduzido grau de associação observado entre este fungo e *M. galloprovincialis* não pode ter contribuído para a destruição dos mecanismos de defesa das árvores após o ataque do inseto vetor. É sugerido que esta associação possa ser importante na dissecação dos ramos causada pelos fungos mas para tal não são apresentadas provas conclusivas.

Num trabalho recente, Wang *et al.* (2018) referem as espécies de Ophiostomataceae associados à DMP na China: *Ophiostoma ips*, *O. deltoideosporum*, *Graphilbum rectangulosporum*, *O. massoniana* e *Sporothrix zhejiangensis*.

Os trabalhos agora referidos permitem ilustrar a importância que algumas espécies de *Ophiostomataceae* desempenham na DMP ao interagir com o hospedeiro e com o vetor e por poder condicionar os níveis populacionais do NMP. Por esta razão procedeu-se à elaboração do Quadro 4 onde se dá conta das espécies de fungos isoladas em *Pinus* spp. com quadros sintomatológicos de doença associados – DMP, DAM, doenças radiculares (DR) ou declínio (Dec) – e da origem do isolamento (galerias ou no próprio inseto de *M. galloprovincialis*, ou ainda em insetos subcorticais xilófagos). No caso destes últimos sinalizaram-se igualmente as espécies já identificadas em Portugal. Algumas das espécies listadas no Quadro 4 inserem-se nas seis grandes linhagens da família *Ophiostomatales* apresentadas por De Beer & Wingfield (2013): *Ophiostoma s. str.*, *Raffaelea s. str.*, *Ceratocystiopsis*, *Fragosphaeria*, *Graphilbum*, e *Leptographium c. l.*, e outras sobre as quais ainda há dúvida sobre a sua posição filogenética (ex: *Sporothrix* sp.1 e *Sporothrix* sp.2). Tal como no Anexo I incluiu-se a informação sobre o grau de suscetibilidade da espécie hospedeira ao NMP, de acordo com Evans *et al.* (1996). Tendo em conta a esta riqueza de associações possíveis na composição do mecanismo da DMP de Zhao *et al.* (2014) sugerem que *B. xylophilus* pode ter adquirido genes por transferência (Horizontal Gene Transfer) através das suas associações com o microbiota ou a partir dos pinheiros o que aumenta a sua patogenicidade.

Mamiya (2006) testou um conjunto de espécies de fungos associadas à decomposição da madeira e constatou haver um grupo que demonstrou atividade nematófaga relativamente ao NMP (*Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *Lentinula edodes* e *Lampteromyces japonicus*) enquanto outras espécies (*Neolentinus lepideus*, *Trichaptum abietinum*, *Cryptoporus volvatus* e *Pholiota nameko*) demonstraram menor actividade nematófaga, ou mesmo inexistente.

A importância do estudo das comunidades micófagas e interações associadas é elucidada por Chu *et al.* (2018) ao terem concluído que a DMP conduz a significativas alterações na microflore das raízes de *P. tabulaeformis* traduzida na redução de biomassa, na riqueza/diversidade de espécies bem como na abundância e colonização de ectomicorrizas. Chu *et al.* (2019) mostraram inclusivamente a importância de determinados grupos de fungos (ex.: ectomicorrizas) na prevenção da DMP ao induzirem a resistência.

2.5.2. A importância dos compostos voláteis

Espécies dos géneros *Ophiostoma* e *Ceratocystis* produzem composto voláteis com aroma particularmente intenso em *Ceratocystis*, sugerindo-se ser uma estratégia para atrair insetos capazes de os disseminar (Kile, 1993; Harrington & Wingfield, 1998). Os fungos penetram no sistema condutor do hospedeiro e o desenvolvimento do seu micélio conduz à obstrução das células vasculares e perturbação na circulação dos fluidos orgânicos. Também são responsáveis pela produção de toxinas e cavitação dos traqueídeos facilitando desta forma a entrada de insetos (Vasconcelos & Duarte, 2013). A interação entre o NMP e estes fungos parece ser condicionada por dois compostos voláteis, α -pineno e β -pineno, uma vez que inibem o crescimento micelial de *Sporothrix* sp.2 e *Ophiostoma ips* mas parece não terem qualquer influência em *Sporothrix* sp.1 que constitui a fonte de alimento do NMP na China. Esta constatação sugere que *Sporothrix* sp.1, presente na DAM, é insensível aos sinais do hospedeiro e como tal fomenta a propagação do NMP.

Quadro 4 – Espécies de fungos isolados em *Pinus* spp. (ou em insetos associados) com sintomatologia (se referida) de declínio (Dec), Doença do Azulado da Madeira (DAM), Doença da Murchidão do Pinheiro (DMP) ou Doença Radicular (DR).

Espécie*	<i>Pinus</i> sp. associada	Suscetibilidade a BX (a)	Local	Sintomatologia da árvore	Isolamento em:			Referência
					MG inseto	MG galerias	madeira infestada com*:	
<i>Ceratocystiopsis cf. minuta</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, 2002
<i>Ceratocystiopsis minuta</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	–	México	D			DM - i g	Zhou <i>et al.</i> 2004
<i>Ceratocystiopsis alba</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	D				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ceratocystis allantospora</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	D				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ceratocystis angusticollis</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	D				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ceratocystis arborea</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	D				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ceratocystis chinensis</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Ceratocystiopsis fasciata</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	D				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Grosmania allacris</i>	<i>Pinus pinea</i>	●●	Itália	DR				Jacobs & Wingfield, 2001
<i>Grosmania allacris</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	África do Sul	DR				Jacobs & Wingfield, 2001
	<i>Pinus radiata</i>	●●						
	<i>Pinus taeda</i>	●●						
<i>Grosmania allacris</i>	<i>Pinus taeda</i>	●●	Nova Zelândia	DR				Jacobs & Wingfield, 2001
<i>Grosmania allacris</i>	<i>Pinus resinosa</i>	●●	EUA (WS) e sudeste	DR			HtS – i ; HtT - i	Klepzig <i>et al.</i> , 1991
<i>Grosmanea cf. cucullata</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, T., 2002
<i>Grosmania davidsonii</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Grosmania francke-grosmanniae</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Grosmania huntii</i>	<i>Pinus resinosa</i>	●●	EUA (WS) e sudeste	DR			HtS - i HtT - i	Klepzig <i>et al.</i> , 1991
<i>Grosmania huntii</i>	<i>coniferas</i>	–	Nova Zelândia				HtA ■	Harrington, 1988 Jacobs <i>et al.</i> , 1998
<i>Grosmanis penicillata</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Graphium</i> sp. 'W'	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–		MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Graphium aureum</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Graphium flagrans</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	N. Zelandia	DAM				Harrington <i>et al.</i> , 2001 Thwaites <i>et al.</i> , 2005
<i>Graphium pseudormiticum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia			MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Graphium pycnocephalum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia			MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007

(cont.)

Quadro 4 (cont.)

Espécie*	Pinus sp. associada	Suscetibilidade a BX (a)	Local	Sintomatologia da árvore	Isolamento em:			Referência
					MG inseto	MG galerias	madeira infestada com*:	
<i>Leptographium serpens</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Leptographium serpens</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtA ■/ HtO	Wingfield & Gibbs, 1991
<i>Leptographium koreanum</i>	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	Coreia do Sul	DAM			TP	Kim, J.-J <i>et al.</i> , 2005
	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●						
<i>Leptographium procerum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–	MG - i	MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Leptographium sp.1</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, T., 2002
<i>Leptographium sp. 2</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, T., 2002
<i>Leptographium spp.</i>	<i>Pinus echinata</i>	●●	EUA (Sudeste)	DR				Hess <i>et al.</i> , 1999; Eckardt <i>et al.</i> , 2004
<i>Leptographium guttulatum</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Leptographium guttulatum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtO	
<i>Leptographium lundbergii</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Leptographium lundbergii</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtA ■/ HtO	Wingfield & Gibbs, 1991
<i>Leptographium procerum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtO	
<i>Leptographium procerum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma abietinum</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma cf. ainoae</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, T., 2002
<i>Ophiostoma type 1</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma type 6</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma type 7</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma floccosum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma floccosum</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Ophiostoma floccosum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	N. Zelandia	DAM				Harrington <i>et al.</i> , 2001 Thwaites <i>et al.</i> , 2005
<i>Ophiostoma galeiformis-like</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	–	México	Dec			DM - i g	Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>Ophiostoma guttulatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Espanha	–			HtA ■	Romón <i>et al.</i> , 2007
<i>Ophiostoma ips</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Ophiostoma ips</i>	–	–	–	Dec			i vetores	Kim, <i>et al.</i> , 2003
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013

(cont.)

Quadro 4 (cont.)

Espécie*	Pinus sp. associada	Suscetibilidade a BX (a)	Local	Sintomatologia da árvore	Isolamento em:			Referência
					MG inseto	MG galerias	madeira infestada com*:	
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>coniferas</i>	–	Am. do Norte Europa; N.Zelândia Áf. do Sul; Japão	DAM; D			Ip** ■	Benade <i>et al.</i> , 1995; Rane & Tattar, 1987
<i>Ophiostoma ips</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Ophiostoma lignicola</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma minus</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Ophiostoma minus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–	MG - i	MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Ophiostoma minus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma montium</i>	–	–	–	–			DP	Kim, <i>et al.</i> , 2003
<i>Ophiostoma montium</i>	<i>coniferas</i>	–	Am. do Norte Europa; N.Zelândia Áf. do Sul; Japão	DAM			Ip** ■ ; D	Benade <i>et al.</i> , 1995 Rane & Tattar, 1987 Rumbold, 1931
<i>Ophiostoma piceae</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Ophiostoma piceae</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtA ■	Wingfield & Gibbs, 1991
<i>Ophiostoma piceae</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Espanha	–			HtA ■	Romón, P. <i>et al.</i> , 2007
<i>Ophiostoma piceae</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–	MG - i	MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Ophiostoma piliferum</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Espanha	–			HtA ■	Romón, P. <i>et al.</i> , 2007
<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–	MG - i	MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Ophiostoma piliferum</i>	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	Dec				Álvarez, <i>et al.</i> , 2015
<i>Ophiostoma pinicola</i>	<i>Pinus massoniana</i>	●●	China	DMP + DAM				Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma pluriannulatum</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	–	México	Dec			DM ; IC - i g	Zhou <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pinus maximinoi</i>	–						
<i>Ophiostoma pulvinisporum</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>	–	México	Dec			DM/IC - i g	Zhou <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pinus maximinoi</i>	–						
<i>Ophiostoma quercus</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013
<i>Ophiostoma setosum</i>	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Butão	–			IpS - i	Kirisits, 2002
<i>Ophiostoma stenoceras</i>	<i>Pinus radiata</i>	●●	Espanha	–			HtA ■	Romón, <i>et al.</i> , 2007
<i>Pesotum spp.</i>	–	–	Suécia	–			HtA ■	Mathiesen-Käärik, 1953
<i>Pesotum spp.</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Inglaterra	–			HtA ■ ; HtO	Wingfield & Gibbs, 1991

Quadro 4 (cont.)

Espécie*	Pinus sp. associada	Suscetibilidade a BX (a)	Local	Sintomatologia da árvore	Isolamento em:			Referência
					MG inseto	MG galerias	madeira infestada com*:	
<i>Sporothrix</i> sp.	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	Polónia	–		MG - g		Jankowiak & Rossa, 2007
<i>Sporothrix</i> sp. 1	<i>Pinus pseudostrobus</i> <i>Pinus maximinoi</i>	– –	México	Dec			DM ; IC- i g	Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>Sporothrix</i> sp. 1	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 2	<i>Pinus pseudostrobus</i>	–	México	Dec			DM - i	Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>Sporothrix</i> sp. 2	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 3	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 4	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 8	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 9	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 10	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sporothrix</i> sp. 11	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	Espanha	–			IpSx ■	Bueno <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphaeropsis sapinea</i> ***	<i>Pinus radiata</i>	●●	Nova Zelândia	DAM				Thwaites <i>et al.</i> , 2013

* à exceção de *Sphaeropsis sapinea*, pertencente à Divisão: Ascomycota / Classe: Dothideomycetes todos os restantes casos pertencem à Divisão: Ascomycota / Classe: Sordariomycetes

● resistente a *B. xylophilus* ●● moderadamente suscetível a *B. xylophilus* ●●● suscetível a *B. xylophilus* (a) Evans *et al.* (1996)

BX – *Bursaphelenchus xylophilus*; (a) - Evans, H.F. *et al.*, 1996

MG – *Monochamus galloprovincialis*

*i – inseto; *g – galerias

*DM – *Dendroctonus mexicanus*; *DM – *Dendroctonus ponderosae*; *D-*Dendroctonus* spp.

*HtA – *Hylastes ater*; *HtO- *Hylastes opacus*; *HtS-*Hylastes salebrosus*; *HtT-*Hylastes tenuis*

*HgL – *Hylurgus ligniperda*

*IpC – *Ips calligraphus*; *IpS – *Ips schmutzenhoferi* (madeira com *Ips schmutzenhoferi*); **Ip – *Ips* spp. (■ em Portugal *Ips sexdentatus*); IpSx – *Ips sexdentatus*

*TP – *Tomicus piniperda*

Dec – Declínio; DAM – Doença do Azulado da Madeira; DMP – Doença da Murchidão do Pinheiro; DR – doenças da Raiz;

V – vetor

■ Espécie registada em Portugal

I – isolamento a partir do inseto; g – isolamento a partir das galerias; * isolamento em madeira com inseto; ** isolamento no inseto e galerias

*** Botryosphaeraeaceae

Cardoza *et al.* (2006) referem que se identificaram bactérias nas secreções orais de alguns escolitídeos o que pode representar um importante papel na interação inseto-fungo. As bactérias, após serem inoculadas metabolizam compostos tóxicos existentes na resina o que explica o desenvolvimento de fungos após o ataque de insetos (Gibson & Hunter, 2010; Fäldt *et al.*, 2006). De acordo com Adams *et al.* (2011), os hospedeiros defendem-se mediante a emissão de monoterpenos, α -pineno e δ -3careno, descodificados pelos insetos.

Zhao *et al.* (2014) observaram que as proporções e as concentrações de terpenos são diferentes quando se comparam árvores sãs e árvores com DAM tendo Niu *et al.* (2012) concluído que estes compostos influenciam os fungos da família Ophiostomataceae identificados em árvores mortas bem como as interações com o NMP e os fungos. Estes autores observaram que a propagação do NMP em árvores expostas à proporção de monoterpenos característica de árvores com a DAM (α -pineno: β -pineno=1:0.8) é maior do que perante a proporção característica de árvores saudáveis ou alvo dos estragos causados por *M. alternatus* mas sem sintomas de DAM (α -pineno: β -pineno=1:0.1)

Por sua vez Zhao *et al.* (2007) mostraram que o rácio α -pineno: β -pineno:longifoleno de 1:0.1:0.01 em árvores saudáveis de *P. massoniana* exerce efeito atrativo para os estádios propagativos de *B. xylophilus*.

Ainda a respeito da influência destes compostos, supõe-se que a agregação de J_{III} em torno das câmaras pupais resulta do estímulo causado pela proporção de α -pineno: β -pineno:longifoleno produzida pelas larvas do vetor (1:2.7:1.1). Por sua vez esta proporção é diferente da produzida pela árvore que apenas atrai os estádios larvares da fase propagativa.

2.5.3. A doença do azulado da madeira e o declínio do pinheiro

É habitual encontrar na bibliografia relacionada com DMP a referência de dois importantes quadros sintomatológicos que, pela sua importância neste contexto, convém apresentar. Um deles – referido como *blue-stain* ou azulado da madeira – que será aqui designada de doença do azulado da madeira (DAM) é reconhecido por conferir o tom azulado ou azul-acinzentado à madeira devido à invasão das células do alburno por fungos transportados por insetos (Yamaoka, 2017). O mesmo autor refere que o enquadramento taxonómico dos fungos responsáveis por esta sintomatologia varia entre os autores e inclusivamente tem variado ao longo do tempo. Mas parece ser consensual que o complexo de fungos responsável é predominantemente constituído por espécies da ordem *Ophiostomatales* (exs.: espécies pertencentes aos géneros *Ceratocystis*, *Graphilbum*, *Leptographium*, *Ophiostoma*, *Grosmania*, etc.) podendo incluir outras como é o caso de *Sphaeropsis sapinea* e, no seu conjunto, englobar um número relativamente grande de espécies – a título de exemplo Thwaites *et al.* (2013) tinham identificadas 13 espécies responsáveis por esta doença na Nova Zelândia. As imagens que compõem Figura 1 ilustram esta sintomatologia em madeira proveniente das amostragens efetuadas para a realização deste trabalho. A DAM tem associados impactos económicos negativos pela desvalorização comercial da madeira bem como o risco de exportação de fungos patogénicos nas exportações de madeira contaminada.

Como atrás se referiu estes fungos estabelecem associações com insetos que lhes servem de vetor facilitando a sua dispersão – é o caso de *Hylaster ater* e *Hylurgos ligniperda* – e Farrel *et al.* (1998) mencionam *O. ips* como uma das principais espécies responsáveis pela DAM, em madeira de pinheiro. Algumas associações entre espécies deste grupo de fungos são específicas para determinada espécie de inseto e/ou planta

hospedeira enquanto outras estabelecem essas associações com várias espécies de insetos e/ou plantas hospedeiras (Yamaoka, 2017). Atualmente autores como Wingfield *et al.* (2016) defendem que, para uma identificação precisa de microrganismos associados a insetos florestais e a doenças, sejam usados marcadores moleculares apropriados. Desta forma uma identificação taxonômica mais precisa permitirá uma melhor compreensão das interações entre *Ophiostomatales*, insetos e plantas bem como da coevolução e diferenciação das espécies de *Ophiostomatales*. Estirpes albinas de *Ophiostoma floccosum*, *O. picea* e *O. pluriannulatum* têm sido testadas experimentalmente com resultados promissores em *P. radiata* como meio de luta biológico contra esta doença (Held *et al.*, 2003).

O declínio do pinheiro (DP) resulta duma complexa interação com fatores de origem biótica e abiótica. Insetos que se alimentam das raízes e espécies de fungos do género *Grosmania*, *Leptographium* ou *Ophiostoma* constituem alguns exemplos. Estes fungos, também associados à DAM, em geral não causam a morte de árvores saudáveis mas reduzem o valor económico da madeira e podem causar a morte de árvores sujeitas a algum tipo de *stress*. De acordo com Eckhardt & Menard, (2013) ainda não estão clarificados os graus de patogenicidade e a função associados aos fungos mencionados. Por sua vez, e como exemplo de um conjunto de fungos associados ao declínio de *Pinus nigra*, Ivanová (2015) menciona *Asterosporium asterospermum*, *Beltranis rhombica*, *Camarosporium pini*, *Coleosporium* sp., *Cyclaneusma niveum*, *Lophodermium seeditiosum*, *Nigrospora* sp., *Phomopsis* sp. e *Trichotecium roseum*. A autora refere, no entanto, que neste trabalho foram identificados como os principais responsáveis pela doença *Lophodermium seeditiosum* e *Cyclaneusma niveum*.

A associação com insetos que se alimentam de raízes e de árvores debilitadas funcionam, como na DAM, quer como vetores dos fungos patogénicos quer como causadores de focos infecciosos através das feridas que constituem portas de entrada para agentes patogénicos. A sintomatologia exibida depende da espécie de hospedeiro considerado mas, em geral, incluem cloroses e redução do crescimento das agulhas, copas esparsas, crescimento radial reduzido até à morte da árvore. O sistema radicular caracteriza-se pela presença de raízes finas, infetadas e/ou mortas e em menor número observando-se também a presença de raízes laterais finas, resinosas e com manchas. Este quadro sintomatológico é típico de árvores com mais de 30 anos mas quer os sintomas quer a morte podem ocorrer em árvores mais jovens (Eckhardt & Menard, 2013).

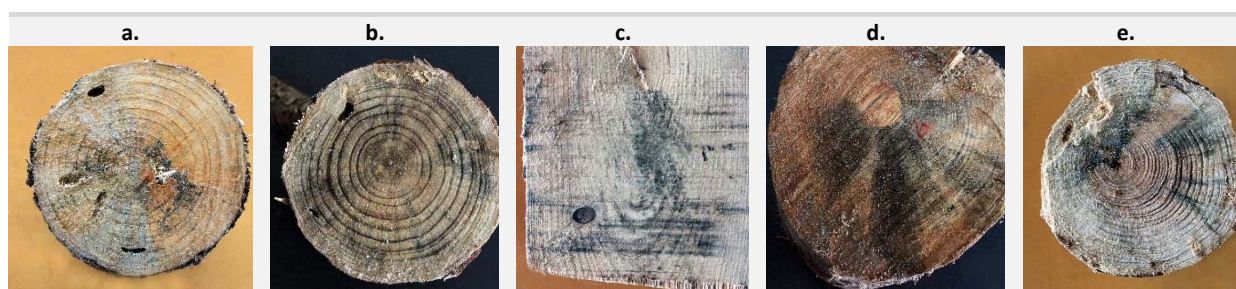


Figura 1 – Imagens (a. – e.) de secções de madeira com sintomatologia da DAM e câmaras pupais de *Monochamus galloprovincialis*. Fotos: MTrindade

2.5.4. As bactérias e a DMP

Dum modo geral, e de acordo com Hardoim *et al.*, (2015) as bactérias endófitas podem constituir importantes promotores do crescimento das plantas, exercer forte ação anti-fúngica, ação anti-bacteriana contra estirpes nocivas e ação anti-nematicida. Desta forma, alterações na constituição do microbioma endófito conduzirá a importantes efeitos no fenótipo das plantas.

Apesar de o NMP ser considerado o agente primário da DMP também está amplamente aceite que um grande número de espécies bacterianas associadas à superfície da cutícula do nemátode estão envolvidas ou na indução ou no desenvolvimento da DMP (Vicente *et al.*, 2011) embora o verdadeiro papel no mecanismo da doença gere ainda discussão. Verifica-se igualmente que existem espécies de bactérias associadas com o NMP que são benéficas para o hospedeiro enquanto outras são patogénicas (Vicente *et al.*, 2016). Por outro lado, Nascimento *et al.* (2016) observaram que a bactéria *Serratia quinivorans* BXF1, habitualmente associada ao NMP, incapaz de colonizar o interior do nemátode mantendo-se associado à sua cutícula com aparente protecção do nematode contra *stress* de origem xenobiótica. Os autores verificaram igualmente que esta estirpe bacteriana não induziu a sintomatologia de murchidão, característica da DMP, quando inoculada artificialmente em pinheiro. Pelo contrário comportou-se como um endófito promotor do crescimento quer de plantas de tomateiro quer de pinheiro, manifestando igualmente clara atividade antagonista contra espécies de fungos e de bactérias isoladas em *P. pinaster*. Com este trabalho os autores sugerem que *B. xylophilus* parece não ter uma comunidade de microscanismos simbioticamente associados capazes de induzirem os sintomas característicos da DMP, hipótese que já havia sido sugerida, sendo a comunidade bacteriana representada por estirpes benéficas e patogénicas associadas a DMP (Vicente *et al.*, 2016). Como exemplo Kim *et al.* (2019) sugerem indução de resistência a *B. xylophilus* por bactérias endófitas.

A composição das comunidades bacterianas associadas a *B. xylophilus* parecer diferir consoante a localização geográfica. Trabalhos realizados na China por Han *et al.* (2003) permitiram evidenciar a presença de estirpes dos géneros *Pantoea* e *Pseudomonas* em árvores infetadas com o NMP e a sua ausência em árvores sãs.

Estas comunidade são constituídas principalmente por espécies do género *Bacillus* no Japão, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Ewingella* e *Serratia* na China e *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Ewingella*, e *Serratia* na Coreia do Sul (Proença *et al.*, 2016). Estes autores referem que no caso de Portugal foram identificadas espécies pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* com exemplos dos géneros *Cronobacter*, *Ewingella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Erwinia* relativamente ao primeiro grupo e o género *Pseudomonas* do segundo.

Existem fortes evidências que permitem supor o seu envolvimento na virulência de *B. xylophilus* sem no entanto o mecanismo de patogenicidade ser conhecido (Nascimento, F. *et al.*, 2015). A produção de fitotoxinas por estirpes associadas ao NMP parece estar associada ao aumento da patogenicidade do nemátode. No entanto ensaios *in vitro* mostraram que existem igualmente espécies com efeito nematicida tendo-se identificado compostos como lipases e proteases aos quais se atribui a responsabilidade por essa actividade (Proença *et al.*, 2016).

Outros trabalhos também levados a cabo em Portugal, em *P. pinaster*, como os de Vicente *et al.* (2016) que evidenciaram o tipo de interação entre o NMP e um isolado do género *Serratia* e os de Alves *et al.* (2016) que elucidam a composição da comunidade bacteriana no inseto vetor, para além dos já referidos nesta alínea,

mostram ser consensual a importância que este grupo suscita no mecanismo da doença. sem que, à semelhança de trabalhos realizados em outros países, permitir ir mais além na compreensão do envolvimento das bactérias na DMP.

Proença *et al.*, (2017) sugerem que nos primeiros estádios da doença os mecanismos da planta parecem ser reprimidos pelo nemátode resultando, em consequência, a colonização dos tecidos da árvore pelos microrganismos do solo. Por sua vez, as observações de Alves *et al.* (2018) apontam para a influência que o microbioma pode exercer em função do estágio da doença podendo alguns grupos de bactérias desempenhar funções chave na supressão de processos que poderão conduzir à interrupção do ciclo da doença.

He *et al.*, (2016) demonstraram que uma estirpe de *Stenotrophomonas maltophilia* (endobactéria) pode afetar a expressão de genes envolvidos em importantes mecanismos como a degradação da parede celular, detoxificação, reprodução do NMP e influenciar a virulência do NMP. Desta forma constitui um exemplo do avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na interação nemátode-bactéria contribuindo para facilitar uma melhor compreensão do papel das bactérias na DMP.

Por último refere-se o interesse que este grupo de microrganismos tem suscitado para o desenvolvimento de produtos a utilizar no controlo do NMP. Prova disso é o considerável número de trabalhos, alguns dos quais são apresentados no Quadro 5. Algumas das estirpes bacterianas referidas foram isoladas em solos, em plantas e outras na superfície do corpo do NMP. Outros casos, já conhecidos em estudos de engenharia genética, foram também explorados neste sentido. Os trabalhos referidos procuraram isolar moléculas do metabolismo das estirpes bacterianas com atividade de interesse no controlo biológico de *B. xylophilus*.

Quadro 5 – Exemplos organismos procarióticos em estudo para obtenção de produtos a utilizar em luta biológica contra o NMP.

Taxa	Isolamento do microrganismo	Actividade*	Referência
Actinomicetas Várias estirpes bacterianas pertencentes aos géneros: <i>Actinomadura</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Streptomyces</i> e <i>Streptosporangium</i>	Solo	N	Liu <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus pumilus</i> LYMC-3	<i>Pinus massoniana</i>	N	Li <i>et al.</i> , 2018
Bactérias diazotróficas <i>Cunninghamella elegans</i>	-	R	Silva <i>et al.</i> , 2019
<i>Curtobacterium pusillum</i> 16YSM-P180; <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> 16YSM-P39; <i>Pseudomonas putida</i> 16YSM-E48	Agulhas de pinheiro	R	Kim <i>et al.</i> , 2019
<i>Raoultella ornithinolytica</i> MG	<i>Panax ginseng</i>	N	Shanmugam <i>et al.</i> , 2018
<i>Streptomyces avermitilis</i> MHJ1011	-	A; N	Wan <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces avermitilis</i> TM24	-	A; N	Feng <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCJ60	-	A; N	Li <i>et al.</i> , 2017

* **A:** Acaricida; **N:** Nematicida relativamente a NMP; **R:** Indutor de Resistência relativamente ao NMP

3. Material e Métodos

3.1. Prospecção, processamento das amostras e delineamento do ensaio

O trabalho de prospecção de amostras decorreu em dois locais do território continental (Comporta e Góis) e na ilha da Madeira. Em cada um dos três locais foram seleccionadas e abatidas 6 árvores com sintomatologia da DMP e 6 árvores consideradas sãs por não apresentarem esta sintomatologia (Figura 2).

A confirmação da presença/ausência do NMP nas árvores consideradas foi efetuada posteriormente no Laboratório de Nematologia do INIAV através do procedimento utilizado na rotina deste Laboratório para a prospecção do *Bursaphelenchus xylophilus*.

Após o abate das árvores procedeu-se à obtenção de secções provenientes de três regiões dos troncos. Essas regiões foram designadas para efeitos de análise posterior, da seguinte forma: Nível 1 (N1) – correspondente à zona da base, Nível 2 (N2) correspondente à zona intermédia situada entre a anterior e o Nível 3 (N3), correspondente à região terminal do tronco.

O material recolhido foi processado na serração de forma a obter pequenos pedaços de madeira, de forma aproximadamente cúbica, a partir dos quais se procedeu ao isolamento de fungos (Figura 3).

O isolamento foi efetuado a partir de madeira proveniente das três secções do tronco seleccionadas (ZB, ZM e ZT) de todas as árvores (sãs e com DMP) das três regiões amostradas, tendo sido testados para o efeito três meios de cultura em autoclave:

- **Meio 1:** Agar a 2% (AA), (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA);
- **Meio 2:** PDA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com Sulfato de estreptomicina (500 µg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), antibiótico de largo espectro, para evitar o crescimento de bactérias;
- **Meio 3:** PDA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com cicloheximida (500 µg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), antibiótico com ação antibacteriana e antifúngica e utilizado para distinguir fungos da família Ophiostomataceae (Harrington, 1981).

Para cada combinação “local de amostragem × estado sanitário da árvore × número de árvores × região do tronco × meio de cultura” efetuaram-se três repetições, perfazendo assim um total de 972 amostras para estudo.

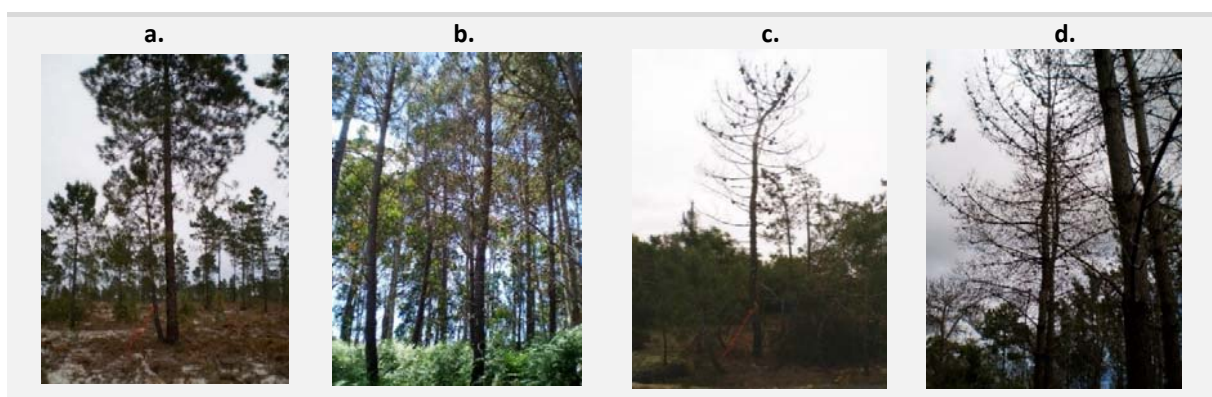


Figura 2 – Aspeto dos dois grupos de árvores seleccionadas para o trabalho de isolamento. (a. e b.: árvores sãs; c. e d.: árvores com sintomatologia da DMP) (Fotos cedidas por JHenriques)

3.2. Isolamento de fungos

Nota prévia: para evitar repetições, sempre que seja necessário descrever as condições de trabalho que envolveram a manipulação de fungos considere-se, salvo exceções oportunamente a apresentar, que:

1. todas as placas de Petri utilizadas ao longo deste trabalho são estéreis;
2. todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm; 20 min;
3. as placas de Petri, após inoculação do meio de cultura, foram sempre seladas com “Parafilm”;
4. o crescimento das culturas ocorreu no escuro, em estufa de incubação à temperatura de 24±1°C;
5. todas as operações que envolveram a manipulação de fungos foram executadas em câmara de fluxo laminar ocorrendo a manipulação do material a uma distância segura, mas próximo da chama de uma lamparina de álcool salvaguardando assim as necessárias condições de assepsia.
6. para observação/manipulação de placas de Petri com culturas não cobertas com tampa recorreu-se a microscópio estereoscópico binocular instalado numa câmara de fluxo laminar.

Como resultado do trabalho efetuado na serração (Figura 3) seguiram para o laboratório três subamostras (com aproximadamente 100 pedaços de madeira – Figura 3.e.) provenientes de cada uma das três zonas de cada árvore (N1; N2; N3).

