



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Efeito do nemátode do pinheiro no módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo

Filipa Cardoso Morais de Almeida Pico

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

Orientador: Doutor José Afonso Rodrigues Graça

Co-orientador: Doutor José António dos Santos

Júri:

Presidente: Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor José Afonso Rodrigues Graça, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor José Maria Santos Rodrigues Saporiti, Investigador Auxiliar do Laboratório Nacional de Engenharia Civil, I.P.;

Doutor Edmundo Manuel Rodrigues de Sousa, Investigador Auxiliar do Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Direção da Embar – Associação Nacional de Recuperação e Reciclagem de Resíduos e Embalagens de Madeira, José António Alberty, João Ferreira da Costa, Paulo Verdasca, Abel Pereira e Joaquim Santos, onde trabalho e que mais uma vez apostou na minha formação enquanto profissional, tendo suportado na íntegra as propinas da minha inscrição. Também lhes agradeço a confiança que senti depositarem em mim e os contactos profissionais que me proporcionaram e que me deram acesso às melhores condições para desenvolver este trabalho. Para a realização do trabalho propriamente dito, pude contar com a ajuda de muitas pessoas a quem gostaria, nos parágrafos seguintes, de mostrar o meu agradecimento.

Ao meu orientador Prof. Doutor José Graça do Departamento de Engenharia Florestal do Instituto Superior de Agronomia, pela disponibilidade para ser meu orientador e pelas sugestões e indicação do rumo correto a tomar.

Ao meu co-orientador, Doutor José António dos Santos, Investigador Principal do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), sempre acessível, paciente e disponível para a realização de muitas horas de ensaios no LNEG, cálculos e simulações para análise dos dados obtidos e interesse em que o trabalho chegasse a bom porto.

Ao Engenheiro Silvicultor Mário Tavares, Investigador Principal da Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais (UISPF) do Instituto Nacional Recursos Biológicos (INRB), I.P./INIA, pela amizade, generosidade e por todo o apoio dado no tratamento estatístico dos dados, pela disponibilização de bibliografia, pelas questões e dúvidas levantadas, pelas discussões, permanente apoio e revisão do trabalho.

Ao Doutor Edmundo Rodrigues de Sousa, Investigador e Coordenador da UISPF/L-INIA/INRB, I.P. tenho a agradecer a disponibilidade para que grande parte do trabalho se realizasse no INRB nomeadamente o delineamento da parte experimental, montagem dos ensaios de inoculação e pesquisa e quantificação de NMP. Da abertura para obter acesso a recursos, equipamentos, conhecimentos e técnicos especializados a que de outra forma eu não teria acesso.

Ao Engenheiro Silvicultor José Manuel Rodrigues o meu reconhecimento pela predisposição, interesse e tempo despendido na obtenção da madeira utilizada, desde a amostragem das árvores para seleção do material para os ensaios, à serragem e transporte da madeira com e sem NMP pela empresa ICIMAD - Indústria e Comércio Ibérico de Madeiras S.A. e ainda à revisão do trabalho.

Ao Doutor Pedro Duarte Naves, Investigador da UISPF/ L-INIA/ INRB, I.P., a minha gratidão pelo esclarecimento de dúvidas na montagem e acompanhamento das inoculações com NMP realizadas no INRB, bem como a revisão do trabalho.

À Prof. Doutora Isabel Maria de Oliveira Abrantes Prof. Catedrática do Instituto do Mar – Centro do Mar e Ambiente da Universidade de Coimbra, pela generosidade, bibliografia relevante e pela disponibilidade para revisão do trabalho.

Na da UISPF/ L-INIA do INRB, tenho ainda que agradecer ao técnico Sr. Adérito Matos pela acessibilidade, empenho e apoio nas montagens dos ensaios e preparações das amostras, à Engenheira Margarida Fontes pelo trabalho laboratorial ao Doutor Jorge Capelo, Investigador Auxiliar pelo esclarecimento de dúvidas relacionadas com o *software* STATISTICA, e ao Sr. Vítor Gonçalves pelo apoio na preparação de algumas amostras.

Ao Prof. Doutor Manuel Mota Prof. Auxiliar da Universidade de Évora, pela disponibilidade para leitura e comentários à parte do trabalho referente ao NMP.

À Eng.ª Isabel Carrasquinho, investigadora da UISPF/ L-INIA/ INRB, I.P. a bibliografia relevante para o tema do melhoramento genético florestal.

Por fim, agradeço à minha família que sempre me apoiou e incentivou no meu desejo de valorização profissional, em particular à minha Madrinha a revisão da totalidade do texto e ao meu Avô e Lynnéa a revisão do sumário em Inglês.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao Ricardo, meu marido, sempre calmo, paciente e compreensivo, a melhor pessoa e com quem posso contar sempre.

Resumo

Com o objetivo de conhecer eventuais efeitos do nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* nas propriedades mecânicas da madeira de pinheiro-bravo, *Pinus pinaster*, estudou-se o módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) e a massa volúmica em tábuas de madeira sã, madeira naturalmente infetada e madeira sã inoculada, ao longo de três meses.

O valor médio do NMP nas 15 tábuas estudadas de madeira infetada foi, no borne, de $49,45 \pm 57,99$ MNP/g ps, tendo-se verificado a inexistência de NMP no cerne. A madeira sã foi inoculada com reduzido sucesso, pois apenas 33% do número de tábuas se apresentou infetada, com uma $\mu \pm dp$ de apenas $7,91 \pm 14,85$ MNP/g ps.

As madeiras analisadas revelaram diferenças significativas entre os valores médios das massas volúmicas das madeiras sã ou inoculada - $0,54 \text{ g/cm}^3$ e o da madeira infetada - $0,63 \text{ g/cm}^3$. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre o valor médio do MOE da madeira sã - $7\,100 \text{ MPa}$ e o da infetada - $7\,451 \text{ MPa}$, nem entre os das madeiras sã ou inoculada - $6\,825 \text{ MPa}$. Assim, poderá concluir-se não existir evidência de que o NMP afete o MOE da madeira de pinheiro-bravo.

Palavras chave: Pinheiro-bravo; madeira serrada; nemátode da madeira do pinheiro; módulo de elasticidade à flexão estática; massa volúmica; doença da murchidão.

Summary

The goal of this work was to study the effect of pinewood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, in the mechanical properties of maritime pine wood, *Pinus pinaster*, assessed by the modulus of elasticity in bending (MOE) and wood density in boards of sound wood, naturally infected wood and artificially inoculated wood. Each treatment was characterized regarding PWN degree of infection, considering its number per unit of dry weight, studied for a period of three months of infection evolution.

The average of PWN in the 15 studied boards of infected wood was, in sapwood, $49,45 \pm 57,99$ MNP/g dw, with no PWN detected at heartwood. Sound wood inoculation was not very successful, as only 33 % of the number of boards was actually infected, with a $\mu \pm sd$ of $7,91 \pm 14,85$ MNP/g dw.

There were significant differences between the density of the sound or inoculated woods, $0,54 \text{ g/cm}^3$, and the infected wood, $0,63 \text{ g/cm}^3$. Nevertheless, no significant differences were found between the average MOE of sound wood, 7 100 MPa, and infected wood, 7 451 MPa, nor between the ones of sound or inoculated, 6 825 MPa.

Therefore, there is no evidence, that the infection with PWN affects the MOE of maritime pine wood.

Keywords: Maritime pine; sawn wood; pinewood nematode; modulus of elasticity in bending; density; pine wilt disease.

Summary

Maritime pine, *Pinus pinaster* Aiton, is one of the most important forest species in Portugal, not only for occupying 27% of the national forest area, $8,8 \times 10^5$ ha, but also for its economic relevance, with a production of “softwood sawn wood” of $9,2 \times 10^7$ € in 2009.

The pinewood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner e Buhrer, 1934) Nickle, 1970, is the causal agent of pine wilt disease that causes the death of pine trees. It is a quarantine organism in the European Union since 1976 (Directive 77/93/EEC) however its presence was first detected in Portugal and in Europe only in 1999. Following this situation, the movement of softwood has been regulated by the Commission Decision 2006/133/EC, amended by the Commission Decision 2006/993/EU and adapted to national regulations, *Decreto-Lei n.º 95/2011*, 8th August, obliging the treatment of all sawn wood. As maritime pine has been identified as the PWN susceptible species in Portugal, and foreseeing the possibility of using its wood, it has been decided to study the effect of PWN in some of its mechanical properties.

The goal of this work was to study the effect of PWN in the mechanical properties of maritime pine wood, assessed by the modulus of elasticity in bending (MOE). This was identified as a good indicator of rigidity and mechanical resistance, a relevant characteristic for wood in its most common uses, namely packaging and construction (Sanz *et al.*, 2007).

The methodology designed to answer these questions was the study of the MOE in three different treatments: sound wood, naturally infected wood and artificially inoculated wood. Simultaneously, wood density was studied, because it was considered as an important physical property used for the characterization of wood samples, and one of the factors known as influencing the MOE. Each treatment was characterized regarding PWN degree of infection, considering its number per unit of dry weight, studied for a period of three months of infection evolution.

The average of PWN in the 15 studied boards of infected wood was, in sapwood, $49,45 \pm 57,99$ MNP/g dw, with no PWN detected at heartwood. Sound wood inoculation was not very successful, as only 33 % of the number of boards was actually infected, with a $\mu \pm sd$ of $7,91 \pm 14,85$ MNP/g dw.

There were significant differences between the density of the sound or inoculated woods, $0,54 \text{ g/cm}^3$, and the infected wood, $0,63 \text{ g/cm}^3$. Nevertheless, no significant differences were found between the average MOE of sound wood, 7 100 Mpa, and infected wood, 7 451 MPa, nor between the ones of sound or inoculated, 6 825 MPa.

Therefore, there is no evidence, that the infection with PWN affects the MOE of maritime pine wood.

Keywords: Maritime pine; sawn wood; pinewood nematode; modulus of elasticity in bending; density; pine wilt disease.

Índice

Objetivos e Âmbito	1
Estado da arte	2
1 Pinheiro-bravo	2
1.1 A madeira de pinheiro-bravo: estrutura anatómica	4
1.2 Propriedades mecânicas: o módulo de elasticidade à flexão estática	7
1.2.1 Módulo de elasticidade	8
1.2.2 Fatores que afetam as propriedades mecânicas e o módulo de elasticidade	10
1.3 O módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo	13
2 Nemátode da madeira do pinheiro	14
2.1 Identificação e Biologia	15
2.1.1 Identificação	16
2.1.2 Biologia	17
2.2 Doença da murchidão do pinheiro	22
2.3 O NMP em Portugal	27
2.4 O NMP e as propriedades físico-mecânicas da madeira de pinheiro	29
2.5 Controlo da doença da murchidão do pinheiro	29
3 Material e Métodos	32
3.1 Seleção da madeira	33
3.2 Preparação das tábuas para os ensaios	35
3.2.1 Madeira sã	36
3.2.2 Madeira infetada com NMP	38
3.2.3 Madeira inoculada com NMP	38
3.3 Ensaios físicos e mecânicos	39
3.3.1 Preparação dos provetes	39
3.3.2 Teor de água da madeira	40
3.3.3 Massa volúmica	41
3.3.4 Módulo de elasticidade à flexão estática	41
3.4 Pesquisa e quantificação de NMP	42

3.5	Tratamento e análise estatística	44
4	Resultados e Discussão	45
4.1	Caracterização da madeira	46
4.1.1	Caracterização física e mecânica da madeira sã	46
4.1.2	Quantificação de NMP e caracterização física e mecânica da madeira infetada.....	47
4.1.3	Comparação entre as características físicas e mecânicas das madeiras sã e infetada	49
4.2	Efeitos da infeção com NMP	50
4.2.1	Evolução temporal na madeira infetada.....	50
4.2.2	Evolução temporal na madeira inoculada.....	54
4.3	Modelos estatísticos por tratamento.....	58
4.3.1	Madeira sã.....	58
4.3.2	Madeira infetada.....	63
4.3.3	Madeira inoculada	68
4.4	Modelo estatístico global	74
4.4.1	Modelação.....	75
5	Conclusões	80
6	Referências bibliográficas	82
ANEXO	87

Lista de Quadros

Quadro 1.1 Produção de “bens silvícolas” e de “madeira de resinosas para serrar” nas Contas Económicas da Silvicultura	3
Quadro 1.2 Funções que relacionam o MOE com a massa volúmica (ρ) de madeira de resinosas isenta de defeitos e com fio direito a diferentes teores de humidade	11
Quadro 1.3 MOE e sua relação com a massa volúmica para a madeira e outros materiais.....	13
Quadro 1.4 MOE e massa volúmica da madeira de algumas espécies de pinheiro a teor de água de 12%.....	13
Quadro 2.1 Sintomas externos e alterações internas observadas em pinheiros <i>P. thumbergii</i> jovens, inoculados com o nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	23
Quadro 3.1 Calendarização e n.º de amostras previstas para o trabalho experimental	33
Quadro 3.2 Re-calendarização do trabalho e número de amostras previstas para o trabalho experimental	34
Quadro 4.1 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) dos provetes de madeira sã.....	46
Quadro 4.2 Quantificação inicial de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas tábuas de madeira infetada	47
Quadro 4.3 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) dos provetes de madeira infetada.....	48
Quadro 4.4 Caracterização média ($\mu \pm dp$) da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e MOE do estado de referência da madeira sã e da madeira infetada, por repetição.....	49
Quadro 4.5 Caracterização média da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas amostras das tábuas de madeira infetada, nos três meses em estudo (A) e QNMP realizada nas três repetições (D1, D2 e D3) ao longo do tempo (B)	50
Quadro 4.6 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) nos provetes de madeira infetada, nos três meses em estudo (A), e valores médios das três repetições ao longo do tempo (B).....	52
Quadro 4.7 Caracterização média da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas amostras das tábuas de madeira inoculada durante o período em estudo (A) e QNMP realizada nas três repetições (A, B e C) ao longo do tempo (B).....	54
Quadro 4.8 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) nos provetes de madeira inoculada, nos três meses em estudo	57

Quadro 4.9 Modelo de regressão da massa volúmica função da distância ao centro da tábua (DC), proporção de borne (PB) e repetições (REP), para a madeira sã	59
Quadro 4.10 Modelo de regressão do MOE função do nível (NV) e repetições (REP), para a madeira sã	61
Quadro 4.11 Modelo de regressão da massa volúmica função da distância ao centro da tábua (DC), proporção de borne (PB) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), para a madeira infetada	63
Quadro 4.12 Modelo de regressão de quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função da massa volúmica (MV), para a madeira infetada.....	66
Quadro 4.13 Modelo de regressão da massa volúmica (MV) função da proporção de borne (PB) e repetições (REP), para a madeira inoculada	69
Quadro 4.14 Modelo de regressão do MOE função da proporção de borne da madeira recetora (PB) e repetições (REP), para a madeira inoculada	70
Quadro 4.15 Modelo de regressão da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função das repetições (REP), para a madeira inoculada	72
Quadro 4.16 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (MV) e MOE dos provetes de todos os tratamentos	74
Quadro 4.17 Caracterização biológica da amostra, borne das tábuas, de todos os tratamentos.....	74
Quadro 4.18 Modelo de regressão da massa volúmica (MV) função de proporção de borne (PB), quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), repetições (REP) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos	76
Quadro 4.19 Modelo de regressão do MOE função das repetições (REP) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos	77
Quadro 4.20 Modelo de regressão da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função de massa volúmica (MV) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos	78

Lista de Figuras

Figura 1.1 Distribuição do pinheiro-bravo na Bacia Mediterrânica	2
Figura 1.2 Produtos fabricados com madeira de pinheiro-bravo em Portugal.....	3
Figura 1.3 Disco de pinheiro-bravo, <i>Pinus pinaster</i>	4
Figura 1.4 Representação esquemática dos três planos fundamentais da madeira: transversal e longitudinal radial e tangencial	4
Figura 1.5 Estrutura anatómica de uma resinosa: a – lenho inicial, b – lenho final, c – raio fusiforme com canal de resina transversal, d – raio lenhoso unisseriado, e – canal de resina axial, f – traqueídeos radiais, g – células de parênquima.....	5
Figura 1.6 Secção radial de madeira do género <i>Pinus</i> com canal de resina radial ligado a canal de resina axial.....	5
Figura 1.7 Representação esquemática da estrutura de raios de uma resinosa: raio unisseriado e fusiforme	6
Figura 1.8 Representação esquemática de (a) secção transversal de uma pontuação areolada funcional (adaptado de Petty, 1970) e (b) pontuações areoladas unisseriadas na parede radial de traqueídeos de lenho inicial de uma resinosa.....	6
Figura 1.9 Representação dos três tipos de tensão a que a madeira pode ser submetida	7
Figura 1.10 Representação dos três tipos de tensões envolvidos na flexão da madeira	8
Figura 1.11 Relação carga-deformação, num ensaio de flexão estática em madeira	8
Figura 1.12 Esquemas de ensaio à flexão para determinação do módulo de elasticidade (a) flexão a três pontos (b) flexão a quatro pontos	9
Figura 1.13 Direção da aplicação da carga em relação à direção dos anéis de crescimento, 90° ou radial, 45° e 0° ou tangencial.....	10
Figura 2.1 Dispersão de NMP no Mundo	14
Figura 2.2 Nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	15
Figura 2.3 Fotografias de um isolado português de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> : (a) região anterior; (b) cauda do macho; (c) região vulvar; Bu, bursa; Cu, cucullus; VF, vulva com prega vulvar.....	16
Figura 2.4 Esquema representativo do ciclo de vida do nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , estádios propagativos e dispersivos	17
Figura 2.5 Ciclos propagativo e dispersivo do nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	18
Figura 2.6 Inseto vetor, <i>Monochamus galloprovincialis</i> e larva em galeria no interior da madeira	19
Figura 2.7 Relação entre os ciclos biológicos do NMP, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> , com o inseto vetor, <i>Monochamus galloprovincialis</i>	20

Figura 2.8 (a) Jovens dispersivos (J_{IV}) no corpo do inseto vetor, <i>Monochamus alternatus</i> (adaptado de Aikawa, 2008) e (b) no interior da traqueia de <i>M. galloprovincialis</i> adulto	20
Figura 2.9 Pupa na câmara pupal do inseto vetor, <i>Monochamus galloprovincialis</i> e vários orifícios de emergência do inseto vetor	21
Figura 2.10 Estrutura tridimensional de raminho de pinheiro.....	22
Figura 2.11 Canais de resina com nemátodes da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> – cortes transversal, axial e radial.....	23
Figura 2.12 Embolia nos traqueídeos do borne de pinheiro na presença de nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> e estrutura das pontuações areoladas	24
Figura 2.13 Distribuição do aparecimento de árvores com sintomas e do ciclo biológico do inseto vetor, <i>Monochamus galloprovincialis</i> ao longo do ano em Portugal.....	25
Figura 2.14 <i>Pinus pinaster</i> com sintomas da doença da murchidão do pinheiro e presença confirmada de NMP na “Herdade da Apostiça”, Portugal (Fevereiro de 2011).....	25
Figura 2.15 Reação de uma árvore hospedeira resistente e suscetível após a infeção com nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	26
Figura 2.16 Mapa com a localização e delimitação geográfica da zona de restrição e manchas críticas na península de Setúbal	28
Figura 2.17 Marca utilizada para comprovar a realização do tratamento fitossanitário numa embalagem de madeira.....	28
Figura 2.18 Exemplo de armadilha utilizada para o inseto vetor	30
Figura 3.1 Exemplo de árvores selecionadas, sem (a) e com sintomatologia (b) da doença da murchidão Aspeto de um local de colheita da amostra (c) e berbequim de amostra utilizado na colheita (d)	33
Figura 3.2 Localização geográfica dos povoamentos de pinheiro-bravo onde foram abatidas as árvores. (A) “Herdade da Apostiça”, Sesimbra e (B) Possanco, Alcácer do Sal.....	35
Figura 3.3 Rodela de toro de árvore infetada com NMP com feridas da resinagem (a) e pormenor de cerne dessa madeira com podridão alveolar/cardido (b)	35
Figura 3.4 Toros de árvores sãs selecionadas, serragem da madeira e tábuas obtidas	36
Figura 3.5 Representação esquemática da marcação das tábuas retiradas de cada toro e dos códigos atribuídos ao longo de cada tábua. Exemplo de marcação da tábua B para o tempo “zero”	36
Figura 3.6 Representação esquemática da metodologia seguida após entrada dos toros de madeira na serração – 3 toros de árvores sãs e 2 toros de uma árvore infetada com NMP	37
Figura 3.9 Inoculação através da sobreposição das tábuas dadora e recetora e colocação em câmara climatizada	38