O isolamento foi realizado em placas de Petri (90 mm Ø), contendo 20 mL do meio de cultura, consistiu numa série de procedimentos cuja sequência se descreve:

A) obtenção de fragmentos de madeira:

- seleção aleatória de pedaços de madeira (Figura 3.e.);
- imersão em álcool etílico 96° (cerca de ±3 segundos);
- passagem por água destilada;
- absorção do excesso de água com papel de filtro esterilizado;
- corte dos pedaços de madeira, com auxílio de pinça e escalpelo, para recolha de 4 pequenos fragmentos de madeira, com cerca de 10×4×4mm, que foram transferidos para cada placa de Petri com meio de cultura.

B) observação diária das placas, à vista desarmada e ao microscópio estereoscópico binocular, para deteção do crescimento de fungos que, uma vez detetados foram repicados, cada um para uma nova placa de Petri (55 mm Ø), contendo 10 mL de meio de cultura.

A Figura 4 ilustra o material laboratorial envolvido no isolamento, estando em 4b., 4c. e 4d. evidenciado o aspeto de uma placa de Petri com os fragmentos de madeira de onde se isolou o fungo X.

3.3. Obtenção de culturas puras: isolamento por esporo único e hifa única

Excetuando os casos em que notoriamente se observou a presença de mais de um tipo de fungo na placa ou contaminação por presença de colónias bacterianas, a base de trabalho inicial indicava, com alguma margem de segurança, que os isolados obtidos no isolamento inicial do ensaio constituíam culturas puras. No entanto, e apesar do aspeto uniforme das colónias, para garantir a presença de micélio de uma única espécie em cada placa, procedeu-se à obtenção de culturas puras mediante as metodologias de esporo único ou hifa única, conforme os casos em estudo (Quadro 6).

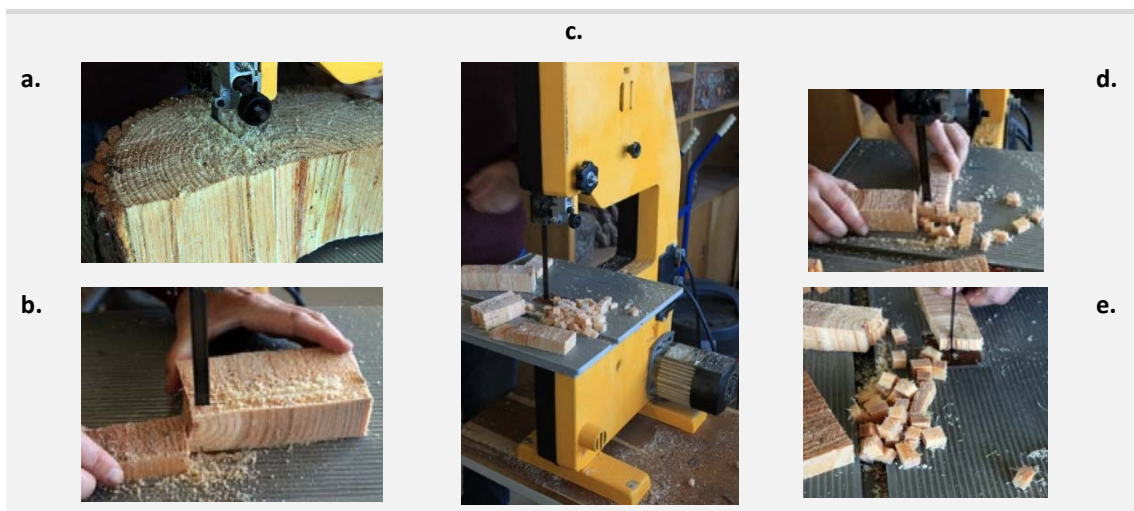


Figura 3 – Processamento das secções dos troncos. (a.; b.) para obtenção de pedaços de madeira (c.; d.; e.) para isolamento de fungos. Fotos: MTrindade



Figura 4 – Material utilizado no isolamento. (a.); aspeto da evolução de uma placa de Petri de onde se procedeu ao isolamento do fungo X (b.; c.; d.) Fotos: MTrindade

Nos grupos em que se obtiveram culturas monospóricas prepararam-se suspensões de conídios em tubos *Eppendorf* com água destilada estéril, adicionando uma pequena quantidade de inóculo esporulado. Após agitação em vortex obtiveram-se diluições decimais seriadas. Com recurso a uma hança procedeu-se ao riscado em placa com AA das suspensões atrás obtidas, incubação em estufa e posterior observação diária das mesmas. Esta observação permitiu selecionar a(s) placa(s) onde a seleção de um único esporo germinado fosse possível para posterior transferência para nova placa de Petri, com PDA como meio de cultura, garantindo-se desta forma a pureza da cultura. No caso dos isolados de *Botryosphaeriaceae* a esporulação foi induzida conforme será referido em 3.4.1.

Relativamente ao isolamento a partir de hifa única o procedimento consistiu em recolher a zona terminal de uma única hifa do micélio em crescimento e transferência para uma nova placa de Petri com PDA. Desta forma garante-se a fiabilidade do trabalho a jusante evitando atrasos e gastos de material acrescidos, nomeadamente na

fase da biologia molecular. Ambas as técnicas foram executadas com auxílio de microscópio estereoscópico binocular localizado na câmara de fluxo laminar.

Quadro 6 – Técnica utilizada na obtenção de culturas puras dos diferentes *taxa* – isolamento por esporo único (IEU) e por hifa única (IHU).

<i>Taxon</i>	IEU	IHU
Filo Basidiomycota		✓
Família Botryosphaeriaceae	✓	
Família Ophiostomataceae		✓
Género <i>Alternaria</i>	✓	
Género <i>Aspergillus</i>	✓	
Género <i>Beauvaeria</i>	✓	
Género <i>Cladosporium</i>	✓	
Género <i>Fusarium</i>		✓
Género <i>Pestalotiopsis</i>	✓	
Género <i>Trichoderma</i>	✓	
Género <i>Penicillium</i>	✓	
restantes casos		✓

3.4. Identificação taxonómica com base nas características morfológicas, culturais e biométricas dos isolados

Após estabelecer a coleção de isolados em cultura pura procedeu-se, como primeira abordagem, ao agrupamento, pelo nível de organização taxonómica possível, com base em características macro e micro-morfológicas das culturas, recorrendo à lupa binocular e ao microscópio ótico. As famílias Botryosphaeriaceae e Ophiostomataceae e os géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, pela sua abundância e relativa facilidade de reconhecimento constituíram os agrupamentos iniciais.

A observação microscópica de grampos de conexão – estruturas características (mas não obrigatórias) do filo Basidiomycota – permitiu estabelecer este novo grupo.

Os géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauvaeria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Pestalotiopsis*, foram também identificados nesta fase, mas com menor representatividade.

As restantes situações, por o estudo macro e microscópico das colónias ter sido inconclusivo e, sobretudo, pela ausência de esporulação, optou-se por proceder às respetivas repicagens para um meio de cultura nutritivamente mais pobre (AA), tendo-se inclusivamente testado a presença de materiais como agulhas de pinheiro, folhas de craveiro e palhas de trigo, na tentativa de induzir a esporulação e assim facilitar uma primeira identificação (Sinclair & Dhingra, 1995; Quaglia & Moretti, 2014). Este estudo não permitiu qualquer avanço na identificação, restando como recurso a abordagem à biologia molecular.

Dada o elevado número de isolados, optou-se por:

- proceder à análise das características morfológicas, culturais e biométricas dos isolados pertencentes à família Botryosphaeriaceae e géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* recorrendo-se, em paralelo, às técnicas da biologia molecular para complementar a análise e,
- recorrer apenas à biologia molecular para a identificação dos restantes casos.

Destacaram-se ainda os isolados do filo *Basidiomycota*, da família Ophiostomataceae e do género *Fusarium* quer pela importância dos segundos no contexto deste trabalho, quer pela diversidade e/ou abundância associadas

aos três grupos para os quais se recorreu igualmente a alguns aspetos morfológicos para complementar os resultados obtidos com as técnicas de biologia molecular.

Na avaliação/descrição das faces superior e inferior das colónias foram contemplando os seguintes *items*: aspeto da cultura, densidade, presença/ausência de zonagem, tipo de margem, presença/ausência de exsudados, produção ou não de pigmento, cor e diâmetro da colónia. Na identificação da cor recorreu-se à carta de cores de Rayner (Rayner, 1970).

O resultado do trabalho de identificação é apresentado em quadros onde se ilustram as culturas (fotos das faces superior e inferior) com crescimento de 7 dias em meio nutritivo, e em alguns casos incluem-se também imagens com pormenores auxiliares à identificação.

Recorreu-se a bibliografia específica para a identificação baseada nas características morfológicas, culturais e biométricas dos isolados de Botryosphaeriaceae, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. e que oportunamente será referida. Para a família Ophiostomataceae recorreu-se a Seifert *et al.* (2013) e para o género *Fusarium* recorreu-se a Leslie & Summerell (2006).

Notas:

1. Presentemente, na caracterização das espécies a abordagem usada é polifásica, conjugando dados da morfologia com dados biomoleculares (técnicas baseadas em PCR e sequenciação de DNA). A elevada resolução destas técnicas tem conduzido à reclassificação de algumas espécies e à criação e descrição de novos géneros e espécies. Slippers *et al.* (2004), Mohali *et al.* (2007) e van Niekerk *et al.* (2006) são exemplos de autores que se referem, a este respeito, muito concretamente à família Botryosphaeriaceae, mas esta que se pode alargar a outros grupos, senão mesmo à generalidade deles. Os mesmos autores consideram ainda que, não obstante os inúmeros progressos alcançados, as dificuldades na identificação destes fungos têm aumentado.
2. Para a nomenclatura das espécies de fungos consultou-se: MicoBank (<http://www.mycobank.org/>) (Robert *et al.*, 2005) e Index Fungorum (www.indexfungorum.org) (Landcare Research & RBG Kew : Mycology, 2019)

3.4.1. Estudo dos isolados pertencentes à família Botryosphaeriaceae

Considerou-se justificado proceder a um estudo mais exaustivo deste grupo:

- por incluir espécies patogénicas relativamente a *Pinus* spp. (1.1. e 1.2.);
- pela abundância de isolados;
- pela dificuldade, com base nas características culturais morfológicas e biométricas das colónias, de criar sub-grupos potencialmente representativos de diferentes espécies,

Assim sendo, o primeiro passo foi garantir a pureza das colónias. Neste caso o processo diferiu do descrito em 3.3. uma vez que as 32 colónias não apresentavam esporulação, pelo que foi necessário induzi-la. Para tal inocularam-se placas de Petri (55 mm Ø), contendo 10 mL de AA, com micélio de cada um dos isolados colocando uma agulha de pinheiro devidamente esterilizada a fim de induzir a esporulação.

À medida que se verificou a formação de picnídeos (frutificações) maduros (Figura 5) procedeu-se ao isolamento de conídios que, dada a sua dimensão, foram facilmente transferidos e separados em placa de Petri com AA, contornando assim o descrito em 3.3.

No estudo deste grupo procedeu-se, para os 32 isolados, à análise das suas características culturais e à medição de 30 conídios (para cada isolado). No entanto Philips *et al.* (2013) consideram insuficientes as características morfológicas dos conídios para a identificação da espécie.

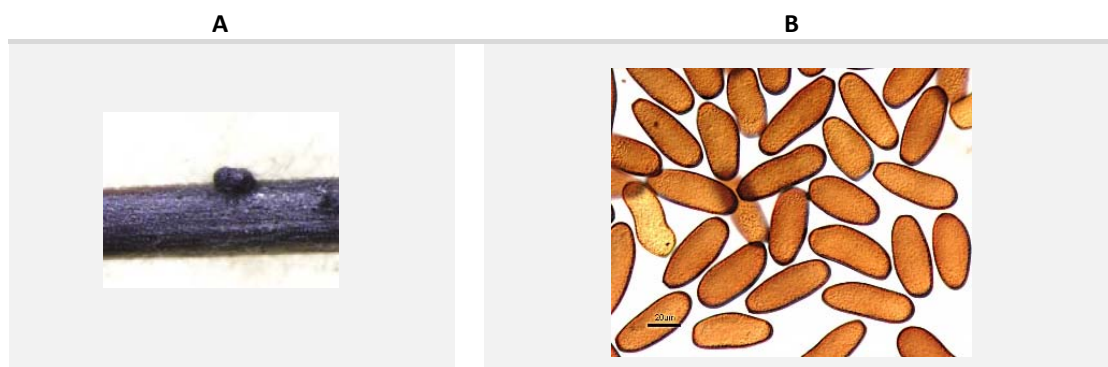


Figura 5 – Estruturas de Botryosphaeriaceae.

A) Microscópio estereoscópico binocular: picnídio de Botryosphaeriaceae numa secção de agulha de pinheiro; B) Microscópio ótico: Conídios de Botryosphaeriaceae. Fotos: MTrindade

3.4.2. Estudo dos isolados pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*

Os isolados pertencentes ao género *Penicillium* foram agrupados de acordo com o aspeto das respetivas culturas (MEA) e de acordo com a morfologia e padrão de ramificação dos conidióforos – espécies monoverticiladas, biverticiladas e terverticiladas – tendo sido estudadas as características biométricas apresentadas no Quadro 7. Relativamente aos conídios e pés dos conidióforos de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., e aos ramos de *Penicillium* sp. foi ainda registado, por ser de relevância taxonómica, a textura da superfícies externas (lisas vs. rugosas). Para a identificação dos isolados recorreu-se a bibliografia específica destes dois grupos, nomeadamente: Frisvad & Samson, 2004; Frisvad *et al.*, 2003; Houbraken *et al.*, 2011; Houbraken *et al.*, 2014; Klich. 2002; Kwasna & Nirenberg, 2005; Onions & Brady, 1987; Peterson, 2004; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2008; Thom, 1910.

Quadro 7 – Características biométricas avaliadas nas espécies de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (medições (comprimento e largura) produzidos em MEA, à temperatura de 24±1°C, para identificação das respetivas espécies.

<i>Penicillium</i> sp.				
espécies monoverticiladas	30 conídios	30 fiálides		30 pés
espécies biverticiladas	30 conídios	30 fiálides	30 métulas	30 pés
espécies terverticiladas	30 conídios	30 fiálides	30 métulas	30 pés
<i>Aspergillus</i> sp.				
	30 conídios	30 cabeças conidiogénicas		30 pés

3.4.3. Estudo dos isolados pertencentes ao género *Trichoderma*

A identificação de espécies recorrendo aos tradicionais critérios morfológicos tem representado uma enorme dificuldade dada a controvérsia na identificação de alguns grupos devido à plasticidade de alguns caracteres e o género *Trichoderma* constitui um bom exemplo dessa plasticidade.

Os 67 isolados resultantes do isolamento inicial, a partir do material lenhoso, foram agrupados de acordo com a semelhança morfológica das respetivas colónias, cultivadas em PDA, tendo sido estabelecidos sete grupos que aparentemente se apresentavam como distintos. No entanto subsistiram dúvidas com esta compartimentação por se suspeitar que alguns destes sub-grupos correspondiam à mesma espécie. Para tentar clarificar esta questão:

- procedeu-se à comparação da morfologia das colónias após crescimento em três meios de cultura referidos para este género (Jaklitsch, 2009) – PDA, CMD e SNA;
- estudaram-se as características biométricas dos conídios (medição de 30 conídios) e fiáides.

Para a identificação dos isolados recorreu-se a bibliografia específica deste grupo, nomeadamente: Chaverri & Samuels, 2003; Dodd *et al.*, 2017; Druzhinina & Kubicek, 2005; Jaklitsch, 2009; Jaklitsch, 2011; Jaklitsch & Voglmayr, 2015; Samuels, 2006 e Samuels *et al.*, 2012.

3.5. Identificação através de técnicas da biologia molecular

A identificação taxonómica com recurso a técnicas da biologia molecular ocorreu:

- nos grupos de isolados para os quais foi possível a identificação do género com base nas características morfológicas, tendo-se agregado a informação proveniente das técnicas de biologia molecular e de morfologia para a identificação da espécie;
- nos restantes casos, isto é, em todos os isolados para os quais a morfologia, por si só, não permitiu qualquer identificação.

3.5.1. Extração de DNA

Para proceder à extração do DNA recorreu-se a culturas cujo crescimento ocorreu durante 7 dias em placas de Petri (90mm Ø) com PDA como meio de cultura. O micélio superficial foi raspado, submetido a congelação com recurso a azoto líquido e imediata maceração em almofariz.

Para a extração de DNA a partir do macerado assim obtido utilizou-se um kit de extração selecionado para o efeito – DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) – obedecendo ao protocolo do fabricante. Parte do macerado não utilizado foi conservado em tubos *Eppendorf* mantidos a -80°C.

Após a extração procedeu-se, para todas as amostras, à quantificação e registo do DNA genómico em espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). As medições efectuadas para a absorvância foram feitas a 260 nm, sendo também registado o valor da razão entre as absorvâncias 260/280 nm para determinação da pureza das amostras de ácidos nucleicos.

3.5.2. Amplificação por reação de PCR

Recorrendo a reações de PCR amplificou-se o ADN da região ITS, em todos os isolados em estudo.

Para amplificação da região ITS dos genes que codificam para o ARN ribossomal utilizaram-se os pares de *primers* ITS1/ITS4, ITS1F/ITS4 e ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990; Manter & Vivanco, 2007) (Quadro 8). Para os isolados de Botriosphaeriaceae efetuou-se ainda a amplificação da região do genoma que codifica para parte do Fator de Alongamento, 1-alfa (EF1- α), tendo-se utilizado o par de *primers* EF1-728F e EF1-986R segundo Carbone *et al.* (1999).

Quadro 8 – *Primers* usados na amplificação das regiões ITS e Fator de Alongamento dos isolados em estudo, e respectivas sequências.

<i>primer forward</i>		<i>primer reverse</i>	
amplificação da região ITS			
ITS1	(5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3')		
ITS1F	(5'- CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA -3')	ITS4	(5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3')
ITS5	(5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3')		
amplificação da região que codifica para parte do Fator de Alongamento			
EF1-728F	(5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')	EF1-986R	(5' TACTTG AAGGAACCCTTACC-3')

As reações de PCR, relativas a um volume final de 20 μ l contendo a mistura apresentada no Quadro 9, foram realizadas num termociclador Tgradient (Biometra, Alemanha) programado de acordo com a Quadro 10. Em cada reação de PCR utilizou-se aproximadamente 10ng de DNA genómico. Os produtos de PCR (DNA amplificado) foram submetidos a eletroforese (5V \times cm⁻¹) em gel de agarose (1,5%) contendo 0.5 μ g/ml de brometo de etídeo (o qual se liga especificamente ao ADN e é visível sob luz UV) e o tampão TBE (1 \times). Para visualização das imagens das eletroforeses recorreu-se ao software VersaDoc Gel Imaging System (BioRad, USA).

Quadro 9 – Composição das misturas usadas na amplificação das regiões ITS e EF1- α do DNA por PCR.

Reagentes	Volume/reação (μ L)
<i>Go Taq buffer</i> (5x)	4
MgCl ₂ (25 mM)	1,6
dNTP's (10 mM)	0,4
<i>Primer forward</i> (10 μ M)	1
<i>Primer reverse</i> (10 μ M)	1
<i>Taq DNA Polimerase</i> (5 U/ μ L)	0,25
ADN	1
H ₂ O	10,75
Volume total	20

Quadro 10 – Programas utilizados no termociclador para amplificação por PCR de duas regiões do DNA – ITS e EF1- α .

Região de DNA amplificada	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos (n.º)
ITS	Desnaturação inicial	95	5min	35
	Desnaturação	94	30s	
	Hibridação	55	30s	
	Extensão	72	1min	
	Extensão final	72	10min	
EF1- α	Desnaturação inicial	95	5min	40
	Desnaturação	94	30s	
	Hibridação	52	30s	
	Extensão	72	1min 30s	
	Extensão final	72	7min	

3.5.3. Caso particular da família Botryosphaeriaceae: análise de perfis de MSP-PCR

Na ausência de iniciadores para deteção específica de fungos de Botryosphaeriaceae, optou-se pela análise da variabilidade dos isolados, com base em marcadores aleatórios ISSR, para averiguar a existência de grupos bem definidos que permitam a distinção de diferentes espécies existentes neste grupo em estudo tendo-se utilizado o marcador (CAG)_s, adequado para todas as espécies de Botryosphaeriaceae (Zhou *et al.*, 2001), e seguindo o protocolo descrito por Uddin *et al.* (1997).

A análise dos resultados foi efectuada visualmente, comparando os diferentes perfis, gerando-se uma matriz binária de presença/ausência de bandas. Para o cálculo da matriz de similaridade, aplicou-se à matriz binária o coeficiente de similaridade de “Dice” recorrendo ao programa NTSYSpc2 que permitiu obter o dendrograma.

Os microsatélites são regiões do genoma compostas por um número variável de nucleótidos repetidos, existindo uma grande variação do número de unidades repetidas entre indivíduos. Trata-se de regiões que são componentes ubíquas de genomas eucarióticos e servem de base à técnica de MSP-PCR. Esta baseia-se no facto de os *primers* utilizados imitarem as regiões referidas (microsatélites), não sendo por isso necessária a prévia identificação das sequências específicas do genoma. Cada produto resultante da amplificação vai derivar de uma região do genoma entre duas destas sequências repetitivas, desde que estas sejam suficientemente próximas para que a amplificação resulte. Os produtos são separados em géis de agarose submetidos a uma corrente elétrica, e, na presença de brometo de etídio, são visualizados sob luz ultravioleta. A amplificação gera assim padrões de bandas individuais únicos para cada organismo, funcionando como se fossem “impressões digitais” (*fingerprints*) de cada um (Alves *et al.*, 2007). Esta técnica tem demonstrado ser relativamente robusta e discriminatória de outras espécies (Alves *et al.*, 2007).

O Quadro 11 apresenta a composição da mistura utilizada nas reações de PCR, relativas a um volume final de 25 μ l tendo sido utilizado em cada reação aproximadamente 10ng de DNA genómico quantificado em espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA).

Quadro 11 – Composição da mistura usada na amplificação de DNA dos isolados de Botryosphaeriaceae spp., por MSP-PCR.

Reagentes	Volume/reacção (µL)
<i>Dream Taq buffer</i> (1x) *	13
MgCl ₂ (25 mM)	1
<i>Primer</i> (CAG) ₅ (10 µM) **	2,5
BSA	1
ADN	1
H ₂ O	7
Volume total	25

* inclui Taq DNA polimerase, dNTPs e MgCl₂

3.5.4. Sequenciação e caraterização filogenética

Para todos os casos em estudo, após a amplificação e a obtenção de uma banda única em electroforese procedeu-se à purificação dos produtos de PCR para garantir uma boa qualidade das sequências de ADN a serem geradas na reacção de sequenciação. Para o efeito foram utilizados o *Kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen, USA) ou o *illustra™ – ExoProStar™ Enzymatic PCR and Sequencing Clean-up kit* (GE Healthcare, Life Sciences, UK), seguindo o protocolo dos fabricantes. Procedeu-se ao envio para sequenciação na empresa STAB-VIDA.


Os cromatogramas resultantes foram editados e corrigidos com o programa BioEdit Sequence Alignment V 7.2.6.1 (Hall, T.A., 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), e as sequências corrigidas foram submetidas a uma análise por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para a pesquisa de homologias numa base de dados internacional (GenBank – NCBI- National Center for Biotechnology Information).

Com a mesma finalidade e para comparação da informação assim obtida e uma melhor segurança dos resultados recorreu-se igualmente ao MicoBank: (<http://www.mycobank.org/>) (Robert, V. *et al.*, 2005) e BOLDSYSTEMS: *Barcode of Life Data Systems* (<http://www.boldsystems.org/>) (Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N., 2007).

Para as análises filogenéticas procedeu-se à seleção de sequências a partir de bibliografia específica para cada grupo estudado. O alinhamento das sequências foi efetuado recorrendo ao programa MEGA7 v. 7.0.6 (Kumar *et al.*, 2016) e ao CIPRES Science Gateway V. 3.3 (Miller *et al.*, 2010): <https://www.phylo.org/> com os quais também se procedeu às análises filogenéticas. As árvores filogenéticas foram obtidas pelo método de Máxima Verossimilhança, segundo o modelo definido pelo critério de informação Bayesiana para cada situação, com 1000 réplicas de *bootstrap*.

As sequências de Botryosphaeriaceae (ITS e EF1-α) foram alinhadas com o software Clustal Omega, <http://www.clustal.org>, (Larkin *et al.*, 2007), tendo-se recorrido ao Concatenator V 1.0.1 (Martins, F.P. & Paulo, O.S., 2007) para a concatenação. A análise filogenética foi realizada com recurso ao CIPRES Science Gateway V. 3.3 (Miller *et al.*, 2010): <https://www.phylo.org/>.

3.5.5. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado recorrendo ao *software*  version 3.5.1 (2018-07-02) (R Core Team, 2018) sendo a fundamentação teórica baseada em Wolda, H. (1981), Hosmer & Lemeshow (2000) e Krzanowski, W.J. (2000).

Para contornar a limitação dos índices ecológicos utilizados para comparar a diversidade/abundância populacionais cuja utilização apenas permite a comparação entre duas populações em simultâneo (ex.: índice de Sørensen, índice de Jaccard, etc), optou-se pela abordagem estatística direcionada à análise do delineamento experimental realizado.

De acordo com o descrito em 3.1. trata-se de um delineamento fatorial a 4 fatores (**local** de amostragem, **estado sanitário** das árvores, **nível** de amostragem na árvore, **meio de cultura** utilizado no isolamento):

$$\begin{aligned}g(E(Y_{ijklm})) = & \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \\ & + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\delta)_{il} + (\beta\gamma)_{jk} + (\beta\delta)_{jl} + (\gamma\delta)_{kl} + \\ & + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + (\alpha\beta\delta)_{ijl} + (\beta\gamma\delta)_{jlk} + \\ & + (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl} + \epsilon_{ijklm}\end{aligned}$$

α_i : Efeito de local;

β_j Efeito de Estado Sanitário;

γ_k Efeito de Nível de amostragem na árvore;

δ_l : efeito de meio de cultura

No âmbito deste trabalho, e tendo em conta os fatores envolvidos no delineamento experimental, considerou-se para estudo duas variáveis de interesse: uma relativa à abundância de uma espécie, a selecionar, considerada importante no contexto da DMP – “presença da espécie X” – e uma outra variável que permita estudar a abundância – “abundância de fungos”.

Y = presença da espécie X

Optou-se pelo modelo de regressão logística, tratando-se de uma resposta binária (presença/ausência) cuja componente aleatória tem distribuição de Bernoulli.

$$Y_{ijkl} = \begin{cases} 1 \\ 0 \end{cases}$$

P [Y=1] = P_{ijkl} = E [Y_{ijkl}] depende do Local i, Estado sanitário j, Nível k e Meio de cultura l

Ao modelar não Y mas E[Y_{ijkl}] resulta:

$$E[Y_{ijkl}] = g(P_{ijkl}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l \quad (\alpha_1 = \beta_1 = \gamma_1 = \delta_1 = 0)$$

Como na Regressão Logística a função de ligação é a função *logit* vem

$g(p) = \ln \frac{p}{1-p}$, donde $\ln \frac{P_{ijkl}}{1-P_{ijkl}} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l$, sendo a Probabilidade da presença dada pela expressão

$$\Leftrightarrow P_{ijkl} = \frac{1}{1 + e^{-(\mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l)}}$$

Z = abundância de fungos

Tratando-se igualmente de um modelo linear generalizado (Log-linear) e recorrendo aos mesmos preditores usados na situação anterior, parte-se agora do pressuposto, por se tratarem de contagens, que a componente aleatória tem distribuição de Poisson, distribuição esta cujo parâmetro (λ) se admite variar consoante os fatores explicativos (local, estado sanitário, nível, meio de cultura).

Z – Poisson, $Z \approx P_o(\lambda)$

Tal como no modelo anterior será $E[Z_{ijkl}]$ que vai ser modelada, admitindo-se também que

$$E[Z] = \lambda$$

$$g(E[Z]) = \lambda = g[Z] = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k \quad (\alpha_1 = \beta_1 = \gamma_1 = \delta_1 = 0)$$

O modelo Log-linear resulta de escolher $g(\lambda) = \ln(\lambda)$

$\ln(\lambda_{ijkl}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l$, sendo o valor esperado da abundância dado pela expressão

$$\Leftrightarrow \lambda_{ijkl} = e^{\mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l}$$

4. Resultados e discussão

Apresentam-se de seguida os resultados obtidos no trabalho experimental descrito em 3.

São apresentados primeiramente os resultados da identificação dos grupos para os quais se procedeu a um estudo mais exaustivo das características culturais, morfológicas e biométricas – família Botryosphaeriaceae, géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Tentou-se ainda, com base em estudos desta natureza e em bibliografia específica, recolher informação que suportasse os resultados obtidos com as técnicas de biologia molecular para os isolados da família Ophiostomataceae e género *Fusarium*. Esta informação é apresentada nos Quadros 12 a 24 relativos a cada um dos agrupamentos. Embora a identificação dos isolados do filo *Basidiomycota* tenha ocorrido apenas recorrendo à biologia molecular foram agrupados no Quadro 22 dado o número de espécies identificadas. Por último apresenta-se o conjunto dos isolados com identificação baseada apenas em biologia molecular (Quadro 24). A Figura 14 agrega o conjunto de *taxa* identificados, por local de amostragem.

Nos quadros que sistematizam o trabalho de identificação baseado nas técnicas da biologia molecular incluem informação retirada de três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank) para fundamentar a decisão do *táxon* atribuído a cada isolado – códigos das sequências selecionadas para justificar a identificação (GenBank Accession Number).

Todos os isolados foram depositados na Micoteca do INIAV, IP (Anexo III).

Apresentam-se igualmente os resultados do tratamento estatístico enunciado em 3.5.5.

4.1. Identificação taxonómica

4.1.1. Isolados pertencentes à família Botryosphaeriaceae

O estudo deste grupo, descrito em 3.4.1. permitiu compilar os seguintes resultados:

- **aspecto cultural das colónias:** numa forma geral as colónias dos 32 isolados de Botryosphaeriaceae (Quadro 12) apresentam-se densas, com micélio lanoso ocupando toda a placa (Ø90mm), e em alguns casos verifica-se a cobertura total da placa inclusivamente em altura (Bot 2, Bot 5 e Bot 17); verifica-se a ausência de zonagem e de exsudados e as margens são regulares; a maioria das colónias apresenta coloração escura (105 – Smokey Grey; 117 – Pale Mouse Grey; 118 – Mouse Grey; 119 – Dark Mouse Grey; 121 – Olivaceous Grey; 122 – Iron Gray; 125 – Lavender Grey) havendo um grupo de isolados cuja coloração é branca ou com tonalidades de cinzento pouco intenso que no grupo anterior (ex.: 125 – Lavender Grey). Também relativamente à face inferior das colónias se observam genericamente dois grupos, em que a maioria se apresenta muito escura observando-se a dominância de 124 Greenish Black; 122 – Iron Gray; 119 – Dark Mouse Grey e 105 – Smokey Grey. Um pequeno grupo de isolados apresenta coloração clara com dominância de branco marfim, 64 - Honey e 90 – Greenish Olivaceous.

Apesar da variabilidade observada permaneceu, sobretudo, a dúvida relativa ao isolado Bot15 por o aspecto da colónia ser o mais divergente do grupo (daí se apresentar no Quadro 12 as imagens com 7 e 21 dias de crescimento deste isolado, que se manteve divergente dos restantes até às 3 semanas de

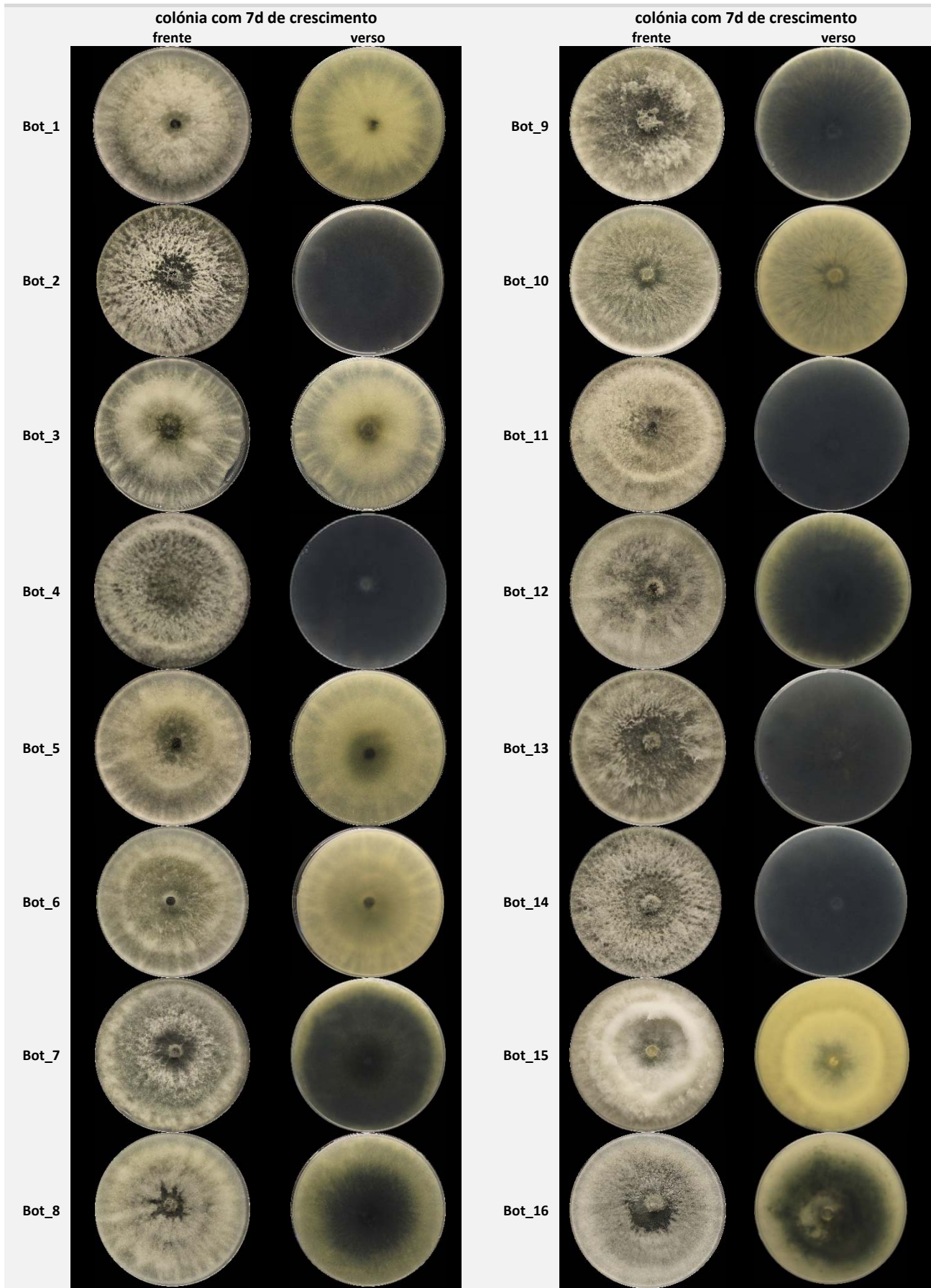
crescimento – ao contrário de todos os restantes que, com esta idade, já apresentavam homogeneidade – culturas com as tonalidades mais escuras.

- **características biométricas dos conídios**, resultado da medição de 30 conídios por isolado, cuja informação é apresentada no Quadro 13.
- **estudo com a técnica MSP-PCR**: a análise molecular por MSP-PCR dos isolados de Botriosphaeriaceae dos 32 isolados através da técnica de MSP-PCR (Figura 6) evidencia que as 16 diferentes posições de bandas devolvidas pela técnica permitem organizar os isolados em 4 diferentes padrões de amplificação. Considerando os três locais de amostragem, observa-se que os quatro padrões de amplificação estão presentes no grupo de isolados provenientes da Comporta. Em Góis existem isolados com o padrão A e isolados com o padrão B, enquanto nos isolados da ilha da Madeira apenas se observa o padrão D. Estes quatro padrões de amplificação correspondem aos organizados pelo dendrograma devolvido pela análise no NTSYSpc2 (Figura 6).

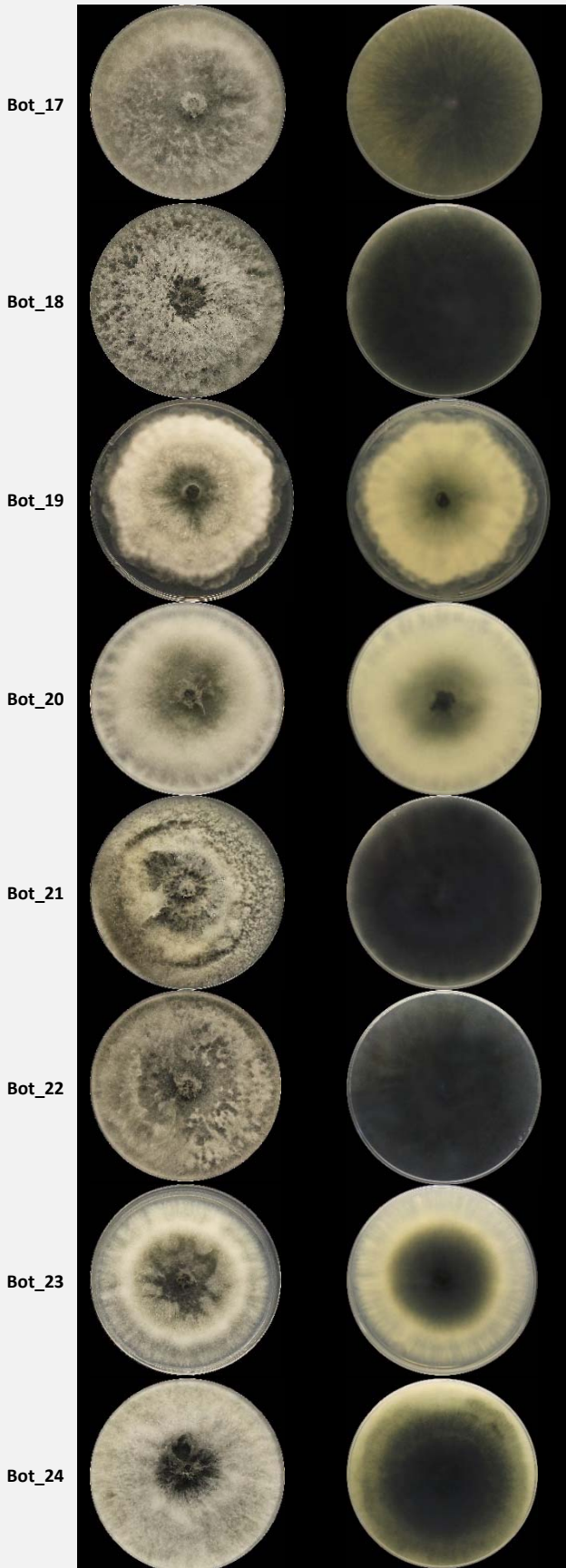
Verificou-se pela análise por BLAST que as sequências correspondentes à região ITS indicaram homologia para *Sphaeropsis sapinea* enquanto as correspondentes à região EF1- α indicaram homologia para *Diplodia seriata*. No entanto, considerando as características biométricas dos conídios obtidas neste trabalho, estas seriam, de acordo com Philips *et al.* (2013), inconsistentes com as de *Diplodia seriata* já que nesta espécie o comprimento dos conídios nunca ultrapassa os 30 μ m – informação que diverge bastante dos valores obtidos pelas medições efetuadas com os 32 isolados (Quadro 13).

A concatenação das duas regiões e posterior análise permitiu concluir, pela análise da árvore filogenética (Figura 7), que os isolados em causa (os selecionados de entre os 32, como representativos da diversidade exibida pelas 32 colónias – aspeto cultural das colónias descrito no início de 4.1.; Quadro 12) pertencerão à mesma espécie, ***Sphaeropsis sapinea*** (Fr.) Dyko & B. Sutton, *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*: 120 (1980), correspondendo a variabilidade morfológica observada, a variabilidade intraespecífica associada, o que é corroborado pelas várias abordagens utilizadas no estudo deste grupo.

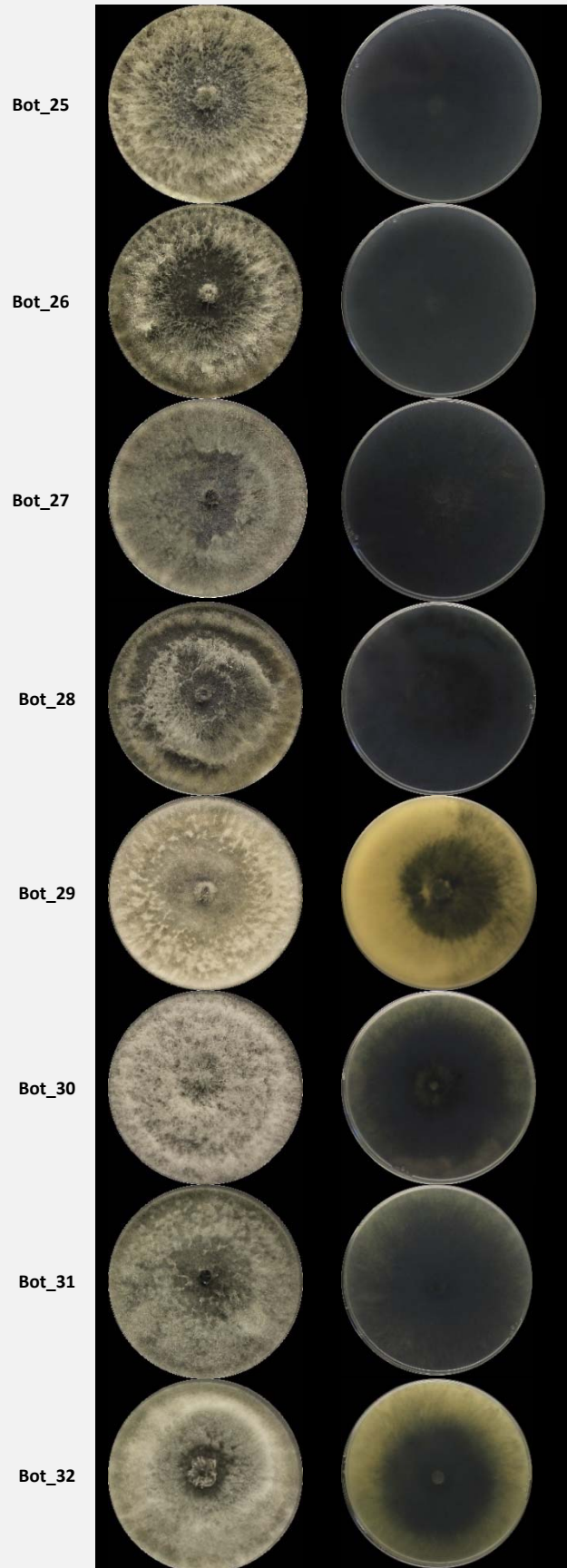
Quadro 12 – Culturas dos isolados de Botryosphaeriaceae spp. (frente e verso das colônias), ao fim de 7 e de 21 dias de crescimento em PDA (24±1°C). Fotos: MTrindade

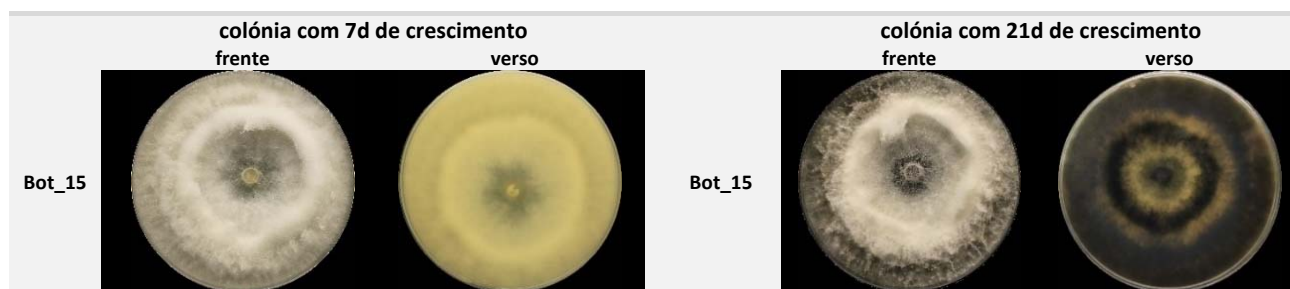


colônia com 7d de crescimento
frente verso



colônia com 7d de crescimento
frente verso





Quadro 13 – Características biométricas dos conídios nos 32 isolados de Botryosphaeriaceae spp. cultivados em AA a 2%, à temperatura de 24±1°C, e relação comprimento/largura (c/l) (valores obtidos a partir de 30 conídios por isolado *).

Isolado	Intervalo de confiança a 95%	Média e Desvio Padrão	RazãoC/L
Bot_1*	(34,99 –) 39,66–42,13 (–47,96) × (12,33–) 13,42–13,95 (–15,05) μm	($\bar{x} \pm DP = 40,90 \pm 3,45 \times 13,69 \pm 0,73 \mu\text{m}$)	2,99
Bot_2*	(34,79 –) 37,84–39,21 (–41,55) × (11,43–) 12,70–13,35 (–14,71) μm	($\bar{x} \pm DP = 38,52 \pm 1,91 \times 13,02 \pm 0,91 \mu\text{m}$)	2,97
Bot_3	(27,18 –) 33,16–35,90 (–41,29) × (11,64–) 13,21–14,06 (–16,13) μm	($\bar{x} \pm DP = 34,53 \pm 3,84 \times 13,63 \pm 1,19 \mu\text{m}$)	2,56
Bot_4*	(33,27 –) 38,04–41,05 (–49,68) × (13,09–) 14,69–15,51 (–18,40) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,55 \pm 4,21 \times 15,10 \pm 1,14 \mu\text{m}$)	2,63
Bot_5*	(30,58 –) 37,70–40,04 (–42,95) × (10,01–) 12,94–14,01 (–16,55) μm	($\bar{x} \pm DP = 38,87 \pm 3,28 \times 13,47 \pm 1,50 \mu\text{m}$)	2,92
Bot_6	(30,39 –) 33,50–35,26 (–39,74) × (11,48–) 13,33–14,12 (–15,77) μm	($\bar{x} \pm DP = 34,38 \pm 2,45 \times 13,72 \pm 1,10 \mu\text{m}$)	2,52
Bot_7	(29,24 –) 36,34–38,93 (–45,87) × (11,62–) 13,46–14,31 (–16,05) μm	($\bar{x} \pm DP = 37,64 \pm 3,62 \times 13,89 \pm 1,20 \mu\text{m}$)	2,73
Bot_8	(32,51 –) 38,08–40,47 (–44,77) × (11,97–) 15,17–16,28 (–18,86) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,28 \pm 3,34 \times 15,72 \pm 1,56 \mu\text{m}$)	2,51
Bot_9	(31,19 –) 35,38–38,00 (–44,89) × (11,49–) 13,78–14,50 (–16,12) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,69 \pm 3,67 \times 14,14 \pm 1,01 \mu\text{m}$)	2,61
Bot_10	(31,14 –) 34,24–35,89 (–39,96) × (12,24–) 14,05–15,26 (–18,81) μm	($\bar{x} \pm DP = 35,07 \pm 2,31 \times 14,65 \pm 1,70 \mu\text{m}$)	2,42
Bot_11	(35,12 –) 39,19–41,08 (–44,62) × (10,67–) 11,79–12,29 (–14,14) μm	($\bar{x} \pm DP = 40,14 \pm 2,65 \times 12,04 \pm 0,69 \mu\text{m}$)	3,34
Bot_12	(33,65 –) 37,54–40,63 (–48,45) × (10,71–) 13,00–14,10 (–17,45) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,08 \pm 4,33 \times 13,55 \pm 1,54 \mu\text{m}$)	2,90
Bot_13	(29,46 –) 34,96–36,93 (–40,32) × (9,12–) 12,73–13,59 (–16,17) μm	($\bar{x} \pm DP = 35,94 \pm 2,75 \times 13,16 \pm 1,20 \mu\text{m}$)	2,76
Bot_14	(28,96 –) 36,51–39,40 (–46,48) × (8,75–) 10,75–11,49 (–12,98) μm	($\bar{x} \pm DP = 37,96 \pm 4,05 \times 11,12 \pm 1,03 \mu\text{m}$)	3,45
Bot_15*	(30,36 –) 34,29–36,28 (–45,12) × (9,66–) 11,01–11,75 (–13,54) μm	($\bar{x} \pm DP = 35,28 \pm 2,78 \times 11,38 \pm 1,03 \mu\text{m}$)	3,12
Bot_16*	(30,68 –) 35,54–37,57 (–42,80) × (10,84–) 12,54–13,18 (–14,78) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,56 \pm 2,85 \times 12,86 \pm 0,89 \mu\text{m}$)	2,86
Bot_17	(23,78 –) 27,67–29,73 (–34,86) × (10,82–) 12,28–13,03 (–14,63) μm	($\bar{x} \pm DP = 28,70 \pm 2,88 \times 12,65 \pm 1,05 \mu\text{m}$)	2,28
Bot_18	(34,48 –) 38,18–39,35 (–41,89) × (10,28–) 11,50–11,98 (–13,21) μm	($\bar{x} \pm DP = 38,76 \pm 1,64 \times 11,74 \pm 0,67 \mu\text{m}$)	3,32
Bot_19*	(33,64 –) 38,62–41,13 (–48,07) × (9,64–) 11,11–11,65 (–12,55) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,87 \pm 3,50 \times 11,38 \pm 0,75 \mu\text{m}$)	3,51
Bot_20*	(27,57 –) 32,63–34,54 (–38,35) × (10,56–) 12,94–13,78 (–15,99) μm	($\bar{x} \pm DP = 33,58 \pm 2,68 \times 13,36 \pm 1,17 \mu\text{m}$)	2,53
Bot_21*	(26,90 –) 32,36–33,89 (–36,49) × (10,39–) 11,70–12,46 (–14,86) μm	($\bar{x} \pm DP = 33,12 \pm 2,13 \times 12,08 \pm 1,05 \mu\text{m}$)	2,76
Bot_22	(34,83 –) 38,33–40,01 (–42,98) × (13,56–) 14,85–15,48 (–16,82) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,17 \pm 2,35 \times 15,16 \pm 0,88 \mu\text{m}$)	2,59
Bot_23*	(30,31 –) 33,53–35,69 (–40,68) × (12,35–) 13,96–14,57 (–16,28) μm	($\bar{x} \pm DP = 34,61 \pm 3,02 \times 14,27 \pm 0,85 \mu\text{m}$)	2,43
Bot_24	(24,65 –) 31,80–34,47 (–42,56) × (10,33–) 12,69–13,63 (–15,53) μm	($\bar{x} \pm DP = 33,13 \pm 3,74 \times 13,16 \pm 1,30 \mu\text{m}$)	2,55
Bot_25	(34,53 –) 39,04–40,70 (–43,58) × (11,43–) 13,22–13,80 (–14,85) μm	($\bar{x} \pm DP = 39,87 \pm 2,32 \times 13,51 \pm 0,81 \mu\text{m}$)	2,96
Bot_26*	(27,93 –) 35,38–37,57 (–41,50) × (9,66–) 11,90–13,20 (–16,50) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,48 \pm 3,06 \times 12,55 \pm 1,82 \mu\text{m}$)	2,97
Bot_27	(29,21 –) 34,92–37,91 (–45,75) × (12,55–) 14,22–15,33 (–18,53) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,41 \pm 4,18 \times 14,77 \pm 1,55 \mu\text{m}$)	2,50
Bot_28	(27,43 –) 34,22–37,10 (–44,18) × (11,37–) 12,68–13,42 (–15,33) μm	($\bar{x} \pm DP = 35,66 \pm 4,03 \times 13,05 \pm 1,02 \mu\text{m}$)	2,74
Bot_29*	(28,61 –) 34,99–37,10 (–40,92) × (11,57–) 15,19–16,92 (–20,31) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,05 \pm 2,96 \times 16,06 \pm 2,42 \mu\text{m}$)	2,28
Bot_30	(32,18 –) 35,48–37,43 (–41,37) × (10,29–) 14,43–16,24 (–20,31) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,46 \pm 2,73 \times 15,34 \pm 2,52 \mu\text{m}$)	2,45
Bot_31	(26,46 –) 32,79–35,32 (–40,19) × (11,00–) 14,60–17,35 (–29,08) μm	($\bar{x} \pm DP = 34,06 \pm 3,53 \times 15,98 \pm 3,84 \mu\text{m}$)	2,22
Bot_32*	(31,72 –) 35,40–37,61 (–42,58) × (12,11–) 15,82–17,72 (–22,56) μm	($\bar{x} \pm DP = 36,51 \pm 3,08 \times 16,77 \pm 2,65 \mu\text{m}$)	2,23

* Para estabelecer correspondência entre este estudo, a morfologia das colônias (Quadro 12) e os resultados obtidos pela técnica MSP-PCR (Figura 6), e para melhor visualização da correspondência de resultados, os tons de cinza deste quadro correspondem aos tons atribuídos aos perfis de bandas PCR (Figura 6)

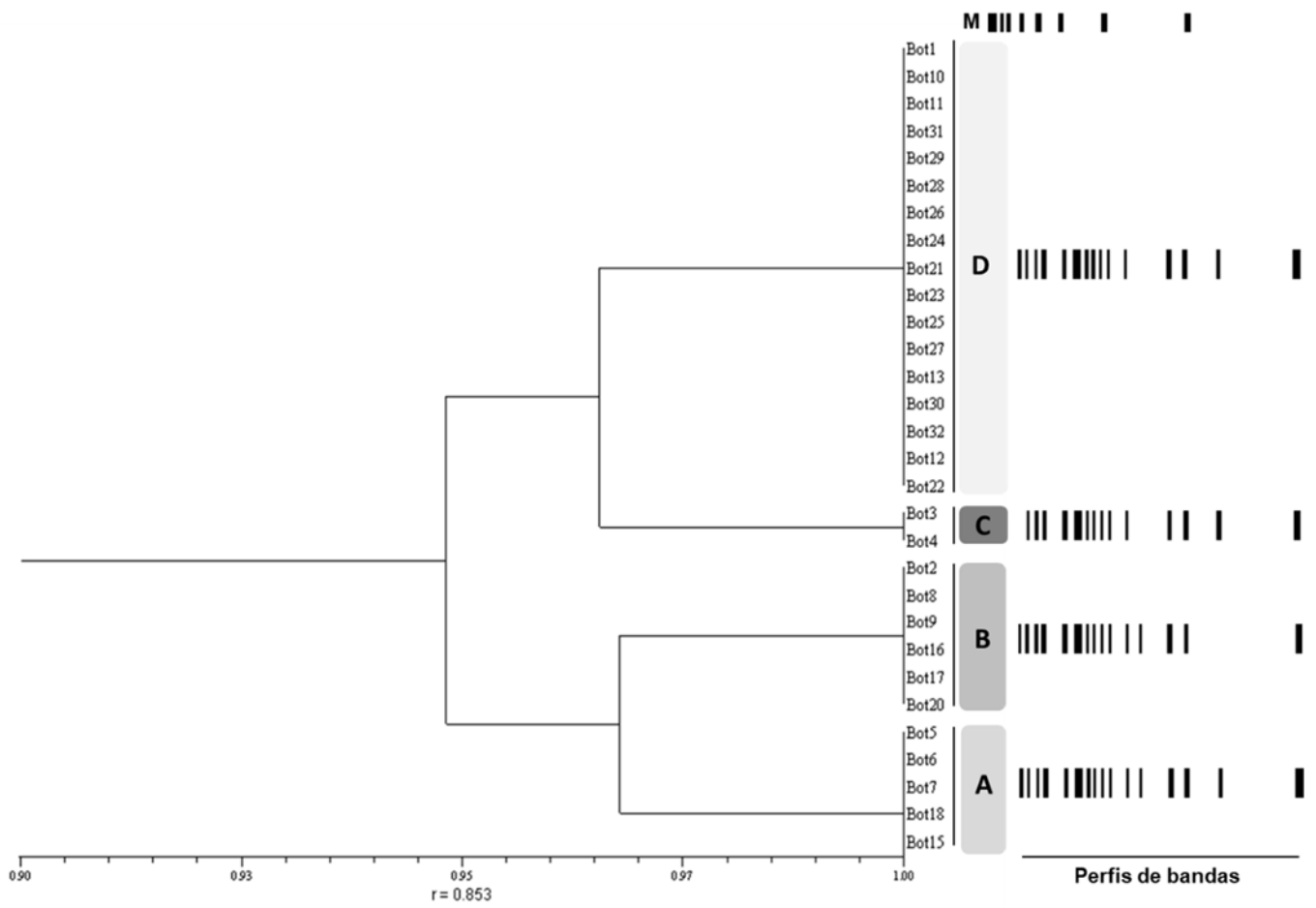


Figura 6 – Dendrograma resultante da análise pela técnica MSP-PCR, e perfis de bandas do conjunto dos isolados de Botryosphaeriaceae, obtido em NTSYSp2 usando o coeficiente de correlação de DICE. A barra de escala representa a percentagem de similaridade.

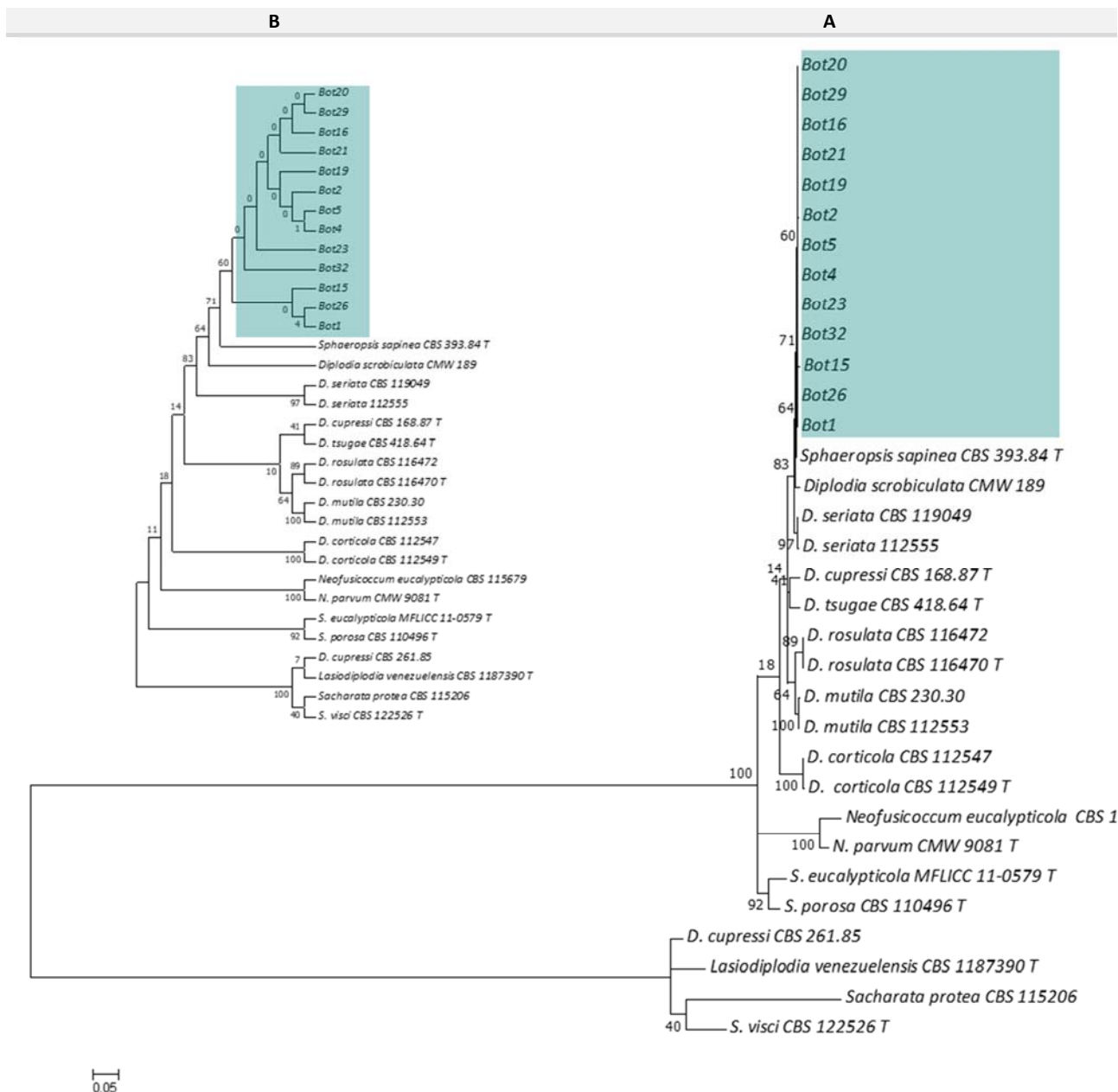


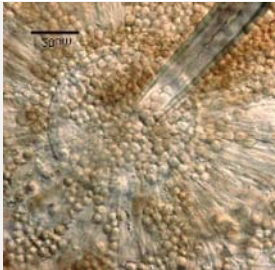



Figura 7 – (A) Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências concatenadas correspondentes às regiões ITS (456 pb) e EF1- α (250 pb) (Botriosphaeriaceae), onde se incluem 13 isolados de fungos em *Pinus pinaster* (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES. À esquerda (B) apresenta-se o cladograma resultante da mesma análise para melhor visualização da variabilidade intraespecífica dos isolados.

4.1.2. Isolados pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*

Os isolados pertencentes a estes dois géneros foram analisados de acordo com o descrito em 3.4.2. sendo os resultados desse estudo apresentados nos Quadros 14 e 15. O Quadro 15 apresenta os *taxa* possíveis de concluir com base no estudo realizado (morfologia e biologia molecular). A filogenia destes *taxa* é ilustrada da Figura 8.