Figura 3.7 Exemplo de marcação de tábua de madeira infetada com os códigos referentes ao tempo, árvore de origem e região do lenho (1DB3 e 1DC3)	38
Figura 3.8 Exemplo de marcação de tábua de madeira a inocular com os códigos referentes ao tempo, toro de origem e região do lenho (1BB, 1BC)	38
Figura 3.10 Fases de preparação dos provetes para realização dos ensaios físicos e mecânicos: (1) condicionamento, (2) aplainamento, (3) desengrosso e (4) serragem dos provetes	39
Figura 3.11 Localização radial dos provetes – distância ao centro da tábua	40
Figura 3.12 Esquema da montagem do ensaio a três pontos segundo a EN 408:2003	41
Figura 3.13 Equipamento “Instron” utilizado e exemplo da montagem realizada dos ensaios à flexão estática a três pontos com a distância entre apoios	41
Figura 3.14 Preparação da amostra: medidor do teor de água da madeira, separação do cerne e borne, corte em cubos e pesagem	42
Figura 3.15 Fases de extração, identificação e quantificação realizadas no INRB	43
Figura 4.1 Número de provetes utilizados nos ensaios físicos e mecânicos e número de amostras analisadas na quantificação de NMP, por tratamento e total	45
Figura 4.2 Aspeto das tábuas de madeira sã: (1) repetição A, (2) repetição B e (3) repetição C	50
Figura 4.3 Quantificação de nemátode de madeira do pinheiro (QNMP) no borne nas amostras das tábuas de madeira infetada; valores observados por repetição: – D1, o D2, X D3; • $\mu \pm dp$ (barras verticais)	51
Figura 4.4 Proвете do cerne de madeira infetada, com elevado teor de resina	52
Figura 4.5 Quantificação de nemátode de madeira do pinheiro (QNMP) no borne das amostras das tábuas de madeira inoculada; valores observados por repetição: – A, o B, X C (n=15)	54
Figura 4.6 Relação entre a quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira dadora (QNMPD) e recetora (QNMP), n=99 amostras (provetes)	55
Figura 4.7 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira sã (a sombreado variáveis não significativas)	59
Figura 4.8 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábua (DC) na madeira sã. • valores observados; • valores médios $\pm dp$ (barras verticais)	60
Figura 4.9 Variação da massa volúmica (MV) entre nível (NV), na madeira sã • valores observados; • valores médios $\pm dp$ (barras verticais)	60
Figura 4.10 Variação do MOE entre nível (NV), na madeira sã ■ valores observados; ■ valores médios \pm desvio padrão (barras verticais)	61
Figura 4.11 Variação do MOE com a distância ao centro da tábua (DC), na madeira sã; ■ valores observados; ■ valores médios \pm desvio padrão (barras verticais)	62

Figura 4.12 Variação do MOE com a massa volúmica (MV) e proporção de borne (PB), na madeira sã	62
Figura 4.13 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira infetada (a sombreado variáveis não significativas)	63
Figura 4.14 Variação da massa volúmica (MV) com a proporção de borne (PB) na madeira infetada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes	64
Figura 4.15 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábu (DC) na madeira infetada (a) amostra com provetes com proporção de borne>0; (b) amostra com todos os provetes • valores observados; • $\mu \pm dp$ (barras verticais) de todas repetições	65
Figura 4.16 Variação do MOE com a quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), massa volúmica (MV), distância ao centro da tábu (DC) e proporção de borne (PB), na madeira infetada	66
Figura 4.17 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) com a massa volúmica (MV) e com a distância ao centro da tábu (DC), na madeira infetada	67
Figura 4.18 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira inoculada (a sombreado variáveis não significativas)	68
Figura 4.19 Variação da massa volúmica (MV) com a proporção de borne (PB) na madeira inoculada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes	69
Figura 4.20 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábu (DC) e nível (NV), na madeira inoculada	70
Figura 4.21 Variação do MOE com a proporção de borne (PB) na madeira inoculada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes	71
Figura 4.22 Variação do MOE com a distância ao centro da tábu (DC), massa volúmica (MV), quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira recetora (QNMP) e dadora (QNMPD), e proporção de borne da madeira dadora (PBD), na madeira inoculada	72
Figura 4.23 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira recetora (QNMP) com o nível (NV), distância ao centro da tábu (DC), massa volúmica (MV), proporção de borne da madeira recetora (PB) e dadora (PBD) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira dadora (QNMPD), na madeira inoculada	73
Figura 4.24 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira de todos os tratamentos (a sombreado variáveis não significativas)	75

Figura 4.25 Relação da massa volúmica (MV) com o nível (NV) e a distância ao centro da tábua (DC), em todos os tratamentos	77
Figura 4.26 Variação da MOE com a nível (NV), distância ao centro da tábua (DC), massa volúmica (MV), proporção de borne (PB) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), em todos os tratamentos	78
Figura 4.27 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) com o nível (NV), distância ao centro da tábua (DC) e proporção de borne (PB) e tempo (TMP), em todos os tratamentos.....	79

Lista de abreviaturas

β – coeficiente estandardizado do modelo de regressão
 μ – média
 μm – micrómetro
ADN – ácido desoxirribonucleico
AFN – Autoridade Florestal Nacional
AIFF – Associação para a Competitividade das Indústrias da Fileira Florestal
ANOVA – análise de variância
cm – centímetro
D – estatística do teste de *Kolmogorov-Smirnov*
DAP – Diâmetro à altura do peito
DC – variável distância ao centro da tábua
DGADR - Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
dp – desvio-padrão
dw – dry weight
E – módulo de elasticidade
e.g. – *exempli gratia*
EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization
F – estatística do teste da ANOVA
FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
g – grama
gl – graus de liberdade (*degrees of freedom*)
INE – Instituto Nacional de Estatística
INRB - Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.
ISPM 15 - Norma Internacional para as Medidas Fitossanitárias n.º 15 da FAO
LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.
min – minuto
ml - mililitro
mm – milímetro
MOE – módulo de elasticidade à flexão estática
MPa – mega Pascal
MV – variável massa volúmica
n – grandeza da amostra
NMP - nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner e Buhner, 1934) Nickle, 1971
NV – variável nível
p – probabilidade ou nível de significância
PB – variável proporção de borne
PBD – variável proporção de borne da madeira dadora
ps – peso seco
PSF - ponto de saturação das fibras
QM – quadrados médios (*mean square*)
QNMP – variável quantificação de nemátode da madeira do pinheiro
QNMPD – variável quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira dadora
 R^2 – coeficiente de determinação
REP – variável repetições
REPA – variável repetição A
REPB – variável repetição B
REPC – variável repetição C
s – segundo
SW-W – estatística do teste de *Shapiro-Wilk*
TINF – variável tratamento infetada
TINOC – variável tratamento inoculada
TMP – variável tempo
TSA – variável tratamento sã
TT – variável tratamentos
 ρ – massa volúmica

Objetivos e Âmbito

O pinheiro-bravo, *Pinus pinaster* Aiton, é a espécie florestal mais abundante em Portugal, ocupando uma área de $8,8 \times 10^5$ ha, 27% da área florestal nacional, representando um volume de madeira em pé de $8,5 \times 10^7$ m³ (AFN, 2010). A sua importância económica também é relevante pois, em 2009, a produção de “madeira de resinosas para serrar” atingiu um total de $9,2 \times 10^7$ €, perto de 14 % do valor nacional português de produtos florestais (INE, 2011).

O nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner e Buhrer, 1934) Nickle, 1970, é o agente causal da doença da marchidão dos pinheiros, doença que provoca a morte das árvores. O NMP é um organismo de quarentena da União Europeia (Diretiva 77/93/CEE) e foi detetado pela primeira vez em Portugal e na Europa em 1999 (Mota *et al.*, 1999).

A Decisão da Comissão n.º 2006/133/CE, de 13 de Fevereiro, alterada pela Decisão da Comissão n.º 2009/993/UE, de 17 de Dezembro, e o Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto, obrigam ao tratamento de toda a madeira de coníferas para posterior utilização como madeira maciça. Contudo, em Portugal o NMP tem como único hospedeiro conhecido o pinheiro-bravo.

Perante a possibilidade de utilização industrial de madeira de pinheiro-bravo infetada pelo NMP e devido à reduzida informação disponível em bibliografia, decidi estudar-se o efeito do NMP em algumas propriedades mecânicas da madeira.

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito do NMP nas propriedades mecânicas da madeira, avaliadas pelo módulo de elasticidade à flexão estática. Esta propriedade mecânica foi escolhida por ser um bom indicador da rigidez e resistência mecânica da madeira, característica que tem implicações diretas nas utilizações mais frequentes, em embalagem e na construção (Sanz *et al.*, 2007), e ainda por recorrer a um método de ensaio não destrutivo.

O plano de trabalhos delineado para alcançar tal objetivo incidiu no estudo do módulo de elasticidade à flexão estática, em três tratamentos distintos: madeira sã, madeira naturalmente infetada com NMP e madeira inoculada com NMP. Em paralelo e de forma acessória foi também estudada a massa volúmica pois foi utilizada para caracterizar as amostras e é apontada como um dos fatores que afetam o módulo de elasticidade à flexão estática. Cada tratamento foi caracterizado quanto à infeção de NMP, através da sua quantificação em número de NMP por unidade de peso seco (n.º/g ps), tendo-se estudado a sua variação ao longo de três meses.

Estado da arte

Inicialmente, apresentam-se as características da madeira de pinheiro-bravo, estrutura anatómica e propriedades físicas e mecânicas, através do comportamento à flexão estática – módulo de elasticidade. Em seguida, a biologia do nemátode da madeira do pinheiro (NMP), os efeitos desta doença da murchidão do pinheiro ao nível da árvore, incluindo os impactes nas propriedades mecânicas e a situação em Portugal.

1 Pinheiro-bravo

O pinheiro-bravo, *Pinus pinaster* Aiton, é uma espécie florestal pertencente à divisão das Gimnospermas e à ordem das Coníferas, e encontra-se num grupo botânico comumente designado por Resinosas. Esta espécie encontra-se distribuída pela costa Atlântica portuguesa, espanhola e francesa e pela bacia mediterrânica (Figura 1.1).

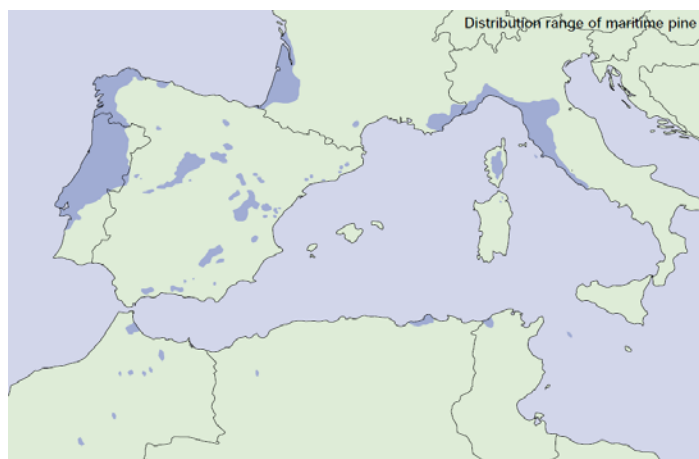


Figura 1.1 Distribuição do pinheiro-bravo na Bacia Mediterrânica (adaptado de Alía e Martín, 2003)

Em Portugal, o pinhal bravo ocupa uma área de $8,8 \times 10^5$ ha, com diversos tipos de povoamentos (puros, mistos dominantes, mistos dominados, jovens puros/dominantes e dispersos), e representa um volume de $8,5 \times 10^7$ m³ de madeira em pé (AFN, 2010).

De acordo com os dados publicados no 5º Inventário Florestal Nacional, baseado em trabalhos de campo de 2005 e 2006, Portugal tem uma área

florestal de $3,46 \times 10^6$ ha, 39 % da ocupação do solo, e o pinheiro-bravo é a espécie mais representada, ocupando 27% desse território (AFN, 2010). A comparação destes dados com o inventário anterior, realizado entre 1995 e 1998, mostra que a área ocupada por esta espécie sofreu uma variação negativa de cerca de 9 % em 10 anos, a que correspondeu um decréscimo de $9,1 \times 10^4$ ha (AFN, 2010).

A análise da “Produção de Bens Silvícolas” nas “Contas Económicas da Silvicultura” (INE, 2011), permite constatar a importância económica da madeira desta espécie em Portugal. Os dados provisórios publicados acerca da produção de “madeira de resinosas para serrar”, fundamentalmente pinheiro-bravo, referentes a 2009, apontam um valor total de $9,2 \times 10^7$ € (Quadro

1.1). Este valor representa cerca de 14 % do valor da produção nacional de “bens silvícolas” (INE, 2011 e INE, 2000).

Quadro 1.1 Produção de “bens silvícolas” e de “madeira de resinosas para serrar” nas Contas Económicas da Silvicultura (adaptado de INE, 2011)

Contas Económicas da Silvicultura	Produção (10 ⁶ €)*				
	1995	2000	2005	2008	2009**
Produção de bens silvícolas	528	996	693	726	664
Madeira de resinosas para serrar	154	220	115	98	92

* valores a preços correntes ** valores provisórios

A observação dos valores do Quadro 1.1 permite constatar, que à semelhança da área ocupada por esta espécie se verificou também um decréscimo da produção em valor. A evolução da “madeira de resinosas para serrar” teve um ponto máximo no ano 2000, tendo-se verificado um decréscimo abrupto nos dois anos subsequentes (INE, 2011). Contudo, os anos de 2008 e 2009 são precisamente aqueles em que as diminuições observadas são mais evidentes, com um decréscimo de cerca 6 % em valor. Para esta evolução terão concorrido o abrandamento e contração da atividade económica, bem como a desvalorização da madeira de pinheiro-bravo fruto dos problemas relacionados com o NMP e consequentes restrições à exportação (INE, 2011), para além dos incêndios ocorridos em 2003 e 2004.

As principais utilizações industriais da madeira maciça de pinheiro-bravo, em Portugal, são: embalagens, construção, mobiliário, postes, carpintaria e outros produtos (Sanz *et al.*, 2007), com a distribuição representada na Figura 1.2.

Para além das suas aplicações industriais, existem outras de mais difícil quantificação económica associadas ao espaço florestal, mas nem por isso menos importantes, de que são exemplo as atividades de apicultura, caça, produção de cogumelos ou resinagem, atividades que continuam a contribuir para o desenvolvimento dos espaços rurais (Fernandes *et al.*, 2007).

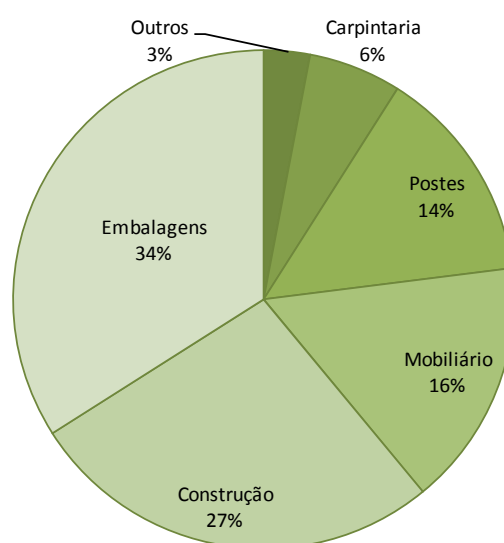


Figura 1.2 Produtos fabricados com madeira de pinheiro-bravo em Portugal (adaptado de Sanz *et al.*, 2007)

1.1 A madeira de pinheiro-bravo: estrutura anatómica

Macroscopicamente, a madeira de pinheiro-bravo apresenta geralmente borne e cerne, ambos com anéis de crescimento distintos (camadas de crescimento ou anéis anuais) e a medula no centro (Figura 1.3).

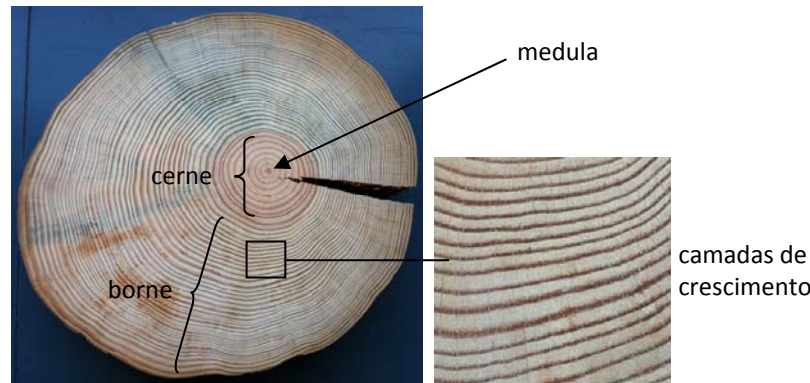


Figura 1.3 Disco de pinheiro-bravo, *Pinus pinaster*

Em termos da sua estrutura, a madeira é geralmente estudada considerando três planos fundamentais perpendiculares entre si: um transversal e dois longitudinais. O plano transversal é perpendicular ao eixo do tronco e os planos longitudinais, radial e tangencial, paralelos a ele. O plano radial é aquele que inclui a medula passando no centro da secção transversal e o plano tangencial é tangente aos anéis de crescimento (Figura 1.4) (Carvalho, 1996).

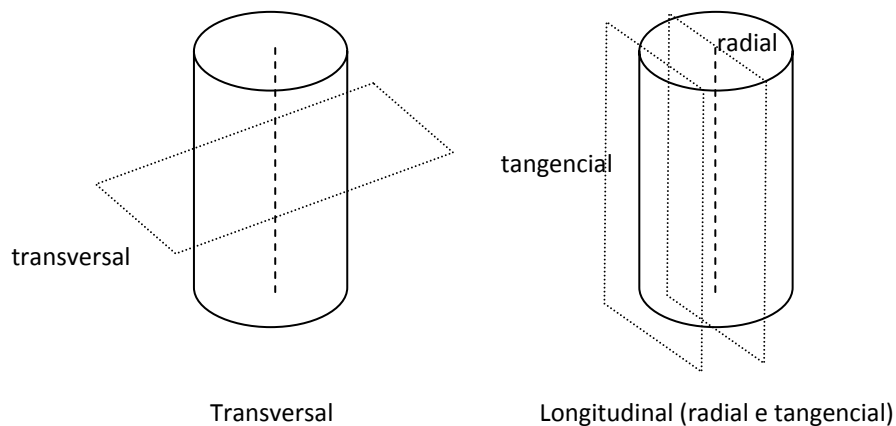


Figura 1.4 Representação esquemática dos três planos fundamentais da madeira: transversal e longitudinal radial e tangencial

Quanto à sua estrutura anatómica, a madeira de pinheiro-bravo (Figura 1.5) é constituída quase exclusivamente por traqueídeos axiais, um tipo de elementos celulares que tem a dupla função de suporte mecânico e transporte. Estas células, apresentam entre 2 a 5 mm de comprimento e 10 a 80 μm de largura, e encontram-se ligadas entre si pela lamela média constituída essencialmente por lenhina (Carvalho, 1996).

A orientação dos traqueídeos axiais em relação ao eixo do tronco é designada por fio da madeira.

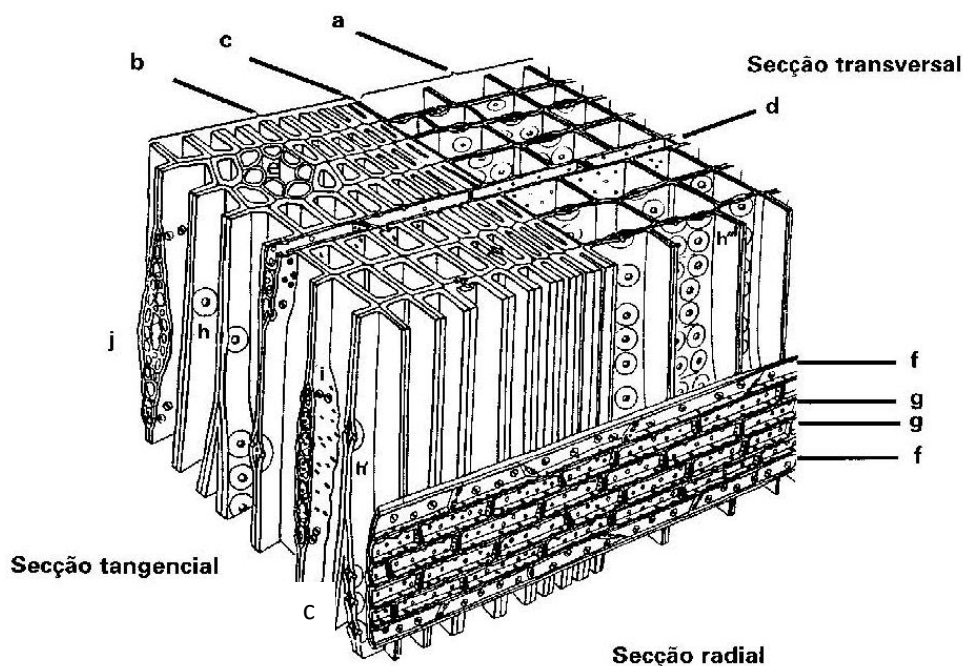


Figura 1.5 Estrutura anatômica de uma resinosidade: a – lenho inicial, b – lenho final, c – raio fusiforme com canal de resina transversal, d – raio lenhoso unisseriado, e – canal de resina axial, f – traqueídeos radiais, g - células de parênquima (adaptado de Carvalho, 1996)

Os anéis de crescimento visíveis na madeira de pinheiro-bravo (Figura 1.3) devem-se à alternância da espessura das paredes celulares dos traqueídeos axiais observadas no plano transversal. Estes conjuntos de células de paredes celulares, menos espessas e mais espessas, designam-se respetivamente por lenho inicial, ou de princípio de estação e lenho final, ou de fim de estação (Figura 1.5).

Os canais de resina, axiais e transversais, são espaços intercelulares criados pela separação de células de parênquima formadas recentemente pelo câmbio (Evert, 2006). Estes canais encontram-se rodeados por células epiteliais que produzem resina. Os canais de resina axiais estão em contacto com os canais de resina transversais existindo aberturas nesses locais de contacto (Figura 1.6).

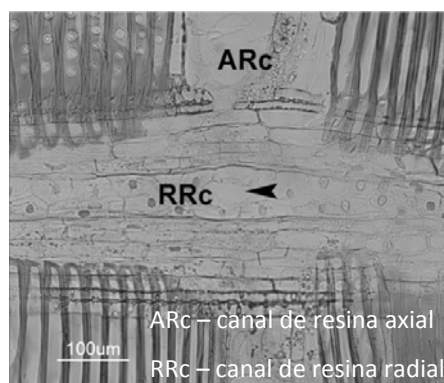


Figura 1.6 Secção radial de madeira do género *Pinus* com canal de resina radial ligado a canal de resina axial (adaptado de Zhang *et al.*, 2008)

No pinheiro-bravo, os canais de resina axiais são numerosos e grandes, com 200 a 300 µm de diâmetro quando vistos no plano transversal, circundados por células epiteliais de paredes finas, encontrando-se sobretudo localizados na zona de transição do lenho inicial para o lenho final (Carvalho, 1997).

As células de parênquima radial (Figura 1.5) desempenham um papel importante na acumulação de assimilados sob a forma de grãos de amido, no metabolismo secundário e na acumulação de resíduos eventualmente tóxicos para a árvore,

podendo viver mais de 10 anos (Hillis, 1987). Estas células encontram-se dispostas em raios lenhosos e rodeando os canais de resina radiais. Não se verifica a existência de parênquima axial no pinheiro-bravo (Carvalho, 1996).

Os raios lenhosos têm uma posição ortogonal em relação aos traqueídeos axiais e no pinheiro-bravo são heterogêneos, unisseriados ou fusiformes (Carvalho, 1997). Estes últimos contêm um canal de resina transversal, de diâmetro inferior ao dos canais axiais, e para além das células de parênquima radial, apresentam traqueídeos marginais abundantes – traqueídeos radiais (Figura 1.7).

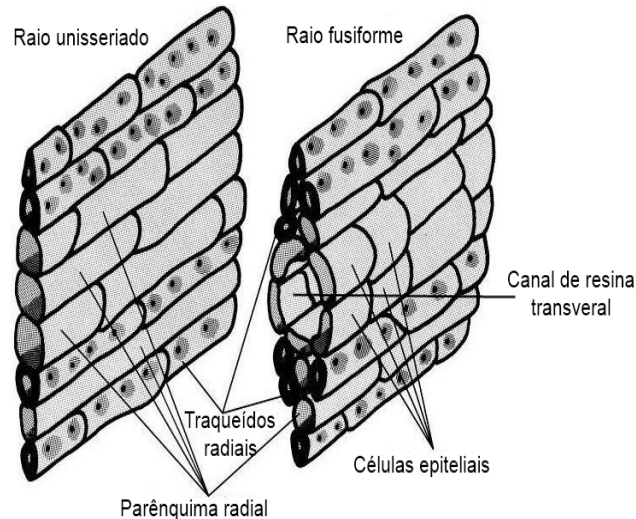


Figura 1.7 Representação esquemática da estrutura de raios de uma resinoso: raio unisseriado e fusiforme (adaptado de Bowyer *et al.*, 2007)

A comunicação entre os traqueídeos é efetuada através de pontuações areoladas (Figura 1.8). No pinheiro-bravo as pontuações areoladas são unisseriadas e encontram-se presentes na parede radial dos traqueídeos de lenho inicial, e excecionalmente também nas paredes tangenciais do lenho final (Figura 1.8). Por seu lado, a comunicação entre os traqueídeos e as células dos raios é realizada nos designados campos de cruzamento com 1 a 4 pontuações pinóides (Carvalho, 1997).

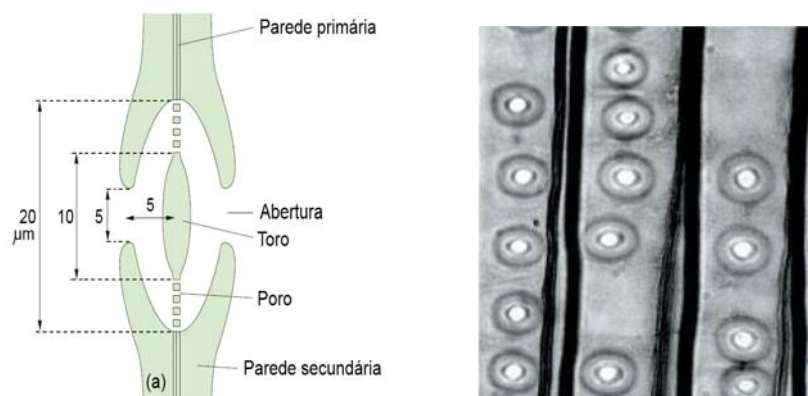


Figura 1.8 Representação esquemática de (a) secção transversal de uma pontuação areolada funcional (adaptado de Petty, 1970) e (b) pontuações areoladas unisseriadas na parede radial de traqueídeos de lenho inicial de uma resinoso (adaptado de Bruce, 1990)

1.2 Propriedades mecânicas: o módulo de elasticidade à flexão estática

As propriedades mecânicas de um material referem-se à sua resistência à aplicação de forças (ou cargas) exteriores, medidas através da quantidade de material que é comprimido, distorcido ou dobrado com a aplicação de determinada carga (Bowyer *et al.*, 2007). Na Figura 1.9, estão representados os três tipos principais de tensões a que a madeira pode ser submetida: tração, compressão e corte. A madeira é um material anisotrópico e apresenta variação das suas propriedades, em função da direção considerada – axial, radial ou tangencial (ver 1.2.2).

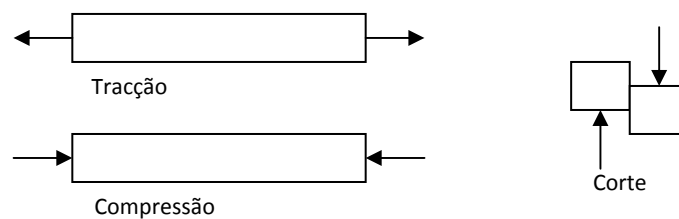


Figura 1.9 Representação dos três tipos de tensão a que a madeira pode ser submetida (adaptado de Tsoumis, 1991)

As tensões são medidas em unidades de pressão, da força aplicada por unidade de área, como é o caso do Pascal (Pa), a unidade de pressão do Sistema Internacional. As tensões de tração e compressão manifestam-se pela alteração da forma e dimensão por deformação do corpo, onde é aplicada a força, e que geralmente se mede em milímetros (mm). Por outro lado, a tensão de corte deriva da tendência para deslizamento entre planos, ou seja, de uma parte da madeira em relação a uma parte adjacente da própria madeira (Tsoumis, 1991; Santos, 2007).

Na madeira, tal como em outros materiais, verificam-se deformações elásticas que ocorrem momentaneamente durante a aplicação de uma carga, verificando-se a recuperação da forma e dimensões iniciais após a retirada da carga exterior (Santos, 2007). Na zona de deformação elástica, a relação entre a aplicação da carga e a deformação é linear até um valor máximo de carga – limite de proporcionalidade (Figura 1.11) – valor a partir do qual deixa de haver proporcionalidade e parte da deformação passa a ser permanente (Tsoumis, 1991).

A elasticidade é uma característica importante da madeira e é medida pelo módulo de elasticidade, que permite estimar a deformação esperada em determinadas condições de carga. A maior ou menor deformação por flexão é designada por rigidez, existindo uma estreita correlação entre a rigidez e a resistência à rutura à flexão. A valores elevados de rigidez corresponde uma fraca deformação aquando da aplicação de uma carga, sendo portanto um indicador de que o material se encontra dentro de margens elevadas de segurança para utilização, por exemplo, na construção (Santos, 2007).

Nos ensaios à flexão estática, realizados para determinação do módulo de elasticidade da madeira, estão envolvidos os três tipos básicos de tensões: tração, compressão e corte (Figura 1.10).

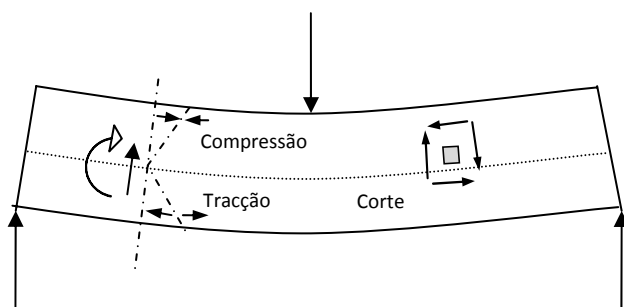


Figura 1.10 Representação dos três tipos de tensões envolvidos na flexão da madeira (adaptado de Santos, 2007)

A rigidez é uma das características mais importantes e decisivas para o dimensionamento de componentes em madeira, em particular nos usos estruturais. Assim, a avaliação do módulo de elasticidade pode servir como método de avaliação não destrutiva da qualidade, pois a madeira com defeitos interiores ou degradação sofre uma perda abrupta de rigidez (Santos, 2007).

1.2.1 Módulo de elasticidade

O módulo de elasticidade (E), também designado por módulo de *Young*, é definido como a relação entre a carga aplicada e a deformação unitária resultante, na zona elástica de proporcionalidade (Figura 1.11 b).

A zona b da Figura 1.11 refere-se ao local da curva onde o declive tem um valor constante, ou seja, onde há proporcionalidade entre o valor da carga aplicada e a deformação resultante. Neste intervalo, quanto maior o valor de E maior é a carga necessária para provocar uma determinada deformação (Bowyer *et al.*, 2007). Na maioria dos materiais estruturais, incluindo a madeira, a zona de proporcionalidade é a zona segura, pois é regra que ao retirar a carga a deformação diminui também proporcionalmente (Santos, 2007).

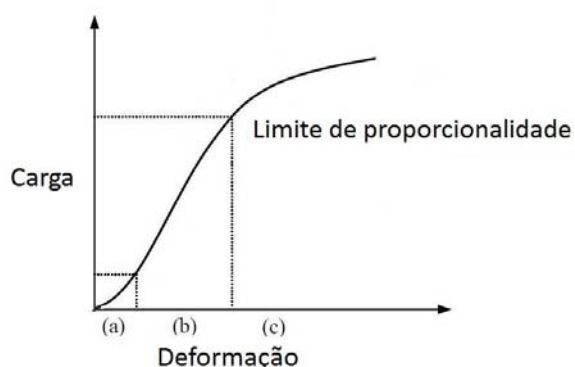


Figura 1.11 Relação carga-deformação, num ensaio de flexão estática em madeira (adaptado de Santos, 2007)

Determinação do módulo de elasticidade à flexão estática

O E de um material pode determinar-se em ensaios à flexão, estática ou dinâmica, ensaios de compressão ou ensaios de tração. Contudo, o E à flexão da madeira, ao contrário de outros materiais, difere do E à compressão e à tração (Santos, 2007). Assim, a forma de determinar o E na madeira, em condições muito semelhantes às da utilização real do material, faz-se recorrendo a ensaios à flexão estática (Santos, 2007).

Os ensaios à flexão estática, encontram-se definidos em normas internacionais (ISO – *International Organization for Standardization*), europeias (EN – *European Standards*), americanas (ASTM – *American Society for Testing and Materials*) e britânicas (BS – *British Standard*), permitindo a comparação dos valores obtidos entre amostras de uma mesma espécie e entre espécies florestais distintas. A título de exemplo:

- Europeia: EN 408:2003 - *Timber structures. Structural timber and glued laminated timber. Determination of some physical and mechanical properties*
- Americana: ASTM D 143 - *Standard Test Methods for Small Clear Specimens of Timber.*
- Britânica: BS 373:1957 - *Methods of testing small clear specimens of timber.*

Nestas normas, são definidas, entre outras, as condições e metodologias de ensaios, caracterização das amostras: humidade, massa volúmica e presença de defeitos, e preparação dos provetes (ver 3.3).

Nas referidas normas, EN 408, ASTM D 143 e BS 373, são apresentadas duas formas de realização do ensaio de flexão para determinação do E : aplicação de uma carga central com flexão a três pontos, ou aplicação de duas cargas entre apoios com flexão a quatro pontos (Figura 1.12).

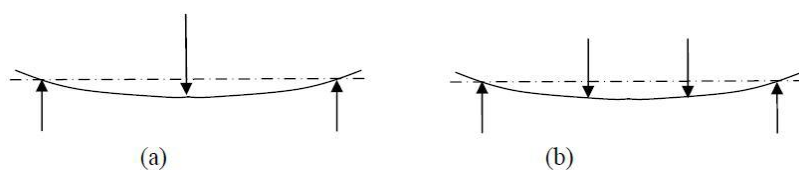


Figura 1.12 Esquemas de ensaio à flexão para determinação do módulo de elasticidade (a) flexão a três pontos (b) flexão a quatro pontos (adaptado de Santos, 2007)

Nas normas EN 408, ASTM D 143 e BS 373, o ensaio da flexão a três pontos é utilizado para o cálculo do módulo aparente de elasticidade (MOE) e a flexão a quatro pontos para o módulo global de elasticidade (E).

A opção por uma das duas formas de ensaio está relacionada com a necessidade de precisão dos resultados, pois o ensaio a três pontos é mais simples e prático de realizar, mas menos próximo das condições reais que o ensaio a quatro pontos. No ensaio a quatro pontos, a região entre as duas cargas centrais tem condições mais representativas do conjunto da peça no caso de materiais heterogéneos e com defeitos, como é a madeira, enquanto no ensaio a três pontos se avalia o material numa zona muito localizada, junto à aplicação da carga central (Santos, 2007).

No entanto, mesmo a norma BS 373 indica que a utilização do ensaio a três pontos é suficiente para uma análise comparativa entre espécies e entre a madeira e outros materiais.

Os resultados destes ensaios, de cargas aplicadas e deformação, são utilizados para determinação de uma reta (regressão linear) e posterior cálculo do MOE conforme será explanado no 3.3.4.

1.2.2 Fatores que afetam as propriedades mecânicas e o módulo de elasticidade

A madeira é um material biológico anisotrópico que apresenta variação das suas propriedades, em função da direção considerada, e o seu comportamento à flexão estática não é exceção pois está diretamente relacionado com a direção do fio e outros defeitos (Bowyer *et al.*, 2007).

Os valores obtidos para as diferentes propriedades mecânicas, incluindo o E , variam por vezes consideravelmente entre amostras de espécies diferentes, árvores da mesma espécie e até entre provetes numa mesma árvore (Carvalho, 1996). Ensaios realizados com madeira de 50 espécies florestais diferentes apontam um valor médio de variação do E de cerca 22% (FPL, 2010).

O valor do E determinado na direção axial, i.e. paralelo ao fio da madeira, é entre 8 a 20 vezes superior ao determinado no plano transversal (Tsoumis, 1991). Em relação às variações existentes no plano transversal (Figura 1.13), na maioria das espécies florestais a direção da aplicação da carga entre 0°, direção tangencial, ou 45°, não implica variações significativas no MOE determinado. Caso a carga seja aplicada a 90°, direção radial, o MOE geralmente apresenta valores ligeiramente superiores aos determinados para os 0° e 45° (quando estes valores são semelhantes entre si) (FPL, 2010).

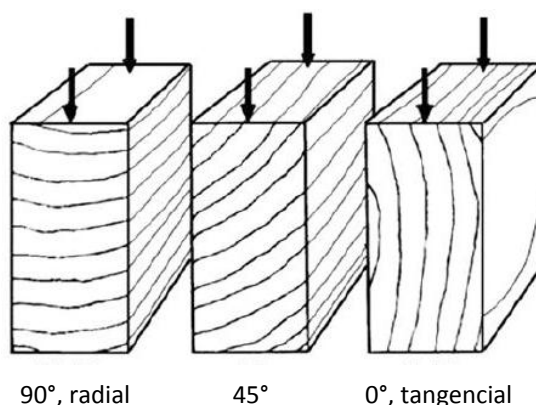


Figura 1.13 Direção da aplicação da carga em relação à direção dos anéis de crescimento, 90° ou radial, 45° e 0° ou tangencial (adaptado de FPL, 2010)

As propriedades mecânicas da madeira são afetadas por vários fatores, mas principalmente pelo teor de água, pela massa volúmica, presença de defeitos e de degradação provocada por fatores externos (Tsoumis, 1991).

Teor de água

A madeira é um material higroscópico e apresenta variações do teor de água em função das condições de temperatura e humidade relativa do ar. Caso as condições de temperatura e humidade relativa do ar sejam constantes durante um período de tempo suficiente, a madeira perde ou ganha água, dependendo da sua humidade inicial, atingindo um teor de humidade de equilíbrio.

A água na madeira está presente em duas formas, no estado líquido nas paredes celulares – água ligada ou de embebição – e no estado líquido ou de vapor nos lúmens das células – água livre (Tsoumis, 1991). Quando as paredes celulares estão saturadas de água e não existe água nos lúmenes das células atinge-se o ponto de saturação das fibras (PSF). É abaixo deste teor de água, correspondente ao PSF (cerca de 30%), que as propriedades mecânicas da madeira são afetadas. Quando o teor de água diminui aumenta a resistência e vice-versa (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 Funções que relacionam o MOE com a massa volúmica (ρ) de madeira de resinosas isenta de defeitos e com fio direito a diferentes teores de humidade

Propriedade em ensaios à flexão estática	Relação com a massa volúmica (ρ)	
	Madeira verde	Teor de água de 12 %
MOE (MPa)	$16\,100 \rho^{0,76} \text{ (*)}$	$20\,500 \rho^{0,84} \text{ (*)}$
	-	$21\,580 \rho^{(**)}$

(*) FPL (2010) e (**) Bowyer *et al.* (2007)

No Quadro 1.2 é possível verificar que o MOE da madeira verde é inferior ao MOE de madeira com um teor de água de 12% para a mesma massa volúmica.

Esta variação é explicada pelas alterações provocadas ao nível das paredes celulares que se tornam mais compactas devido a um aumento da força das ligações intermoleculares das moléculas de celulose (Tsoumis, 1991).

As diferentes propriedades mecânicas variam de forma diferente, e no caso específico do MOE à flexão, uma variação de 1% no teor de água da madeira altera o valor do MOE em cerca de 2%. Existem equações que permitem corrigir o valor medido da propriedade para diferentes teores de água (Tsoumis, 1991).

Massa volúmica

A massa volúmica da madeira é medida pela razão entre a sua massa e o volume respetivo, e expressa-se geralmente em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3). Os valores da massa volúmica de uma madeira variam essencialmente com seu teor de água, a estrutura e a composição química. A um aumento do teor de água da madeira corresponde um acréscimo da sua massa volúmica. Em valores aproximados, a cada 1% de aumento do teor de água corresponde um incremento de 0,5% da sua massa volúmica (Tsoumis, 1991).

A relação da estrutura de uma madeira com a sua massa volúmica deve-se à relação entre os seus principais constituintes, as paredes celulares e as cavidades celulares (lúmens e outros espaços). A massa volúmica dos materiais que constituem a parede celular é praticamente constante e tem o valor aproximado de $1,50 \text{ g/cm}^3$ ps. Logo, a massa volúmica das diferentes madeiras varia abaixo deste valor consoante a proporção de paredes e cavidades celulares presentes nessa madeira (Tsoumis, 1991).

Também a composição química de uma madeira, nomeadamente o teor de extrativos, condiciona o valor da massa volúmica. O maior teor de extrativos presente no cerne resulta em valores de massa volúmica superiores ao borne, e a sua remoção tem como consequência a redução da massa volúmica (Tsoumis, 1991).

A variação da massa volúmica verifica-se ainda no tronco de uma árvore, diminuindo nas resinosas, à medida que se sobe em altura. Esta variação deve-se a fatores mecânicos e biológicos. Os fatores mecânicos que promovem o aumento da massa volúmica, derivam das tensões provocadas pela

sustentação de toda a árvore, desde o seu próprio peso à necessária resistência a outros efeitos exercidos ao nível da copa, como o vento ou a neve (Tsoumis, 1991). Em termos biológicos, a maior massa volúmica na base do tronco deve-se à presença de extrativos no cerne (maior proporção de cerne na base do tronco da árvore) e à menor quantidade de lenho juvenil (com menor massa volúmica nas resinosas) (Tsoumis, 1991).

Já a variação horizontal da massa volúmica no tronco de uma árvore, apesar de também estar relacionada com os fatores que influem na variação vertical, aumenta com a distância ao centro (nas resinosas). Estas variações relacionam-se com a espessura das paredes celulares e com a proporção de lenho final. Na maioria das resinosas, verifica-se uma diminuição da massa volúmica em árvores que atingem idades consideráveis (100 anos) (Tsoumis, 1991).

Os valores de resistência mecânica da madeira aumentam com o acréscimo da sua massa volúmica, pela maior proporção de paredes celulares em relação às cavidades, em madeira isenta de defeitos (e.g. os nós conferem mais massa volúmica mas não necessariamente maior resistência mecânica). Assim, genericamente o MOE aumenta com um acréscimo da massa volúmica de madeira isenta de defeitos (Quadro 1.2). As equações representadas no Quadro 1.2 permitem estimar o MOE, em ensaios à flexão estática com base na massa volúmica de uma madeira de resinosas (a determinado teor de água), para madeira isenta de defeitos e com fio direito.

Defeitos da madeira

A presença de defeitos na madeira, como sejam nós, bolsas de resina, fendas, desvios de fio entre outros, afeta as propriedades mecânicas dessa madeira, particularmente no caso de existirem nas arestas das peças (Carvalho, 1996). A determinação do E em ensaio à flexão estática não é exceção. Por esta razão, as determinações dos valores de resistência mecânica de referência, nos termos dos ensaios normalizados, são sempre feitas em provetes isentos de defeitos.

Ataque da madeira por agentes bióticos

O ataque da madeira por agentes bióticos pode afetar as suas propriedades mecânicas e mais concretamente o E , mas esse efeito depende do tipo de organismos responsáveis pelo ataque: fungos decompositores e insetos xilófagos, xilófagos marinhos ou bactérias. Por se considerarem mais relevantes para o presente trabalho, apenas se irão referir os efeitos de alguns fungos.