Quadro 14 – Resultados da medição de características biométricas em estruturas (30 medições por estrutura) de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., ao fim de 7 dias de crescimento em MAE (24±1°C). Imagens de cabeças conidiogênicas de *Aspergillus* spp. e de conidióforos de *Penicillium* spp. Fotos: MTrindade

Intervalo de confiança a 95%		Média e Desvio Padrão	
A1_pé	(171,14 –) 198,99–263,39 (–298,93) × (2,2–) 2,42–7,72 (–15,53) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 231,19 \pm 49,28 \times 5,07 \pm 4,06 \mu\text{m}$)	
A1_métula	(3,69 –) 4,1–4,45 (–4,93) × (1,91–) 2–2,22 (–2,68) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 4,28 \pm 0,34 \times 2,11 \pm 0,22 \mu\text{m}$)	
A1_fiálide	(4,44 –) 4,69–5,11 (–5,29) × (1,84–) 1,99–2,25 (–2,43) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 4,9 \pm 0,3 \times 2,12 \pm 0,19 \mu\text{m}$)	
A1_conídio	(2,43 –) 2,74–2,93 (–3,12) × (2,27–) 2,54–2,71 (–3,01) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 2,83 \pm 0,23 \times 2,63 \pm 0,2 \mu\text{m}$)	
A2_pé	(85 –) 76,13–204,2 (–246,46) × (4,59–) 4,67–5,76 (–6,16) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 140,16 \pm 73,06 \times 5,22 \pm 0,62 \mu\text{m}$)	
A2_fiálide	(6,23 –) 7,14–8,92 (–10,36) × (2,96–) 3,48–4,13 (–4,58) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 8,03 \pm 1,57 \times 3,81 \pm 0,58 \mu\text{m}$)	
A2_conídio	(3,76 –) 4,08–5,53 (–7,72) × (3,39–) 3,87–4,48 (–5,42) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 4,8 \pm 1,23 \times 4,18 \pm 0,52 \mu\text{m}$)	
A3_conídio	(3,49 –) 3,84–4,04 (–4,46) × (3,49–) 3,6–3,78 (–4,2) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 3,94 \pm 0,24 \times 3,69 \pm 0,22 \mu\text{m}$)	 

Intervalo de confiança a 95%		Média e Desvio Padrão		
conidióforos	monoverticilados			
P1_pé	(27,59 -) 26,75-60 (-82,8) × (1,64-) 1,88-2,52 (-2,69) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 43,38 \pm 20,78 \times 2,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$)		
P1_fiálide	(6,64 -) 7,51-8,44 (-9,8) × (2,21-) 2,49-2,7 (-2,88) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 7,98 \pm 0,89 \times 2,59 \pm 0,2 \mu\text{m}$)		
P1_conídio	(1,45 -) 1,58-1,71 (-1,93) × (1,32-) 1,47-1,61 (-1,93) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 1,64 \pm 0,15 \times 1,54 \pm 0,17 \mu\text{m}$)		
conidióforos	monoverticilados			
P2_pé	(31,95 -) 44,54-68,38 (-83,52) × (2,33-) 2,51-3 (-3,27) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 56,46 \pm 16,09 \times 2,76 \pm 0,33 \mu\text{m}$)		
P2_fiálide	(8,48 -) 8,48-10,02 (-10,77) × (2,52-) 2,56-2,97 (-3,05) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 9,25 \pm 0,88 \times 2,76 \pm 0,23 \mu\text{m}$)		
P2_conídio	(2,77 -) 2,9-3,02 (-3,25) × (2,53-) 2,72-2,85 (-3,01) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 2,96 \pm 0,15 \times 2,79 \pm 0,16 \mu\text{m}$)		
conidióforos	bi (ter) verticilados			
P3_pé	(42,48 -) 48,92-177,55 (-286,76) × (2,52-) 2,56-3,02 (-3,36) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 113,24 \pm 86,82 \times 2,79 \pm 0,31 \mu\text{m}$)		
P3_métula	(6,3 -) 6,69-7,41 (-8,19) × (1,94-) 2,1-2,33 (-2,64) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 7,05 \pm 0,6 \times 2,21 \pm 0,2 \mu\text{m}$)		
P3_fiálide	(7,44 -) 8,25-9,18 (-9,74) × (2,13-) 2,31-2,71 (-3,37) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 8,72 \pm 0,82 \times 2,51 \pm 0,35 \mu\text{m}$)		
P3_conídio	(2,4 -) 2,56-2,71 (-2,9) × (2,06-) 2,4-2,58 (-2,88) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 2,64 \pm 0,18 \times 2,49 \pm 0,21 \mu\text{m}$)		
conidióforos	biverticilados			
P4_pé	(39,1 -) 49,21-83,05 (-100,05) × (2,18-) 2,39-3,03 (-3,18) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 66,13 \pm 21,14 \times 2,71 \pm 0,4 \mu\text{m}$)		
P4_métula	(7,9 -) 9,08-10,85 (-10,98) × (1,81-) 1,9-2,19 (-2,33) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 9,97 \pm 1,11 \times 2,05 \pm 0,18 \mu\text{m}$)		
P4_fiálide	(6,85 -) 7,45-8,08 (-8,23) × (1,76-) 1,92-2,1 (-2,18) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 7,76 \pm 0,48 \times 2,01 \pm 0,14 \mu\text{m}$)		
P4_conídio	(2,04 -) 2,26-2,37 (-2,53) × (1,69-) 2-2,14 (-2,4) μm	($\bar{x} \pm S.D. = 2,32 \pm 0,14 \times 2,07 \pm 0,17 \mu\text{m}$)		

Intervalo de confiança a 95%

Média e Desvio Padrão

conidióforos monoverticilados

P5_pé (55,91 -) 65,38-83,34 (-94,81) × (1,52-) 2,08-2,59 (-3,09) μm

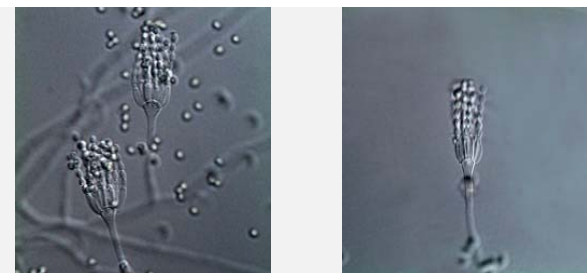
P5_fiálide (8,74 -) 9,18-10,2 (-10,61) × (2,36-) 2,45-2,72 (-2,9) μm

P5_conídio (2,06 -) 2,33-2,5 (-2,77) × (1,8-) 2,06-2,29 (-2,64) μm

($\bar{x} \pm S.D.$ = 74,36 ± 14,49 × 2,33 ± 0,41 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 9,69 ± 0,73 × 2,58 ± 0,19 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 2,41 ± 0,21 × 2,18 ± 0,26 μm)

**conidióforos monoverticilados**

P6_pé (16,19 -) 40,97-66,77 (-84,56) × (1,58-) 2,58-4,52 (-5,56) μm

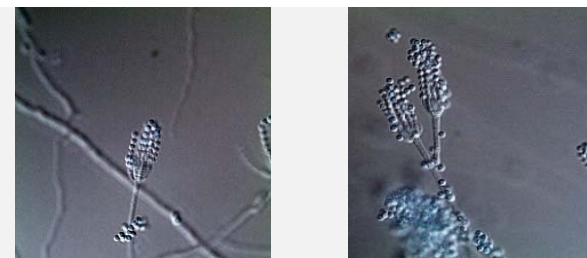
P6_fiálide (5,28 -) 5,97-6,85 (-7,37) × (1,56-) 1,93-2,45 (-3,16) μm

P6_conídio (1,8 -) 2-2,18 (-2,4) × (1,56-) 1,72-1,86 (-2,17) μm

($\bar{x} \pm S.D.$ = 53,87 ± 20,81 × 3,55 ± 1,57 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 6,41 ± 0,81 × 2,19 ± 0,48 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 2,09 ± 0,22 × 1,79 ± 0,17 μm)

**conidióforos biverticilados**

P7_pé (80,01 -) 79,98-132,42 (-124,01) × (2,57-) 2,42-3,3 (-3,3) μm

P7_métula (12,23 -) 14,41-20,68 (-23,85) × (2,88-) 2,99-3,57 (-3,93) μm

P7_fiálide (27,67 -) 29,34-34,05 (-34,9) × (5,94-) 6,27-7,54 (-8,18) μm

P7_conídio (2,77 -) 3,27-3,56 (-4,09) × (2,51-) 3,07-3,38 (-3,96) μm

($\bar{x} \pm S.D.$ = 106,2 ± 23,17 × 2,86 ± 0,39 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 17,55 ± 3,91 × 3,28 ± 0,37 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 31,7 ± 2,95 × 6,91 ± 0,79 μm)

($\bar{x} \pm S.D.$ = 3,41 ± 0,35 × 3,22 ± 0,37 μm)

**conidióforos biverticilados**

P8_pé (196,34 -) 194,48-247,78 (-256,36) × (1,88-) 1,87-2,62 (-2,71) μm

P8_métula (10,1 -) 11,14-12,89 (-14,57) × (2,58-) 2,71-2,97 (-3,13) μm

P8_fiálide (6,75 -) 8,09-9,77 (-11,57) × (2,24-) 2,44-2,75 (-3,1) μm

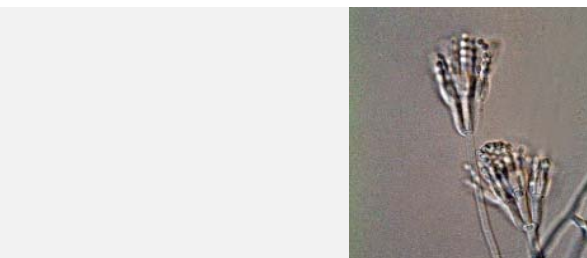
P8_conídio (2,06 -) 2,29-2,44 (-2,64) × (1,93-) 2,15-2,33 (-2,53) μm

($\bar{x} \pm S.D.$ = 221,13 ± 27,19 × 2,24 ± 0,38 μm)







($\bar{x} \pm S.D.$ = 12,01 ± 1,26 × 2,84 ± 0,19 μm)









($\bar{x} \pm S.D.$ = 8,93 ± 1,48 × 2,6 ± 0,27 μm)





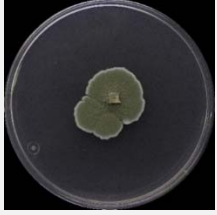



($\bar{x} \pm S.D.$ = 2,37 ± 0,17 × 2,24 ± 0,22 μm)



Quadro 15 – Resultado da identificação dos isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (T: Material Tipo) Fotos: MTrindade

local/táxon	colónia com 7d de crescimento frente verso		GenBank		BoldSystems	MycoBank	
			Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Madeira			100 KX664312	100	100 JX501390	100	100 KX664316
A1: <i>Aspergillus tubingensis</i> Mosseray, La Cellule 43: 245-247 (1934)							
Góis Madeira			100 KX696361	100	100 EF652050	100	99.433 HM036592
A2: <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz, Annales Mycologici 27 (3-4): 207 (1929)							
Madeira			99 LN898693 <i>A. creber</i>	99.82	99.82 AM883156 <i>A. versicolor</i>	100	98.78 LN898693 <i>A. creber</i>
A3: <i>Aspergillus creber</i> Jurjević, S.W. Peterson & B.W. Horn, IMA Fungus 3 (1): 69 (2012) <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab., Annali Bot.: 9 (1908)							

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank	
	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Comporta Madeira			98 MH857876	100	99.63 AY373908	99.634	100 EF198645
P1: <i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx, <i>Annales de la Société Scientifique de Bruxelles</i> 25 (1): 86 (1901)							
Comporta			99 MH863551	100	100 AY373915	100	100 DTO 135-F4 (CBS)
P2: <i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling, <i>Arkiv för Botanik</i> 11 (1): 131 (1911)							
Góis Madeira			99 KT200204	99.56	99.55 JX313153	99.567	99.781 KT200205
P3: <i>Penicillium buchwaldii</i> Frisvad & Samson, <i>FEMS Microbiology Letters</i> 339 (2): 86 (2012)							
Góis			100 NR_077155 T	99.64	99.64 AY373923	99.635	100 NR_077155 T
P4: <i>Penicillium melinii</i> Thom, <i>The Penicillia</i> : 273 (1930)							

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank	
	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Comporta Madeira			100 HM469425	100	100 AY742706	99.818	100 DTO 049-F5 (CBS)
P5: <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge, <i>La Cellule</i> 33: 262 (1923)							
Comporta Madeira			99 EF198650	100	100 EF198661	100	100 DTO 107-C7 (CBS)
P6: <i>Penicillium toxicarium</i> I. Miyake, <i>Japanese Journal of Medical Progress</i> 34: 161 (1947)							
Comporta			100 MH854996 (CBS)	99.81	99.80 KC427176	99.809	100 AY484911
P7: <i>Penicillium bialowiezense</i> K.W. Zaleski, <i>Bulletin International de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres Série B</i> 1927: 450 (1927)							
Madeira			100 MH865564	96.79	96.79 AY373924	97	94.609 AF033416
P8: <i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> Houbraken, Frisvad & Samson, <i>Studies in Mycology</i> 70: 80 (2011) <i>Penicillium miczynskii</i> K.W. Zaleski, <i>Bulletin International de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres Série B</i> 1927: 482 (1927)							

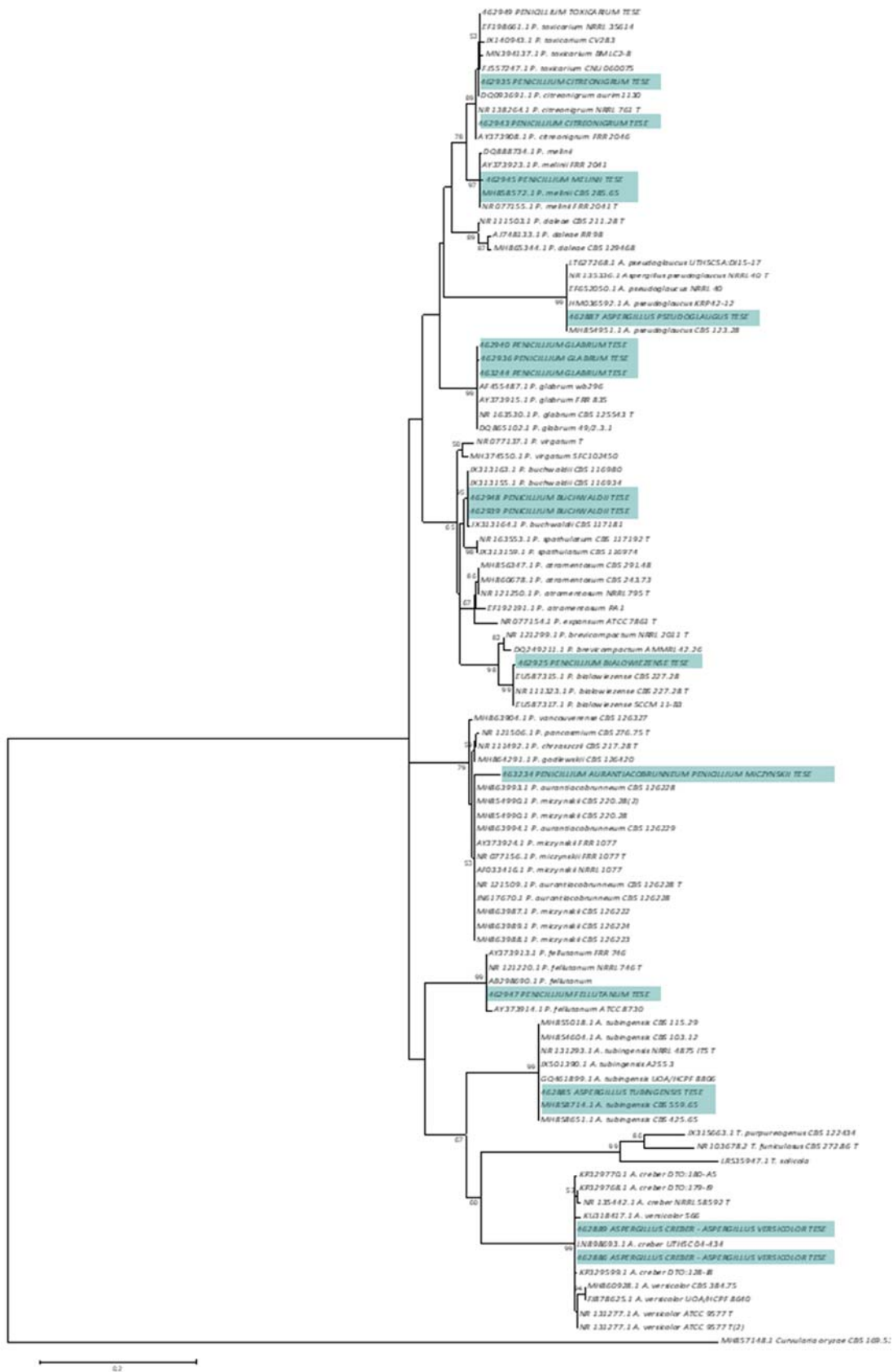


Figura 8 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (634 pb) e de 97 sequências (*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.), onde se incluem 17 isolados em *Pinus pinaster* (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.

4.1.3. Isolados pertencentes ao género *Trichoderma*










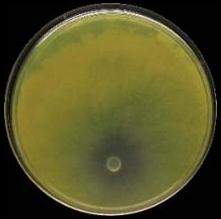


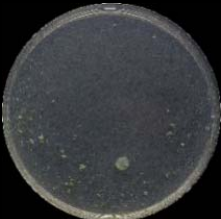









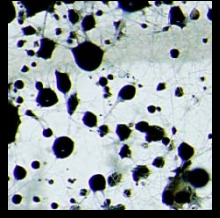
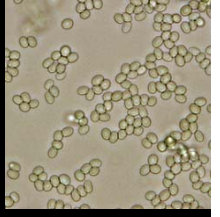
Conforme se menciona em 3.4.3., os isolados de *Trichoderma* spp. inicialmente cultivados em PDA, foram primeiramente agrupados de acordo com a semelhança morfológica das respetivas colónias em sete grupos. Por se ter suspeitado que alguns destes sete sub-grupos correspondiam à mesma espécie, a conjugação dos resultados obtidos nos estudos morfológicos e culturais das colónias (em três meios de cultura apropriados) e da biologia molecular (análise da e sequenciação da região ITS) permitiu concluir tratarem-se de três espécies.

Os Quadros 16, 17 e 18 reúnem a informação resultante do estudo de morfologia das colónias, tendo-se concluído existirem três espécies (Quadro 19) e cuja filogenia é ilustrada na Figura 9.

Quadro 16 – Resultados da medição de características biométricas em *Trichoderma* spp., ao fim de 7 de crescimento em PDA ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) (valores obtidos a partir de 30 conídios por isolado).

Grupo	Intervalo de confiança a 95%	Média e Desvio Padrão
T1	$(2,54 -) 2,93 - 3,12 (-3,58) \times (2,28 -) 2,69 - 2,88 (-3,49) \mu\text{m}$	$(\bar{x} \pm \text{DP} = 3,03 \pm 0,26 \times 2,78 \pm 0,27 \mu\text{m})$
T2	$(2,38 -) 2,85 - 3,06 (-3,58) \times (1,54 -) 1,84 - 1,97 (-2,22) \mu\text{m}$	$(\bar{x} \pm \text{DP} = 2,96 \pm 0,30 \times 1,91 \pm 0,19 \mu\text{m})$
T3	$(3 -) 3,35 - 3,53 (-3,92) \times (2,27 -) 2,26 - 2,36 (-2,56) \mu\text{m}$	$(\bar{x} \pm \text{DP} = 3,44 \pm 0,25 \times 2,31 \pm 0,15 \mu\text{m})$







Quadro 17 – Aspeto das colónias dos isolados de *Trichoderma* spp. (frente e verso) ao fim de 7 dias de crescimento em PDA, CMD e SNA – 24±1°C). Pústulas e conídios (em CMD). Fotos: MTrindade

Grupo	PDA colónia com 7d de crescimento		CMD colónia com 7d de crescimento		SNA colónia com 7d de crescimento		pústulas	conídios
	frente	verso	frente	verso	frente	verso		
T1								
T2								
T3								

Quadro 18 – Caracterização cultural dos isolados de *Trichoderma* spp., ao fim de 7 dias de crescimento (24±1°C) em três meios de cultura (PDA, CMD e SNA).

Grupo	Meio	Face superior da colónia				Face inferior da colónia	Ø da colónia (mm)	
		Aspetto da cultura	Densidade	Zonagem	Margem	Exsudado		Cor
T1	PDA	Micélio lanoso; 92 (Pistachio green) e 72 (Malachite green) com micélio esbranquiçado Aroma a côco	Densa	Ligeira (anéis sem clara delimitação)	Regular	Ausente	Pale yellow	90
T1	CMD	Micélio transparente com maior densidade nas zonas de anéis, zonas onde se formam as pústulas esverdeadas 69 (Dark herbage green) a 72 (Malachite green)	Densa mas crescimento só à superfície da placa. Crescimento em altura apenas na zonas de pústulas	ausente	Regular	Ausente		90
T1	SNA	Micélio transparente com maior densidade nas zonas de anéis onde se observam pústulas brancas a 72 (Malachite green)	idem	Ausente	Regular	Ausente		90
T2	PDA	Micélio lanoso; 15 (Sulphur yellow)a 14 (Pure Yellow)	Densa	Ausente	Regular	Ausente	14 (Pure yellow)	90
T2	CMD	Micélio transparente com pústulas, muito dispersas, verdes e 69 (Dark herbage green) a 72 (Malachite green)	Densa mas crescimento apenas à superfície da placa. Crescimento em altura apenas na zonas de pústulas	Ausente	Regular	Ausente		90
T2	SNA	idem	idem, emnora com menor densidade	Ausente	Regular	Ausente		90
T3	PDA	Colónia com micélio lanoso. Hifas aéreas. 114 (Violaceus black)	Densa	Presente	Regular	Ausente	107 (Grey olivaceus)	90
T3	CMD	Micélio transparente a esbranquiçado sendo visíveis os agregados de conídios nas zonas terminais dos conidióforos (drops) (negras)	Pouco densa	Ligeira	Regular	Ausente		90
T3	SNA	idem	idem	Ligeira	Regular	Ausente		90

Quadro 19 – Resultado da identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) Fotos: MTrindade

local/táxon	colônia com 7d de crescimento		GenBank Q.C. (%)	I (%)	BoldSystems Sim. (%) GenBank AN	MycoBank	
	frente	verso				Sim. (%)	Overlap (%)
Comporta Madeira			100 MH862501 (CBS)	99.81	99.81 GU197855	99.813 AF359263 (CBS)	100
T1: <i>Trichoderma atroviride</i> Bissett, <i>Canadian Journal of Botany</i> 62 (5): 925 (1984)							
Góis Comporta			100 MG972800	98.79	99.11 98.94 EU330960 KJ174202	99.115 MH865864 (CBS)	97.82
T2: <i>Trichoderma citrinoviride</i> Bissett, <i>Canadian Journal of Botany</i> 62 (5): 926 (1984)							
Góis Comporta			99 MH971266	100	100 AY737770	100 KU738454	99.79
T3: <i>Trichoderma melanomagnum</i> P. Chaverri & Samuels, <i>Studies in Mycology</i> 48: 77 (2003)							

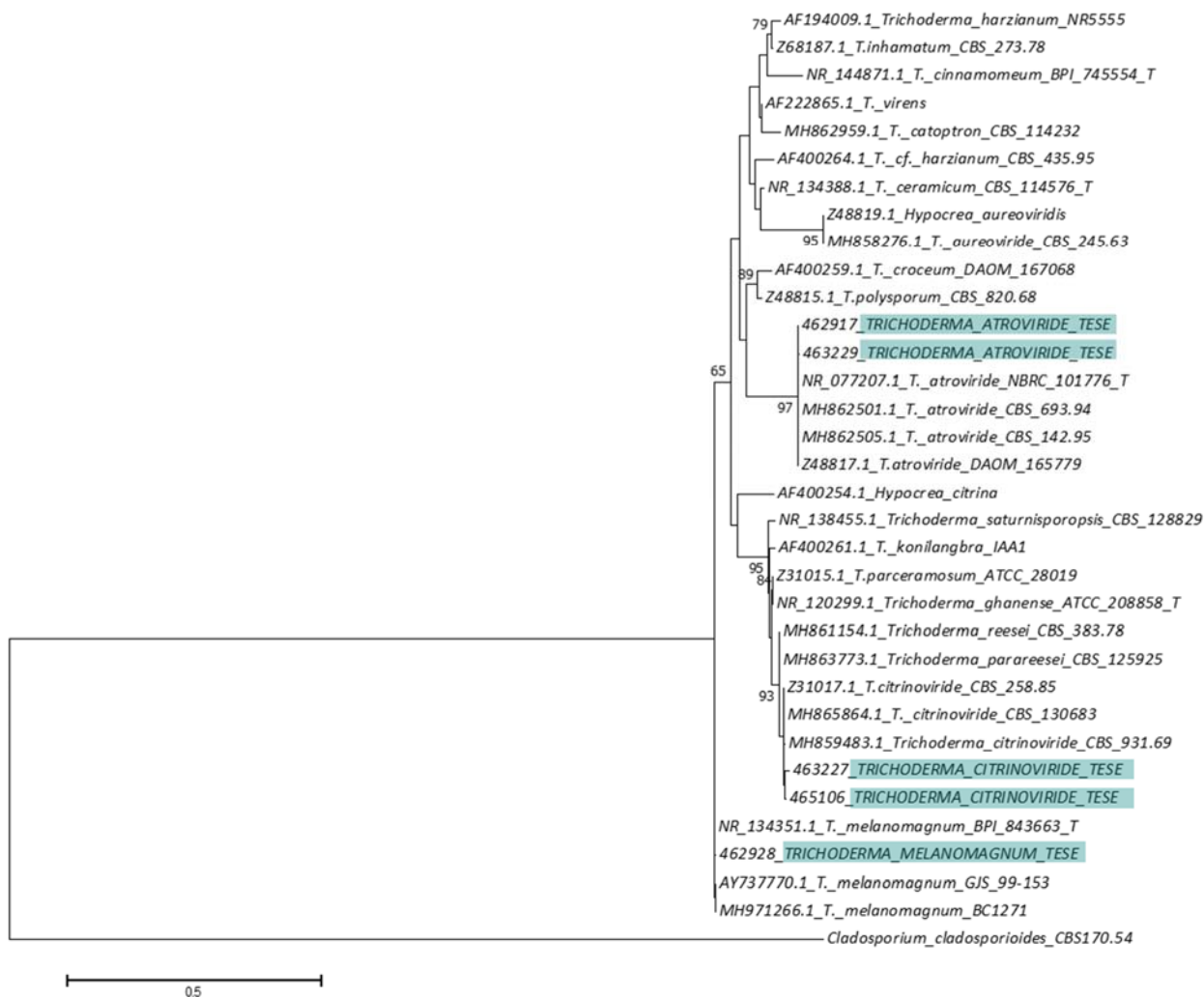


Figura 9 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (832 pb) e de 43 sequências (*Trichoderma* spp.), onde se incluem 5 isolados em *Pinus pinaster* (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.

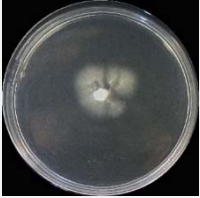

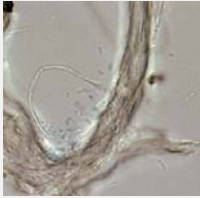


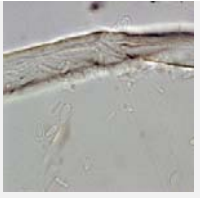




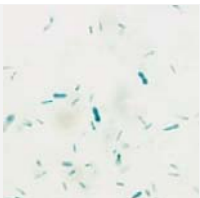
4.1.4. Isolados pertencentes à família Ophiostomataceae

No estudo deste grupo além da morfologia das colônias e de características biométricas de esporos (Quadro 20) foi decisivo o recurso às técnicas da biologia molecular e que permitiu estabelecer a identificação (Quadro 21) sendo a filogenia ilustrada na Figura 10.

Quadro 20 – Resultado da medição de características biométricas em Ophiostomataceae spp. (valores obtidos a partir de 30 esporos por isolado).

Grupo	Intervalo de confiança a 95%	Média e Desvio Padrão
O1: <i>Ceratocystiopsis</i> sp.	(2,76 –) 3,42–3,93 (–4,97) × (1,04–) 1,39–1,58 (–1,81) µm	($\bar{x} \pm DP = 3,68 \pm 0,57 \times 1,48 \pm 0,21 \mu\text{m}$)
O2: <i>Graphiium fragrans</i>	(3,87 –) 4,87–5,76 (–8,42) × (1,43–) 1,79–2,05 (–2,88) µm	($\bar{x} \pm DP = 5,31 \pm 1,18 \times 1,92 \pm 0,34 \mu\text{m}$)
O3: <i>Ophiostoma ips</i>	(3,56 –) 4,11–4,59 (–5,84) × (2,16–) 2,59–2,76 (–3,05) µm	($\bar{x} \pm DP = 4,35 \pm 0,66 \times 2,67 \pm 0,23 \mu\text{m}$)
O5: <i>Sporothrix</i> sp.	(2,63 –) 4,45–5,27 (–7,66) × (0,74–) 1,25–1,49 (–2,08) µm	($\bar{x} \pm DP = 4,86 \pm 1,14 \times 1,37 \pm 0,33 \mu\text{m}$)

Quadro 21 – Resultado da identificação dos isolados de Ophiostomataceae spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado)
Fotos: MTrindade

local/táxon	colônia com 7d de crescimento		GenBank Q.C. (%)	I (%)	BoldSystems Sim. (%) GenBank AN	MycoBank		
	frente	verso				Sim. (%)	Overlap (%)	
Góis Comporta				99	97.61	99.48 97.61 EU913708	99.481	91.759
						AY761157 EU913708	AY761157 np	
	O1: <i>Ceratocystiopsis</i> H.P. Upadhyay & W.B. Kendr., <i>Mycologia</i> 67: 799 (1975)							
Góis				100	100	99.47	100	93.818
				100	99.30			
				MH283086 MH857329		JX444673	JX444672	
O2: <i>Graphilbum fragrans</i> (Math.-Käärik) Z.W. de Beer, Seifert & M.J. Wingf., <i>CBS Biodiversity Series</i> 12: 269 (2013)								
Góis Comporta Madeira				99	100	100	100	99.368
				MH324814		AY546697	SH1521014.08FU KY593324	
	O3: <i>Ophiostoma ips</i> (Rumbold) Nannf., <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 32: 408 (1934)							
Góis Madeira				100	99.49	99.49	100	93.825
				AY546722		AY546722	KX590815	
	O4: <i>Sporothrix</i> Hektoen & C.F. Perkins, <i>Journal of Experimental Medicine</i> 5: 80 (1900)							

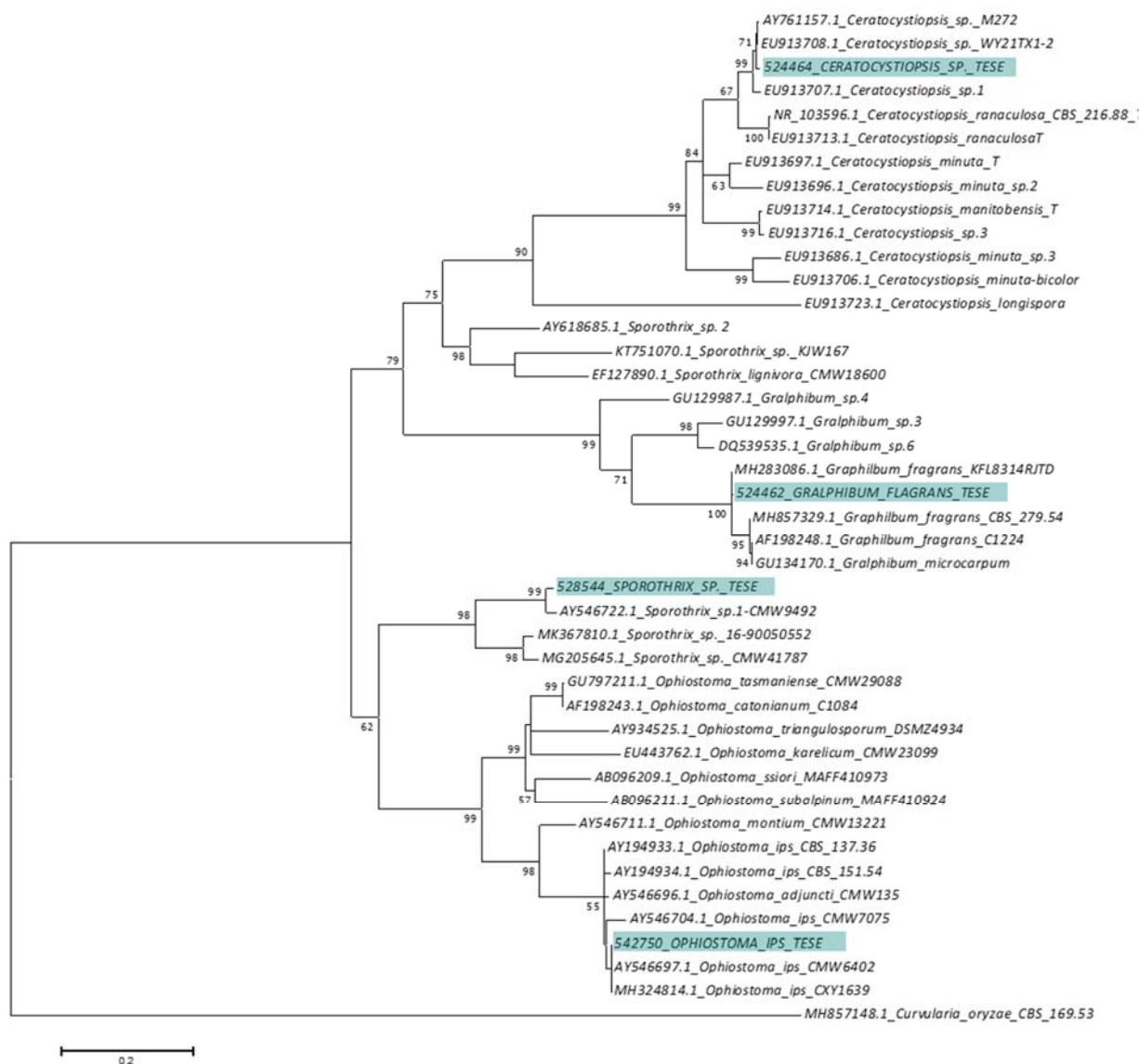


Figura 10 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das seqüências correspondentes às regiões ITS (832 pb) e de 43 seqüências (*Ophiostomataceae* spp.), onde se incluem 4 isolados em *Pinus pinaster* (Tese), como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.

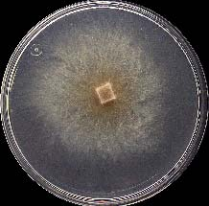
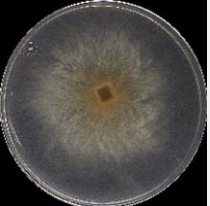






4.1.5. Isolados pertencentes ao filo *Basidiomycota*







Pormenores de morfologia observados em alguns dos isolados permitiram incluí-los no Filo *Basidiomycota* (Figura 11). O resultado da identificação é apresentado no Quadro 22.



Figura 11 – Aspectos morfológicos presentes em algumas espécies de *Basidiomycota*.
A: grampos de conexão; **B:** cistidea observados em *Trichaptum abietinum* Fotos: MTrindade

Quadro 22 – Resultado da identificação dos isolados de *Basidiomycota* spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado) Fotos: MTrindade





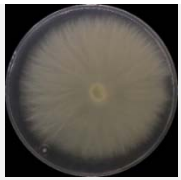







local/táxon	colônia com 7d de crescimento frente verso		GenBank		BoldSystems	MycoBank	
			Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%)		Overlap (%)
					GenBank AN		
Góis			100	99.3198.61	99.65	99.307	100
			99		99.31		
			GQ409531		Status: privado	SH1540196.08FU	
			MH860513 (CBS)		GQ409531	GQ409531	
					AJ534285		
B1: <i>Hyphoderma setigerum</i> (Fr.) Donk, <i>Fungus</i> 27: 15 (1957)							
Góis			100	99.81	99.59	99.891	100
				MH857631 (CBS)	EU118651		
						EU118651	
						MH071728	
B2: <i>Peniophora pini</i> (Schleich.) Boidin, <i>Revue de Mycologie (Paris)</i> 21: 123 (1956)							
Góis			100	99.48	99.47	99.48	100
				MH857639 (CBS)	Status: privado		
						MH857638 (CBS)	
B3: <i>Peniophora rufomarginata</i> (Pers.) Bourdot & Galzin, <i>Bulletin de la Société Mycologique de France</i> 28 (4): 408 (1913)							
Góis			99	98.81	97.63	99.407	99.408
				AF266677	KC581332 np		
						AF266676 (CBS)	
B4: <i>Trichaptum abietinum</i> (Pers. ex J.F. Gmel.) Ryvarden, <i>Norwegian Journal of Botany</i> 19: 237 (1972)							

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Sim. (%)	MycoBank
	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%)		GenBank AN
Góis			100	99.65	94.26	99.48 94.221 94.017	98.801 97.603 100
			KX527870 np <i>S. brinkmannii</i>		JX535039 <i>S. brinkmannii</i>		KX527870 np KJ714008 KF218967 <i>S. brinkmannii</i>
B5: <i>Sistotrema</i> Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 1: 426 (1821)							
Góis			100 98	93.92 <86	<83	94.095	99.62
			JF705944 <i>Pucciniomyces</i> sp.		<i>Septobasidium</i> sp.		JF705944 <i>Pucciniomyces</i> sp.
B6: <i>Pucciniomyces</i> R. Bauer, Begerow, J.P. Samp., M. Weiss & Oberw., <i>Mycological Progress</i> 5 (1): 48 (2006)							
Góis			100 99	98.97 98.62	98.62	98.799	100
			MH114894 np AY618670		AY618670		MH878309 (CBS)
B7: <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schwein.) Fr., <i>Epicrisis Systematis Mycologici</i>: 549 (1838)							

4.1.6. Isolados pertencentes ao género *Fusarium*

O Quadro 23 apresenta as espécies pertencentes ao género *Fusarium*, identificadas com recurso à biologia molecular e a características culturais das colónias e conídios.


Quadro 23 – Resultado da identificação dos isolados de *Fusarium* spp. com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado) Fotos: MTrindade








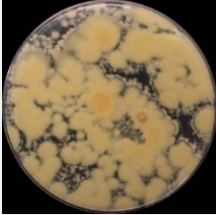
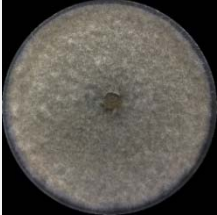

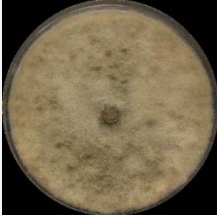

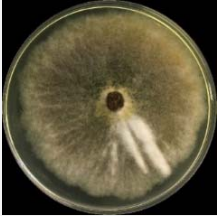


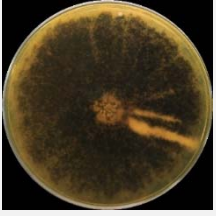
local/táxon	colónia com 7d de crescimento		GenBank		BoldSystems	MycoBank		
	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)	
Comporta Madeira				100	99.52	99.52	99.518	100
				99	99.28			
F1: <i>Fusarium lateritium</i> Nees, <i>System der Pilze und Schwämme</i> : 31, t. 2:26 (1817)								
Comporta				100	100	100	100	100
				MN523180	DQ453704 np	LC383471		
F2: <i>Fusarium oxysporum</i> Schldl., <i>Flora Berlinensis, Pars secunda: Cryptogamia</i> : 139 (1824)								
Comporta				100	100	100	100	100
				MN481205	KF221215	MG274294		
F3: <i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg, <i>Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft</i> 169: 38 (1976)								
Madeira				100	99.80	99.80	100	100
				GQ916543 np	EU151476	AB587010		
F4: <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg, <i>Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft</i> 169: 26 (1976)								




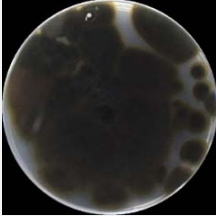
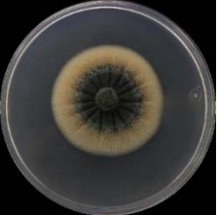







4.1.7. Restantes isolados

O Quadro 24 apresenta o resultado da identificação dos isolados para os quais se recorreu unicamente à biologia molecular. De notar que restam ainda alguns casos cuja identificação não foi possível ao nível da espécie ou género e relativamente aos quais seria necessário a sequenciação de outras regiões que não apenas a região ITS. As Figuras 12 e 13 apresentam a relação evolutiva de todos os isolados para cuja identificação se recorreu á biologia molecular. Na Figura 13 procede-se à organização por Classe e Filo dos diferentes *taxa* identificados.

















Quadro 24 – Resultado da identificação de isolados com base na análise por BLAST para pesquisa de homologias em três bases de dados (GenBank, BoldSystems e MycoBank). Código das sequências selecionadas na identificação (GenBank AN) e locais de isolamento. (Q.C.: Query cover; I: Identity; Sim.: Similarity) (np: não publicado; T: Material Tipo) Fotos: MTrindade

local/ <i>táxon</i>	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	MycoBank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Góis Comporta					100 MH859034 (CBS)	100	100 EF042103 (CBS) <i>Acremonium</i> sp.	100	100 MH859768 (CBS)
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams, <i>Cephalosporium-artige Schimmelpilze</i> : 46 (1971)									
Comporta					94 JX421733 np <i>Aequabiella effusa</i>	99.86	99.00 GQ154598 <i>Aequabiella effusa</i>	99.340	99.611 JQ759941 <i>Aequabiella</i> sp.
<i>Aequabiella</i> Crous, <i>Persoonia</i> 34: 225 (2015)									














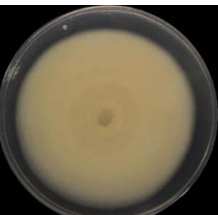
local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	MycoBank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Comporta					100	100	100	100	100
					KP131536		FN539059	KP131536	
<i>Alternaria infectoria</i> E.G. Simmons, <i>Mycotaxon</i> 25 (1): 298 (1986)									
Madeira					100	99.82	99.82	100	97.79
					MN428792		AY334536	MH856568 (CBS)	
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill., <i>Bulletin de la Société Botanique de France</i> 59: 40 (1912)									
Góis Comporta					100	99.82	99.82	99.805	100
					MH316147		KC683713	KJ476441	
<i>Botrytis cinerea</i> Pers., <i>Neues Magazin für die Botanik</i> 1: 126, t. 3:9 (1794)									
Madeira					100	100	100	100	100
					100	100		100	100
					JN209871 (CBS)		JN209871 (CBS)	JN209871 (CBS)	
					<i>Chaetomium cruentum</i>		<i>Chaetomium cruentum</i>	<i>Chaetomium cruentum</i>	
					HQ914911			HQ914911	
					<i>C. globosum</i>			<i>C. globosum</i>	
<i>Chaetomium</i> Kunze, <i>Mykologische Hefte</i> 1: 15 (1817)									

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Comporta					100	99.81	99.81	100	97.271
					MH864012 (CBS)		AY251070	MF472944	
				<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. cladosporioides</i>		
						KP131832	MG250413		
						<i>C. tenuissimum</i>	<i>C. pseudocladosporioides</i> np		
Cladosporium Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 8: 37 (1816) (isolado A)									
Madeira					100	100	100	100	100
					MH864012 (CBS)		KP131832	DTO 101-H7 (CBS)	
				<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. tenuissimum</i>	<i>C. cladosporioides</i> GenBank AN nd		
						AY251070	MF473219		
						<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. pseudocladosporioides</i>		
							MF473276		
							<i>C. subuliforme</i>		
							CBS 126363		
							<i>C. verrucocladosporioides</i> sem GenBank AN		
Cladosporium Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 8: 37 (1816) (isolado B)									
Comporta					100	100	100	100	100
					NR_158444 T		JN712458	JN712459	
				<i>Curvularia coatesiae</i>		<i>Curvularia trifolii</i>	<i>Curvularia trifolii</i>		
Curvularia Boedijn, <i>Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg</i> 13 (1): 123 (1933)									

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		frente	verso	GenBank		BoldSystems Sim. (%) GenBank AN	MycoBank	
	frente	verso			Q.C. (%)	I (%)		Sim. (%)	Overlap (%)
Góis Comporta					100 MH931271	100	100 FJ424241	100 KX664346	100
<i>Epicoccum nigrum</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 8: 32 (1816)									
Góis					100 KX869958	99.80	98.53 AM921717	99.804 KX869958	100
<i>Fimetariella rabenhorstii</i> (Niessl) N. Lundq., <i>Botaniska Notiser</i> 117: 239 (1964)									
Madeira					100 JF705951	100	100 AY253451 <i>Hormonema dematioides</i>	100 JF705951	100
<i>Hormonema</i> Lagerb. & Melin, <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 2 (2-4): 219 (1927)									
Góis					91 100 EU770250 np KF534505	99.79 91.87	<80	99.791 EU770250 np	91.396
<i>Hypocreales</i> Lindau, <i>Natürl. Pflanzenfam.</i> : 343 (1897)									

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank		
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)	
Madeira					99 HQ608087 <i>Isaria farinosa</i>	100	<95	100 HQ608087 <i>Isaria farinosa</i>	99.819	
<i>Isaria farinosa</i> (Holmsk.) Fr., <i>Systema Mycologicum</i> 3: 271 (1832)										
Góis					99 MH864676	98.48	98.54 HQ878587	98.536 HQ878587	90.53	
<i>Jattaea discreta</i> (Berl.) Réblová, <i>Fungal Diversity</i> 49 (2011)										
Góis Madeira					100 KX100366 <i>Lecythophora</i> sp.	99.42	99.58 AY618679 <i>Phialophora</i> sp.	99.801 99.784 JX910080 np <i>Lecythophora</i> sp.	97.67 90.448	
<i>Lecythophora</i> Nannf., <i>Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift</i> 32: 435 (1934) <i>Phialophora</i> Medlar, <i>Mycologia</i> 7 (4): 202 (1915)										
Comporta					100 98 MN547972 np <i>Pragmopora pini</i>	100 99	<95 np	100 np	<90	
<i>Leotiomyces</i> O.E. Erikss. & Winka, <i>Myconet</i> 1: 7 (1997) (isolado A)										

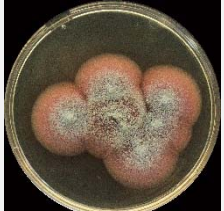

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems Sim. (%) GenBank AN	Mycobank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)		Sim. (%)	Overlap (%)
Góis					100	99.54	<95	99.543	100
					MN547972 np <i>Pragmopora pini</i> JX421731 np <i>Leotiomyces</i> sp. FR668004 <i>Massarina corticola</i>		FR668004 <i>Helotiales</i> sp. (<i>Leotiomyces</i> sp.)		
<i>Leotiomyces</i> O.E. Erikss. & Winka, <i>Myconet</i> 1: 7 (1997) (isolado B)									
Góis					100	100	100	100	100
					KY104246		EU568971		KC237294
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki, <i>Mycoscience</i> 51 (1): 7 (2010)									
Comporta					100	100	100	100	100
					100 96.09 KM066577 <i>Nectria</i> sp.		99.43 np <i>Nectria haematococca</i>		99.62 KM066577 <i>Nectria</i> sp.
					NR_163531 <i>Fusarium solani</i> (CBS) T		JN983016		GU170638 <i>Fusarium</i> sp.
<i>Nectriaceae</i> Tul. & C. Tul., <i>Selecta Fungorum Carpologia: Nectriei- Phacidiei- Pezizei</i> 3: 3 (1865)									
Góis					99	100	98.32	100	99.44
					100 98.32 KT323123 np MH865221 (CBS)		JN995617		KT323123 np
<i>Nectria balsamea</i> Cooke & Peck (1874)									

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%)	Sim. (%)	Overlap (%)
							GenBank AN		
Madeira					100	100	100	100	100
					100	100			
					DQ187954		DQ682593	SH1160518.08FU	
					<i>Paecilomyces parvisporus</i>		<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	
					JN798529			DQ187954	
					<i>Penicillium</i> sp.			<i>Paecilomyces parvisporus</i>	
<i>Paecilomyces</i> Bainier, <i>Bulletin de la Société Mycologique de France</i> 23: 27 (1907)									
<i>Penicillium</i> Link, <i>Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin</i> 3 (1): 16 (1809)									
Madeira					97	100	99.65	100	98.827
								100	98.618
					MH860161 (CBS)		EF055221 np	KX343168 np	
					<i>P. neglecta</i>		<i>P. vismiae</i>	SH 1563658.08FU	
								<i>P. rhododendri</i>	
<i>Pestalotiopsis</i> Steyaert, <i>Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles</i> 19 (3): 300 (1949)									
Góis					100	100	98.47	100	100
					KR859199		JN387907	KR859190	
							<i>Pezizula</i> sp.		
<i>Pezizula eucrita</i> (P. Karst.) P. Karst., <i>Bidrag till Kännedom av Finlands Natur och Folk</i> 19: 166 (1871)									
Comporta					100	100	100	100	100
					MK460826		NR_111145 T	SH 1541921.08FU	
								AY214439	

Sarocladium strictum (W. Gams) Summerbell, *Studies in Mycology* 68: 158 (2011)

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	MycoBank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%)	Sim. (%)	Overlap (%)
Góis					100 MH855019	100	99.63 GQ412722	100	98.18 LN714608

Sydowia polyspora (Bref. & Tavel) E. Müll., *Sydowia* 7 (5-6): 340 (1953)

Comporta					100 100 MH856399 NR_1117800 T	98.821 100	100 JX965242	100	100 LT558958
----------	---	---	--	--	--	---------------	-----------------	-----	-----------------









Talaromyces ruber (Stoll) Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson, *Persoonia* 29: 48 (2012)

Góis					99 MN096582	100	<95	100	90.875 KT943937
------	--	--	---	--	----------------	-----	-----	-----	--------------------

Tolypocladium W. Gams, *Persoonia* 6 (2): 185 (1971)

Comporta					100 JN206400	99.48	99.66 AJ876493	99.828	99.828 MG098308
----------	---	---	--	---	-----------------	-------	-------------------	--------	--------------------

Umbelopsis isabellina (Oudem.) W. Gams, *Mycological Research* 107 (3): 349 (2003)

local/táxon	colónia com 7d de crescimento		colónia com 21d de crescimento		GenBank		BoldSystems	Mycobank	
	frente	verso	frente	verso	Q.C. (%)	I (%)	Sim. (%) GenBank AN	Sim. (%)	Overlap (%)
Góis					100	99.30	98.14	98.41	98.949
	<p><i>Valsa</i> Fr., <i>Summa vegetabilium Scandinaviae</i> 2: 410 (1849)</p>				MH856113 <i>Valsa pini</i> CBS 197.42		DQ243791 <i>Valsa kunzei</i> CBS118556	98.302	92.644
Madeira					100	100	99.59	100	100
	<p><i>Zythia pinastri</i> P. Karst., <i>Revue Mycologique Toulouse</i> 7: 106 (1885)</p>				MH854935		AY590792		MH857111

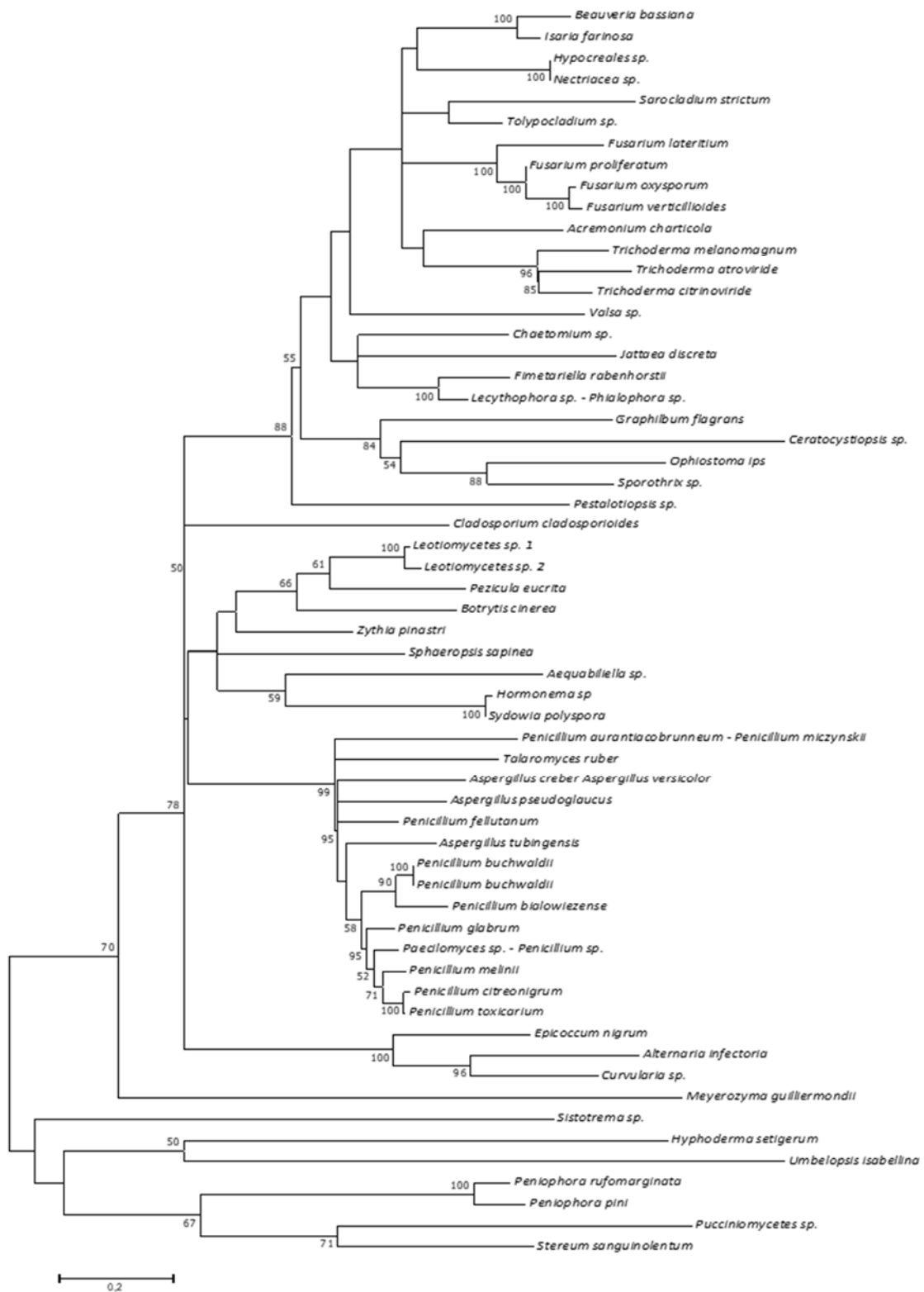


Figura 12 – Árvore filogenética representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (917 pb) e de 59 sequências (isolados deste trabalho) como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.

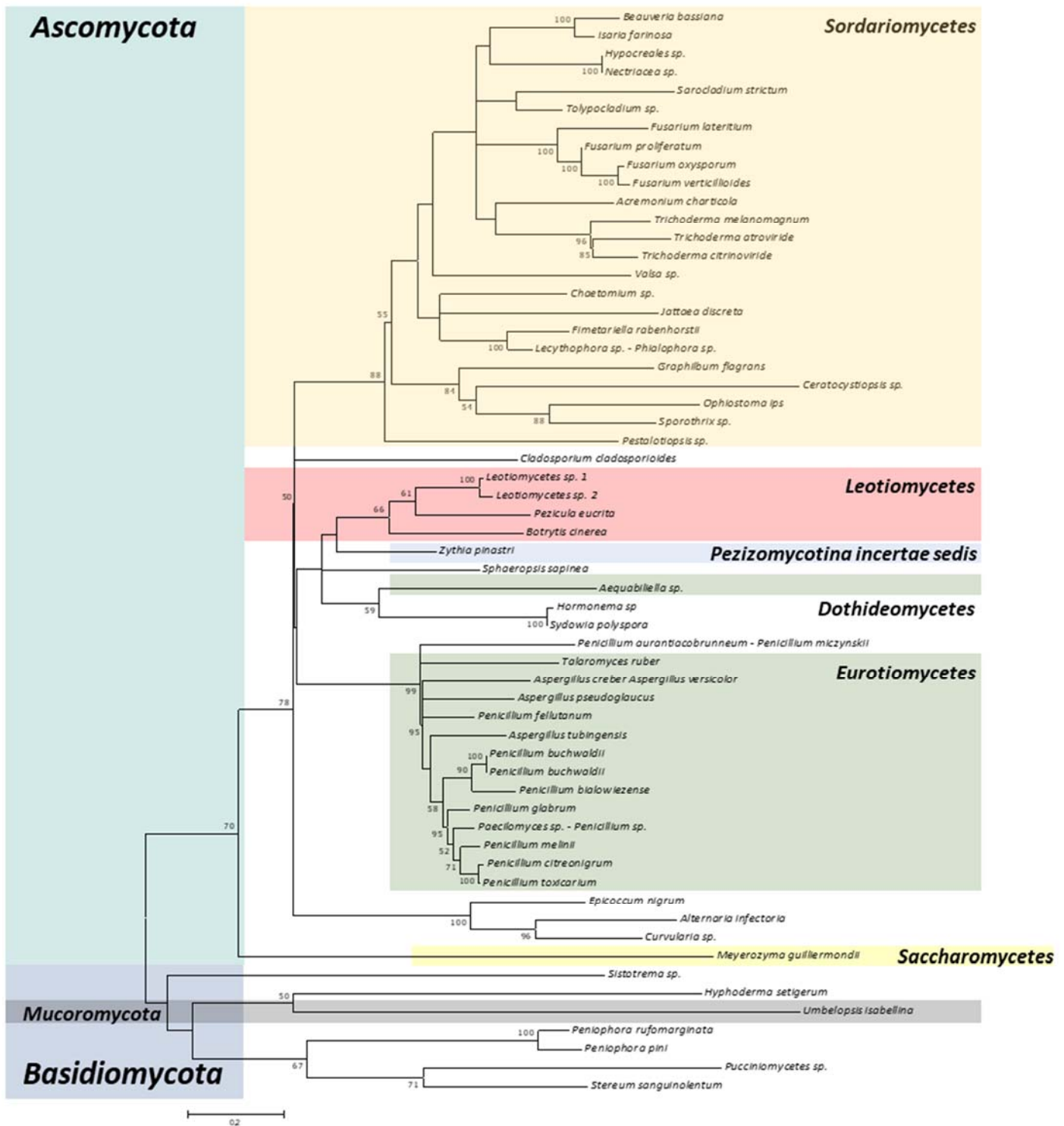


Figura 13 – Árvore filogenética – agrupamento por **Classes** e **Filos** – representativa das relações evolutivas das sequências correspondentes às regiões ITS (917 pb) e de 59 sequências (isolados deste trabalho) como resultado de uma análise Máxima Verosimilhança (RAxML-HPC2 on XSEDR), em 1000 réplicas de “bootstrap”. A análise foi realizada em CIPRES.

A Figura 14 sistematiza o resultado do trabalho de identificação indicando os *taxa* identificados, por local de amostragem e o estado sanitário, relativamente à DMP, das árvores a partir das quais foram isolados.

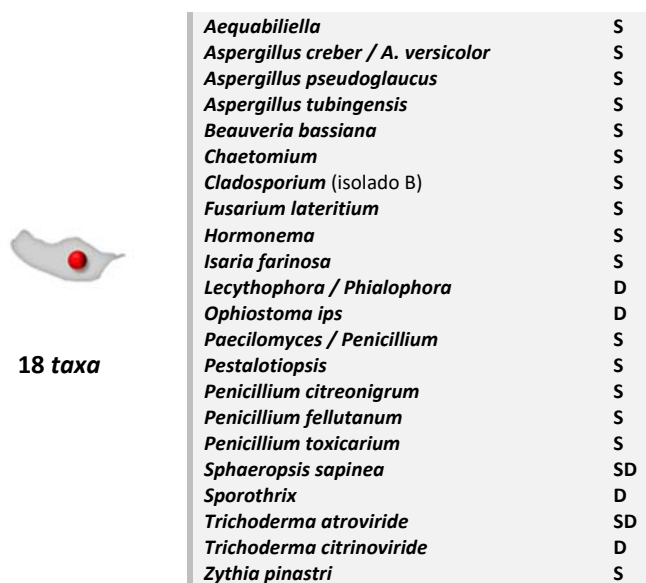
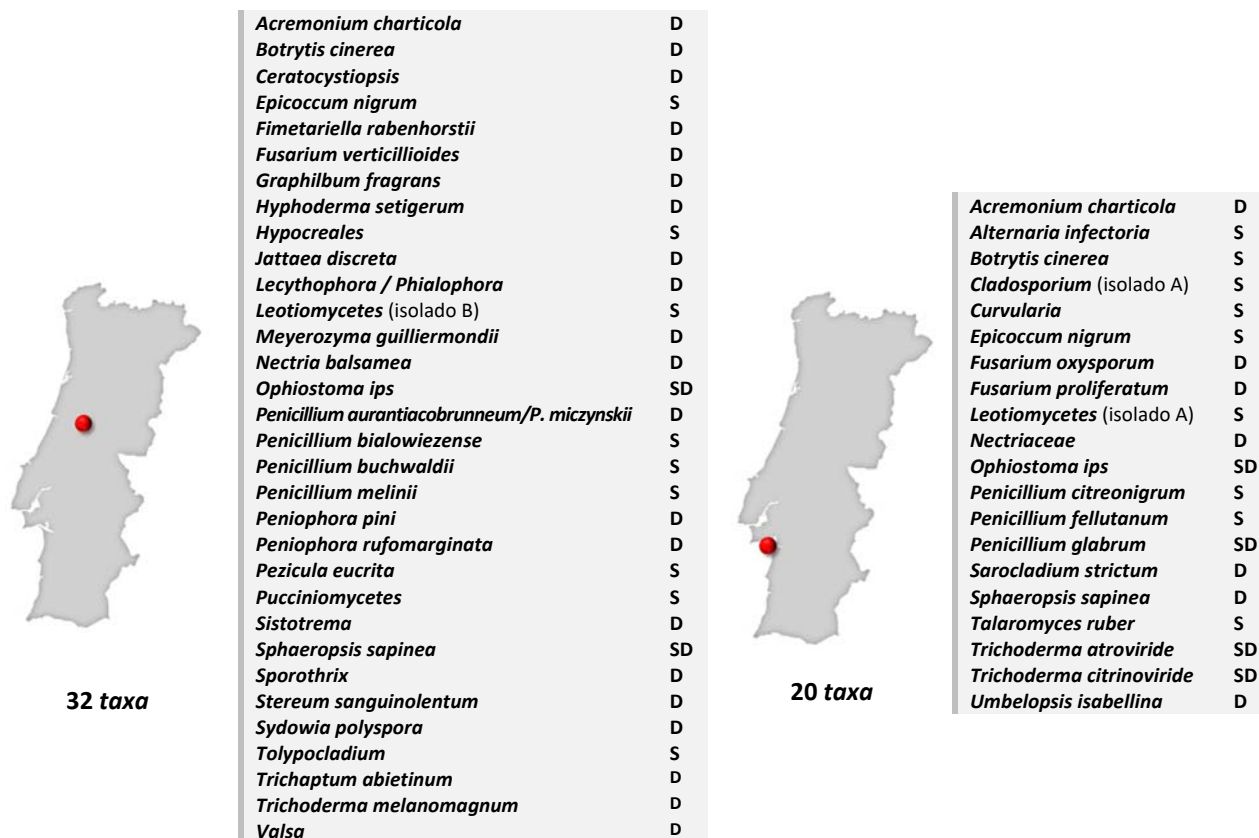


Figura 14 – Conjunto dos taxa identificados no lenho de *Pinus pinaster* proveniente dos três locais de amostragem (Góis, Comporta e ilha da Madeira) e estado sanitário das árvores relativamente à DMP. (árvores doentes: D; árvores sãs: S)

4.2. Tratamento estatístico

Estudo da variável Y = presença da *Ophiostoma ips*

Conforme mencionado em 3.5.5., tratando-se de delineamento fatorial a 4 fatores (local, estado sanitário, nível, meio de cultura). Poderia ter sido considerado o modelo com todas as interações entre fatores e com todos os fatores. A complexidade do modelo resultante não se justificava para este efeito tendo-se optado pelo modelo sem interação e sem o fator “Meio de cultura”. O teste do qui-quadrado (Anexo II) permitiu a conclusão acerca do desvio não ser significativo.

Assim sendo, para o estudo da variável “presença da *Ophiostoma ips*”, e concretamente após ter sido selecionada a espécie com maior número de isolamentos e, simultaneamente, importante no contexto da DMP, a variável ser estudada presença de *O. ips*”, vem:

$$P_{ijk} = \frac{1}{1 + e^{-(\mu + \alpha i + \beta j + \gamma k)}} =$$

A expressão permite, ao concretizar para as diversas situações possíveis, calcular as probabilidades de presença desta espécie, nas situações experimentais consideradas (Quadro 25; Figura 15).

Como exemplo, se $i=1, J=1, K=1$, isto é (Comporta, Doente, Nível 1), obtém-se: a Probabilidade de ser isolada a espécie *O. ips* no Nível1 de árvores afetadas pela DMP, na zona da Comporta.

$$P_{111} = \frac{1}{1 + e^{-(\mu)}} = \frac{1}{1 + e^{-0,2081}} = 0,5518381;$$

Se $i=2, J=2, K=1$ (Góis, Saudável, Nível 1)

$P_{211} = \frac{1}{1 + e^{-(\mu + \alpha 2 + \beta 2)}} = \frac{1}{1 + e^{-(0,2081 + 0,6530 - 3,0079)}} = 0,1046306$, e assim sucessivamente, obtendo-se a matriz das 18 situações possíveis geradas pelo modelo com base nos parâmetros expressos no *output* do Anexo II (A), representando a Figura 15 a curva gerada pelo modelo pelo qual se optou.

Quadro 25 – Matriz de probabilidades associadas à variável “presença da espécie *Ophiostoma ips*”, de acordo com o modelo ajustado (sem interação e sem o fator “meio de cultura”).