Os fungos cromogéneos afetam em pequena medida as propriedades mecânicas da madeira, uma vez que estes fungos não se alimentam da parede celular (Tsoumis, 1991; FPL, 2010).

Por seu lado, os fungos da podridão castanha alimentam-se da celulose da madeira, danificando as paredes celulares e reduzindo as suas propriedades mecânicas, sendo na resistência ao impacto que se regista a maior redução. As propriedades à flexão, tal como o E , são menos afetadas e seguem-se com impacto decrescente, as propriedades relacionadas com a compressão axial e transversal e a

tração axial, esta última com reduzido significado (Tsoumis, 1991). Para perdas de massa volúmica entre 5 % e 10 % podem verificar-se reduções das propriedades mecânicas entre 20 % e 80 % (FPL, 2010).

1.3 O módulo de elasticidade da madeira de pinheiro-bravo

Os valores do E da madeira variam entre os 2 500 e o 17 000 N/mm² (2,5 a 17 GPa), um valor intermédio quando comparado com outros materiais (Quadro 1.3).

Apesar do MOE da madeira ser bastante inferior ao do aço, mais de 20 vezes, caso se considere a relação com a massa volúmica do próprio material e a capacidade de suportar pesos exteriores, a madeira torna-se um material estruturalmente vantajoso e competitivo.

Quadro 1.3 MOE e sua relação com a massa volúmica para a madeira e outros materiais (adaptado de Tsoumis, 1991)

Material	MOE (N/mm ²)	MOE/massa volúmica
Madeira – <i>Picea spp</i>	9 100	20 680
Betão	13 800	5 520
Aço	207 000	26 200
Plástico - PVC	5 800	4 460

A eficiência relativa da madeira (MOE/massa volúmica), com um valor de 20 680, já é comparável com a do aço, 26 200 (Quadro 1.3).

No Quadro 1.4 apresentam-se alguns valores encontrados na bibliografia para o MOE e massa volúmica da madeira de pinheiro-bravo, bem como para outras espécies de pinheiro.

Quadro 1.4 MOE e massa volúmica da madeira de algumas espécies de pinheiro a teor de água de 12%. Adaptado de ⁽¹⁾Sanz et al. (2007) ⁽²⁾Carvalho (1996) ⁽³⁾LNEC (1963) ⁽⁴⁾Santos (2007) ⁽⁵⁾FPL (2010)

Material	MOE (N/mm ²)	Massa volúmica (g/cm ³)
<i>Pinus pinaster</i>	7 378 ^a	0,47 ^a
(1)	10 200 ^b	0,56 ^b
(2)	11 760	0,56
(2)	13 520	0,64
(3)	13 800 ^c	0,53 – 0,60 ^c
(4)	16 794 ^d	0,70 ^d
<i>Pinus ponderosa</i>	(5) 8 900	-
<i>Pinus silvestris</i>	(5) 10 000	-
<i>Pinus radiata</i>	(5) 10 200	-
<i>Pinus oocarpa</i>	(5) 15 500	-
<i>Pinus caribaea</i>	(5) 15 400	-

^apinheiro-bravo de Viana; ^bpinheiro-bravo de Leiria; ^cresultados baseados em “grande número de ensaios” em madeira isenta de defeitos; ^dpinheiro-bravo de Leiria, dados provenientes de ensaio com 30 provetes (35x35 mm) de madeira limpa isenta de defeitos e sem lenho juvenil.

Os diferentes valores encontrados na bibliografia para o MOE (e respetivas massas volúmicas) mostram a elevada variabilidade existente dentro da espécie e entre espécies de *Pinus* (Quadro 1.4).

2 Nemátode da madeira do pinheiro

Os nemátodes constituem um filo do reino animal que se distribui por todo o planeta, sendo a sua maioria úteis ou inócuos e uma minoria, cerca de 10%, causa danos nas plantas sendo responsáveis pela sua destruição (Maggenti, 1981).

Os nemátodes do género *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937, podem ser micófagos ou fitófagos, conhecendo-se apenas duas espécies patogénicas: o nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *B. xylophilus* (Steiner e Buhner, 1934) Nickle, 1970 e o nemátode do anel vermelho do coqueiro, *B. cocophilus* (Cobb, 1919) Baujard, 1989 (Kanzaki, 2008).

O NMP é o agente causal da doença da murchidão dos pinheiros (em inglês “*pine wilt disease*”) e embora seja nativo da América do Norte (Figura 2.1) foi observado pela primeira vez, no início do século XX (1905), na cidade portuária de Nagasaki no Japão (Mamiya 1984a, 1988).



Figura 2.1 Dispersão de NMP no Mundo (adaptado de Rodrigues, 2011)

A primeira descrição desta espécie remonta a 1929 em *P. palustris* Mill., como *Aphelenchoides xylophilus* (Steiner e Buhner, 1934). Posteriormente, este nemátode foi descrito como *B. lignicolus* Mamiya e Kiyohara, 1972, quando determinado como agente causal da doença da murchidão no Japão (Mamiya e Kiyohara, 1972). O facto de serem a mesma espécie, *B. xylophilus*, foi reconhecido em 1981 por Nickle (Nickle *et al.*, 1981).

B. mucronatus Mamiya e Enda (1979) é outra espécie não patogénica muito semelhante a *B. xylophilus*, diferindo morfológicamente do NMP apenas nalgumas características da fêmea (ver 2.1).

A doença da murchidão do pinheiro, bem como a sua origem, eram desconhecidas e apenas em 1971, Kiyohara e Tokushige identificaram o NMP como o agente responsável de uma doença que provocou a perda de 46 milhões de metros cúbicos de madeira de *P. densiflora* Siebold e Zucc nos últimos 50 anos no Japão. Em 1982 a doença da murchidão alastrou para a China e em 1988 para a Coreia (Figura 2.1) (Zhao *et al.*, 2008).

Enquanto espécie nativa, o NMP não é considerado uma doença florestal na América do Norte (Dwinell e Nickle, 1989) pois, apesar da sua presença e do seu inseto vetor, a doença tem reduzida importância, porque sendo o nemátode originário desta região, encontra-se em equilíbrio ecológico - co-evolução - com o hospedeiro. Sutherland (2008) refere que o facto da maioria das coníferas nativas serem resistentes à doença e, por outro lado, as temperaturas elevadas no verão ocorrerem em períodos curtos, não permitem o desenvolvimento deste agente patogénico.

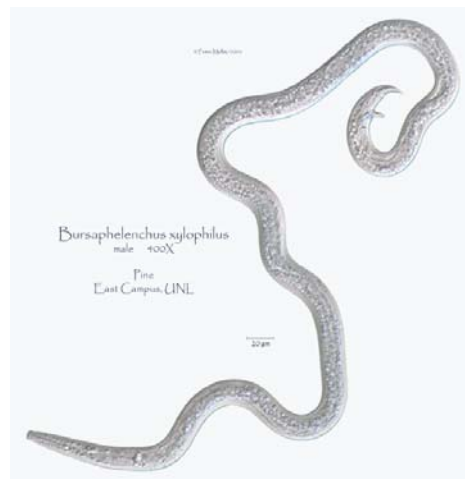


Figura 2.2 Nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (adaptado de Mullin, 2001)

Na Europa, foi detetado pela primeira vez em Portugal (Figura 2.1) na Península de Setúbal, em 1999 (Mota *et al.*, 1999), mas é considerado um organismo de quarentena pela União Europeia desde 1976 (Anexo II, Parte A - Secção I da Diretiva 77/93/CEE). A legislação Europeia refere-o como material suscetível ao NMP (Decisão da Comissão 2006/133/CE, de 13 de Fevereiro):

- madeira e casca isolada de coníferas (*Coniferales*), exceto a de *Thuja L.*;
- os vegetais, com exceção dos frutos e sementes, de *Abies* Mill., *Cedrus* Trew, *Larix* Mill., *Picea* A. Dietr., *Pinus* L., *Pseudotsuga* Carr. e *Tsuga* Carr.

Contudo, os principais hospedeiros do NMP são espécies do género *Pinus*, com a seguinte distribuição (EPPO, sd):

- *P. pinaster*, *P. nigra* J.F. Arnold e *P. sylvestris* L., na Europa;
- *P. bungeana* Zucc. ex Endl., *P. densiflora*, *P. luchuensis* Mayr, *P. massoniana* Lamb. e *P. thumbergii* Parl.(EPPO, sd), na Ásia oriental.

Segundo a *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) as espécies mais ameaçadas na Europa são *P. nigra*, *P. pinaster* (regiões centrais e do sul) e *P. sylvestris* (regiões norte e central) (EPPO, sd). Existem outras coníferas que também podem ser hospedeiras do NMP, principalmente dos géneros *Larix*, *Abies* e *Picea*, mas são raros os relatos de danos. Foram relatados casos de morte de *Picea* e *Pseudotsuga* provocados pelo NMP nos EUA (Malek e Appleby, 1984) e a presença do NMP em árvores a morrer no México (Dwinell, 1993).

2.1 Identificação e Biologia

Para classificação taxonómica do NMP é utilizado o sistema proposto por Hunt (1993, 2008):

- Filo: Nematoda
- Ordem: Aphelenchida
- Sub-Ordem: Aphelenchina
- Super Família: Aphelenchoidea
- Família: Parasitaphelenchidae
- Género: Bursaphelenchus

Estão descritas quase 100 espécies do género *Bursaphelenchus* (Ryss *et al.*, 2005). Em Portugal, ocorrem nove ou 10 espécies do género *Bursaphelenchus* associadas ao pinheiro-bravo (Penas *et al.*, 2004).

A taxonomia do filo Nematoda tem vindo a sofrer alterações significativas e continua em estudo. Persistem dúvidas relacionadas com problemas encontrados nos sistemas de classificação morfológicos: descrições desatualizadas e pouco claras de algumas espécies e a ausência de material tipo para consulta. Há propostas de reformulação do sistema taxonómico recorrendo a um sistema temporal baseado na observação detalhada de material tipo e/ou espécimes vivos, e também à sua análise molecular (Kanzaki, 2008).

2.1.1 Identificação

A identificação do NMP pode fazer-se através de caracteres morfológicos ou recorrendo a técnicas de biologia molecular. Em Portugal existem três laboratórios reconhecidos para a realização de análises para despiste do NMP (DGADR, 2011):

- Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P. (INRB);
- Laboratório de Nematologia - Centro do Mar e Ambiente - Instituto do Mar – IMAR-CMA - Universidade de Coimbra;
- NemaLab - ICAAM - Laboratório de Nematologia - ICAAM - Universidade de Évora.

Caracteres morfológicos

Para identificação do NMP, devem observar-se três caracteres morfológicos específicos e discriminativos desta espécie em particular (Fonseca *et al.*, 2008) (Figura 2.3):

- nos machos as espículas são robustas com um *cucullus* na extremidade distal;
- nas fêmeas, o lábio anterior da vulva tem uma prega vulvar (“vulval flap”) e a terminação da cauda é geralmente subcilíndrica com um término arredondado a digitado.

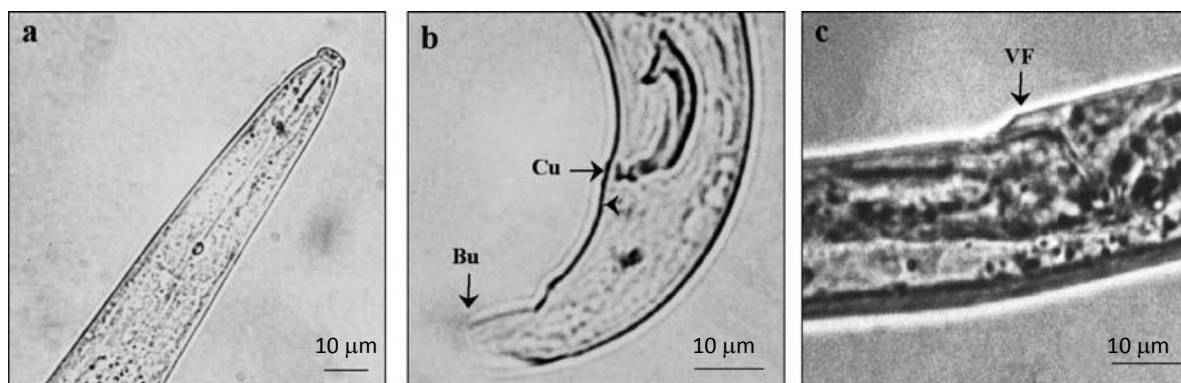


Figura 2.3 Fotografias de um isolado português de *Bursaphelenchus xylophilus*: (a) região anterior; (b) cauda do macho; (c) região vulvar; Bu, bursa; Cu, cucullus; VF, vulva com prega vulvar (adaptado de Fonseca *et al.*, 2008)

Foi detetada uma grande variabilidade no término de caudas nas fêmeas de 12 isolados portugueses de NMP variando entre: arredondado, digitado e mucronado (Fonseca *et al.*, 2008). Esta situação

complica a identificação recorrendo a este carácter morfológico das fêmeas uma vez que *B. mucronatus* também tem fêmeas com caudas mucronadas. Sendo assim, sempre que subsistam dúvidas deverá recorrer-se à análise de ADN (ácido desoxirribonucleico) para confirmar a identificação de *B. xylophilus*.

Caracteres moleculares

Na identificação de isolados de NMP ou de outras espécies do género *Bursaphelenchus* têm sido utilizadas várias técnicas moleculares. A vantagem destas técnicas, em relação à morfologia, está relacionada com o facto de não requererem formação específica em observação morfológica e permitirem a identificação das espécies a partir de estádios juvenis que não possuem caracteres morfológicos específicos, para além de que atualmente já são mais sustentáveis do ponto de vista económico (Kanzaki, 2008).

2.1.2 Biologia

O ciclo de vida do NMP, desde a fertilização ao estágio adulto, pode completar-se em 4 a 5 dias a uma temperatura de 25 °C (Mamiya, 1984a; Tomminen, 1993), envolvendo estádios propagativos e dispersivos (Figura 2.4).

Os NMP são organismos microscópicos e os vários estádios do seu desenvolvimento, desde os juvenis aos adultos, têm dimensões que variam entre 260 e 810 µm (Figura 2.4). A reprodução do NMP dá origem a uma descendência entre 100 e 800 indivíduos (Bolla e Boschert, 1993) e é particularmente condicionada pela temperatura, tendo sido

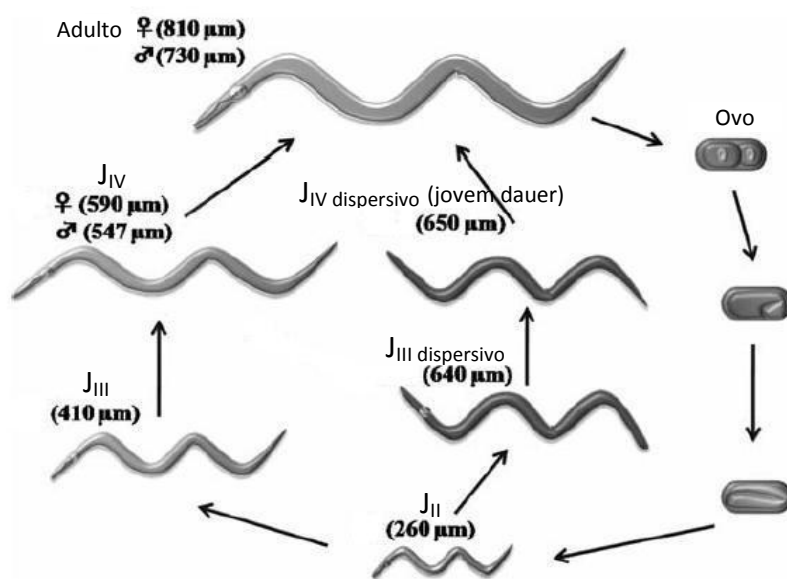


Figura 2.4 Esquema representativo do ciclo de vida do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, estádios propagativos e dispersivos (adaptado de Mamiya, 1975)

verificada uma correlação entre a diminuição da reprodução e o aumento da temperatura para valores acima de 28 °C (Mamiya, 1975).

As temperaturas ideais para a sua reprodução encontram-se entre 20 e 30 °C (Dozono e Kiyohara 1971; Futai 1980a) com um mínimo de 9,5 °C e um máximo de 33 °C (Mamiya, 1984) ou 35 °C (Kanzaki, 2008).

O NMP, apesar de poder ser um fitoparasita, pode ser facilmente mantido no laboratório em culturas de fungos, geralmente *Botrytis cinerea*, ou culturas de callus de várias plantas (Iwahori e Futai, 1990). Alguns estudos sugerem que fungos da podridão, decompositores da madeira, em situações de carência de azoto, tornam-se predadores de microrganismos incluindo nemátodes (Thorn e Barron 1984; 1986 e Barron, 2003). Foi possível observar a imobilização e morte de NMP após uma inoculação com os fungos da podridão das espécies *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *Lentinula edodes* e *Lampteromyces japonicus* (Mamiya et al., 2005).

Propagação e dispersão

O ciclo de vida do NMP está relacionado com o ciclo de vida do inseto vetor e pode ocorrer sob a forma de propagação ou dispersão (Figura 2.5). A transmissão é realizada por um inseto vetor e está associada ao “ciclo dispersivo” do NMP. O “ciclo propagativo” ocorre numa única árvore (Wingfield, 1987).

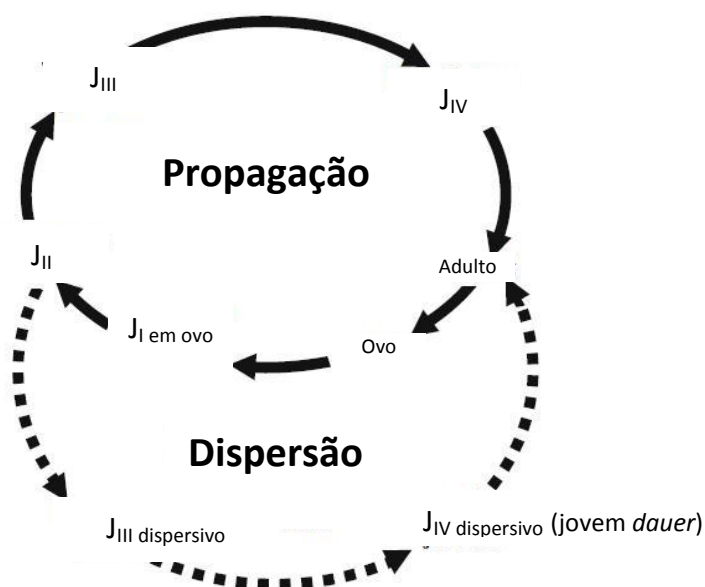


Figura 2.5 Ciclos propagativo e dispersivo do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (adaptado de Aikawa, 2008)

Na Figura 2.5 estão representadas as várias fases do NMP, desde o ovo passando pelos vários estádios juvenis (J e J_{dispersivo}) até ao estágio adulto.

Inseto vetor

Em Portugal, o inseto vetor associado ao NMP é o cerambicídeo *Monochamus galloprovincialis* (Figura 2.6) (Sousa et al., 2001; 2002, Naves, 2007).



Figura 2.6 Inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* e larva em galeria no interior da madeira (adaptado de MADRP, 2011 e Naves, 2007)

Este inseto vetor é um xilófago secundário que necessita de árvores mortas ou muito debilitadas para fazer a oviposição e ramos jovens para o pasto de maturação (Figura 2.7). Em Portugal, apresenta apenas uma geração por ano e tem um ciclo biológico que começa pela emergência dos adultos, entre Maio e Agosto (Figura 2.13), atingindo valores máximos entre Junho e Julho (INRB, 2008). Estes insetos, voam até árvores saudáveis onde se alimentam de ramos jovens, pasto de maturação (Figura 2.7) (Naves, 2007).

Após um período de maturação sexual de 2 a 3 semanas, ambos os sexos são atraídos por árvores debilitadas ou recentemente mortas onde acasalam e as fêmeas põem os ovos através de um orifício na casca, denominadas feridas de oviposição (Figura 2.7). A oviposição coincide com o período de voo do inseto, Maio a Outubro (Figura 2.13), e durante a sua vida cada fêmea deposita em média 70 ovos (Naves, 2007).

A larva do inseto vetor eclode em 6 a 9 dias e constrói uma galeria na zona subcortical (Figura 2.6), emergindo como adulto na Primavera seguinte, através de um buraco circular de 4 a 9 mm de diâmetro (Figura 2.9) (Sousa *et al.*, 2005).

O maior número de galerias foi encontrado nos ramos da copa, com diâmetros entre 4 e 10 cm, e na metade superior do tronco, à altura da copa (Sousa *et al.*, 2005)

Ciclo propagativo

A transmissão dos estádios juvenis J_{IV} (jovens *dauer*) do NMP pelo inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* (Olivier), pode ocorrer sob duas formas: primária e secundária (Figura 2.7). A primeira, transmissão primária, verifica-se através de feridas de alimentação (pasto de maturação) provocadas pelo inseto vetor em ramos jovens de árvores sãs. A segunda, transmissão secundária, ocorre através de feridas de oviposição, provocadas pelo inseto vetor em árvores doentes ou mortas (Figura 2.7).