EstSan_Nível	P _{ijk}		
	Comporta	Góis	Ilha da Madeira
S_N1	0,057335	0,104631	0,004224
S_N2	0,038461	0,071366	0,002782
S_N3	0,018426	0,034811	0,001307
D_N1	0,551838	0,70289	0,079081
D_N2	0,447445	0,608735	0,053454
D_N3	0,275379	0,422017	0,025819

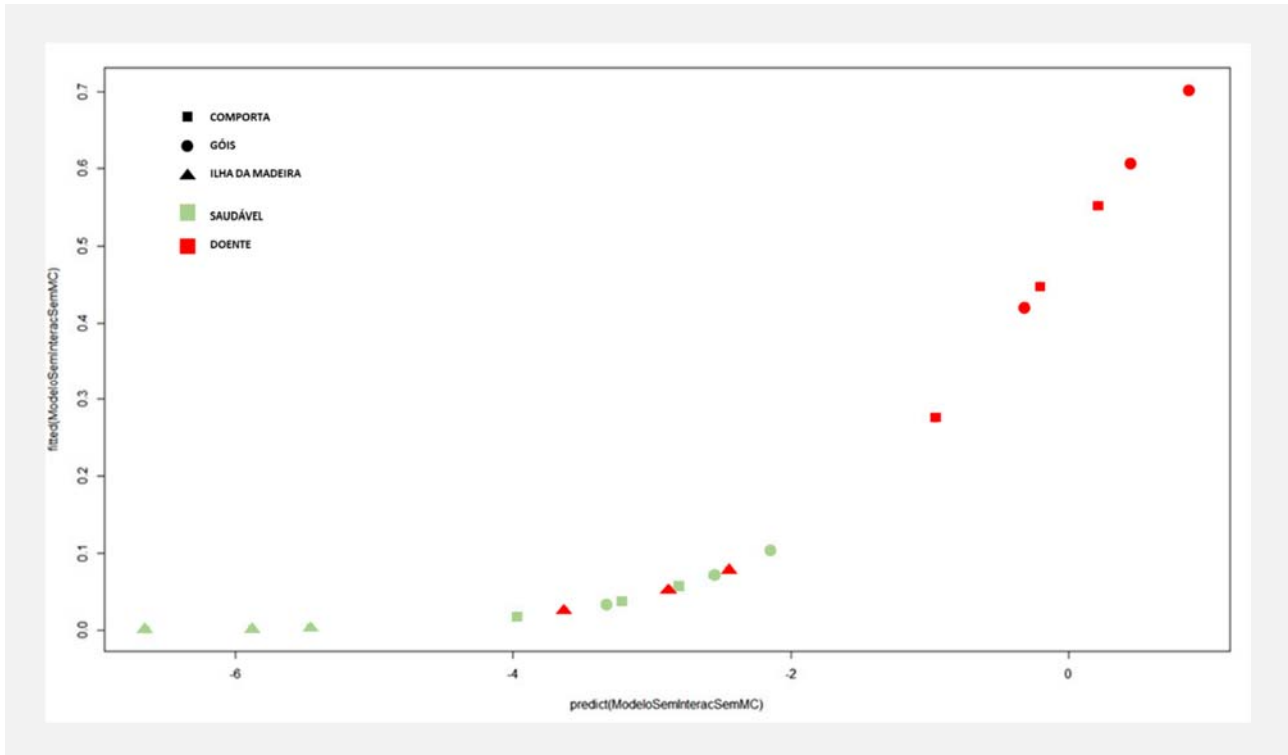


Figura 15 – *Output* do Modelo de Regressão Logística ajustado aos dados do ensaio para estudo da variável “presença da espécie *Ophiostoma ips*” (Modelo sem interação e sem o fator “meio de cultura”).

Desta forma, de acordo com o modelo ajustado, estão associadas probabilidades mais elevadas de isolamento de *O. ips* na situação de árvores com DMP (embora na ilha da Madeira, apesar de os valores de probabilidade para a situação de presença de DMP serem superiores à situação de árvores saudáveis, estas estão a um nível muito semelhante ao das probabilidades mais elevadas de presença na situação de árvores sãs, em Góis e na Comporta) (Figura 15).

Estudo da variável Z = abundância de fungos

Para o estudo da variável “abundância de fungos”, e remetendo o conceito de “abundância” para contagens, ajustou-se o modelo Log-Linear sendo a função em estudo uma Poisson e usando os mesmos preditores já usados inicialmente no modelo anterior. Verificou-se igualmente que o desvio não é significativo de forma a explicar a informação ao optar por um modelo mais simples, sem interação e sem o fator “nível de amostragem”.

Assim sendo, e de acordo com o apresentado em 3.5.5:

$$\ln(\lambda_{ijk}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k \quad \Leftrightarrow \quad \lambda_{ijk} = e^{\mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k}$$

será possível estabelecer uma matriz correspondentes às situações experimentais contempladas pelo modelo.

Como exemplo, se $i=1$, $J=1$, $K=1$, isto é (Comporta, Árvore Doente, MC1=AA) obtém-se: a Abundância de fungos (número de isolamentos) esperada, ao isolar em AA a partir de madeira proveniente de árvores afetadas pela DMP da zona da Comporta:

$$\lambda_{111} = e^{\mu} = e^{2,20328} = 9.054664$$

se $i=3, j=2, k=2$ (ilha da Madeira, Árvore Sã, MC=PDA)

$\lambda_{322} = e^{\mu + \alpha_3 + \beta_2 + \gamma_2} = e^{2,20328 + 0,07594 - 1,68941 + 0,03637} = 1,870452$, e assim sucessivamente, obtendo-se a matriz das 18 situações possíveis geradas pelo modelo com base nos parâmetros expressos no *output* do Anexo II (C) (Quadro 26; Figura 16).

Quadro 26 – Matriz de frequências esperadas, associadas à variável “abundância de fungos”, de acordo com o modelo ajustado (sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”)

EstSan_MC	λ_{ijk}		
	Comporta	Góis	Ilha da Madeira
D_MC1	9,054664	6,500766	9,769058
D_MC2	9,390044	6,741551	10,130898
D_MC3	5,332179	11,039062	5,752877
S_MC1	1,671748	2,019761	1,803646
S_MC2	1,733669	2,094571	1,870452
S_MC3	0,984472	1,189412	1,062145

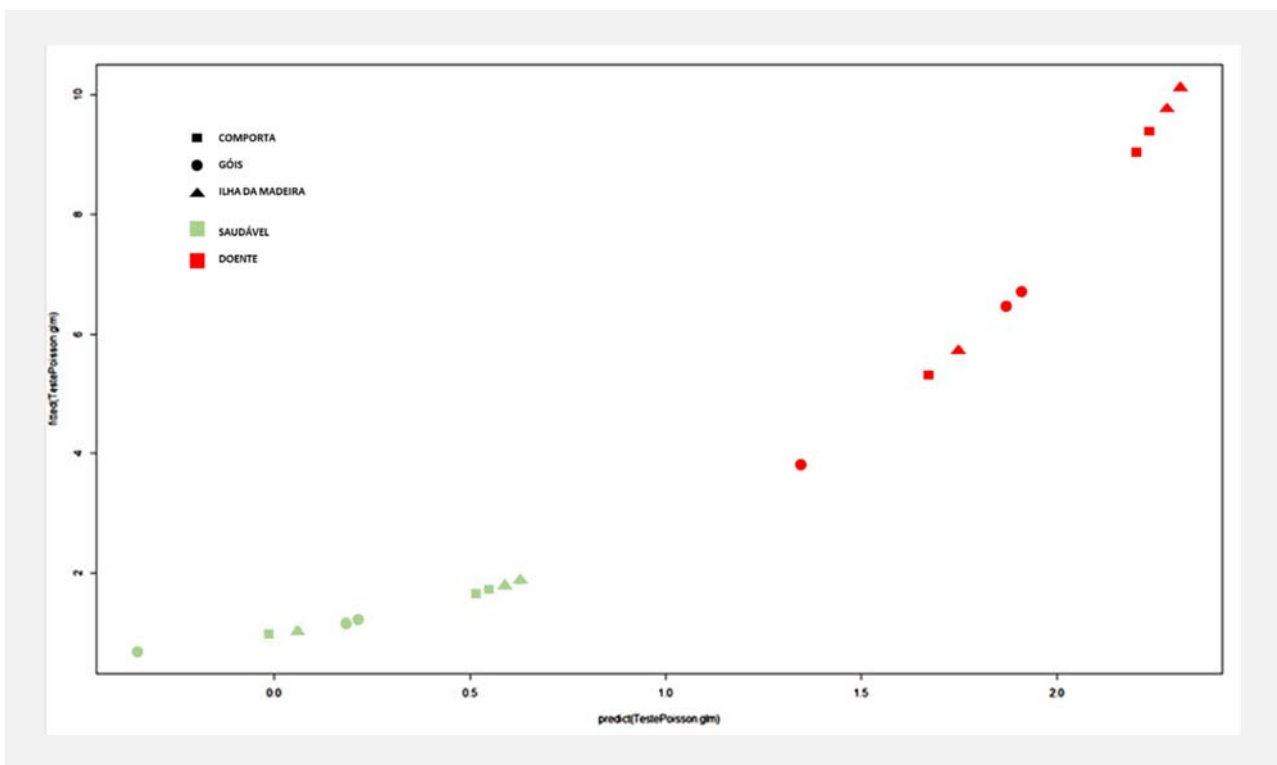


Figura 16 – *Output* do Modelo de Log-linear ajustado aos dados do ensaio para estudo da variável “abundância de fungos isolados” (Modelo sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”).

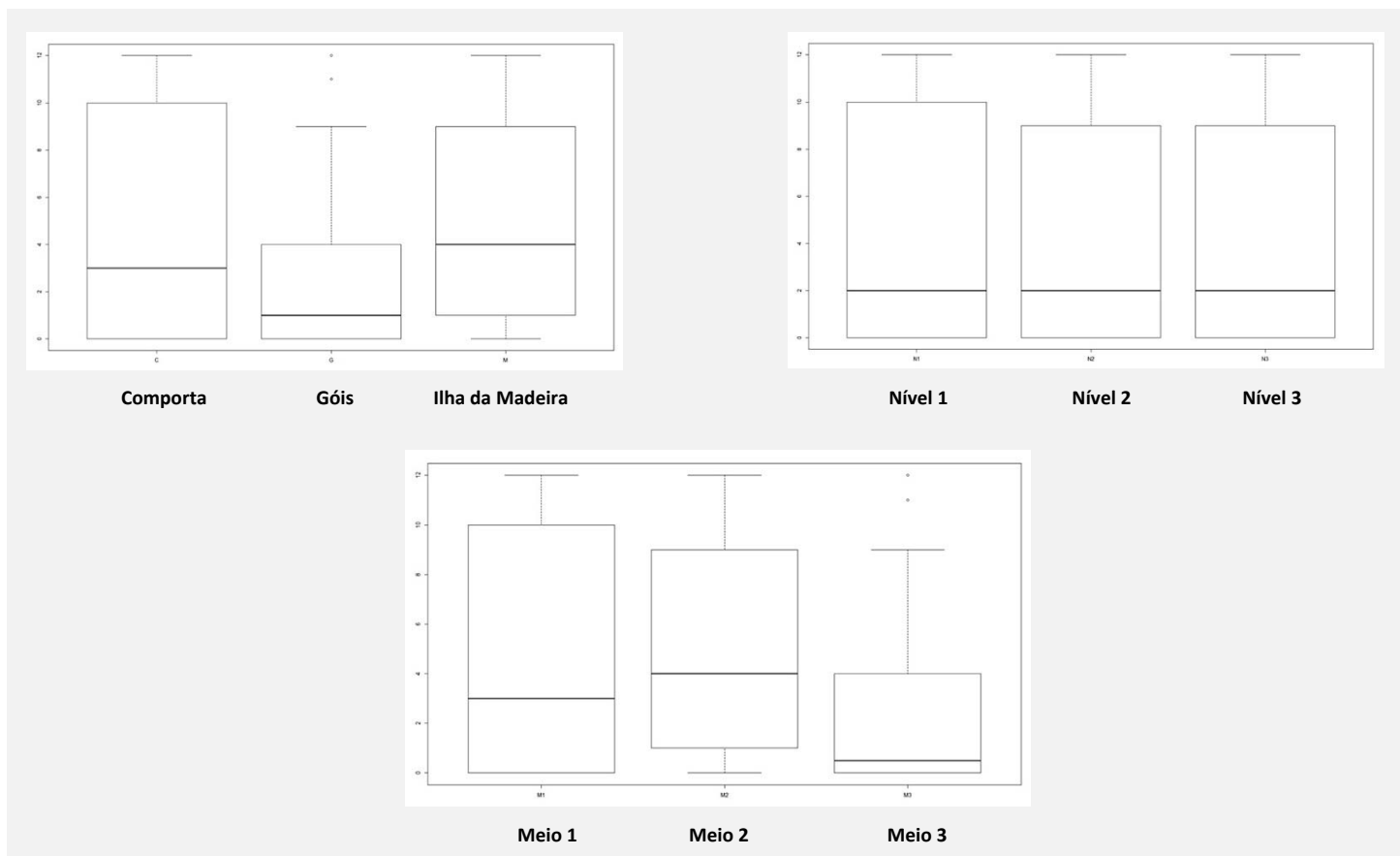


Figura 17 – Diagramas de extremos e quartis relativos ao modelo ajustado para o estudo da variável “abundância de fungos isolados” (Modelo Log-linear sem interação e sem o fator “nível de amostragem na árvore”).

5. Conclusões

Globalmente, foram identificados 61 *taxa*, no conjunto dos isolamentos efetuados nas 972 amostras correspondentes às condições do ensaio estabelecidas.

Identificaram-se grupos com abundâncias mais elevadas como é o caso do filo *Basidiomycota* (uma classe, um género e cinco espécies), das famílias *Botriosphaeriaceae* (uma espécie) e *Ophiostomataceae* (3 espécies e um género) e dos géneros *Aspergillus* (3 espécies), *Fusarium* (quatro espécies), *Penicillium* (8 espécies) e *Trichoderma* (três espécies).

A família *Botriosphaeriaceae* foi o grupo mais exaustivamente estudado, tendo-se confirmado, através da abordagem clássica e de técnicas da biologia molecular, a hipótese de que a variabilidade fenotípica dos isolados correspondia a variabilidade intraespecífica. A conjugação de toda a informação obtida permitiu concluir tratar-se de *Sphaeropsis sapinea*.

Apesar da maior diversidade de espécies em Góis (32 *taxa*), o número total de isolamentos na ilha da Madeira foi ligeiramente superior (Figura 14; Figura 17). No entanto essa ligeira vantagem relativa à abundância, na ilha da Madeira, é em grande parte devida ao número de isolamentos de *Trichoderma* spp. e *S. sapinea* e não devida às restantes espécies, isoladas maioritariamente em árvores isentas de BX, mas com número de isolamentos, por espécie, muito inferior.

A maioria dos *taxa* isolados em árvores de Góis provem de árvores afetadas pela DMP. Situação inversa ocorre com os *taxa* provenientes da ilha da Madeira, maioritariamente isolados em árvores não afetadas pela DMP. Relativamente aos *taxa* provenientes da Comporta, apesar de quantitativamente estarem muito próximos, existe uma ligeira vantagem do número correspondente a isolamentos em madeira de árvores não afetadas pela DMP.

Ascomycota e *Sordariomycetes* constituem o filo e a família, respetivamente, mais representados em termos de diversidade (Figura 13) o que vai de encontro ao observado na pesquisa elaboração do Anexo I.

De entre os *taxa* identificados neste trabalho, e de acordo com o estatuto atribuído pelos autores dos trabalhos do Anexo I conclui-se que a maioria (cerca de 30) são classificados como Endófitos, cerca de 10 são Saprófitas e 4 considerados Patogénicos. De referir que nem todos os *taxa* aqui identificados estão incluídos no Anexo I – onde estão inventariados 303 *taxa* com estatuto de Endófitos, 80 Saprófitas e 108 Patogénicos.

Em árvores afetadas pela DMP:

- a abundância esperada de isolamentos é muito superior (Quadro 26; Figura 15), relativamente aos três locais de amostragem e aos três meios de cultura, comparativamente a árvores isentas da doença;
- a probabilidade de presença de *O. ips* é muito superior (Quadro 25; Figura 14), relativamente aos três locais e aos três níveis de amostragem.

Apesar de o número de isolamentos de *O. ips* ter ocorrido praticamente em árvores doentes, a espécie também foi isolada em árvores sãs (Góis e Comporta) embora em número muito reduzido – daí lhe corresponderem, no modelo ajustado, probabilidades muito próximas de zero.

Os isolados de *Sphaeropsis sapinea* não foram objeto da abordagem estatística de que *O. ips* foi alvo. No entanto esta espécie, patogénica, foi igualmente isolado em árvores sãs, nomeadamente em Góis e ilha da Madeira (Figura 14). Convém por isso notar que, quando neste trabalho se menciona árvores sãs vs. árvores doentes, se remete para a DMP, o que não invalida que a árvore possa incluir outras espécies que denunciem ou potenciem o agravamento do seu estado sanitário, em sentido lato. A deteção de insetos sub-corticais como os escolitídeos, que estabelecem associações complexas e especializadas com fungos patogénicos, poderia ajudar à compreensão destes isolamentos.

Pela observação da Figura 17 é também bem ilustrado que MC3 (PDA com adição de antibiótico) tem como consequência um menor número de isolamentos, o que é espetável.

O facto de o modelo ajustado para o estudo da abundância de isolamentos ter indicado não haver diferenças significativas nos três níveis de árvore amostrados (base, zona intermédia e topo) pode permitir conjecturar a existência de um microbioma homogéneo ao longo do tronco da árvore.

De acordo com a informação recolhida na pesquisa para a elaboração do Anexo I – observa-se que na grande maioria dos trabalhos o isolamento ocorreu em órgãos da copa das árvores (ex.: ramos, pinhas, agulhas).

Por último conclui-se também que, apesar de se ter seguido um protocolo de isolamento de fungos patogénicos, outras espécies resistiram à desinfeção. O grau de dureza da madeira e o facto de esta apresentar um teor de humidade favorável, possivelmente auxiliaram a que, no curto período de desinfeção externa da madeira, não tivesse havido penetração para a totalidade, nomeadamente para o interior do volume da madeira, de onde se retiraram os fragmentos para isolamento.

Na identificação dos isolados com atribuição de *táxon* mais afastado da espécie (*Hypocreales*, *Leotiomycetes*, *Nectriaceae* e *Pucciniomycetes*) seria de explorar quer a parte cultural desses isolados, nomeadamente o êxito na sua esporulação e ensaios de crescimento, bem como o recurso a uma abordagem multigénica na área da biologia molecular, explorando outras regiões que não apenas a região ITS. Esta abordagem multigénica, abordada de forma generalizada eventualmente asseguraria uma identificação mais próxima da espécie. Seria igualmente a ferramenta ideal para concluir acerca das espécies de *Penicillium* (*P. aurantiacobrunneum*/*P. miczynskii*) e *Aspergillus* (*A. creber*/*A. versicolor*) e do isolado da ilha da Madeira com dúvida no género (*Paecilomyces*/*Penicillium*), de uma forma geral abordados na bibliografia específica com duas ou mais regiões sequenciadas.

Este trabalho não permite estabelecer a comparação com outros órgãos da árvore uma vez que o isolamento se restringiu ao tronco onde, globalmente, parece não haver zonas preferenciais de deteção. O estudo comparativo de isolamento em diferentes órgãos da planta (ex.: madeira de ramos da copa, tronco, folhas, pinhas) poderia investigar a existência, ou não, de diferenças significativas entre as diferentes proveniências ao longo da árvore.

Relativamente à interação entre DMP/Micobiota seria de interesse investigar a importância que *O. ips* representa no contexto da DMP.

Referências Bibliográficas

- Abeleira, A., Picoaga, A., Mansill, J.P. & Aguin, O. (2011). Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in North western Spain. *EPPO Bulletin* 39: 344-353.
- Adams, A.S., Boone, C.K., Bohlmann, J. & Raffa, K.F. (2011). Responses of bark beetle-associated bacteria to host monoterpenes and their relationship to insect life histories. *Journal of Chemical Ecology*, 37 (8): 808-817.
- Aikawa, T. (2008). Transmission biology of *Bursaphelenchus xylophilus* in relation to its insect vector. In Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeushi, Y. (eds.). *Pine wilt disease*. Tokyo, Springer, 123-140pp. Tokyo, Springer.
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M. & Yaghmaour, R. (1998). *Mycology Manual*. Nablus, 143 pp.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST & PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389-3402.
- Álvarez, G., Fernández, M. & Diez, J.J. (2015). *Ophiostomatoid* fungi associated with declined *Pinus pinaster* stands in Spain. *Forest Systems*, 24 (1), e006, 9pp.
- Álvarez-Baz, G., Fernadez-Bravo, M., Pajares, J. & Quesada-Moraga, E. (2015). Potential of native *Beauveria pseudobassiana* strain for biological control of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 48–56.
- Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. (2007). A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. In Alves, A.M., Pereira, J.S. & Silva, J.M.N. *O Eucalipto em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica*. Lisboa, SAPress, 13-26pp.
- Alves, M., Pereira, A., Matos, P., Henriques, J., Vicente, C., Aikawa, T., Hasegawa, K., Nascimento, F., Mota, M., Correia, A. & Henriques, I. (2016). Bacterial community associated to pine wilt disease insect vectors *Monochamus galloprovincialis* and *Monochamus alternatus*. *Scientific reports*. 6.23908. 12pp. DOI: 10.1038/srep23908.
- Alves, M., Pereira, A., Vicente, C., Matos, P., Henriques, J., Lopes, H., Nascimento, F., Mota, M., Correia, A. & Henriques, I. (2018). The role of bacteria in pine wilt disease: insights from microbiome analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 94 (7), fiy077, 13pp.
- Azevedo, N. (1971). Forest tree diseases (doenças das essências florestais). Secretaria de Estado da Agricultura, DGSFA, 101 p.
- Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. In Melo I.S. & Azevedo, J.L. (eds.). *Ecologia microbiana*. Jaguariuna, Embrapa Meio Ambiente, 488pp.
- Baldrian, P., Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Review*, 32: 501-521.
- Beaver, R.A. (1989). Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. *Insect-Fungus Interactions*, 121-143. (cit. Vasconcelos & Duarte, 2013)
- Benade, E., Wingfield, M.J. & van Wyk, P.S. (1995). Conidium development in the *Hyalorhinocladiella* anamorph of *Ophiostoma ips*. *Mycologia*, 87: 298-303. (cit. Kim, J-J. et al., 2003)
- Bhardwaj, A., Sharma, D. & Agrawal, P.K. (2015). Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Archives of Clinical Microbiology*. 6 (3): 1-9.
- Bills, G.F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from wood plants. In Redlin, S.C. & Carris, L.M. (eds.). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics ecology, and evolution*. St. Paul (MN), APS Press, 31-35pp. (cit. Sun & Guo, 2012)

- Botella, L. & Diez, J.J. (2011). Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47: 9–18.
- Botella, L., Santamaria, O. & Diez, J.J. (2010). Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 40: 1–11.
- Branco, M., Bragança, H., Sousa, E. & Phillips, A. (2014). Pests and diseases in portuguese forestry: current and new threats. In Reboredo, F. (ed.). *Forest context and policies in Portugal. Present and future challenges*. Springer, 239 p.
- Braun, K., Romero, J., Liddell, C. & Creamer, R. (2003). Production of swainsonine by fungal endophytes of locoweed. *Mycol. Res.*, 104: 980-988.
- Breen J.P. (1994). *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology*, 39: 401-423. (cit. Vega *et.al.*, 2008)
- Broders, K., Munck, I., Wyka, S., Iriarte, G. & Beaudoin, E. (2015). Characterization of Fungal Pathogens Associated with White Pine Needle Damage (WPND) in Northeastern North America. *Forests*, 6, 4088-4104.
- Brown, A. & Macaskill, G. (2005). Shoot diseases of pine. Foresy Commission, 5p.
- Bueno, A., Diez, J.J. & Fernández, M.M. (2010). Ophiostomatoid fungi transported by *Ips sexdentatus* (Coleoptera; Scolytidae) in *Pinus pinaster* in NW Spain. *Silva Fennica*, 44 (3): 387–397.
- Calvão, T., Duarteb, C.M. & Pimentel, C.S. (2019). Climate and landscape patterns of pine forest decline after invasion by the pinewood nematode. *Forest Ecology and Management*, 433: 43–51
- Carbone, I., Anderson, J.B. & Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Cardoza, Y.J., Klepzig, K.D. & Raffa, K.F. (2006). Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology*, 31 (6): 636-645.
- Carris, L. M., Little, C. R. and Stiles, C. M. (2012). Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01.
- Carrol, G.C. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to Woody plants. In Fokkema, N.J. & van den Heuvel, J. (eds.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, Cambridge University Press, 205-222pp. (cit. Sun & Guo, 2012)
- Chapela, I.H. (1989). Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. *New Phytologist*, 113: 65-75.
- Chaverri, P. & Samuels, G.J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Micology*, 48:1-116.
- Cheng, H.R. (1983). The occurrence of a pine wilting disease caused by nematode found in Nanjing. *Forestry Pest and Disease*, 4: 1-5.
- Choi, G.J., Park, J.H., Kim, H.T., Lee, S.W., Choi, J.S., Hong, K.S., Cho, K.Y. & Kim. J.C. (2004). Phytotoxicity of endophytic fungi and characterization of a phytotoxin isolated from *Gliocladium catenulatum* from *Pinus densiflora*. *The Korean Journal of Mycology*. 32 (1): 8-15.
- Chu, H., Tang, M., Wang, H. & Wang, C. (2018). Pinewood nematode infection alters root mycoflora of *Pinus tabulaeformis* Carr. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 554—563
- Chu, H., Wang, C., Li, Z., Wang, H., Xiao, Y., Chen, J. & Tang, M. (2019). The dark septate endophytes and ectomycorrhizal fungi effect on *Pinus tabulaeformis* Carr. seedling growth and their potential effects to pine wilt disease resistance. *Forests*, 10, 140; doi:10.3390/f10020140

- De Bary, H.A. (1884). *Vergleichende morphologie und biologie der pilze mycetozen und bacterien*. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann. (cit. Veja et al., 2008)
- De Beer, Z.W. & Wingfield, M.J. Emerging lineages in the Ophiostomatales. In Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (eds.). *Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 21-46pp.
- de Guiran, G. & Bruguir, N. (1989). Hybridization and phylogeny of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus* spp.). *Nematologica*, 35:321-330.
- Dingle, J. & McGee, P.A. (2003). Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research*, 107: 310-316. (cit. Vega et al., 2008)
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M.M., Cone, J.W., Marques, G.S.M., Barros, A.R.N. & Rodrigues M.A.M. (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 100:4829-4835. (cit. Hou et al., 2012)
- Dodd, S.L., Lieckfeldt & Samuels, G.J. (2017). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95 (1): 27–40.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 6B (2): 100-112.
- Dwinell, L.D. (1993). First report of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*. 77 (8): 846.
- Eckardt, L.G., Jones, J.P. & Klepzig, K.D. (2004). Pathogenicity of *Leptographium* species associated with loblolly pine decline. *Plant disease*, 88: 1174-1178. (cit. Eckardt, L.G. & Menard, R.D., 2013)
- Eckardt, L.G. & Menard, R.D. (2013). Pine decline in the southeastern United States and the involvement of bark beetles and ophiostomatoid fungi. In Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (eds.). *Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 155-164pp.
- Elmi, A.A., West, C.P., Robbins, R.T. & Kirkpatrick, T.L. (2000). Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. *Grass and Forage Science*, 55: 166-172. (cit. Vega et al., 2008)
- Eo, J.K., Kim, C.K., Lee, H.B. & Eom, A.H. (2013). Diversity of endophytic fungi isolated from *Pinus densiflora* and *Larix kaempferi* in Mt Oser, Korea. *Kor. J. Mycol.* 41 (3): 137-141.
- EPPO (2019). EPPO Global Database: *Bursaphelenchus xylophilus*, BURSXY, 05-04-2019.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. & Magnusson, C. (1996). Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 26: 199-249.
- Fäldt, J., Solheim, H., Langström, B. & Borg-Karlson, A.K. (2006). Influence of fungal infection and wounding on contents and enantiomeric compositions of monoterpenes in phloem of *Pinus sylvestris*. *Journal of Chemical Ecology*, 32 (8): 1779-1795.
- Firáková, S, Sturdíková, M, Mucková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 62 (3), 251–257. (cit. Selim, K.A. et al., 2012)
- Feng, Y., Yu, Z., Zhang, S., Xue, Z., Huang, J., Zhang, H., Wan, X., Chen, A. & Wang, J. (2019). Isolation and Characterization of New 16-Membered Macrolides from the aveA3 gene replacement mutant strain *Streptomyces avermitilis* TM24 with acaricidal and nematocidal activities, *J. Agric. Food Chem.*, 67, 4782–4792
- Fernandez, M., Alonso, J. & Costas, J. (1999). Oviposition and development of the immature stages of *Tomicus minor* (Coleoptera: Scolytidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 1: 97-102.

- Fonseca, L., Cardoso, J. & Abrantes M I. (2013). Nemátode – Planta. In E. Sousa, F. Vale, I. Abrantes (eds.). *Doença da murchidão do pinheiro na Europa – Interações biológicas e gestão integrada*. Lisboa, FNAPF, 33-78 pp.
- Fonseca, L., Cardoso, J.M.S., Lopes, A., Pestana, F., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M. & Abrantes, I. (2012). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, 49 (2): 96-103.
- Frisvad, J.C. & Samson, R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their Mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49: 1-174.
- Frisvad, J.C., Houbraken, J., Popma, S. & Samson, R.A. (2013). Two new *Penicillium* species *Penicillium buchwaldii* and *Penicillium spathulatum*, producing the anticancer compound Asperphenamate. *FEMS Microbiol Lett*, 339: 77-92.
- Fukushige, H. (1991). Propagation of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) on fungi growing in pine shoot segments. *Applied Entomology and Zoology*, 26: 371-376.
- Ganley, R.J., Brunsfeld, S.J. & Newcombe, G. (2004). A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *PNAS*. 101 (27): 10107-10112.
- Ganley, R. (2008). Density and diversity of fungal endophytes isolated from needles of *Pinus radiata*. *Forest Biosecurity Research Council*. Client Report N. 12925. 8pp.
- Gibson, C.M. & Hunter, M.S. (2010). Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters*, 13 (2): 223-234.
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G.C., Miserere, L. & Nicolotti, G. (2009). Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 69-83.
- Greenfield, M., Pareja, R., Ortiz, V., Gómez-Giménez, M.I., Veja, F. & Parsa, S. (2015). A novel method to scale up fungal endophyte isolations. *Biocontrol Science and Technology*, 25 (10): 1208-1212.
- Grünig, C.R., Queloz, V. & Sieber, T.N. (2011). Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. In Pirtillä, A.M. & Frank, A.C. (eds.). *Endophytes of forest trees. Biology and applications*. Dordrecht Heidelberg London New York, Springer, 3-30pp.
- Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y., He, W.H. & Zheng, W.H. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycol. Res.* 107 (6): 680-688.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98pp.
- Han, Z.M., Hong, Y.D. & Zhao, B.G. (2003). A study of pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematode. *Journal of Phytopathology*, 151: 683-689.
- Haridim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirtillä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 79 (3): 293-320.
- Harrington T.C. (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73, 1123-1129.
- Harrington, T.C. & Cobb, F.W. (1988). *Leptographium root diseases on conifers*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN USA, 149pp. (cit. Eckardt, L.G. & Menard, R.D., 2013).
- Harrington, T.C., McNew, D., Steimel, J., Hofstra, D. & Farrel, R.L. (2001). Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch Elm disease fungi. *Micologia*, 93: 111-136. (cit. Thwaites, J.M. et al., 2013)

- Harrington, T.C. & Wingfield, M.J. (1998). The *Ceratocystis* species on conifers. *Canadian Journal of Botany*, 76 (8): 1446-1457. (cit. Vasconcelos & Morais, 2013)
- Hasegawa, K. & Miwa, J. (2008). Embriology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. In B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland & Y Takeushi (eds.). *Pine wilt disease*. Tokyo, Springer, 81-104pp.
- He, L.X., Wu, X.Q., Xue, Q Qiu, X.W. (2016). Effects of Endobacterium (*Stenotrophomonas maltophilia*) on pathogenesis-related gene expression of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and pine wilt disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 778, 14pp.
- Helander, M., Vesterlund, S.-R. & Saikkonen, K. (2011). Responses of foliar endophytes to pollution. In Pirttilä, A.M. & Frank, A.C. (eds.). *Endophytes of Forest Trees – Biology and applications*. Springer, 319pp.
- Held, B.W., Thwaites, J.M., Farrell, R.L. & Blanchette, R.A. (2003). Albino strains of *Ophiostoma* species for biological control of sapstaining fungi. *Holzforschung*, 57 (3): 237-242.
- Hess, N.J., Otrason, W.J., Jones, J.P., Goddard, A.J. & Walkinshaw, C.H. (1999). *Reassessment of loblolly pine decline on the Oakmulgee District, Talladega National Forest, Alabama*. US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station, Asheville, NC, USA. General Technical Report SRS-50, 560-564. (cit. Eckardt, L.G. & Menard, R.D., 2013)
- Hirata, A., Nakamura, K., Nakao, K., Kominami, Y., Tanaka, N., Ohashi, H., Takano, K.T., Takeushi, W. & Matsui, T. (2017). Potential distribution of pine wilt disease under future climate change scenarios. *PLoS ONE*, 12 (8): e0182837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182837>
- Hobbie, E.A., Macko, S.A. & Shugart, H.H. (1999). Insights into nitrogen and carbon dynamics of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi from isotopic evidence. *Oecologia*, 118: 353-360.
- Hood, I.A., Oliva, J., Kimberley, M.O., Arhipova, N. & Bakys, R. (2015). *Armillaria novae-zelandiae* and other basidiomycete wood decay fungi in New Zealand *Pinus radiata* thinning stumps. *For. Path.*, 45: 298-310.
- Hosmer, D.W. & Lemeshow, S. (2000). *Applied logistic regression*. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 376 pp. doi:10.1002/0471722146
- Hou, W., Lian, B., Dong, H., Jiang, H. & Wu, X. (2012). Distinguishing ectomycorrhizal and saprophytic fungi using carbon and nitrogen isotopic compositions. *Geoscience Frontiers*, 3 (3): 351-356.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. *Studies in Mycology*, 70: 53–138.
- Houbraken, J., Visagie, C.M., Meijer, M., Frisvad, J.C., Busby, P.E., Pitt, J.I., Seifert, K.A., Louis-Seize, G., Demirel, R., Yilmaz, N., Jacobs, K., Christensen, M. & Samson, R.A. (2014). A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 78: 373-451.
- Hyde, K.D. & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- ICNF (2013). Resultados preliminares do 6.º Inventário florestal nacional. <http://www2.icnf.pt/portal/florestas/ifn/ifn6>
- Ishizaki, T., Nomura, N. & Watanabe, K. (2015). Screening of mushrooms for nematophagous activity against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematological Research*, 45 (1) 19-25.
- Ivanová, H. (2015). Fungi associated with a decline of *Pinus nigra* in urban greenery. *Acta fytotechn. zootechn.*, 18 (2): 36–43.
- Jacobs, K. & Wingfield, M.J. (2001). *Leptographium* Species: tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, 207pp. (cit. Eckardt, L.G. & Menard, R.D., 2013).