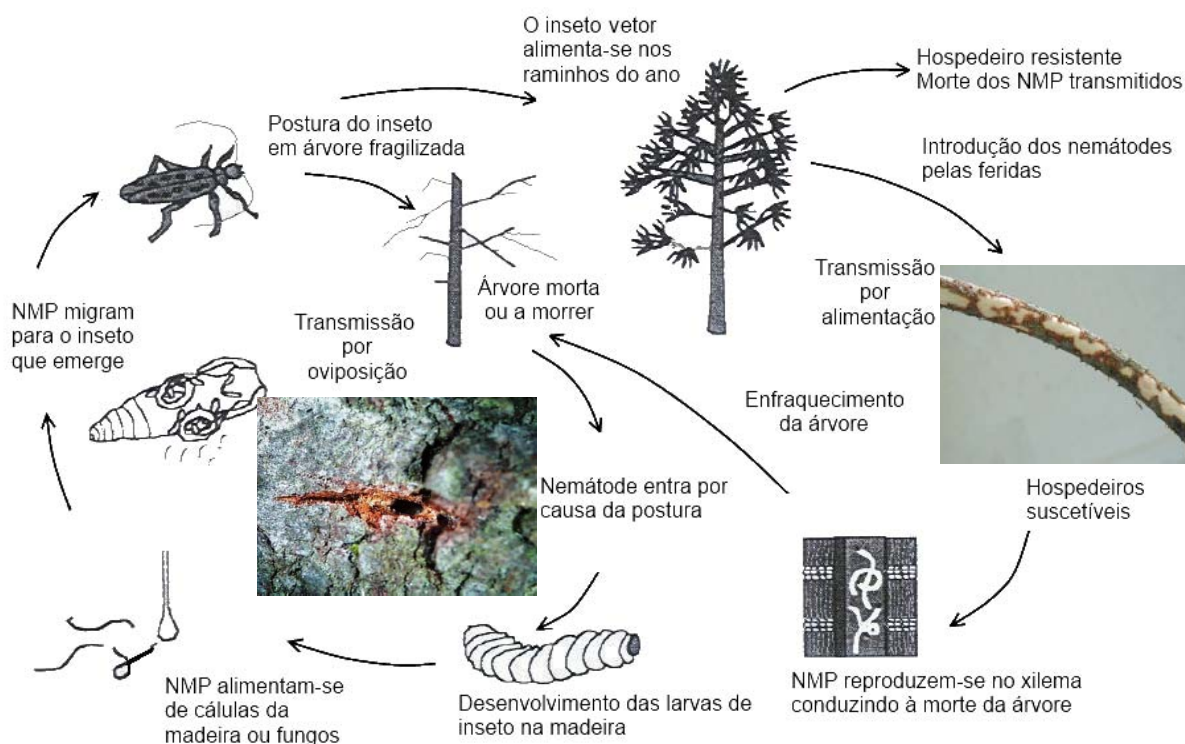


Figura 2.7 Relação entre os ciclos biológicos do NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*, com o inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* (adaptado de Evans *et al.*, 2006 e Naves, 2007)

Ambas as formas de transmissão ocorrem porque os estádios juvenis J_{IV} dispersivos que se encontram no corpo do inseto vetor, na traqueia ou no exterior da superfície corporal (Figura 2.8), abandonam o inseto penetrando nas árvores hospedeiras através das feridas (Kobayashi *et al.*, 1984). A transmissão ocorre de forma intermitente ao longo da vida do inseto mas, geralmente, tem um pico 2 a 3 semanas após a sua emergência de uma árvore morta (Naves, 2007).

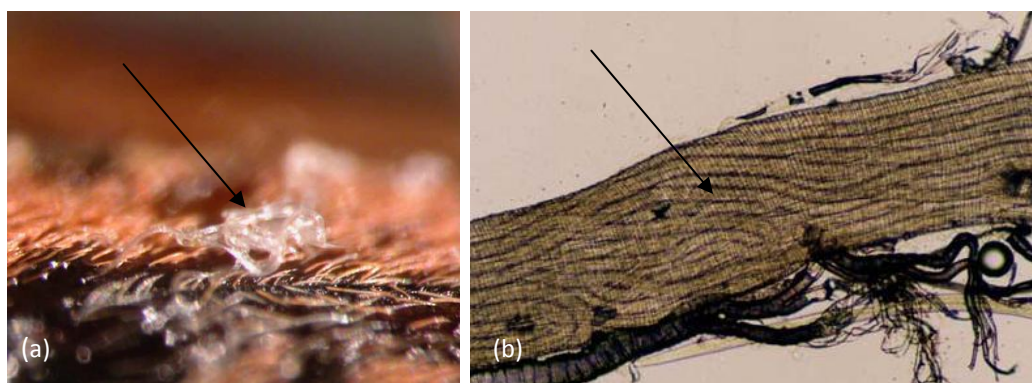


Figura 2.8 (a) Jovens dispersivos (J_{IV}) no corpo do inseto vetor, *Monochamus alternatus* (adaptado de Aikawa, 2008) e (b) no interior da traqueia de *M. galloprovincialis* adulto (adaptado de Naves, 2007, fotografia de Bravo, M.A.)

Nem todos os jovens dispersivos conseguem invadir os tecidos de pinheiros sãos, mas os que forem bem-sucedidos sofrem uma muda para dar origem aos adultos que se reproduzem, começando o ciclo propagativo (Figura 2.4 e Figura 2.5) (Mamiya, 1975). A migração é feita principalmente através

dos canais de resina e os NMP alimentam-se dos conteúdos das células vivas (células epiteliais) – fase fitófaga – no processo de migração (Tamura e Mamiya, 1979; Kuroda e Mamiya, 1986). Presume-se que a opção pelas células epiteliais esteja relacionada com a sua maior suscetibilidade devido à espessura mais reduzida da sua parede celular, parede primária (Kikuchi, 2008). Em árvores em declínio ou mortas, os NMP alimentam-se de fungos, fase micófaga, particularmente de fungos cromogêneos do azulamento, por exemplo dos géneros: *Ophiostoma*, *Ceratocystis* e *Gliocladium* (Ye *et al.*, 1993). Contudo, a presença de fungos não é garantia da presença de NMP.

As distâncias percorridas pelo NMP na árvore são variáveis e vão desde os 7,2 cm/dia, para inoculações com 1 000 nemátodes (Togashi *et al.*, 2003), a 20-80 cm/dia numa árvore com 8 m de altura (Hashimoto, 1975) e um máximo de 150 cm/dia ao longo do tronco de *P. tumbergii* com 7 anos (Kuroda e Ito, 1992).

Quanto à sua distribuição ao longo da árvore e no plano radial, verifica-se que as maiores densidades populacionais de NMP se encontram até à profundidade de 6 cm, observando-se uma redução em número à medida que aumenta a profundidade de amostragem. Na direção axial, apesar do NMP estar distribuído por toda a árvore, verificaram-se maiores densidades ao nível médio da árvore (Sousa *et al.*, 2005).

Após várias semanas, a população de NMP cessa o seu crescimento e começa a declinar, o que poderá estar relacionado com a redução da quantidade de alimento disponível ou redução da temperatura. Perante estas condições, a população inicia o seu ciclo dispersivo (Evans *et al.*, 1996)

Ciclo dispersivo

No ciclo dispersivo, o segundo estágio juvenil (J_{II}) vai dar origem ao estágio juvenil J_{III} dispersivo (Mamiya, 1983) que corresponde a uma fase de sobrevivência capaz de resistir a condições adversas (Figura 2.5). Estes jovens dispersivos migram para as câmaras pupais (Figura 2.9) do inseto vetor e, perto do momento de emergência do inseto, sofrem uma nova muda para dar origem aos estádios juvenis dispersivos J_{IV} , um estágio que não se alimenta.



Figura 2.9 Pupa na câmara pupal do inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* e vários orifícios de emergência do inseto vetor (adaptado de Naves, 2007)

No inseto vetor os NMP instalam-se sob os élitros, nas traqueias ou no corpo do inseto e são transportados até ao novo hospedeiro reiniciando-se assim o ciclo propagativo (Evans *et al.*, 1996). Apenas 30 a 70% dos insetos que emergem de árvores infetadas transportam NMP e, geralmente, cada inseto transporta algumas centenas de NMP mas, apesar de raro, é possível um inseto transportar vários milhares de NMP (INRB, 2008).

2.2 Doença da murchidão do pinheiro

A doença da murchidão dos pinheiros resulta sobretudo da interação complexa entre o NMP, o inseto vetor e a árvore hospedeira. Apesar deste conhecimento, muitos dos sintomas e mecanismos da doença permanecem por explicar, havendo cientistas que sugerem o envolvimento de toxinas ou a simbiose do NMP com bactérias patogénicas (Zhao *et al.*, 2008). Contudo, não há consenso e é necessário o prosseguimento da investigação sobre os componentes envolvidos nesta doença.

Desde a descoberta do NMP como agente causal da doença, que a investigação se tem desenvolvido em torno do estudo do mecanismo de murchidão. A propagação artificial do NMP e o recurso a uma técnica de inoculação, estabelecida pela primeira vez por Mamiya (1980, 1984), permitiu a realização de medições fisiológicas (Tamura *et al.* 1987, 1988) bem como a realização de centenas de trabalhos de investigação no Japão até ao final dos anos 1990, compilados e traduzidos para inglês por Kishi (1995).

Mecanismos de infeção

Na natureza, o NMP invade o hospedeiro quando o inseto vetor se alimenta de ramos jovens, ramos com 1 ano de idade. Os nemátodes que invadem com sucesso o hospedeiro tentam perfurar os traqueídeos, mas não conseguem avançar muito devido à sua maior espessura relativamente às pontuações areoladas (Kuroda, 2008). Assim, os NMP invadem os canais de resina (Figura 2.11) nas zonas danificadas do córtex e xilema e deslocam-se, ao longo da árvore, aproveitando as ligações entre os canais axiais e radiais referidos no capítulo 1.1.

Em ramos e troncos com mais de três ou quatro anos (*Pinus thunbergii* e *Pinus densiflora*), o NMP utiliza os canais de resina axiais do xilema para se deslocar (Figura 2.10) uma vez que não existem no floema secundário (Kuroda, 2008). Como os canais de resina axiais e radiais estão largamente

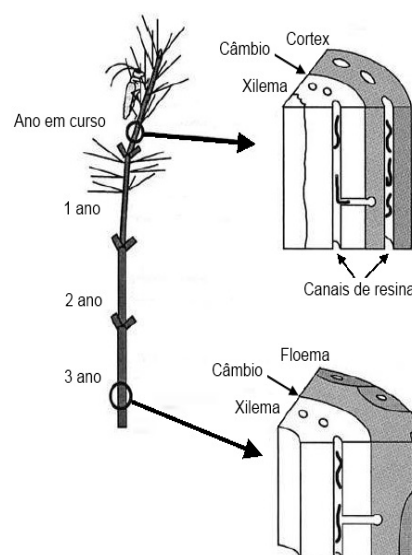


Figura 2.10 Estrutura tridimensional de raminho de pinheiro (adaptado de Kuroda, 2008)

distribuídos no xilema (Figura 2.11), os NMP podem dispersar-se ao longo de uma árvore jovem, de 10 anos de idade e com 2,5 a 4 m altura, numa semana (Hashimoto e Kiyohara, 1973; Kuroda e Ito, 1992), mas nem todos os NMP atingem as raízes (Kuroda, 2008).

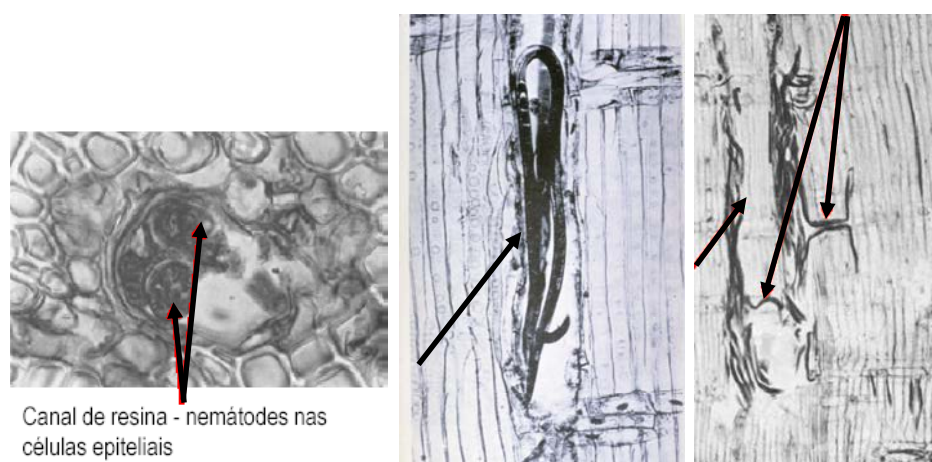


Figura 2.11 Canais de resina com nemátodes da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* – cortes transversal, axial e radial (adaptado de Mamiya, sd)

Para estudar os mecanismos de infeção, Suzuki (1992), Fukuda (1997) e Yamada (2006) recorreram à inoculação de pinheiros *P. thumbergii* jovens com NMP. Pretendiam avaliar os sintomas e alterações internas nas fases inicial e de desenvolvimento da doença (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 Sintomas externos e alterações internas observadas em pinheiros *P. thumbergii* jovens, inoculados com o nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (adaptado de Zhao *et al.*(2008)

Estádios		Fase inicial		Fase de desenvolvimento	
		1	2	3	4
Externo	Sintoma	Nenhum	→	Descoloração das agulhas velhas	Descoloração das agulhas novas → Morte
	Oleo-resinas	Normal	→ Decréscimo	→ Nenhuma	
Interno	Células	Alteração no metabolismo secundário	→	Necrose parcial	→ Necrose em área alargada
	Ascensão de seiva	Normal	→ Início do bloqueio	Baixa condução	→ Paragem completa
NMP		População reduzida	→	Propagação	Propagação extensa
Tempo (semanas)*		1	2	3	4 e acima

Na fase inicial da doença, correspondente aos estádios 1 e 2 (Quadro 2.1), o NMP desloca-se exclusivamente nos canais de resina e as células epiteliais nesses canais apresentam necrose e inchamento – formação de tilos (Kuroda, 2008).

Por volta das 3 semanas, coincidindo com o início da descoloração das agulhas (Quadro 2.1), a população inicial com menos de 10 NMP/g ps, cresce para mais de 100 NMP/g ps. Durante este período, estágio 3 (Quadro 2.1), o número de células necróticas aumenta e o teor de água no xilema decresce drasticamente (Kuroda e Ito, 1992).

O decréscimo do teor de água, no xilema, está relacionado com o início do bloqueio da normal circulação e ascensão da seiva no estágio 2 (Quadro 2.1), através de um fenômeno de embolia devido à presença de bolhas de ar ou vapor de água que se formam na coluna de seiva e que se expandem, conduzindo à sua drenagem e desidratação que se espalha pelos traqueídeos adjacentes (Figura 2.12) (Sperry e Tyree, 1988; Tyree e Zimmermann, 2002).

A desidratação conduz a uma cessação da condução de água no xilema, estágio 4 (Quadro 2.1), que resultará em alterações fisiológicas nas agulhas tais como um decréscimo marcado no potencial de água e nas taxas fotossintética e de transpiração (Ichihara *et al.*, 2001).

Em árvores sãs, o fenômeno de embolia ocorre diariamente, contudo, a tensão de soluto induzida pela transpiração reduz-se após o pôr-do-sol ou precipitação e verifica-se a recuperação da situação de embolia com o reenchimento dos traqueídeos que recuperam a sua função de transporte (Sperry e Tyree, 1988). Daqui se conclui que perante condições adequadas de água no solo as árvores não murcham facilmente.

Na presença de NMP não se verifica o processo de recuperação referido, pelo contrário, a desidratação nos traqueídeos onde é realizado o transporte aumenta

gradualmente, provavelmente devido à oclusão com substâncias oleosas e viscosas exsudadas pelas células epiteliais e parênquima radial. Como consequência, dá-se o aumento da área de xilema disfuncional, desidratação e necrose, estágio 4 (Quadro 2.1), e a paragem completa da ascensão de seiva (Kuroda, 2008).

No estágio final da doença da murchidão, e à medida que a árvore se aproxima da morte, a população de NMP aumenta e está presente na zona do câmbio. Neste momento, as células novas junto ao câmbio aparecem alteradas (Kusunoki, 1987), provavelmente degradadas por enzimas hidrolíticas (Kuroda, 2008). Os NMP exsudam hidrolases como a celulase e a pectinase (Odani *et al.*, 1985; Kuroda, 1987; Kikuchi *et al.*, 2004) e absorvem os conteúdos das células do hospedeiro.

Com a cessação da ascensão de seiva, a árvore é atacada por vários tipos de fungos, nomeadamente fungos cromogéneos do azulamento dos géneros *Ceratocystis* e *Ophiostoma*, detetando-se igualmente, a presença de bactérias e outros microrganismos (Kuroda, 2008 e Ye *et al.*, 1993).

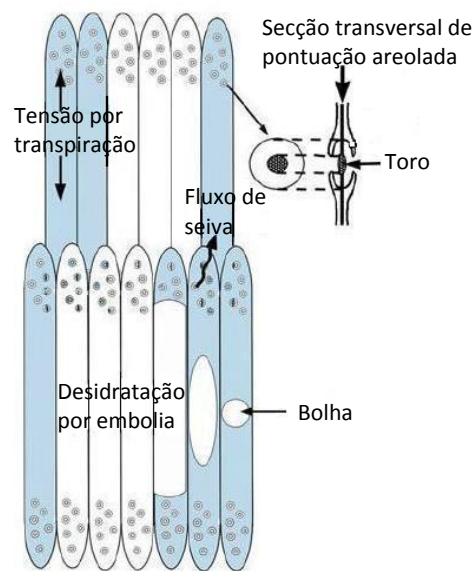


Figura 2.12 Embolia nos traqueídeos do borne de pinheiro na presença de nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* e estrutura das pontuações areoladas (adaptado de Kuroda, 2008)

Sintomatologia

A gravidade dos sintomas observados e da incidência da doença da murchidão do pinheiro estão relacionados com a espécie hospedeira e, também, com a temperatura e consequentemente com a época do ano em que ocorre a transmissão dos jovens dispersivos. A inoculação de árvores no Verão leva a uma morte rápida das árvores, em 40 a 60 dias. Inoculações mais tardias, no Outono ou Inverno, podem resultar na total ausência de sintomas (Kiyohara e Tokushige, 1971) ou no aparecimento de sintomas apenas na Primavera seguinte.

Em Portugal (Figura 2.13), devido à relação com o ciclo biológico do inseto vetor, as árvores infetadas tendem a apresentar sintomas alguns meses após a infeção, geralmente a partir do meio do Verão, mas com maior evidência no Outono e menos frequentemente na Primavera seguinte (INRB, 2008).

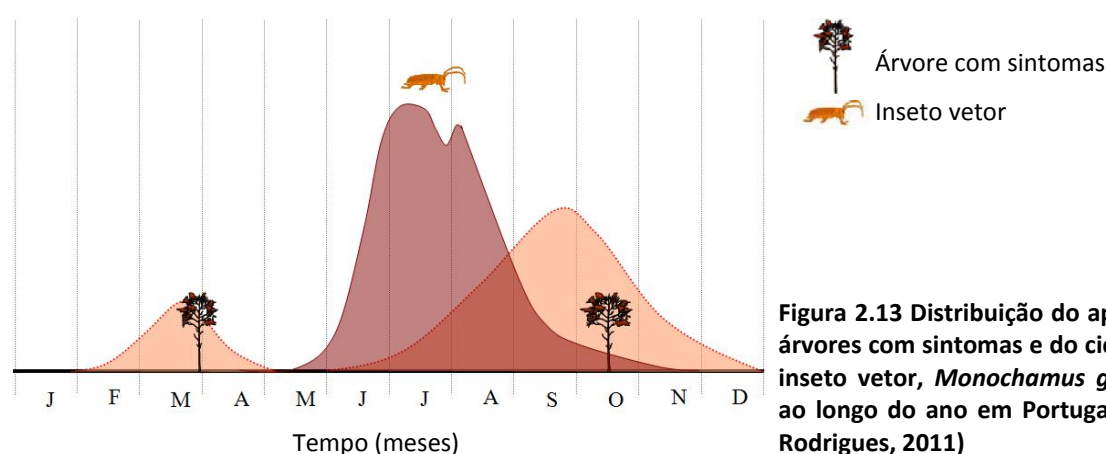


Figura 2.13 Distribuição do aparecimento de árvores com sintomas e do ciclo biológico do inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* ao longo do ano em Portugal (adaptado de Rodrigues, 2011)

No pinheiro-bravo, os sintomas começam algumas semanas após a infeção, pela diminuição do fluxo de resina a que se segue o amarelecimento e murchidão das agulhas (Quadro 2.1), sendo possível encontrarem-se árvores com copas secas ou a secar total ou apenas parcialmente (Figura 2.14).



Esta sintomatologia não é específica da doença, podendo resultar de outros fatores de mortalidade bióticos e abióticos em que o diagnóstico depende de uma análise laboratorial da madeira (ver 2.1) (Sousa *et al.*, 2005).

Figura 2.14 *Pinus pinaster* com sintomas da doença da murchidão do pinheiro e presença confirmada de NMP na “Herdade da Apostiça”, Portugal (Fevereiro de 2011)

Mecanismos de defesa

Quando os tecidos das árvores de pinheiro são feridos por via mecânica ou pela alimentação de insetos, as células epiteliais e parênquima radial sintetizam e exsudam resina que contém ácidos resínicos e monoterpenos voláteis (Hillis, 1987), mecanismo de defesa, para o lúmen dos traqueídeos adjacentes, resultando em cavitações parciais destas células (Kuroda *et al.*, 1991).

O recurso à espectrometria de massa permitiu detetar um aumento da presença de monoterpenos voláteis no xilema tais como α -pinenos e β -pinenos, logo três dias após a inoculação com NMP e a sua concentração atingiu um máximo aproximadamente duas semanas depois, estágio 2 (Quadro 2.1) (Kuroda, 2008).

A maioria dos NMP ficam retidos na resina libertada no local dos tecidos danificados e, como tal, não conseguem invadir os tecidos de pinheiros sãos. As taxas de invasão encontradas na bibliografia variam entre 23,2 e 25,6% (Kishi, 1995; Asai e Futai, 2006). A resina retarda a entrada, mas não é eficaz para evitar a migração dos indivíduos que conseguem entrar (Kuroda, 2008).

A produção de metabolitos secundários, terpenos, compostos fenólicos e estilbenos, que ocorre nas células infetadas, é uma reação de defesa que leva à sua morte tal como sucede na formação do cerne (Hillis, 1987). O mecanismo de produção de metabolitos secundários ocorre de forma localizada em conexão com a distribuição de NMP e não de forma generalizada em toda a árvore (Ichihara *et al.*, 2000).

Apesar das reações de defesa descritas, as espécies suscetíveis aparentam não conseguir sintetizar metabolitos em quantidade e velocidade suficientes para afetar a progressão da doença, pois os NMP dispersam-se rapidamente (ver 2.1.2) (Kuroda, 2008).

Na Figura 2.15, estão representadas as reações de uma árvore hospedeira resistente e suscetível após a infeção com NMP.

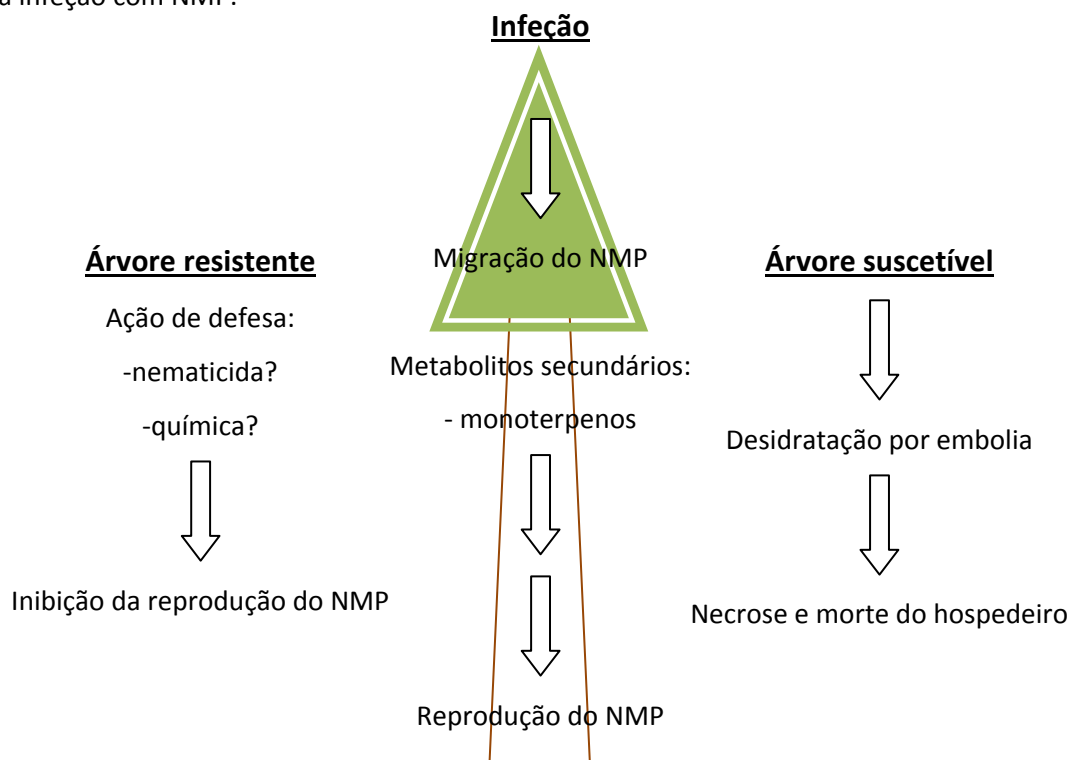


Figura 2.15 Reação de uma árvore hospedeira resistente e suscetível após a infeção com nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (adaptado de Kuroda, 2008)

Na árvore hospedeira suscetível à doença o processo de desenvolvimento envolve (Kuroda, 2008):

- estímulos pela invasão de NMP, migração e alimentação nos canais de resina;
- ativação do metabolismo secundário nas células epiteliais e parênquima;
- libertação de metabolitos oleosos para os traqueídeos;
- desidratação dos traqueídeos por embolia e bloqueio parcial do fluxo de seiva;
- alargamento do xilema disfuncional;
- paragem completa da subida de seiva;
- necrose e morte das células do câmbio.

2.3 O NMP em Portugal

O comércio mundial de produtos florestais, nomeadamente madeira e embalagens, tem um papel importante na disseminação do NMP (Evans *et al.*, 1996) e terá também tido, na sua entrada em Portugal, o primeiro país Europeu onde em 1999 foi detetado este organismo de quarentena da União Europeia (Mota *et al.*, 1999).

A origem da população de NMP encontrada em Portugal é desconhecida e já foram apresentadas diversas hipóteses, nomeadamente a América do Norte, Japão ou China. Contudo, estudos mais recentes apontam para a China (Figura 2.1), pois os isolados portugueses têm uma menor distância genética a isolados dessa origem (Vieira *et al.*, 2007).

Conforme referido, o pinheiro-bravo é o único hospedeiro do NMP conhecido em Portugal, uma das espécies mais suscetíveis no sul da Europa. A presença de NMP é o principal problema fitossanitário desta espécie. Enquanto organismo de quarentena da União Europeia (Anexo II, Parte A - Secção I da Diretiva 77/93/CEE), a presença do NMP em Portugal levou ao estabelecimento de legislação – Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto – que resultou da Decisão n.º 2006/133/CE, da Comissão, de 13 de Fevereiro, alterada pela Decisão da Comissão n.º 2009/993/UE, de 17 de Dezembro. O Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto:

“...estabelece medidas extraordinárias de proteção fitossanitária indispensáveis ao controlo do nemátode da madeira do pinheiro (NMP) Bursaphelenchus xylophilus (Steiner & Bühner) Nickle et al. e do seu inseto -vetor, o longicórneo do pinheiro, Monochamus galloprovincialis (Oliv.), com vista a evitar a dispersão da doença da murchidão do pinheiro e, quando possível, a sua erradicação, procedendo à implementação das medidas de proteção fitossanitária previstas na Decisão da Comissão n.º 2006/133/CE, de 13 de Fevereiro, alterada pela Decisão da Comissão n.º 2009/993/UE, de 17 de Dezembro.”

A aplicação das medidas fitossanitárias teve início na zona afetada, na Península de Setúbal, e na zona tampão com raio de 20 km que delimitava a primeira (Figura 2.16) (Portaria n.º 7/2000, de 7 de Janeiro, atualizada por: Portaria n.º 518/2001, de 24 de Maio, Portaria n.º 1572/2003, de 27 de Dezembro e Portaria n.º 815/2006, de 16 de Agosto).

Em 2008 houve uma extensão das medidas fitossanitárias à região da Lousã e Arganil (Portaria n.º 305-A/2008, de 21 de Abril) e, posteriormente, a todo o território nacional (Portaria n.º 553-B/2008, de 27 de Junho), incluindo a ilha da Madeira; (Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto).

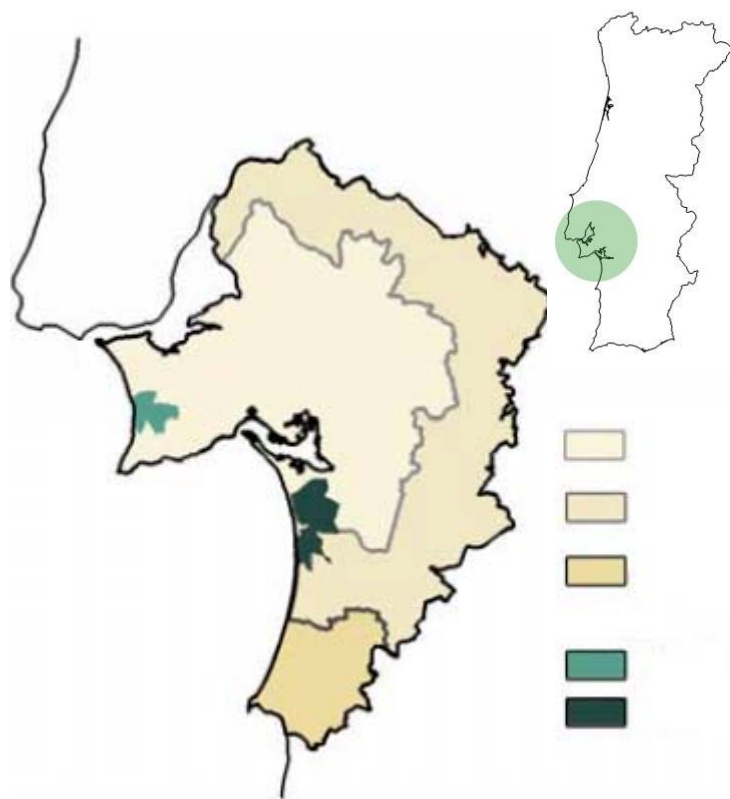


Figura 2.16 Mapa com a localização e delimitação geográfica da zona de restrição e manchas críticas na península de Setúbal (adaptado de Rodrigues, 2011)

Dentro das referidas medidas fitossanitárias encontram-se as seguintes (Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto):

- obrigatoriedade de registo de todos os operadores económicos envolvidos na exploração florestal de coníferas, bem como dos operadores económicos que procedem ao fabrico, tratamento e marcação de material de embalagem de madeira e ao tratamento de madeira de coníferas.

- exigências específicas relativas ao abate, circulação e armazenamento de coníferas hospedeiras.

- medidas relativas ao tratamento de madeira e material de embalagem de madeira, a par das restrições à sua circulação no território nacional e à sua expedição para outros países.

As medidas referidas na legislação para o “tratamento de madeira e material de embalagem de madeira e restrições à sua circulação e expedição” permitem a continuação da sua exportação desde que seguida a Norma Internacional para as Medidas Fitosanitárias n.º 15 da FAO (ISPM 15). Este tratamento da madeira tem como objetivo a eliminação do NMP, madeira essa que após tratada pode ser utilizada sem restrições fitossanitárias.

A comprovação do tratamento é realizada por marcação da madeira, no caso das embalagens (Figura 2.17), e pelo acompanhamento de um “passaporte fitossanitário” no caso da madeira serrada.

O “Programa de Ação Nacional para o Controlo do NMP” (criado pela Portaria n.º 553-B/2008, de 27 de Junho), a que estão

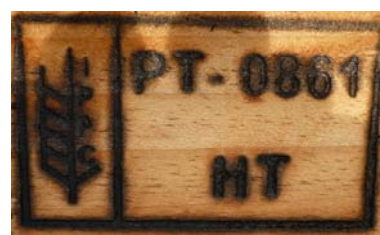


Figura 2.17 Marca utilizada para comprovar a realização do tratamento fitossanitário numa embalagem de madeira

associadas diversas ações, nomeadamente ao nível da prospeção e amostragem de árvores com sintomas de declínio, resultou na identificação de 331 casos positivos, em amostragem realizadas em 2010 e até Setembro 2011 (Rodrigues, 2011).

Desde 1999 foram erradicadas mais de 1 milhão e 600 mil árvores com sintomas de declínio em Portugal, no âmbito dos programas do Estado Português. Inicialmente apenas na Península de Setúbal mas, a partir de 2008, incluindo também a zona centro. Àqueles números, devem somar-se pelo menos 1 milhão e 800 mil árvores erradicadas pela iniciativa privada só nos anos 2009 e 2010 (AIFF, 2010).

A presença do NMP em Portugal tem tido e continuará a ter consequências muito negativas para a indústria, com a redução da quantidade de madeira de pinheiro-bravo disponível e respetiva perda de valor, perda de competitividade associada às necessidades de tratamento e restrições às exportações.

2.4 O NMP e as propriedades físico-mecânicas da madeira de pinheiro

Foram encontradas poucas referências às consequências do ataque do NMP na qualidade da madeira do hospedeiro. Contudo, o NMP segrega celulasas que, tal como as celulasas de outros parasitas de plantas, podem fragilizar a parede celular atuando ao nível da celulose e hemicelulose sintetizadas e depositadas, facilitando a sua alimentação e migração e resultando num enfraquecimento da resistência mecânica dessas paredes (Kikuchi, 2008).

Oliveira *et al.* (2008) e Rodrigues *et al.* (2009) referem que detetaram, em madeira com sintomatologia da infeção pelo NMP, um decréscimo do módulo de elasticidade sem afetar de forma significativa a densidade da madeira. Adicionalmente, nos referidos trabalhos apurou-se uma diminuição (significativa) de 10% da resistência da madeira à flexão estática de madeira com sintomatologia em relação a madeira sem sintomatologia.

2.5 Controlo da doença da murchidão do pinheiro

O agente responsável pela doença da murchidão, o NMP, é de muito difícil controlo, pois tem um ciclo de vida muito curto, uma elevada fecundidade e fertilidade, alternâncias entre fases fitófaga e micófaga e estádios juvenis de resistência (Naves, 2007). Adicionalmente, trata-se de um organismo microscópico de difícil deteção pois, conforme referido, a sintomatologia da murchidão não é específica da doença provocada pelo NMP.

Na floresta de pinheiro-bravo e perante a enorme dificuldade de controlar o NMP depois da sua introdução, por não existirem métodos de controlo eficazes é frequente a realização de cortes rasos, eliminação e replantação. Contudo, considerando a interação entre o NMP, o inseto vetor e a árvore hospedeira existem soluções de controlo ao nível de cada um destes intervenientes na doença.

NMP

Existem vários métodos de combate ao nível do NMP, desde produtos com atividade nematicida para aplicação direta no tronco das árvores a outros métodos de controlo biológico. Em relação aos produtos de atividade nematicida para injeção direta no tronco das árvores, são exemplo o produto Syngenta® e alguns óleos essenciais e voláteis que ainda se encontram em investigação laboratorial (Barbosa *et al.*, 2010).

Em relação a métodos de controlo biológico, refere-se um programa desenvolvido no Japão que teve por base variações na virulência do NMP. Foram pré-inoculadas plantas de pinheiro em viveiros, nativas do Japão, com NMP não virulento. Esta inoculação induziu resistência sistémica das árvores contra uma inoculação subsequente de NMP virulento. Foi considerada importante a produção de metabolitos secundários pela sua atividade nematicida especialmente através da inibição da reprodução e dos movimentos do nemátode, ponderando-se que deveria ser melhor estudada através da inoculação de NMP não virulentos em testes de indução de resistência (Kosaka *et al.*, 2001). Esta resistência induzida pela inoculação com NMP não virulento torna este método como potencial candidato a método de controlo biológico contra a doença da murchidão dos pinheiros.

A inoculação de árvores adultas com NMP não virulentos também foi testada em condições naturais, obtendo-se uma resistência induzida temporária à doença da murchidão. Contudo, estes resultados ainda não são satisfatórios para um controlo biológico efetivo pois é necessário determinar em que condições a resistência é realmente eficaz e apresenta uma maior duração (Kosaka *et al.*, 2001).

Adicionalmente algumas bactérias, de que é exemplo a *Brevibacillus laterosporus*, são capazes de eliminar o NMP (Oliveira *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Inseto vetor

Os métodos de combate, dirigidos à eliminação do inseto vetor, pretendem evitar a transmissão do NMP. São métodos de controlo físico, químico ou biológico:

- controlo físico envolve o abate seguido da produção de estilha ou queima do material;
- o controlo químico implica a aplicação de *sprays* e inseticida na madeira depois de abatida ou nas árvores vivas;
- o controlo biológico é realizado através da utilização de armadilhas, de aves ou de outros predadores de insetos (Figura 2.18).



Figura 2.18 Exemplo de armadilha utilizada para o inseto vetor (Rodrigues, 2011)

Árvore hospedeira

A melhor solução de combate à doença, ao nível do hospedeiro, passará pela definição da melhor alternativa de gestão dos povoamentos de pinheiro-bravo de modo a evitar e/ou reduzir a suscetibilidade dos indivíduos a pragas e doenças. Em paralelo, é importante trabalhar em programas de melhoramento, uma vez que a resistência natural é a melhor forma de controlar a maioria das pragas e doenças, além de que diferentes espécies de pinheiro apresentam variações na sua suscetibilidade ao NMP. Com este método, uma árvore resistente previne a multiplicação da população de NMP de forma que o número de nemátodes após a infeção seja inferior ao número de nemátodes que infestaram a árvore (Trudgill, 1991).

Seguidamente, apresentam-se programas de melhoramento e alguns dos resultados já obtidos.

China e Japão

Na China e Japão foram utilizadas duas estratégias em programas de melhoramento da resistência: seleção e cruzamentos. Os programas baseados na seleção exploram os raros indivíduos resistentes que ocorrem em populações naturais na China e Japão. A sua frequência foi calculada entre 0,1 e 1 num milhão (Ohoba, 1976). A principal vantagem desta estratégia é o ponto de partida serem árvores adultas, permitindo a seleção com base noutras características desejáveis, como por exemplo, crescimento e retidão do tronco, antes do início do programa de melhoramento (Jones *et al.*, 2008).

Por outro lado, os programas baseados nos cruzamentos exploram a resistência natural encontrada em espécies que co-evoluíram na presença de NMP. Apesar de ser mais provável que esta abordagem identifique genes que genuinamente conferem resistência ao NMP, a dificuldade está no facto do material, sujeito a estes programas de melhoramento, ter necessidade de ser reanalisado no que diz respeito a outras características que não a resistência (Jones *et al.*, 2008).

Portugal

Em 2009, foi iniciado um projeto que visa estabelecer os fundamentos para um programa de melhoramento em Portugal. Este projeto é constituído por várias tarefas das quais se destacam: seleção de árvores candidatas que manifestem graus de resistência; escolha de árvores vigorosas e saudáveis na classe dominante de povoamentos sujeitos a fortes ataques de NMP; avaliação da suscetibilidade/resistência ao NMP; colheita de pinhas e separação da semente por árvore selecionada e estabelecimento de ensaio de descendências das árvores candidatas e a monitorização de grau de resistência da população de melhoramento para o volume e forma da árvore (Carrasquinho, 2010).

A fase inicial em que se encontra este programa não permite, ainda, ter resultados que possam ser apresentados (Carrasquinho, 2011).

3 Material e Métodos

O trabalho foi iniciado com a pesquisa de informação acerca de eventuais efeitos do NMP nas propriedades mecânicas da madeira de pinheiro-bravo, nomeadamente no MOE à flexão estática. Perante a inexistência de resultados concretos acerca dos efeitos deste nemátode, foram delineados ensaios para permitir estudá-los.

Com o objetivo de controlar as condições experimentais, optou-se pela inoculação artificial de madeira sã (recetora) com madeira infetada naturalmente pelo NMP (dadora). Este processo permitiu o acompanhamento da infeção do NMP por contacto (inoculação) e da sua evolução no tempo, partindo de um momento inicial com madeira não infetada. A inoculação é já largamente utilizada em plantas e pinheiros, em ensaios orientados para o estudo da doença da murchidão, conforme foi referido no capítulo 2. A inoculação de madeira seguiu a técnica que tem vindo a ser utilizada mais recentemente em estudos realizados no INRB (Sousa, 2011).

A opção pela utilização da madeira inoculada como material de ensaio, baseou-se na hipótese de que o desenvolvimento da população de NMP nesta madeira, será semelhante ao que ocorre na madeira infetada naturalmente. Em paralelo e com o objetivo de comparar resultados, foram também ensaiadas amostras de madeira infetada naturalmente.

Para desenvolvimento do trabalho experimental foram definidas as fases a seguir indicadas que serão especificadas nos capítulos seguintes:

1. seleção de madeira sã e madeira infetada com NMP;
2. preparação da madeira para os ensaios, incluindo a inoculação da madeira sã com NMP através do contacto com a madeira infetada;
3. caracterização das madeiras sã, inoculada e infetada com NMP:
 - a) ensaios físicos e mecânicos realizados no LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P. (ver 3.3);
 - b) pesquisa e quantificação de NMP realizados no INRB (ver 3.4).

A amostra foi definida de modo a garantir, sempre que possível, um número mínimo de casos adequados a assegurar um apuramento de resultados, que permitisse um tratamento estatístico capaz de responder aos objetivos fixados. Para determinação da grandeza da amostra (ver 3.5) foram também tomados em consideração o intervalo de tempo previsto para a realização do trabalho, cerca de quatro meses, e o número de determinações e ensaios a realizar. As estimativas realizadas, com base no delineamento experimental definido, apontavam para 10 amostras para cada tábua (oito para determinações 3.a e duas para 3.b) de madeira sã, inoculada e infetada com NMP, em cada momento no tempo. Assim, definiu-se como material de origem um universo de quatro árvores: três árvores sãs e uma árvore infetada com NMP, perfazendo um total estimado de 486 amostras e um intervalo de ensaios de quatro meses, conforme representado no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 Calendarização e n.º de amostras previstas para o trabalho experimental

Fase	Início do período	Intervalo de tempo (dias)*	N.º de amostras	
			INRB	LNEG
1. Seleção da madeira	3 de Fevereiro	-	-	-
2. Inoculação (tempo 0)	2 de Maio	0	12	54
3. Determinações				
Tempo 1	17 de Maio	15	12	72
Tempo 2	1 de Junho	30	12	72
Tempo 3	1 de Julho	60	12	72
Tempo 4	31 de Julho	90	12	72
Tempo 5	30 de Agosto	120	12	72
* a contagem dos dias iniciou-se com o momento da inoculação		TOTAL	72	414

3.1 Seleção da madeira

O material utilizado no trabalho experimental foi selecionado a partir das amostras colhidas de árvores num povoamento de pinheiro-bravo localizado na “Herdade da Apostiça”, em Sesimbra (Figura 3.2), um dos concelhos classificado como “zona afetada” (2.3) e um dos primeiros onde se detetou a presença do NMP em Portugal (Mota *et al.*, 1999).