- Jacobs, K. & Wingfield, M.J., Wingfield, B.d. & Yamaoka, Y. (1998). Comparison of *Ophiostoma huntii* and *O. europhioides* and description of *O. aenigmaticum* sp. nov. *Mycological Research*, 102: 289-294. (cit. Thwaites *et al.*, 2013)
- Jaklitsch, W.M. (2009). European species of Hypocrea part I: The green-spored species. *Studies in Mycology*, 63: 1-91.
- Jaklitsch, W.M. (2011). European species of Hypocrea part II: Species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity*, 48: 1-250.
- Jaklitsch, W.M. & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Micology*, 80. 10.1016/j.simyco.2014.11.001.
- Jankowiak, R. & Bilanski, P. (2013). Ophiostomatoid fungi associated with root-feeding bark beetles on Scots pine in Poland, *For. Path.* 43: 422-428.
- Jankowiak, R. & Kurek, M. (2006). The early stages of fungal succession in Scots pine phloem and sapwood infested by the pine shoot beetle – *Tomicus piniperda*. *Dendrobiology*, 56: 27-36.
- Jankowiak, R. & Rossa, R. (2007). Filamentous fungi associated with *Monochamus galloprovincialis* and *Acanthocinus adilis* (Coleoptera: Cerambycidae) in scots pine. *Polish Botanical Journal*, 52 (2): 143-149.
- Jankowiak, R., Rossa, R. & Bilanski, P. (2007). Contribution to pathogenicity of three blue-stain fungi associated with the pine sawyer beetle (*Monochamus galloprovincialis*) (Coleoptera: Cerambycidae) to scots pine in Poland. *Phytopathol. Pol.*, 46: 37-46.
- Karadzic, D. & Milasevic, T. (2008). The most importante parasitic and saprophytic fungi in Austrian pine and Scots pine plantations in Serbia. *Bulletin of the Faculty of Forestry*, 97: 147-170.
- Katoh, Rozewicki, Yamada (2019). (Briefings in Bioinformatics 20:1160-1166) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization
- Khan, F.A. & Gbadegesin, R.A. (1991). On the occurrence of nematode induced pine wilt disease in Nigeria. *Pakistan Journal of Nematology*. 9 (1): 57-58.
- Kile, G.A. (1993). Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. In Wingfield, M.J., Seifert, K.A. & Weber, J.F. (eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and Pathogenicity*, 173-193pp. St. Paul, MN, APS Press (cit. Vasconcelos & Morais, 2013)
- Kim, C.K., Eo, J.K. & Eom, A.H. (2013). Diversity and seasonal variation of endophytic fungi isolated from three conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology*. 41 (2): 82-85.
- Kim, C.K., Eo, J.K. & Eom, A.H. (2014). Diversity of endophytic fungi isolated from leaves of coniferous trees on Mt. Minjuji, Korea. *Kor. J. Mycol.* 42 (2): 174-177.
- Kim, C.S., Park, M.S. & Yu, S.H. (2008). Two species of endophytic *Penicillium* from *Pinus rigida* in Korea. *Mycobiology*, 36 (4): 222-227.
- Kim, J.J., Kim, S.H., Lee, S. & Breuil, B. (2003). Distinguishing *Ophiostoma ips* and *Ophiostoma montium*, two bark beetle-associated sapstain fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 222: 187-192
- Kim, J.J., Lim, Y.W., Breuil, C., Wingfield, M.J., Zhou, X.D. & Ki, G.-H. (2005). A new *Leptographium* species associated with *Tomicus piniperda* L. infesting pine logs in Korea. *Mycol. Res.* 109 (3): 275-284.
- Kim, N., Jeon, H. W., Manna, M., Jeong, S.Y., Kim, J., Kim, J., Lee, C., Park, A. R., Kim, J.C. & Seo, Y.S. (2019). Induction of resistance against pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* using selected pine endophytic bacteria. *Plant Pathology*, 68, 434–444

- Kirisits, T. (2010). Fungi isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips Typographus* in the Bialowieza forest in north-eastern Poland. *Forest Pathology*, 40 (2): 100-110.
- Kirisits, T., Konrad, H., Wingfield, M.J. & Chhetri, D.B. (2013). Ophiostomatoid fungi associated with the Eastern Himalayan spruce bark beetle, *Ips schmutzenhoferi*, in Buthan and their pathogenicity to *Picea spinulosa* and *Pinus wallichiana*. In Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (eds.). *Ophiostomatoid fungi: expanding fronteirs*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 99-112pp.
- Kirisits, T., Wingfield, M.J. & Chhetri, Db (2002). Studies on the association of blue-stain fungi associated with the Eastern Himalayan spruce bark beetle (*Ips schmutzenhoferi*) and with other bark beetles in Bhutan. Renewable Natural resources Research Centre, Yusipang, Bhutan, Yusipang Report, YREP/2002/02, 88pp. (cit. Kirisitis, T. *et al.*, 2013)
- Kishi, Y. (1995). *The pine wood nematode and tje Japanese pine sawyer*. Tokyo. Thomas Company Limited. 302pp.
- Kiyohara T. & Tokushige, Y. (1971). Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp. onto pine trees. *Journal of Japanese Forestry Society*, 53: 210-218.
- Klepzig, K.D., Raffa, K.f. & Smalley, E.B. (1991). Association of an insect-fungal complex with red pine decline in Wisconsin. *Forest Science*, 37: 1119-1139. (cit. Eckardt, L.G. & Menard, R.D., 2013)
- Klich, M.A. (2002). *Identification of commom Aspergillus species*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 116pp.
- Kobayashi, T., Sasaki, K. & Mamiya, Y. (1974). Fungi associated with *Bursaphelenchus lignicolus*, the pine wood nematode (I). *Journal of the Japanese Forestry Society*, 56: 136-145.
- Kobayashi, T., Sasaki, K. & Mamiya, Y. (1975). Fungi associated with *Bursaphelenchus lignicolus*, the pine wood nematode (II). *Journal of the Japanese Forestry Society*, 57: 184-193.
- Kobayashi, F., Yamane, A. & Ikeda, T. (1984). The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease. *Annual Review of Entomology*, 29: 115-135.
- Konrad, H. (2006). Molecular ecology of forest pathogens causing Dutch elm disease, blue-stain and Sirococcus shot blight. PhD thesis. Institute of Forest Entomology, Forest Pathology and Forest Protection, University of Natural resources and Applied Life Sciences. Vienna (BOKU), Vienna, Austria. 57pp. (cit. Kirisitis, T. *et al.*, 2013)
- Kowalski, T. & Gajosek, M.. (1998). Endophytic mycobiota in stems and branches of *Betula pendula* to a diferente degree affected by air pollution. *Öster. Z. Pilzk.*, 7: 13-24. (cit. Kowalski & Zych, 2002)
- Kowalski, T. & Stanczykiewicz, A. (2000). Communities of endophytic fungi in twigs and needles of *Pinus sylvestris* affected to a diferente degree by air pollution. *Phytopathol., Pol.*, 19: 69-87. (cit. Kowalski & Zych, 2002)
- Kowalski, T. P. & Zych (2002). Fungi isolated from living symptomless shots of *Pinus nigra* growing in diferente site conditions. *Osterr. Z. Pilzk.*, 11: 107-116.
- Krokene, P. & Solheim, H. (1998). Pathogenenicity of four blue-stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. *Ecology and Population Biology*. 88 (1): 39-44.
- Krzanowski, W.J. (2000). *Principles of multivariate analysis. A user's perspective*. Oxford University Press, New York, 586 pp.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. & Kubicek, C.P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.*, 106 (7): 757–767
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33 (7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054.

- Kuraku, Zmasek, Nishimura, Katoh (2013). (Nucleic Acids Research 41:W22-W28) Leaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity
- Kuz'michev, E.P., Sokolova, E.S. & Kulikova, E.G. (2001). *Common fungal diseases of Russian forests*. USDA Forest Service, Delaware, 137pp.
- Kwasna, H. & Nirenberg, H.I. (2005). Delimitation of *Penicillium virgatum* sp. nov. and *P. daleae* on the basis of morphological and molecular characters. *Mycol. Res.*, 109 (9): 974–982.
- Kwon, H.R., Son, S.W., Han, H.R., Choi, G.J., Jang, K.S., Choi, Y.H., Lee, S., Sung, N.D. & Kim, J.C. (2007). Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathol. J.* 23 (4): 318-321.
- Landcare Research & RBG Kew: Mycology (2019). *Index Fungorum*.www.indexfungorum.org, set. 2019
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Iowa. 388p.
- Li, G.-H., Yu, Z.-F., Li, X., Wang, X.-B. & Zhang, K.-Q. (2007). Nematicidal Metabolites Produced by the Endophytic Fungus *Geotrichum* sp. AL4. *Chemistry & Biodiversity*, 4: 1520-1524.
- Li, J.S., Zhang, H., Zhang, S.Y., Wang, H.Y., Zhang, J., Chen, A.L., Wang, J.D., & Xiang, W.S. (2017). New macrocyclic lactones with acaricidal and nematocidal activities from a genetically engineered strain *Streptomyces bingchenggensis* BCJ60. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19 (4): 339–346
- Li, L., Tan, J. & Chen, F. (2018). *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 shows nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* via the production of a guanidine compound. *Biocontrol Science and Technology*, 28 (12): 1128–1139
- Lilja, A., Poteri, M., Petäistö, R.-L., Rikala, R., Kurkela, T. & Kasanen, R. (2010). Fungal diseases in forest nurseries in Finland. *Silva Fennica*, 44 (3): 525–545.
- Linit, M.J. (1988). Nematode-vector relationships in the pine wilt disease system. *Journal of Nematology*, 20:227-235.
- Liu, M.J., Hwang, B.S., Jin, C.Z., Li, W.J., Park, D.J., Seod, S.T. & Kim, C.J. (2019). Screening, isolation and evaluation of a nematicidal compound from actinomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Pest Manag. Sci.*, 75: 1585–1593
- Lopes, A., Fonseca, L. & Abrantes, I. (2011). Axial distribution of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in *Pinus pinaster* trees. *Nematropica*, 41, 424.
- Maehara, N. (2007). Reduction of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) population by inoculating *Trichoderma* spp. into pine wilt-killed trees. *Biological Control*. 44: 61-66.
- Maehara, N. (2008). Interactions of pine wood nematodes, wood-inhabiting fungi, and vector beetles. In Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeushi, Y. (eds.). *Pine wilt disease*. Tokyo, Springer, 286-298pp. Tokyo, Springer.
- Maehara, N. & Futai, K. (1997). Effect of fungal interactions on the numbers of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), carried by the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Fundam. Appl. Nematology*. 20 (6): 611-617.
- Maehara, N. & Futai, K. (2000). Population changes of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on fungi growing in pine-branch segments. *App. Entomol. Zool.* 35 (3): 413-417.

- Maehara, N., Hata, K. & Futai, K. (2005). Effect of blue-stain fungi on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematology*, 7 (2): 161-168.
- Maheshwari, R. (2006). What is an endophytic fungus? *Current Science*. 90 (10): 1309.
- Mamiya, Y. (1972). Aggregation of *Bursaphelenchus xylophilus* around pupal chambers of *Monochamus alternatus*. *Trans. Ann. Mtg. Kyusyu. J. Jpn. For. Soc.*, 24: 30.
- Mamiya, Y. (1975). The life history of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*. *Japanese Journal of Nematology*, 5: 16-25.
- Mamiya, Y. (1983). Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 21: 201-220.
- Mamiya, Y. (1988). History of pine wilt disease in Japan. *Journal of Nematology*. 20 (2) 219-226.
- Mamiya, Y. (2006). Attraction of pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. *Japanese Journal of Nematology*. 36 (1): 1-9.
- Mamiya, Y. & Enda, N. (1972). Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica*, 18:159-162.
- Manter, D.K & Vivanco, J.M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 7–14.
- Martins, F.P. & Paulo, O.S. (2007). Concatenator V 1.0.1
- Mathiesen-Käärik, A. (1953). Eine Übersicht über die gewöhnlichsten mit Borkenkäfern assoziierten Bläuepilze in Schweden und einige für Schweden neue Bläuepilze. *Meddn. St. Skogforsk.* 43, 1-74. (cit. Jakowiak & Bilanski, 2013)
- McMullin, D.R., Nguyen, H.D.T., Daly, G.J., Menard, B.S. & Miller, J.D. (2017). Detection of foliar endophytes and their metabolites in *Picea* and *Pinus* seedling needles. *Fungal Ecology*, 31: 1-8
- Mead, D.J. (2013). *Sustainable management of Pinus radiata plantations*. Rome, FAO, 246 p.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 1-8 pp.
- Min, Y.J., Park, M.S., Fong, J.J., Quan, Y., Jung, S. & Lim, Y.W. (2014). Diversity and saline resistance of endophytic fungi associated with *Pinus thunbergii* in coastal shelterbelts of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (3): 324-333.
- Morimoto, K., Iwasaki, A. (1972). Role of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) as a vector of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *J. Jpn. For. Soc.*, 54: 177-183.
- Mostert, L., Crous, P.W. & Petrini, O. (2000). Endophyte fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 52: 46-58.
- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K. & Sousa, E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727-734.
- Nakajima, G., Iki, T., Yamanobe, T., Nakamura, K. & Aikawa, T. (2019). Spatial and temporal distribution of *Bursaphelenchus xylophilus* inoculated in grafts of a resistant clone of *Pinus thunbergii*. *Journal of Forest Research*, 24 (2): 93–99

- Nascimento, F.X., Espada, M., Barbosa, P., Rossi, M.J., Vicente, C.S.L. & Mota, M. (2016). Non-specific transient mutualism between the plant parasitic nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and the opportunistic bacterium *Serratia quinivorans* BXF1, a plant-growth promoting pine endophyte with antagonistic effects. *Environmental Microbiology*, 18 (12): 5265–527
- Nascimento, F., Hasegawa, K., Mota, M. & Vicente, C. (2015). Bacterial role in pine wilt disease development – review and future perspectives. *Environmental Microbiology Reports*, 7 (1): 51-63.
- Naves, P., Bonifácio, L. & Sousa, E. (2013). Nemátode-Vetor. In Sousa, E., Vale, F., & Abrantes, I. (eds.). *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa – Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Lisboa, FNAPF, 81-121pp.
- Niu, H.T., Zhao, L., Lu, M., Zhang, S. & Sun, J. (2012). The ratio and concentration of two monoterpenes mediate fecundity of the pinewood nematode and growth of its associated fungi. *PLoS ONE*, 7, 331716.
- Nose, M., Shiraishi, S. (2007). Breeding for resistance to pine wilt disease. In Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeushi, Y. (eds.). *Pine wilt disease*. Tokyo, Springer, 334-350pp. Tokyo, Springer.
- Onions, A.H.S. & Brady, B.L. (1987). *Penicillium*. In Peberdy, J.F. (ed.) *Penicillium and Acremonium*. Biotechnology Handbooks, Vol. 1. New York, Springer, 296pp.
- Paine, T.D., Raffa, K.F. & Harrington, T.C. (1997). Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Ver. Entomol.* 42: 179-206.
- Persoh, D., Melcher, M., Flessa, F. & Rambold, G. (2010). First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology*. 114: 585-596.
- Persson, Y., Ihmark, K. & Stenlid, J. (2011). Do bark beetles facilitate the establishment of rot fungi in Norway spruce? *Fungal Ecology*, 4 (4): 262-269.
- Peterson, S.W. (2004). Multilocus DNA sequence analysis shows that *Penicillium biourgeianum* is a distinct species closely related to *P. brevicompactum* and *P. olsonii*. *Mycol. Res.*, 108 (4): 434-440.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews, J.H. & Hirano, S.S. (eds.). *Microbial ecology of leaves*. New York, Springer, 179-197. (cit. Sun & Guo, 2012)
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. & P.W. Crous. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76: 51–167.
- Pimentel, I.C., Figura, G. & Auer, C.G. (2010). Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa Phytopathol.* 36 (1): 85-88.
- Pirtilla, A.M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, A. & Hohtola, A. (2003). Two endophytic fungi in different tissues of scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microb. Ecol.* 62: 45-53.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. 2nd Ed. Blackie Academic & Professional, London, 503pp.
- Potvin, L.R., Richter, D.L., Jurgensen, M.F. & Dumroese, R.K. (2012). Association of *Pinus banksiana* Lamb. and *Populus tremuloides* Michx. seedling fine roots with *Sistotrema brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. (Basidiomycotina). *Mycorrhiza*, 22: 631-638.
- Prieto-Recio, C., Romeralo, C. & Bezos, D. (2012). First Report of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinaster* in Spain. *Plant Disease*, 96 (5): 770.
- Proença, D.N., Francisco, R., Santos, C.V., Lopes, A., Fonseca, L., Abrantes, I.M.O., & Morais, P.V. (2010). Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with pine wilt disease. *PLoS One*, 5(12): e15191

- Proença, D.N., Grass, G. & Morais, P.V. (2016). Understanding pine wilt disease: roles of the pine endophytic bacteria and of the bacteria carried by the disease-causing pinewood nematode. *MicrobiologyOpen*. 6:e415. DOI: 10.1002/mbo3.415.
- Proença, D., Francisco, R., Kublik, S., Scholer, A., Vestegaard, G., Schloter, M. & Morais, P. (2017). The microbiome of endophytic wood colonizing bacteria from pine trees as affected by pine wilt disease. *Scientific Reports*. 7:4205. 9pp. DOI: 10.1038/s41598-017-04141-6.
- Qadri, M., Rajput, R. & Abdin, M.Z. (2014). Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with himalayan blue pine. *Microb. Ecol.* 67: 877-887.
- Quaglia, M. & Moretti, C. (2014). Molecular characterization of *Diplodia seriata*, a new pathogen of *Prunus laurocerasus* in Italy. *Phytoparasitica*, 42:189–197.
- R Core Team (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>
- Radic, N. & Strukelj, B. (2012). Endophytic fungi – The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*. 19: 1270-1284.
- Romón, P., Zhou, X.D., Iturrondobeitia, J.C., Wingfield, M.J., Goldarazena, A. (2007). *Ophiostoma* species (Ascomycetes: *Ophiostomatales*) associated with bark beetles (Coleoptera: *Scolytinae*) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Canadian Journal of Microbiology*, 53 (6): 756-767.
- Rane, K.K. & Tattar, T.A. (1987). Pathogenicity of blue-stain fungi associated with *Dendroctonus terebrans*. *Plant Dis.*, 71: 8798-8883. (cit. Kim, J-J. *et al.*, 2003)
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364. DOI: [10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x)
- Rayner, R.W. (1970). *A Mycological colour chart*. Commonwealth Mycological Institute & British Mycological Society. Kew. 34p.
- Reay, S.D., Brownbridge, M., Gicquel, B., Cummings, N.J. & Nelson, T.L. (2010). Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. *Biological Control*. 54: 52-60.
- Robert, V., Stegehuis, G. & Stalpers, J. (2005). *The MycoBank engine and related databases*. <http://www.mycobank.org>
- Rodrigues, J.M., Sousa, E. & Abrantes, I. (2013). Resenha histórica da doença da murchidão do pinheiro. In Sousa, E., Vale, F. & Abrantes, I. (eds.). *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa – Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Lisboa, FNAPF, 13-32pp.
- Romón, P., Iturrondobeitia, J.C., Gibson, K., Lindgren, B.S. & Goldarazena, A. (2007). Quantitative association of bark beetles with pitch canker fungus and effects of verbanone on their semiochemical communication in Monterey pine forests in northern Spain. *Environmental Entomology*, 36 (4): 743-750.
- Rumbold, C.T. (1931). Two blue-staining fungi associated with bark-beetle infestation of pines. *J. Agric. Res.*, 43: 847-873. (cit. Kim, J-J. *et al.*, 2003)
- Ruskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrel, T., Nicolson, D., Culham, A., Baily, N., Kirk, P., Bourgoïn, T., Baillargeon, G., Hernandez, F. & De Wever, A. (2013). Species 2000 & ITIS Catalogue Of Life, 2013 Annual Checklist. <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/UK>.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). *Food and indoor fungi*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 390pp.
- Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*, 96 (2): 195-206.

- Samuels, G.J., Ismaiel, A., Mulaw, T.B., Szakacs, G., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. & Jaklitsch, W.M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55:77–108. DOI 10.1007/s13225-012-0152-2
- Sanz-Ros, A.V., Müller, M.M. & San Martín, R. (2015). Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. *Fungal Biology*. 119: 870-883.
- Schulz, B. & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Schmit, J.P. & Mueller, G.M. (2007). An estimate of lower limit of global fungal diversity. *Biodivers. Conserv.*, 16: 99-111.
- Scott, J.A., Wong, B., Summerbell, R.C. & Untereiner, W.A. (2008). A survey of *Penicillium brevicompactum* and *P. bialowiezense* from indoor environments, with commentary on the taxonomy of the *P. brevicompactum* group. *Botany*, 86: 732-741.
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M. & El-Diwany Al. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2 (1):31-82.
- Shah, P.A. & Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413-423.
- Shanmugam, G., Dubey, A., Ponpandian, L.N., Rim, S.O., Seo, S.T., Bae, H. & Jeon, J. (2018). Genomic Insights into Nematicidal Activity of a Bacterial Endophyte, *Raoultella ornithinolytica* MG against Pine Wilt Nematode. *Plant Pathol. J.*, 34 (3): 250-255
- Siddiqui, Z.A. & Mahmood, I. (1996). Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresource Technology*. 58: 229-239.
- Sieber, T.N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? (2007). *Fungal Biology Review Reviews*. 21: 75-89.
- Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (2013). *Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 337pp.
- Silva, M.N., Pintado, M.E., Sarmiento, B., Stamford, N.P., Vasconcelos, M.W. (2019). A biofertilizer with diazotrophic bacteria and a filamentous fungus increases *Pinus pinaster* tolerance to the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Biological Control*, 132: 72–80
- Sinclair, J. & Dhingra, O. (1995). *Basic plant pathology methods*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 448pp.
- Six, D.L. (2003). Bark beetle-fungus symbiosis. *Insect Symbiosis*, 1: 97-114. (cit. Vasconcelos & Morais, 2013)
- Soldevilla, C. (1995). Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21: 87-109.
- Solheim, H., Krokene, P. & Långström, B. (2001). Effects of growth and virulence of associated blue-stain fungi on host colonization behaviour of the pine shoot beetles *Tomicus minor* and *T. piniperda*. *Plant Pathol.*, 50: 111-116.
- Sriwati, R., Takemoto, S. & Futai, K. (2007). Cohabitation of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and fungal species in pine trees inoculated with *B. xylophilus*. *Nematology*. 9 (1): 77-86.
- Sriwati, R., Takemoto, S. & Futai, K. (2008). The relationship between the pinewood nematode (PWN) and fungi cohabiting in pine trees inoculated with PWN. *In* M.M. Mota & P. Vieira (eds). *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Berlin, Springer, 101-114 pp.
- Strobel, G.A. (2003). Endophytes are sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5: 535-544.

- Suh, D.Y., Hyun, M.W., Kim, J.J., Son, S.Y. & Kim, S.H. (2013). *Ophiostoma ips* from pinewood nematode vector, Japanese pine sawyer beetle (*Monochamus alternatus*), in Korea. *Mycobiology*, 41, 59-62.
- Sun, X. & Guo, L.D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*. 3 (1): 65-76.
- Tainter, F.H. & Baker, F.A. (1996). *Principles of forest pathology*. John Wiley & Sons, Inc., 805 p.
- Thom, C. (1910). *Cultural studies of species of Penicillium.*, Washington, U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Bulletin 118, 109pp. <https://archive.org/details/culturalstudieso00thom>
- Thwaites, J.M., Farrel, R.L., Duncan, S.M., Reay, s.D., Blanchette, R.A., Hadar, E., Hadar, Y., Harrington, T.C. & McNew, D. (2005). Survey of potencial sapstain fungi on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 43: 653-663.
- Thwaites, J.M., Reay, S.D., Schirp, A., Grinter, W. & Farrel, R.L. (2013). Ophiostomatoid fungi and blue-stain in New Zealand. In Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (eds.). *Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 113-118.
- Tzannes, S.S. & Jan, S. (1985). The occurrence of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Taiwan. *Proceedings of the 6th ROC Symposium of Electron Microscopy*, 38-39.
- Uddin, W., Stevenson, K.L. & Pardo-Schultheiss (1997). Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infections courts. *Plant Disease*, 81 (9): 983-989.
- Urbina, E.O., Mesanza, N., Aragonés, A., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., Boqué, R., Patten, C., Aitken, J. & Iturrutxa, E. (2016). Emerging needle blight diseases in Atlantic Pinus ecosystems of Spain. *Forests*, 8 (18), 13pp.
- Vasconcelos, T. & Duarte, I. (2013). Fatores abióticos/bióticos-planta. In Sousa, E., Vale, F. & Abrantes, I. (eds.). *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa – Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Lisboa, FNAPF, 193-220pp.
- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. & Rehner, S.A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46: 72-82.
- Vicente, C., Espada, M., Vieira, P. & Mota, M. (2012). Pine wilt disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology*. 133 (1): 89-99.
- Vicente, C.S.L., Nascimento, F., Barbosa, P., Ke, H.M., Tsai, I.J., Hirao, T., Cock, P.J.A., Kikuchi, T. Hasegawa, K. & Mota, M. (2016). Evidence for an opportunistic and endophytic lifestyle of *Bursaphelenchus xylophilus*-associated bacteria *Serratia marcescens* PWN146 isolated from wilting *Pinus pinaster*. *Microb. Ecol.* 72: 669-681.
- Vicente, C.S.L., Nascimento, F., Espada, M., Mota, M. & Oliveira, S. (2011). Bacteria associated with the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* collected in Portugal. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100: 477-481.
- Wang, C.-Y. (2009). *Biological control of Pine Wilt Disease with endoparasitic fungus Esteya vermicola*. Tese de doutoramento, Chungnam National University, Daejeon, Coreia do Sul. 144pp.
- Wang, Y. & Guo, L.D. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Can. J. Bot.* 85: 911-917
- Wang, H.M., Lun, Y.Y., Lu, Q., Liu, H.X., Decock, C. & Zhang, X.Y. (2018). Ophiostomatoid fungi associated with pines infected by *Bursaphelenchus xylophilus* and *Monochamus alternatus* in China, including three new species. *MycKeys* 39: 1–27
- Wang, Y., Yamada, T., Sakaue, D. & Susuki, K. (2005a). Variations in life history parameters and their influence on rate of population increase of diferente pathogenic isolates of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*. 7 (3): 459-468. (cit. Vasconcelos & Morais, 2013)

- Wang, Y., Yamada, T., Sakaue, D. & Susuki, K. (2005b). Influence of fungi on multiplication and distribution of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in axenized *Pinus thunbergii* cuttings. *Nematology*, 7 (6): 809-817.
- Wan, X, Zhang, S.Y., Zhang, H., Zhai, J., Huang, J., Chen, A.L. & Wang, J.D. (2016). Two new tenvermectins from a genetically engineered strain *Streptomyces avermitilis* MHJ1011. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19: 4, 327-332
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies, In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T. (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 315-322 pp.
- West, C.P., Izeckor, E., Oostehuis, D.M. & Robbins, R.T. (1988). The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil*, 112: 3-6. (cit. Vega *et.al.*, 2008)
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276. (cit. Vega *et.al.*, 2008)
- Wingfield, M.J., Garnas, J.R., Hajek, A., Hurley, B.P., De Beer, Z.W. & Taerum, S.J. (2016). Novel and co-evolved associations between insects and microorganisms as drivers of forest pestilence. *Biological Invasions*, 18: 1045-1056.
- Wingfield, M.J. & Gibbs, J.N. (1991). *Leptographium* and *Graphium* species associated with pine infesting bark beetles in England. *Mycological Research*, 95: 125-1260. (cit. Thwaites *et al.*, 2013)
- Wolda, H. (1981). Similarity Indices, Sample Size and Diversity. *Oecologia*. 50: 296-302.
- Yamaoka, Y. (2017). Taxonomy and pathogenicity of ophiostomatoid fungi associated with bark beetles infesting conifers in Japan, with special reference to those related to subalpine conifers. *Mycoscience*, 58: 221-235.
- Yan, J.F., Broughton, S.J., Yang, S.L. & Gange, A.C. (2015). Do endophytic fungi grow through their hosts systematically? *Fungal Ecology*. 13: 53-59.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Shao, L., Zhang, K. & Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacif Entomology*. 15: 647-650.
- Yano, S. (1913). Investigation on pine death in Nagasaki prefecture. *Sanrin-Kouhou*, 4:1-14.
- Yi, C., Byun, B., Park, J., Yang, S. & Chang, K. (1989). First finding of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle and its insect vector in Korea. *Research Reports of the Forestry Research Institute Seoul*, 38:141-149.
- Yoo, J.J. & Eom, A.H. (2012). Molecular identification of endophytic fungi isolated from needle leaves of conifers in Bohyeon Mountain, Korea. *Mycobiology*. 40 (4): 231-235.
- You, Y.H., Yoon, H., Woo, J.R., Rim, S.O., Lee, J.H., Kong, W.S. & Kim, J.G. (2011). Diversity of endophytic fungal isolates from the rootlet of *Pinus densiflora* colonized by *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* 39 (3): 223-226.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. & Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165: 437-449.
- Zhang, X.M., Li, G.H., Ma, J., Zeng, Y., Ma, W.G. & Zhao, P.J. (2010). Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi *In Vitro* and its secondary metabolites. *The Journal of Microbiology*, 48 (6): 784-790.
- Zhao, B.G. (2008). Bacteria carried by the pine wood nematode and their symbiotic relationship with the nematode. In Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeushi, Y. (eds.). *Pine wilt disease*. Tokyo, Springer, 264-273pp. Tokyo, Springer.


- Zhao, L.L., Lu, M., Niu, H., Fang, G. & Zhang, S. (2013). A native fungal symbiont facilitates the prevalence and development of an invasive pathogen-native vector symbiosis. *Ecology*, 94: 2817-2826.
- Zhao, L., Mota, M., Vieira, P. Butcher, R.A. & Sun, J. (2014). Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends in Parasitology*. 30 (6): 299-308.
- Zhao, L.L., Wei, W., Kang, L. & Sun, J.H. (2009). Within-tree distribution and attractant sampling of propagative pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: An early diagnosis approach. *Forest Ecology and Management*, 258, 1932-1937.
- Zhao, L.L., Wei, W., Kang, L. & Sun, J.H. (2007). Chemotaxis of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, to volatiles associated with host pine, *Pinus massoniana*, and its vector *Monochamus alternatus*. *J. Chem Ecol.*, 33, 1207-1216.
- Zhou, S., Smith, D.R. & Stanosz, G.R. (2001). Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol. Res.* 105 (8): 919-926.
- Zhou, X., De Beer, W.Z., Cibrian, D., Wingfield, B. & Wingfield, M. (2004). Characterization of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. Pulviinisporum* sp. nov. *Mycol. Res.* 108 (6): 690-698.
- Zhou, X., De Beer, W.Z., & Wingfield, M.J. (2013). Ophiostomatoid fungi associated with conifer-infesting bark beetles in China. In Seifert, A.K., de Beer, Z.W. & Wingfield, M.J (eds.). *Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 91-98pp.