As amostras foram colhidas em árvores com e sem sintomas da doença da murchidão dos pinheiros (Figura 3.1), seguindo a metodologia definida pela Autoridade Florestal Nacional: “Prospecção - Erradicação” (AFN, 2009):

- marcar a árvore selecionada para posterior identificação;
- retirar a casca com uma machada na zona a furar, já que as amostras não devem conter dela vestígios;
- furar à volta do tronco a diferentes alturas, DAP e outras, até uma profundidade de 6 cm e recolher uma amostra com uma quantidade aproximada de 100 g de estilha de madeira por árvore;
- desinfetar a broca entre amostras mergulhando-a em frasco de álcool por um período de 30 s a 1 min.;
- acondicionar cada amostra num saco identificando-o com o respetivo código
- os sacos com amostras das árvores sem sintomatologia da doença da murchidão devem estar separados dos sacos com amostras de árvores com sintomatologia.



Figura 3.1 Exemplo de árvores selecionadas, sem (a) e com sintomatologia (b) da doença da murchidão. Aspeto de um local de colheita da amostra (c) e berbequim de amostra utilizado na colheita (d)

As amostras foram analisadas no INRB para pesquisa e quantificação de NMP (procedimento descrito no 3.4) e a madeira selecionada, serrada pela empresa ICIMAD - Indústria e Comércio Ibérico de Madeiras S.A., foi utilizada para as inoculações (3.2.3).

Após a montagem das inoculações, procedeu-se a uma re-quantificação de NMP na madeira infetada. Os resultados desta análise indicaram um decréscimo acentuado, em relação às amostras colhidas da árvore infetada selecionada, tendo-se constatado que o número de NMP era insuficiente para uma inoculação bem-sucedida. Assim, foi necessário interromper as inoculações já iniciadas, rejeitar o material obtido e recomeçar o trabalho experimental, reiniciando-se a fase de seleção.

Estes factos impuseram uma re-calendarização do trabalho experimental e a sua redução de quatro para três meses, refletindo-se numa redução do número total de amostras (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 Re-calendarização do trabalho e número de amostras previstas para o trabalho experimental

<i>Fase</i>	<i>Início do período</i>	<i>Intervalo de tempo (dias)*</i>	<i>N.º de amostras</i>	
			INRB	LNEG
1. Seleção da madeira	9 de Maio	-	-	-
2. Inoculação (tempo 0)	20 de Maio	0	12	54
3. Determinações				
Tempo 1	3 de Junho	14	12	72
Tempo 2	17 de Junho	28	12	72
Tempo 3	15 de Julho	56	12	72
Tempo 4	10 de Agosto	82	12	72
* a contagem dos dias iniciou-se com o momento da inoculação		TOTAL	60	342

Obteve-se novamente madeira sã, fornecida mais uma vez pela ICIMAD - Indústria e Comércio Ibérico de Madeiras S.A, proveniente de um povoamento de árvores com idades compreendidas entre os 25 e os 40 anos.

Quanto à madeira infetada com NMP, proveio de dois toros de uma árvore de um povoamento de pinheiro-bravo em Possanco, Alcácer do Sal (Figura 3.2), onde já havia sido determinada a presença de NMP em quantidade considerada interessante para utilizar em inoculação da madeira sã (superior a 50 NMP/g ps). Os toros pertenciam a uma árvore com uma idade estimada de 72 anos e com um diâmetro na base de 46 cm, às alturas de 4,40 e 6 m do solo.



Figura 3.2 Localização geográfica dos povoaamentos de pinheiro-bravo onde foram abatidas as árvores. (A) “Herdade da Apostiça”, Sesimbra e (B) Possanco, Alcácer do Sal

A observação do disco retirado da base do tronco desta árvore permitiu identificar várias marcas de resinagem (Figura 3.3). Verificou-se ainda uma aparente “intensificação da cor do cerne e um acréscimo do teor de resina”, efeitos característicos da fase inicial do ataque de fungos decompositores do pinheiro, *Phellinus pini*, defeito designado por “ardido” (Carvalho, 1996). Os esporos deste fungo germinam em tecidos do cerne expostos por feridas das “caretas de resinagem”, alterando o aspeto da madeira, sem provocar modificações expressivas das suas propriedades (Carvalho, 1996).

Depois de serrada a madeira observaram-se “pequenos alvéolos ou bolsas revestidas por enfeltrado micelar branco” no cerne (Figura 3.3), característicos da podridão alveolar/cardido que resulta da fase avançada do ataque de fungos do ardido, *P. pini*. Este ataque causa a gradual destruição da madeira devido a uma decomposição progressiva da lenhina (Carvalho, 1996).

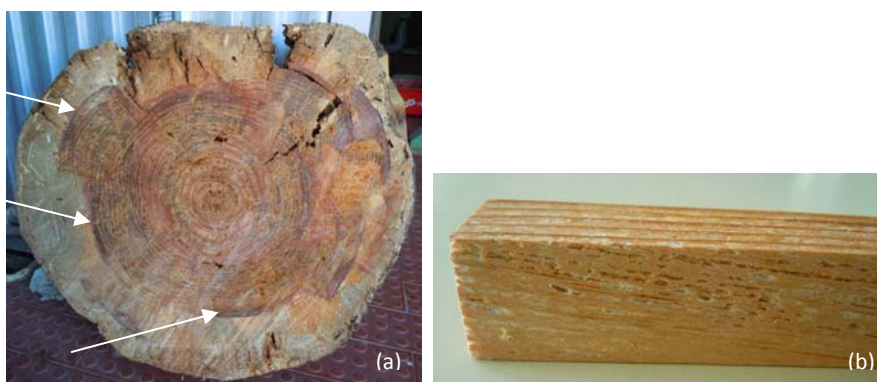


Figura 3.3 Rodela de toro de árvore infetada com NMP com feridas da resinagem (a) e pormenor de cerne dessa madeira com podridão alveolar/cardido (b)

3.2 Preparação das tábuas para os ensaios

As tábuas foram preparadas segundo a metodologia representada na Figura 3.6. Genericamente, após a entrada dos toros na serração, serraram-se as tábuas de madeira sã e infetada com NMP. Após serradas, as tábuas foram marcadas com os códigos dos toros de origem: madeira sã (AN, BN e CN); madeira infetada com NMP (D) e madeira sã para inocular (A, B e C) (ver 3.2.3).

As tábuas foram armazenadas e mantidas numa câmara climática (ARALAB Climaplust 400) em condições de temperatura (25°C) e humidade relativa (70%) constantes, ao longo dos 3 meses de ensaios (Quadro 3.2).

No fim de cada período de tempo do trabalho experimental (tempos 0 a 4 no Quadro 3.2) a madeira foi retirada da câmara e serrada a parte das tábuas referente a esse tempo. A preparação dos provetes utilizados nos ensaios físicos e mecânicos (ver 3.3) e a das amostras utilizadas para a pesquisa e quantificação de NMP (ver 3.4) são detalhadas nos capítulos seguintes.

3.2.1 Madeira sã

Os toros de madeira sã foram serrados em tábuas com 3,90 x 0,20 x 0,03 m (Figura 3.4):

- toros das árvores A e B: duas tábuas com uma face radial (tábuas “radiais”) de cada toro;
- toro da árvore C: duas tábuas tangenciais.



Figura 3.4 Toros de árvores sãs selecionadas, serragem da madeira e tábuas obtidas

As tábuas de madeira sã foram fracionadas em tábuas mais curtas com aproximadamente 1,30 m de comprimento, para facilitar a sua manipulação, e foram marcadas com os códigos que as identificam (Anexo, Quadro I e Figura I). A marcação do momento “zero” nas tábuas da madeira sã fez-se a partir da parte da tábua que corresponde à base de cada toro (Figura 3.5).

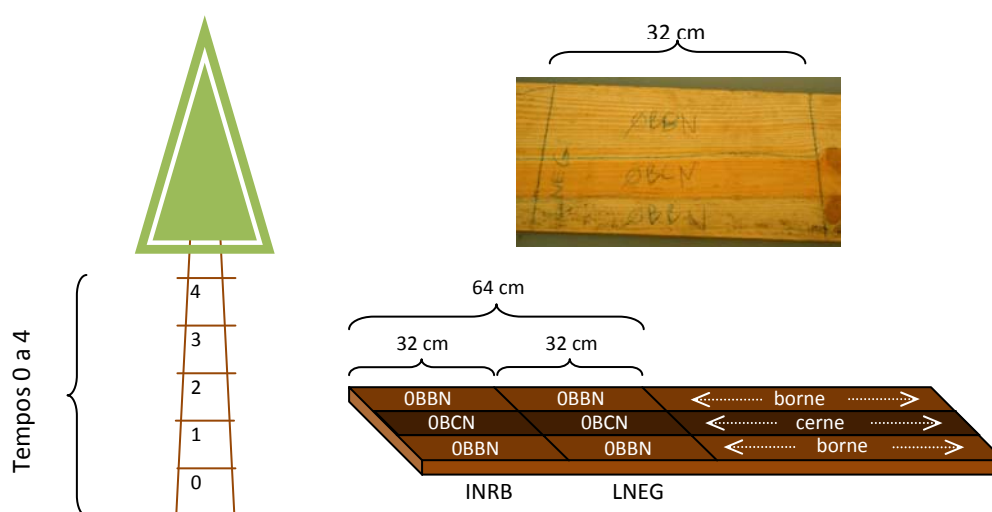


Figura 3.5 Representação esquemática da marcação das tábuas retiradas de cada toro e dos códigos atribuídos ao longo de cada tábua. Exemplo de marcação da tábua B para o tempo “zero”

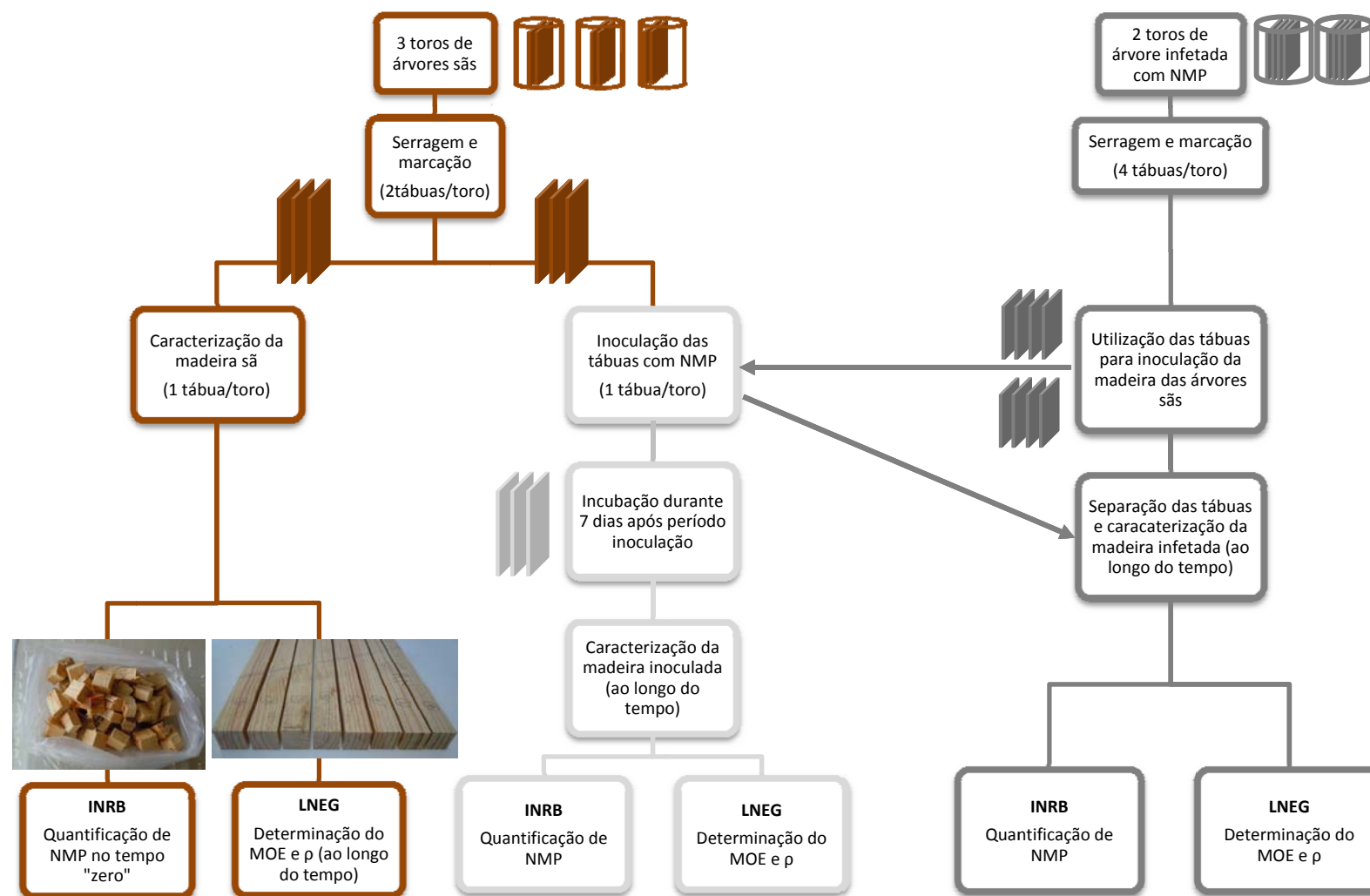


Figura 3.6 Representação esquemática da metodologia seguida após entrada dos toros de madeira na serração – 3 toros de árvores sãs e 2 toros de uma árvore infetada com NMP

3.2.2 Madeira infetada com NMP

Os dois toros foram serrados e selecionadas as quatro tábuas mais centrais de cada um dos toros, com 1,60 x 0,30 x 0,03 m cada (Figura 3.6). As tábuas de madeira infetada com NMP foram também serradas com 1,30 m de comprimento e marcadas com os códigos que as identificam (Anexo, Quadro I e Figura I). Nestas tábuas foi também

marcado o número referente à madeira a inocular (e.g. a tábua infetada marcada com o número 1 foi utilizada para inocular a madeira sã do toro A)

A marcação nas tábuas dos códigos dos momentos de ensaio e dos códigos referentes à madeira a inocular foi realizada de forma aleatória (Figura 3.7).

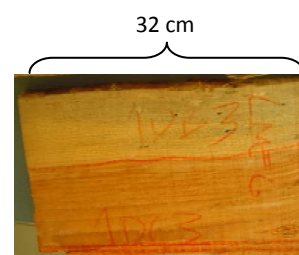


Figura 3.7 Exemplo de marcação de tábua de madeira infetada com os códigos referentes ao tempo, árvore de origem e região do lenho (1DB3 e 1DC3)

3.2.3 Madeira inoculada com NMP

As três tábuas de madeira sã preparadas e marcadas (Figura 3.8), conforme referido no ponto 3.2.1, foram inoculadas recorrendo-se a uma metodologia utilizada no INRB (Sousa, 2011).

Esta metodologia consiste na sobreposição das tábuas de madeira da árvore infetada com NMP (dadora) às tábuas de madeira das árvores sãs (recetora). Assim, as tábuas são agrupadas duas a duas (Anexo, Figura 3.9) colocando-se a tábua infetada por cima da tábua não infetada. As duas tábuas são mantidas juntas utilizando abraçadeiras em plástico (Figura 3.9). No momento imediatamente anterior à sobreposição, é adicionada água com um borrifador às faces de contato de cada par de tábuas, em

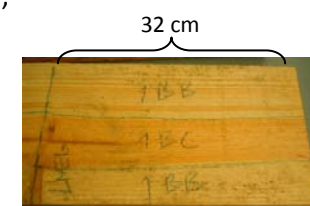


Figura 3.8 Exemplo de marcação de tábua de madeira a inocular com os códigos referentes ao tempo, toro de origem e região do lenho (1BB, 1BC)

quantidade suficiente para humedecer e garantir uma superfície de contínua.



Figura 3.9 Inoculação através da sobreposição das tábuas dadora e recetora e colocação em câmara climatizada

Os conjuntos de tábuas foram colocados na câmara ARALAB Climaplust 400 durante 7 dias, a uma temperatura de 25°C e uma humidade relativa de 70% (Figura 3.9), por serem condições consideradas favoráveis à transferência dos NMP para as tábuas sãs.

Uma semana após o início da inoculação, as tábuas foram separadas e deixadas durante mais uma semana na câmara nas mesmas condições – 25°C, 70% – para promover o estabelecimento das populações de NMP nas tábuas recetoras.

3.3 Ensaios físicos e mecânicos

Para realização dos ensaios físicos e mecânicos foi necessária a preparação dos respetivos provetes.

3.3.1 Preparação dos provetes

Os provetes foram preparados no LNEG, segundo os requisitos dimensionais do ensaio, conforme a norma EN 408:2003 - *Timber structures. Structural timber and glued laminated timber. Determination of some physical and mechanical properties*. As diferentes fases de processamento são as representadas na Figura 3.10.

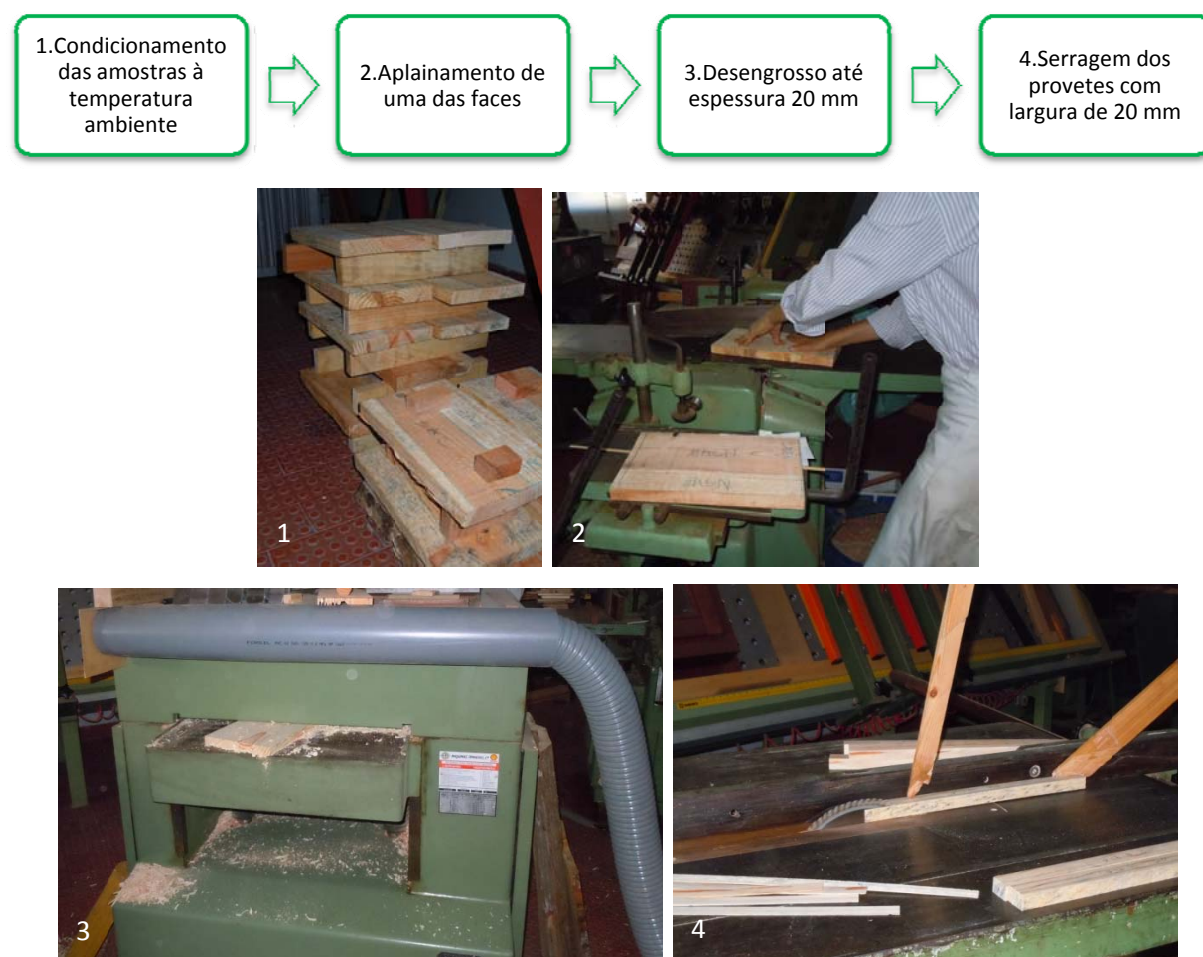


Figura 3.10 Fases de preparação dos provetes para realização dos ensaios físicos e mecânicos: (1) condicionamento, (2) aplainamento, (3) desengrosso e (4) serragem dos provetes

Depois de retiradas da câmara e serradas, as tábuas foram condicionadas à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C e 65% de humidade relativa) até massa constante, a que corresponde um teor de água de equilíbrio da madeira de cerca de 12%. Cada tábua foi aplainada e desengrossada, tendo-se, de seguida, serrado os provetes com uma secção transversal de 20 x 20 mm e

comprimento variável, mas nunca inferior a 320 mm, e com as proporções indicadas na Figura 3.12. Após serragem, os provetes foram marcados individualmente com uma numeração sequencial de 1 a 344 (exemplo na Figura 3.11).