ANEXOS

ANEXO I

Espécies de fungos isolados em 33 espécies de pinheiro, em 16 países. Local de origem e órgão da planta onde se procedeu ao isolamento. Grau de resistência de *Pinus* spp. a *B. Xylophilus*

ANEXO II

Outputs do software  resultantes do tratamento estatístico dos dados

ANEXO III

Lista de isolados depositados na Micoteca do INIAV, I.P. e respetiva proveniência – local e estado sanitário da árvore relativamente à DMP [árvore doentes (D) e árvore sãs (S)]

ANEXO I – Espécies de fungos isolados em 33 espécies de pinheiro, em 16 países. Local de origem e órgão da planta onde se procedeu ao isolamento. Grau de resistência de *Pinus* spp. a *B. xylophilus*

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Género)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Acremonium</i> spp.	A/S	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Acremonium strictum</i>	A/S	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Acremonium variegolor</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Alternaria</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Alternaria</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Alternaria</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	P	<i>Pinus eldarica</i>	–	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas xilema casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	E	<i>Pinus roxburghii</i>	–		Índia (Himalaias)	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2015
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Alternaria alternata</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Alternaria infectoria</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Alternaria tenuissima</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Amphisphaeria umbrina</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Annulohyphoxylon cohaerens</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	agulhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Anthostomella</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Anthostomella formosa</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Armillaria</i> spp.	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	raiz	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Aspergillus</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus</i> spp.	A/E	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus flavus</i>	A/E	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Aspergillus flavus</i>	A/E	E	<i>Pinus pinaste</i>	●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Aspergillus niger</i>	A/D	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i>	A/D	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Aspergillus sydowii</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Aspergillus versicolor</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Asterosporium asterospermum</i>	A/-	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A/D	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Aureobasidium pullulans</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Beauveria caledonica</i>	A/S	E	<i>Pinus radiata</i>	●●	ponta da raiz, folha e semente	Nova Zelândia	Reay <i>et al.</i> , 2010
<i>Beauveria bassiana</i>	A/S	E	<i>Pinus radiata</i>	●●	ponta da raiz, folha e semente	Nova Zelândia	Reay <i>et al.</i> , 2010
<i>Beauveria bassiana</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Beauveria malawiensis</i>	A/S	E	<i>Pinus radiata</i>	●●	ponta da raiz, folha e semente	Nova Zelândia	Reay <i>et al.</i> , 2010
<i>Beltrania rhombica</i>	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>		agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Bifusella linearis</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus albicaulis</i>	–		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
			<i>Pinus flexilis</i>	–			
			<i>Pinus monticola</i>	●●			
			<i>Pinus strobus</i>	●●			
<i>Bifusella linearis</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Bionectria ochroleuca</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Biscogniauxia bartholomaei</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Biscogniauxia marginata</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	A/S	E;P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Biscogniauxia repanda</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Bjerkandera adusta</i>	B/A	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Botrytis cinerea</i>	A/Lt	P	<i>Pinus eldarica</i>	–	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Botrytis cinerea</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Botrytis cinerea</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Brunchorstia pinea</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●		Reino Unido	Brown & Macaskill, 2005
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●		(América do Norte	
			<i>Pinus cembra</i>	–		Europs	
			<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i>	–		Rússia	
			<i>Pinus mugo</i>	●●●		Japão)	
			<i>Pinus nigra</i> var. <i>laricio</i>	–			
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Brunchorstia pinea</i>	A/D	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Camarosporium pini</i>	A/D	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Camarosporium pini</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	pinhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Camarosporium brabeji</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Camillea obularia</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Cenangium acuuum</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Cenangium ferruginosum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Cephalosporium</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Ceratocystis piceae</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	madeira	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Chaetomium</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Chaetomium globosum</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Chalastospora gossypii</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Chaunopycnis</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Chondrostereum purpureum</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Cladosporium</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel, I.C. <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Cladosporium</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	A/D	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cladosporium herbarum</i>	A/D	S	<i>Pinus eldarica</i> <i>Pinus pinaster</i>	– ●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Cladosporium herbarum</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Coelomyces</i> spp. (#4)	A/Co	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	xilema, casca, agulhas	China	Wang & Guo, 2007
<i>Cochliobolus</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Colletotrichum</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Colpoma quercinum</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Coniochaeta</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos, agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Coniochaeta velutina</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Coniothyrium</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Coniothyrium</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Coniothyrium fuckelii</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	A/Lt	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Cyclaneusma minus</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Cyclaneusma minus</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus torreyana</i>	–		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Cyclaneusma minus</i>	A/Lt	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cyclaneusma niveum</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Cyclaneusma niveum</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	casca	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cyclaneusma niveum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Cyclaneusma niveus</i>	A/Lt	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Cylindrobasidium</i> sp.	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	A/S	P	<i>Pinus eldarica</i> <i>Pinus pinaster</i> <i>Pinus halepensis</i> <i>Pinus sylvestris</i>	– ●●● ●● ●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Cytospora</i> sp.	A/S	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Cytospora pinastri</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Daldinia concentrica</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Daldinia fissa</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Daldinia fissa</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Daldinia grandis</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Daldinia petriniae</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Daldinia vernicosa</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Davidiella tassiana</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Davisomycella medusa</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus ponderosa</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Dendrodochium pinastri</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Dermea acerina</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Diaporthe eres</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Diplodia</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Discostroma tosta</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Dothideomycetes</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	Ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Dothichiza pithyophila</i>	A/D	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Dothistroma pini</i>	A/D	P	<i>Pinus radiata</i>		agulhas	Espanha	Urbina <i>et al.</i> , 2016
<i>Dosthistroma septosporum</i>	A/D	P	<i>Pinus radiata</i>	●●	agulhas	Espanha	Urbina <i>et al.</i> , 2016
<i>Dothioraceae</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Drechslera</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Drechslerella dactyloides</i>	A/O	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Elytroderma deformans</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●		China agulhas	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Elytroderma deformans</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus ponderosa</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Entoleuca mammata</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●		China agulhas	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Epicocum</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos, agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Epicocum nigrum</i>	A/D	E	<i>Pinus eldarica</i>	–	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
<i>Epicocum nigrum</i>	A/D	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002
<i>Epicocum nigrum</i>	A/D	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Epicocum nigrum</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Epicocum nigrum</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Eupenicillium javanicum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Eupenicillium pinetorum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Eurotiomycetes</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo <i>et al.</i> , 2012
<i>Fimetariella</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Fusarium</i> spp.	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Fusarium circinatum</i>	A/S	P	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Austrália	Dick, M.A. & Simpson, J. 2003
			<i>Pinus radiata</i>	●●			
<i>Fusarium larvarum</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Fusarium moniliforme</i>	A/D	P	<i>Pinus eldarica</i>	–	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
<i>Fusarium moniliforme</i>	A/D	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	P	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	P	<i>Pinus eldarica</i> <i>Pinus halepensis</i>	– ●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	P	<i>Pinus pinaster</i> <i>Pinus radiata</i>	●●● ●●	sementes	Australia	Dick, M.A. & Simpson, J. 2003
<i>Fusarium oxysporum</i>	A/S	P	<i>Pinus elliotii</i> <i>Pinus taeda</i>	● ●●	sementes	Brasil	Maciel, C.G. <i>et al.</i> , 2017
<i>Fusarium proliferatum</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Fusarium solani</i>	A/S	P	<i>Pinus eldarica</i> <i>Pinus pinaster</i> <i>Pinus halepensis</i> <i>Pinus sylvestris</i>	– ●●● ●● ●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Fusarium verticillioides</i>	A/S	E-P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium verticillioides</i>	A/S	P	<i>Pinus elliotii</i> <i>Pinus taeda</i>	● ●●	sementes	Brasil	Maciel, C.A. <i>et al.</i> , 2017
<i>Fusarium roseum</i>	A/S	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Geomyces</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Geopyxis</i> spp.	A/P	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Geotrichum albida</i>	A/S	E	<i>Pinus roxburghii</i>	●●●		India (Himalaias)	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2015
<i>Gibberella</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Gibberella avenaceae</i>	A/S	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Gliocladium catenulatum</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●		Coreia do Sul	Choi, G.J. <i>et al.</i> , 2004
<i>Gliocladium roseum</i>	A/S	E	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Glomerella cingulata</i>	A/S	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Gremmeniella abietina</i>	A/Lt	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Gremmeniella abietina</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Gremmeniella abietina</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Hansfordia</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Hemiphacidium longisporum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Hendersonia acicola</i>	A/D	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Hendersonia pinicola</i>	A/D	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Herpotrichia juniperi</i>	A/D	P	<i>Pinus</i> spp.	●●	agulhas	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Hormonema dematioides</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	rebentos	Finlândia	Pirttilla, A.M. <i>et al.</i> , 2003
<i>Hormonema dematoides</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Hyphomycetes</i> spp. (#2)	D/H	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Wang & Guo, 2007
<i>Hypocrea</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypocrea caerulescens</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Hypocrea lixii</i>	A/S	E;P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypocrea lixii</i>	A/S	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Hypocrea viridescens</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypoxylon fendleri</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Hypoxylon flagiforme</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Hypoxylon fuscum</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Hypoxylon intermedium</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Hypoxylon rubiaginosum</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypoxylon subgilvum</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Ilyonectria cyclaminicola</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Juxtiphoma eupyrena</i>	A/D	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Khuskia oryzae</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Kretzschmaria clavus</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Kretzschmaria deusta</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Lachnellula pini</i>	A/Lt	P	<i>Pinus pumila</i>	–	ramos	Rússia	Kuz'michev <i>et al.</i> , 2001
			<i>Pinus sibirica</i>	–			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Lachnellula subtilissima</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sibirica</i>	–	ramos	Rússia	Kuz'michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Lachnum pulverulentum</i>	A/Lt	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lecanosticta acicola</i>	A/D	P	<i>Pinus radiata</i>	●●	agulhas	Espanha	Urbina <i>et al.</i> , 2016
<i>Lecanosticta acicola</i>	A/D	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Lecytophora</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Leotiomycetes</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo <i>et al.</i> , 2012
<i>Leotiomycetes</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Lepteutya cupressi</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Leptomelanconium allescheri</i>	A/-	E;P	<i>Pinus monticola</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Leptosphaeria</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Leptosphaeria</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Leptostroma</i> sp.	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Wang & Guo, 2007
<i>Leptostroma pinastri</i>	A/Lt	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Linodochium hyalinum</i>	A/-	E;P	<i>Pinus monticola</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Lirula macrospora</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophiostoma</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Lophium mytilinum</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Lophodermella arcuata</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus monticola</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
			<i>Pinus flexilis</i>	–			
<i>Lophodermella sulcigena</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lophodermium</i> sp.	A/Lt	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Lophodermium</i> sp.	A/Lt	E	<i>Pinus densiflora</i> ,	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Lophodermium australe</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophodermium baculiferum</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus ponderosa</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
			<i>Pinus montezumae</i>	●●			
<i>Lophodermium conigenum</i>	A/L	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo <i>et al.</i> , 2012
<i>Lophodermium conigenum</i>	A/L	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo. & Eom, A.H., 2012
			<i>Pinus koraiensis</i>	●●●			
<i>Lophodermium conigenum</i>	A/L	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Lophodermium conigenum</i>	A/Lt	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Lophodermium conigenum</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas, ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lophodermium macci</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Lophodermium nitens</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Lophodermium pinastri</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lophodermium pini-excelsae</i>	A/Lt	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lophodermium seditiosum</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophodermium seditiosum</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Lophodermium seditiosum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Lophodermium seditiosum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Lophodermium seditiosum</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Lophophacidium dooksii</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Meloderma desmazieriezii</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Meloderma desmazieriezii</i>	A/Lt	E;P	<i>Pinus monticola</i> <i>Pinus strobus</i>	●● ●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Micelia sterilia</i>		E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	xilema, casca, agulhas	China	Wang & Guo, 2007
<i>Microdiplodia</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Microthyrium pinophyllum</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Monocillium</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Mycosphaerella pini</i>	A/D	E;P	<i>Pinus monticola</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycosphaerella pini</i>	A/D	P	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Myxotrichum stipitatum</i>	A/D	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Nectria cucurbitula</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	ramos, agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Nemania aenea</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Nemania chestersii</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Nemania serpens</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Nemania serpens</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, raminhos	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Nemania diffusa</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Neofabraea malicorticis</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Naemacyclus minor</i>	A/Lt	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Neurospora</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos, agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Nigrospora</i> sp.	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Nigrospora oryzae</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Nodulisporium</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Ophiostoma nigrocarpum</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Paecilomyces variotti</i>	A/E	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Paecilomyces variotti</i>	A/E	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Papulaspora</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Paraconiothyrium</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Penicillium</i> sp.	A/E	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Penicillium</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium</i> spp.	A/E	S	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus halepensis</i> ,	●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Penicillium</i> spp.	A/E	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Penicillium</i> spp.	A/E	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Penicillium</i> spp.	A/E	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium adametzii</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium aspersorum</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium atramentosum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	A/E	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Penicillium brevicompactum</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium canescens</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium chrysogenum</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium citrionigrum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium daleae</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium dipodomycicola</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium fellutanum</i>	A/E	E	<i>Pinus rigida</i>	●	folhas	Coreia do Sul	Kim, C.S. <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium frequentans</i>	A/E	E	<i>Pinus roxburghii</i>	–		Índia (Himalaias)	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium glabrum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium glabrum</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium janthinellum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium lividum</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium manginii</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium melinii</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Penicillium minioluteum</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium montanense</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium montanense</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium ochrochloron</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium polonicum</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium purpurogenum</i>	A/E	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Penicillium raistrickii</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium rolfsii</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium spinulosum</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium swiecickii</i>	A/E	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium swiecickii</i>	A/E	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	radícula	Coreia do Sul	You <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium toxicarium</i>	A/E	E	<i>Pinus rigida</i>	●	folhas	Coreia do Sul	Kim, C.S. <i>et al.</i> , 2008
<i>Peniophora incarnata</i>	B/A	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Pestalotiopsis besseyi</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Pestalotiopsis besseyi</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	Ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Pestalotiopsis citrina</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Pestalotiopsis funereoides</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Pestalotiopsis stevensonii</i>	A/S	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Pezicula</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Pezicula aurantiaca</i>	A/L	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Pezicula eucrita</i>	A/L	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski, T. & Zych, P., 2002
<i>Pezicula eucrita</i>	A/L	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Peziza varia</i>	A/P	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Pezizella chionea</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas, pinhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Phacidium infestans</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Phacidium infestans</i>	A/Lt	P	<i>Pinus pumila</i>	–	agulhas	Rússia	
			<i>Pinus sibirica</i>	–			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Phacidium infestans</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Phacidium infestans</i>	A/Lt	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Phacidium lacerum</i>	A/Lt	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Phaeoconiella</i> sp.	A/E	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Phaeoconiella effusa</i>	A/E	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Phialocephala</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Phialocephala fortinii</i>	A/L	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Phialophora</i> spp.	A/E	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Phoma</i> sp.	A/D	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Phoma</i> spp.	A/D	S	<i>Pinus pinaster</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Phoma</i> spp.	A/D	S	<i>Pinus eldarica</i> <i>Pinus pinaster</i> <i>Pinus sylvestris</i>	– ●●● ●●●	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Phoma</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Phoma</i> spp. (#3)	A/D	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	xilema casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Phoma chrysanthemicola</i>	A/D	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Phomopsis columnaris</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Phoma herbarum</i>	A/D	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Phoma herbarum</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Phoma herbarum</i>	A/D	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Phoma leveillei</i>	A/D	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Phoma macrostoma</i>	A/D	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Phomopsis</i> sp.	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Phomopsis</i> sp.	A/S	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Phomopsis</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Phomopsis</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Phomopsis</i> spp.	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Phomopsis archeri</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Phomopsis conorum</i>	A/S	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Pithomyces</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Plectania milleri</i>	A/P	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Pleospora herbarum</i>	A/P	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Preussia</i> sp.	A/P	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Preussia</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudoplectania</i> spp.	A/P	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Pyronema</i> sp.	A/P	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Rachicladosporium</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Pachyramichloridium pini</i>	A/D	P	<i>Pinus contorta</i> <i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i> <i>Pinus peuce</i>	●● – –		Reino Unido	
<i>Rhabdocline parkeri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhabdocline pseudotsugae</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhabdocline weirii</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	A/E	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	A/D	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhizosphaera pini</i>	A/D	E;P	<i>Pinus monticola</i>	●●		EUA	Ganley <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhizosphaera oudemansii</i>	A/D	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Rosellinia</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Rosellinia arcuata</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Rosellinia necatrix</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Órgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Rosellinia obliquata</i>	A/S	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	pinhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Rhytismataceae</i> sp.	A/L	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo <i>et al.</i> , 2012
<i>Sarea resinae</i>	A/Lc	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Sarocladium strictum</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Sclerostagonospora</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos, agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Seimatosporium lonicerae</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Septoria pini-thunbergii</i>	A/D	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Yoo <i>et al.</i> , 2012
<i>Septorioides</i> sp.	A/D	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Simplicillium lamellicola</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Sirococcus conigenus</i>	A/S	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Sordaria</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Sordaria fimicola</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Sordaria fimicola</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos, agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Sordariaceae</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos, agulhas	Alemanha	Persoh <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphaeridium candidum</i>	A/-	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas, pinhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	A/D	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	A/D	E;P;S	<i>Pinus ponderosa</i>	●●		Reino Unido	Brown & Macaskill, 2005
			<i>Pinus radiata</i>	●●		(África	
			<i>Pinus nigra</i>	●●●		América do Norte,	
			<i>Pinus nigra</i> var. <i>laricio</i>	–		Europa,	
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●		Austrália,	
			<i>Pinus mugo</i>	●●●		Nova Zelândia)	
			<i>Pinus patula</i>	●●			
			<i>Pinus contorta</i>	●●			
			<i>Pinus resinosa</i>	●●			
			<i>Pinus canariensis</i>	–			
			<i>Pinus elliottii</i>	●			
			<i>Pinus palustris</i>	–			
			<i>Pinus taeda</i>	●●			
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	A/D	P	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	A/D	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas, ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Sordaria fimicola</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Sporothrix</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Sporormiella</i> spp.	A/D	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Sporormiella minimoides</i>	A/D	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Stemphylium</i> sp.	A/D	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Stemphylium botryosum</i>	A/D	P	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Sydowia polyspora</i>	A/Lt	P	<i>Pinus strobus</i>	●●	agulhas	EUA	Broders <i>et al.</i> , 2015
<i>Therrya pini</i>	A/Lt	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Thielavia</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	Agulhas	India (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Thielavia terrestris</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Thielaviopsis basicola</i>	A/S	E	<i>Pinus roxburghii</i>	–		India (Himalaias)	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2015
<i>Thyronectria balsamea</i>	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Tricharina</i> spp.	A/P	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos,agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma atroviride</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichoderma erinaceum</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma hamatum</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma harzianum</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma polysporum</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	madeira	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Trichoderma velutinum</i>	A/S	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma viride</i>	A/S	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Trichoderma viride</i>	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichoderma viride</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Trichoderma viride</i>	A/S	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos com sintomas de declínio	Espanha	Botella <i>et al.</i> , 2010
<i>Trichothecium roseum</i>	A/S	S	<i>Pinus halepensis</i>	●●	plântula, sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Trichothecium roseum</i>	A/S	P	<i>Pinus nigra</i>	●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Trichothecium roseum</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas, pinhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Truncatella</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos, agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Truncatella angustata</i>	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	Ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Truncatella hartigii</i>	A/S	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Tryblidiopsis pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Tryblidiopsis pinastri</i>	A/Lt	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos, agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Typanis hypopodia</i>	A/Lt	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	Ramos, agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Ulocladium</i> sp.	A/P	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Valsa pini</i>	A/S	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos, rebentos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Whalleya microplaca</i>	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Whalleya microplaca</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylareacea</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Eo <i>et al.</i> , 2013
<i>Xylaria</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	xilema, casca	China	Wang & Guo, 2007
<i>Xylaria</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus halepensis</i>	●●	ramos e agulhas	Espanha	Botella & Diez, 2011
<i>Xylaria</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Xylaria</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos	Espanha	Sanz-Ros <i>et al.</i> , 2015
<i>Xylaria</i> sp.	A/S	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Xylaria</i> spp.	A/S	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	agulhas	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Xylaria acuta</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria apiculata</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria arbuscula</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria castorea</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Xylaria enteroleuca</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria hypoxilon</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria longipes</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylaria mali</i>	A/S	E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	agulhas	China	Guo <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylohypha pinicola</i>	A/-	S	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	madeira	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Armillaria mellea</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		troncos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Basidiomycetes sp.</i>	B	E	<i>Pinus nigra</i>	●●●	rebentos	Polónia	Kowalski & Zych, 2002
<i>Coleosporium sp.</i>	B/P	P	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Rep. Checa	Ivanová, 2015
<i>Coleosporium pini-pumila</i>	B/P	P	<i>Pinus pumila</i>	–	agulhas	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Coleosporium tussilaginis</i>	B/P	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cronartium flaccidum</i>	B/P	P	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	casca	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Cronartium ribicola</i>	B/P	P	<i>Pinus koraiensis</i> <i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sibirica</i> <i>Pinus strobus</i>		ramos	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Fomitopsis officinalis</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		tronco, ramos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Fomitopsis pinicola</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		tronco, ramos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Ganoderma applanatum</i>	B/A	P	<i>Pinus sibirica</i>	–	tronco, ramos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Heterobasidium annosum</i>	B/A	P	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	tronco	Espanha	Prieto-Recio <i>et al.</i> , 2012
<i>Heterobasidium annosum</i>	B/A	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Heterobasidium annosum</i>	B/A	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	raiz	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Hypholoma sp.</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Irpex hydnoides</i>	B/A	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Irpex lacteus</i>	B/A	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Laetiporus sulphureus</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		tronco, ramos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Melampsora pinitorqua</i>	B/P	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	rebentos	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
<i>Merulius tremellosus</i>	B/A	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Mucronella sp.</i>	B/A	E	<i>Pinus koraiensis</i>	●●●	superfície das folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Onnia triquetra</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		troncos, ramos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		troncos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phanerochaete sordida</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Phellinus chrysoloma</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		troncos, raízes	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phellinus hartigii</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		tronco, ramos	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phellinus pini</i>	B/A	P	<i>Pinus montana</i> <i>Pinus sibirica</i> <i>Pinus strobus</i> <i>Pinus sylvestris</i>	– – ●● ●●●	ramos	Rússia	Kuz' michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phellinus pini</i>	B/A	S	<i>Pinus nigra</i> <i>Pinus sylvestris</i>	●●● ●●●	madeira	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008

Fungo			Hospedeiro		Isolamento		Referência
Espécie (Gênero)	Divisão/Classe	Estatuto	Espécie	Grau de resistência a <i>B. xylophilus</i>	Orgão/Estrutura para isolamento	Local	
<i>Pholiota adiposa</i>	B/A	P	<i>Pinus spp.</i>		tronco, ramos, raízes	Rússia	Kuz'michev <i>et al.</i> , 2001
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Resinicium bicolor</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhizoctonia sp.</i>	B/A	E	<i>Pinus taeda</i>	●●	acículas	Brasil	Pimentel <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhizoctonia sp.</i>	B/A	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	árvores jovens	Finlândia	Lilja <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodotorula minuta</i>	B/M	E	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	rebentos	Finlândia	Pirttilla, A.M. <i>et al.</i> , 2003
<i>Schizophyllum commune</i>	B/A	E	<i>Pinus pinaster</i>	●●●	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
<i>Schizophyllum commune</i>	B/A	E	<i>Pinus densiflora</i>	●●●	folhas	Coreia do Sul	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Schizophyllum commune</i>	B/A	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	madeira	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Serpula himantioides</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	B/A	S	<i>Pinus banksiana</i>	●●	raiz	EUA	Potvin, L.R. <i>et al.</i> , 2012
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	B/A	S	<i>Pinus radiata</i>	●●	madeira	Nova Zelândia	Hood <i>et al.</i> , 2015
<i>Stereum hirsutum</i>	B/A	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Stereum sanguinolentum</i>	B/A	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Trametes versicolor</i>	B/A	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Tritirachium spp.</i>	B	E	<i>Pinus wallichiana</i>	●●	ramos	Índia (Himalaias)	Qadri <i>et al.</i> , 2014
<i>Gongronella butleri</i>	M/Mc	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Mortierella alpina</i>	M/Mt	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Mortierella globalpina</i>	M/M	P	<i>Pinus sylvestris</i>	●●●	ramos com sintomas de declínio	Itália	Giordano <i>et al.</i> , 2009
<i>Mucor sp.</i>	M/Mc	S	<i>Pinus nigra</i>	●●●	agulhas	Sérvia	Karadzic & Milasevic, 2008
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Mucor moelleri</i>	M/Mc	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Mucor kurssanovii</i>	M/Mc	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Mucor zonatus</i>	M/Mc	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Rhizopus spp.</i>	M/Mc	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	sementes	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Rhizopus spp.</i>	M/Mc	S	<i>Pinus eldarica</i>	–	plântula	Espanha	Soldevilla, 1995
			<i>Pinus pinaster</i>	●●●			
			<i>Pinus halepensis</i>	●●			
			<i>Pinus sylvestris</i>	●●●			
<i>Umbelopsis sp1</i>	M/U	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Umbelopsis sp2</i>	M/U	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	M/U	E	<i>Pinus thunbergii</i>	●●●	raiz	Coreia do Sul	Min <i>et al.</i> , 2014
Leveduras (#2)		E	<i>Pinus tabuliformis</i>	●●	xilema, agulhas	China	Wang & Guo, 2007

(a) Evans et al. (1996): – sem informação; ● resistente a *B. xylophilus*; ●● moderadamente suscetível a *B. xylophilus*; ●●● suscetível a *B. xylophilus*

Divisão/Classe	
<i>Ascomycota/Coelomycetes</i>	A/Co
<i>Ascomycota/Dothideomycetes</i>	A/D
<i>Ascomycota/Eurotiomycetes</i>	A/E
<i>Ascomycota/Lecanoromycetes</i>	A/Lc
<i>Ascomycota/Leotiomycetes</i>	A/Lt
<i>Ascomycota/Orbiliomycetes</i>	A/O
<i>Ascomycota/Pezizomycetes</i>	A/P
<i>Ascomycota/Sordariomycetes</i>	A/S
<i>Basidiomycota/Agaricomycetes</i>	B/A
<i>Basidiomycota/Microbotryomycetes</i>	B/M
<i>Basidiomycota/Pucciniomycetes</i>	B/P
<i>Mucoromycota/Mucoromycetes</i>	M/Mc
<i>Mucoromycota/Mortierellomycetes</i>	M/Mt
<i>Mucoromycota/Umbelopsidomycetes</i>	M/U

A – Modelo sem interação e sem o fator MEIO DE CULTURA

```
Call:
glm(formula = Presenca ~ L + ES + Nivel, family = binomial, data = Teste)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.5580  -0.4059  -0.2662  -0.0746   3.6441

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  0.2081    0.3585   0.580  0.56160
LG           0.6530    0.3661   1.784  0.07447 .
LM          -2.6630    0.6540  -4.072 4.66e-05 ***
ESS         -3.0079    0.4733  -6.355 2.09e-10 ***
NivelN2     -0.4191    0.4116  -1.018  0.30852
NivelN3     -1.1756    0.4406  -2.668  0.00763 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 319.21  on 323  degrees of freedom
Residual deviance: 208.86  on 318  degrees of freedom
AIC: 220.86
```

B – Teste χ^2

> anova(ModeloSemInterac, ModeloCompleto, test="Chi.sq")

Model 1: Presenca ~ L + ES + Nivel + MC

Model 2: Presenca ~ L * ES * Nivel * MC

Resid. Df Resid. Dev Df Deviance Pr(>Chi)

1 316 206.52

2 270 149.65 46 56.871 **0.1307**

Resid.	Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	316	206.52			
2	270	149.65	46	56.871	0.1307

> anova(ModeloSemInteracSemMC, ModeloCompleto, test="Chi.sq")

Model 1: Presenca ~ L + ES + Nivel

Model 2: Presenca ~ L * ES * Nivel * MC

Resid. Df Resid. Dev Df Deviance Pr(>Chi)

1 318 208.86

2 270 149.65 48 59.212 **0.1287**

Resid.	Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	318	208.86			
2	270	149.65	48	59.212	0.1287

C – Modelo sem interação e sem o fator NÍVEL

```
Call:
glm(formula = Soma ~ L + ES + MC, family = poisson, data = DadosSoma)

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-4.4202  -1.5493  -0.5951   0.8189   4.2265

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  2.20328    0.05700  38.653 < 2e-16 ***
LG          -0.33136    0.06870  -4.823 1.41e-06 ***
LM           0.07594    0.06165   1.232  0.218
ESS         -1.68941    0.07321 -23.075 < 2e-16 ***
MCM2         0.03637    0.06031   0.603  0.547
MCM3        -0.52952    0.07069  -7.491 6.83e-14 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 1810.99  on 323  degrees of freedom
Residual deviance:  950.08  on 318  degrees of freedom
AIC: 1710.6
```

ANEXO III – Lista de isolados depositados na Micoteca do INIAV, I.P. e respetiva proveniência – local e estado sanitário da árvore relativamente à DMP [árvore doentes (D) e árvore sãs (S)]

Código	táxon	Local de isolamento	Árvore D / S
1	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Comporta	D
2	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Madeira	S
3	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Madeira	S
4	<i>Aspergillus creber/ Aspergillus versicolor</i>	Madeira	S
5	<i>Penicillium citreonigrum</i>	Comporta	S
6	<i>Penicillium glabrum</i>	Comporta	S
7	<i>Penicillium buchwaldii</i>	Góis	S
8	<i>Penicillium melinii</i>	Góis	S
9	<i>Penicillium fellutanum</i>	Comporta	S
10	<i>Penicillium toxicarium</i>	Madeira	S
11	<i>Penicillium bialowiezense</i>	Góis	S
12	<i>Penicillium aurantiacobrunneum/ Penicillium miczynskii</i>	Góis	D
13	<i>Trichoderma atroviride</i>	Comporta	D
14	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Comporta	D
15	<i>Trichoderma melanomagnum</i>	Góis	D
16	<i>Ceratocystiopsis sp.</i>	Góis	D
17	<i>Graphilbum fragrans</i>	Góis	D
18	<i>Ophiostoma ips</i>	Comporta	D
19	<i>Sporothrix sp.</i>	Góis	D
20	<i>Hyphoderma setigerum</i>	Góis	D
21	<i>Peniophora pini</i>	Góis	D
22	<i>Peniophora rufomarginata</i>	Góis	D
23	<i>Trichaptum abietinum</i>	Góis	D
24	<i>Sistotrema sp.</i>	Góis	D
25	<i>Pucciniomycetes sp.</i>	Góis	S
26	<i>Stereum sanguinolentum</i>	Góis	D
27	<i>Fusarium lateritium</i>	Madeira	S
28	<i>Fusarium oxysporum</i>	Comporta	D
29	<i>Fusarium proliferatum</i>	Comporta	D
30	<i>Fusarium verticillioides</i>	Góis	D

(Cont.)

(Anexo III – cont.)

Código	táxon	Local de isolamento	Árvore D / S
31	<i>Acremonium charticola</i>	Góis	D
32	<i>Aequabiliella</i> sp.	Madeira	S
33	<i>Alternaria infectoria</i>	Comporta	S
34	<i>Beauveria bassiana</i>	Madeira	S
35	<i>Botrytis cinerea</i>	Góis	D
36	<i>Chaetomium</i> sp.	Madeira	S
37	<i>Cladosporium</i> sp. (isolado A)	Comporta	S
38	<i>Cladosporium</i> sp. (isolado B)	Madeira	S
39	<i>Curvularia</i> sp.	Comporta	S
40	<i>Epicoccum nigrum</i>	Góis	S
41	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	Góis	D
42	<i>Hormonema</i> sp.	Madeira	S
43	<i>Hypocreales</i> sp.	Góis	S
44	<i>Isaria farinosa</i>	Madeira	S
45	<i>Jattaea discreta</i>	Góis	D
46	<i>Lecythophora / Phialophora</i>	Góis	D
47	<i>Leotiomyces</i> (isolado A)	Comporta	S
48	<i>Leotiomyces</i> (isolado B)	Góis	S
49	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Góis	D
50	<i>Nectriaceae</i> sp.	Comporta	D
51	<i>Nectria balsamea</i>	Góis	D
52	<i>Paecilomyces</i> sp./ <i>Penicillium</i> sp.	Madeira	S
53	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Madeira	S
54	<i>Pezicula eucrita</i>	Góis	S
55	<i>Sarocladium strictum</i>	Comporta	D
56	<i>Sydowia polyspora</i>	Góis	D
57	<i>Talaromyces ruber</i>	Comporta	S
58	<i>Tolypocladium</i> sp.	Góis	S
59	<i>Umbelopsis isabellina</i>	Comporta	D
60	<i>Valsa</i> sp.	Góis	D
61	<i>Zythia pinastri</i>	Madeira	S