Caracterização dos provetes

Todos os provetes foram caracterizados no que diz respeito à proporção de borne e à sua localização na tábua.

Proporção de borne

Para caracterização da proporção de borne de cada provete, foram realizadas análises visuais das suas duas seções do topo e calculado o seu valor médio. Esta proporção foi utilizada como representando a razão entre o volume de borne e o volume total de cada provete. A relevância desta caracterização está relacionada com a forma como se realizaram as pesquisas e quantificações de NMP (apenas uma amostra no borne e outra no cerne, ver 3.4).

Localização dos provetes nas tábuas

Cada provete foi localizado na tábua no que diz respeito à sua posição radial e axial. Para a sua localização radial, mediram-se as distâncias do centro da secção transversal de cada provete ao centro da tábua e assumiu-se a sua simetria em relação a um eixo central. No caso das tábuas radiais, este eixo coincidiu com a posição da medula; nas tábuas tangenciais, com o ponto mais central da tábua (Figura 3.11).

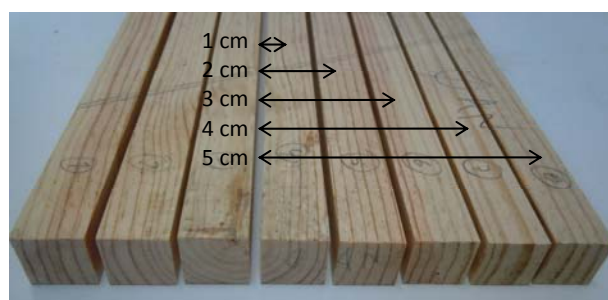


Figura 3.11 Localização radial dos provetes – distância ao centro da tábua

A posição axial dos provetes nas tábuas de madeira sã (e inoculada) coincide com os tempos de ensaio (Figura 3.5). A cada tempo de ensaio foi atribuído o nível equivalente de um a cinco.

Os provetes de madeira infetada não foram localizados no que diz respeito ao seu nível, uma vez que provieram de oito tábuas de dois toros referidos no ponto 3.1. Como tal, foram-lhes atribuídos os níveis correspondentes às zonas de contacto da madeira que inocularam (Figura 3.9).

3.3.2 Teor de água da madeira

Foi medido um teor de água médio de $12 \pm 2\%$ no conjunto das amostras (tábuas) após condicionamento e antes da realização de cada ensaio mecânico. Recorreu-se a um método não destrutivo e instantâneo, utilizando um medidor elétrico de contacto, marca *DOSER*, que usa um método capacitivo.

3.3.3 Massa volúmica

A massa volúmica da madeira foi determinada após condicionamento das amostras e antes da realização de cada ensaio mecânico através do cálculo do volume, recorrendo-se às medições convenientes com um paquímetro e à pesagem dos provetes.

3.3.4 Módulo de elasticidade à flexão estática

O módulo de elasticidade à flexão estática foi determinado segundo a norma EN 408:2003, requisito 12.4.2 - Módulo aparente de elasticidade (ensaio a 3 pontos). Foi utilizado equipamento da marca *Instron*, modelo 1185, com o n.º de série: H4142, existente no LNEG.

A opção pela determinação do módulo de elasticidade aparente (MOE), na qual é utilizada apenas uma carga central (Figura 1.12), deveu-se ao facto de ser de mais simples execução e cálculo, e de apresentar um nível de precisão considerado suficiente para este estudo comparativo (ver 1.2.1).

A montagem dos ensaios, a três pontos, realizou-se segundo a norma EN 408:2003 com as proporções indicadas na Figura 3.12.

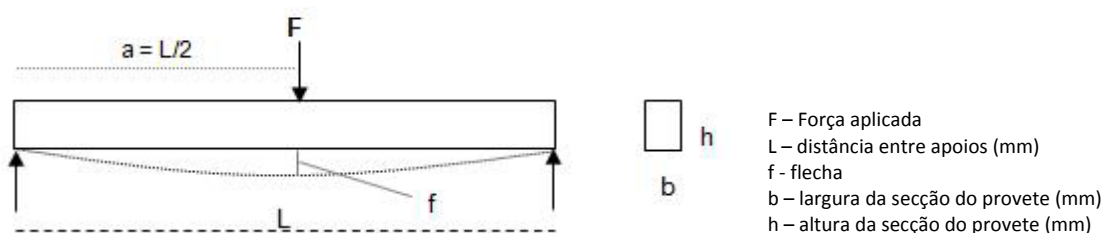


Figura 3.12 Esquema da montagem do ensaio a três pontos segundo a EN 408:2003 (adaptado de Santos, 2007)

As especificações utilizadas para os ensaios seguiram os limites definidos na norma EN 408:2003 e foram as seguintes:

- aplicação da carga a meia distância entre os apoios, $L = 280$ mm (Figura 3.13)
- taxa de aplicação da força constante a uma velocidade de 5 mm/min;
- força máxima aplicada correspondente à flecha de 5 mm (tentando assim evitar a rutura do provete);
- equipamento capaz de medir a carga com uma precisão média de 1 % da carga total aplicada, para cargas inferiores a 10% da carga máxima;
- deformações medidas a meia distância entre os apoios e com uma precisão de 0,02 mm, sendo a deformação máxima imposta até 5 mm.



Figura 3.13 Equipamento “Instron” utilizado e exemplo da montagem realizada dos ensaios à flexão estática a três pontos com a distância entre apoios

Os resultados dos valores de cargas aplicadas obtidos nos ensaios e a respetiva deformação, são utilizados para estabelecer o modelo de uma reta (regressão linear) e posterior cálculo do MOE segundo a Equação 1 e a Figura 3.12 (EN 408:2003). Sendo:

$$MOE = \frac{(F_2 - F_1) L^3}{4 (f_2 - f_1) b h^3}$$

Equação 1

MOE – módulo de elasticidade aparente (N/mm²)

(F₂-F₁) – incremento de força na região reta da curva de deformação (N)

L – distância entre apoios (mm)

(f₂-f₁) – incremento de deformação correspondente a (F₂-F₁) medido no ponto de aplicação da carga (mm)

b – largura da secção do provete (mm)

h – altura da secção do provete (mm)

3.4 Pesquisa e quantificação de NMP

A pesquisa e quantificação de NMP foram realizadas pela Equipa de nematologia e taxonomia do INRB, pelo método do tabuleiro de Whitehead e Hemming (1965) modificado, segundo o procedimento que aqui se reproduz (INRB, 2011).

As amostras (tábuas) utilizadas na quantificação de NMP tinham teores de água variáveis e o número de NMP foi calculado em cada amostra por unidade de peso seco (n.º NMP/g ps).

A fase de preparação da amostra (Figura 3.14) foi acompanhada pela autora do trabalho.

– **Preparação das amostras**

- *determinação do teor de água no borne e no cerne (2 medições em cada local) através da utilização de um método não destrutivo e instantâneo, recorrendo a um medidor elétrico – GANN HT85T;*
- *corte da madeira (borne e cerne separadamente) com serra de fita em cubos de aproximadamente 1 cm³;*
- *separação de cerca de 100±1 g da amostra num saco de plástico com o respetivo código;*
- *limpeza e desinfecção da serra com álcool entre amostras.*



Figura 3.14 Preparação da amostra: medidor do teor de água da madeira, separação do cerne e borne, corte em cubos e pesagem

– **Extração**

- *pesar 100 g da amostra numa folha de papel de mãos;*
- *colocar um quadrado de pano (étamine) na rede do tabuleiro marcando-o com o código da amostra;*
- *dispor a folha de papel com a amostra por cima do pano e fazer um embrulho desta em camada única, primeiro com o papel e de seguida com o pano (Figura 3.15);*

- juntar cerca de 2 l água da torneira até cobrir por completo o embrulho, evitando deixar bolhas de ar por baixo do mesmo (Figura 3.15);
- deixar durante 48 horas à temperatura ambiente;
- retirar o excesso de água, espremendo o embrulho para o tabuleiro;
- escorrer toda a água do tabuleiro para um crivo com malha de 38 μ m, lavando o tabuleiro e a rede, sempre para o crivo;
- lavar a amostra no crivo à torneira de maneira a que vá fazendo-se a concentração num único lado do crivo. Não esquecer os lados do crivo;
- passar a amostra para uma placa de Petri de 50 mm, marcada com o código da amostra, com a ajuda de um esguicho;
- desembrulhar e colocar os cubos de madeira de cada amostra em película de alumínio, marcada com o código, para posterior secagem e pesagem para determinação do peso seco;
- lavar muito bem o crivo com água, entre cada duas amostras, e deixar mergulhado em álcool durante alguns minutos.



– Identificação

- passar a amostra da placa para uma siracusa e observar à lupa;
- retirar para lâmina e confirmar ao microscópio a sua presença, caso à lupa se detete o NMP (Figura 3.15);
- registar na ficha de resultados.

– Quantificação

- deitar a amostra da placa para uma proveta de 25, 50, 100 ml ou maior, consoante a densidade populacional de NMP, acertar ao volume adequado e registar esse volume na ficha de resultados. Se a amostra tiver poucos NMP, passar da placa para siracusa e contar a totalidade (Figura 3.15);
- encher a câmara de contagem com a ajuda de uma pipeta de Pasteur de modo a evitar bolhas de ar;
- contar os NMP à lupa ou no microscópio;
- a contagem deve ser de, pelo menos, 100 NMP;
- se for inferior, contar as alíquotas necessárias até perfazer o total de 100, fazer a média e multiplicar pelo volume;
- registar o resultado da quantificação e fazer as contas em relação ao volume (n° de NMP x volume).



Figura 3.15 Fases de extração, identificação e quantificação realizadas no INRB

3.5 Tratamento e análise estatística

Para aplicação das regras da estatística descritiva foi verificada a normalidade da distribuição das séries de dados obtidas nos ensaios, através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, para as amostras com dimensão inferior a 50 (Shapiro e Wilk, 1965). Verificou-se também a homogeneidade das variâncias através do teste de Levene (Levene, 1960), teste particularmente robusto a desvios de normalidade (Maroco, 2003). A não verificação da normalidade da distribuição dos dados ou homogeneidade da sua variância, exigem a interpretação dos resultados com as necessárias reservas.

Foram utilizados modelos de regressão linear múltipla para procurar relações entre as variáveis em estudo. A seleção das variáveis com poder discriminante foi realizada de modo automático, através do método progressivo ou “*forward stepwise*” disponível no *software*, que encontra o subconjunto de variáveis independentes que ajudam a prever de forma mais adequada as respostas numa variável dependente. Nestes modelos, são calculadas a análise de variância (ANOVA) da regressão com as variáveis com poder discriminativo, bem como os coeficientes e resíduos do modelo e o coeficiente de determinação (R^2) deste. Na modelação é ainda possível a comparação múltipla de médias, tendo-se utilizado para tal o teste de Fisher LSD (Fisher, 1935). Os resíduos dos modelos de regressão foram analisados, verificando a normalidade das suas distribuições através dos gráficos de probabilidade normal (“*normal probability plot*”: probabilidade acumulada que se observaria se os erros possuísssem uma distribuição normal função da probabilidade observada acumulada dos erros) para cada modelo.

Para o tratamento estatístico foi utilizado o *software STATISTICA* versão 10, obtido a partir do site <http://www.statsoft.com/>.

4 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados e a sua discussão referem-se, numa primeira parte, à caracterização das amostras de madeira sã e madeira infetada (4.1) e posteriormente aos efeitos dos ensaios realizados e sua análise estatística (4.2), bem como as modelações realizadas (4.3).

A caracterização das amostras de madeira sã e infetada realizou-se para algumas propriedades físicas e mecânicas, tendo-se também comparado os valores entre amostras. No caso da madeira infetada, analisou-se ainda a presença de NMP, através da sua quantificação (em n.º/g ps).

Os efeitos da infeção com NMP foram estudados através da sua evolução temporal e caracterização das amostras de madeira infetada (4.2.1) e inoculada (4.2.2).

Realizaram-se testes estatísticos para aplicação das regras da estatística descritiva às séries de dados obtidas, tendo-se verificado a normalidade das distribuições e homogeneidade das variâncias (ver 3.5).

Nas modelações realizadas para a madeira sã (4.3.1), infetada (0) e inoculada (4.3.3) pretendeu-se estudar e quantificar a relação entre as variáveis em estudo, nomeadamente a massa volúmica (MV), o módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) e a quantificação de NMP (QNMP) ao longo do tempo.

Por fim, analisaram-se os três tratamentos em conjunto, com o objetivo de avaliar a eventual variação das variáveis MV, MOE e QNMP com o possível efeito dos tratamentos em apreço.

Das 344 amostras (provetes) preparadas para a realização das propriedades físicas e mecânicas, foram rejeitadas quatro por terem defeitos que não permitiram determinar o MOE. Assim, os resultados apresentados referem-se a um total de 340 provetes, repartidos pelos três tratamentos: madeira sã, madeira infetada e madeira inoculada (Figura 4.1 e Anexo Quadro I). Para a quantificação de NMP (n.º/g ps) nas tábuas (QNMP) foram analisadas 30 amostras, duas por cada tratamento (uma amostra do borne e outra do cerne) e em cada momento no tempo (Figura 4.1).

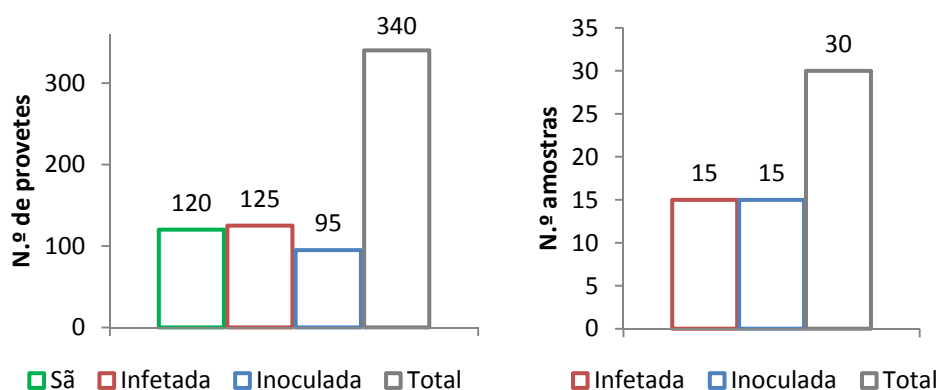


Figura 4.1 Número de provetes utilizados nos ensaios físicos e mecânicos e número de amostras analisadas na quantificação de NMP, por tratamento e total

4.1 Caracterização da madeira

A madeira sã e a madeira infetada foram caracterizadas quanto aos valores médios das seguintes propriedades físicas e mecânicas: proporção de borne (razão entre o volume de borne e o volume total de cada provete, ver 3.3.1); massa volúmica, ρ (ver 3.3.3) e módulo de elasticidade à flexão estática, MOE (ver 3.3.4). Foram realizados os testes estatísticos considerados necessários para estas séries de dados.

4.1.1 Caracterização física e mecânica da madeira sã

A amostra de madeira sã proveio de madeira com origem em três árvores diferentes. Estes provetes foram mantidos sem NMP ao longo dos três meses em estudo.

Como as três tábuas de madeira sã a inocular com NMP provieram das mesmas três árvores, considerou-se que a caracterização destas coincide com aquela que aqui será apresentada para a madeira sã.

A amostra constituída pelos provetes de madeira sã foi caracterizada em relação aos valores médios das propriedades físicas e mecânicas representadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) dos provetes de madeira sã

Estatísticos	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)
$\mu \pm dp$	0,78±0,40	0,54±0,07	7 100±1 517
Coefficiente de variação (%)	50,69	12,18	22
Máximo	1,00	0,77	11 841
Mínimo	0,00	0,44	4 210
n	120		

¹ volume de borne/volume total

A análise dos resultados do Quadro 4.1 permite concluir que existe uma predominância da PB na madeira desta amostra, o que se justificará por tratar-se de madeira proveniente de árvores com idades compreendidas entre os 25 e os 40 anos. A grande variabilidade destes valores, pois o coeficiente de variação é de cerca de 51 % (Quadro 4.1), ajustar-se-á também à variedade etária dos indivíduos amostrados.

O valor médio da ρ , 0,54 g/cm³, encontra-se no intervalo dos valores referidos na bibliografia, que variam entre 0,47 (Sanz *et al.*, 2007) e 0,70 g/cm³ (Santos, 2007). Os valores mínimo e máximo da amostra também não se afastam muito deste intervalo. A amostra apresenta uma variação reduzida de valores em relação à ρ , com um coeficiente de variação de cerca de 12% (Quadro 4.1).

Quanto ao MOE, o valor médio da amostra encontra-se no limite inferior dos valores referidos por vários autores, que variam entre 7 378 (Sanz *et al.*, 2007) e 16 794 MPa (Santos, 2007) e os valores mínimo e máximo encontram-se abaixo dos limites mencionados.

Testes estatísticos

O teste de Kolmogorov-Smirnov realizado para os dados representado no Quadro 4.1 confirmou a proximidade à distribuição normal (aceitação da hipótese nula, $H_0 \sim$ distribuição normal) das amostras ($n=120$) das variáveis ρ ($D=0,1057$; $p<0,1500$) e MOE ($D=0,0974$; $p>0,2000$); rejeitando a normalidade (aceitação da hipótese alternativa, H_1) relativamente à PB ($D=0,4360$; $p<0,0100$).

Foi utilizado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias nas amostras, para as variáveis PB, ρ e MOE, aos pares, entre as três repetições e entre os cinco níveis. Na apreciação realizada relativamente às repetições predomina a homogeneidade de variâncias apenas na ρ e nos níveis verifica-se a homogeneidade de variâncias no MOE e a sua predominância na ρ . Em relação à variável PB, pelas suas características intrínsecas, não apresenta homogeneidade de variâncias em relação às repetições, nem em relação aos níveis (apenas algumas exceções de pares de níveis consecutivos, e.g. a variância da ρ é homogênea entre os níveis dois e três, $p=0,885$).

4.1.2 Quantificação de NMP e caracterização física e mecânica da madeira infetada

A caracterização da amostra de madeira infetada realizou-se antes da sua utilização na inoculação. Como se trata de madeira infetada, começou por caracterizar-se esta madeira do ponto de vista biológico, através da quantificação de NMP (QNMP) (Quadro 4.2).

Quadro 4.2 Quantificação inicial de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas tábuas de madeira infetada

Amostra	QNMP (n.º/g ps) ¹	
	Borne	Cerne
D1	46,54	0,00
D2	4,09	0,00
D3	24,44	0,00

¹ N.º de NMP por unidade de peso seco

Os resultados relativos à QNMP nas amostras de madeira infetada indicam a inexistência de NMP no cerne (Quadro 4.2), conforme é igualmente referido por Yamada para outras espécies do género *Pinus* (2008). A QNMP no borne da madeira infetada varia bastante nas três tábuas analisadas, pois o valor da $\mu \pm dp$ é de $25,02 \pm 221,23$ NMP/g ps. O coeficiente de variação, de cerca de 85 %, mostra uma grande dispersão de valores em torno do valor médio, expressando a grande variabilidade desta amostra.

A inexistência de NMP no cerne da madeira infetada levou a que nas modelações realizadas para a madeira infetada (ver 4.3.2) apenas se tenham considerado provetes com alguma PB, ou seja, excluíram-se todos os provetes constituídos exclusivamente por cerne. O mesmo princípio foi utilizado para a madeira inoculada (ver 4.3.3) e para a análise de todos os tratamentos em conjunto (ver 4.4). Após a QNMP, a amostra constituída pelos provetes de madeira infetada (antes da inoculação) foi caracterizada em relação aos valores médios das propriedades físicas e mecânicas que se representam no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) dos provetes de madeira infetada

Estatísticos	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)
$\mu \pm dp$	0,25±0,43	0,57±0,10	7 053±2 286
Coeficiente de variação (%)	173,33	16,88	32
Máximo	1,00	0,75	10 596
Mínimo	0,00	0,41	3 253
N	28		

¹ volume de borne/volume total

Esta amostra (Quadro 4.3) apresenta um valor médio da PB reduzido, o que pode dever-se aos 72 anos de idade da árvore de onde proveio esta madeira. O valor médio da PB da amostra de madeira sã, 0,78 (Quadro 4.1) proveniente de árvores mais jovens (25-40 anos) é mais de três vezes superior ao da madeira infetada (Quadro 4.3).

A PB na madeira infetada apresenta um nível de variação muito grande em torno do valor médio, expressa por um coeficiente de variação superior a 170% (Quadro 4.3). Este valor é bastante superior ao observado na madeira sã (Quadro 4.1), que se tratará de uma amostra mais homogénea em relação à PB dos provetes que a constituem. O desvio padrão é idêntico em ambos os casos, mas na madeira sã verifica-se um valor médio inferior (Quadro 4.1), por tratar-se de madeira de árvores mais jovens e com mais elevada PB.

O valor médio da ρ , 0,57 g/cm³ (Quadro 4.3), encontra-se entre a gama de valores referidos na bibliografia (0,47 g/cm³, Sanz *et al.*, 2007; 0,70 g/cm³; Santos, 2007), assim como os valores máximo e mínimo (Quadro 4.3). A reduzida variabilidade da ρ na amostra está representada nos valores reduzidos do desvio padrão, 0,10 g/cm³, e do coeficiente de variação, cerca de 17% (Quadro 4.3), ambos relativamente próximos dos calculados para a madeira sã (Quadro 4.1).

O valor mínimo da ρ (Quadro 4.3) é inferior ao referido na bibliografia, o que pode dever-se à presença da doença do ardido/cardido no cerne. Os “*pequenos alvéolos ou bolsas revestidas por enfeltrado micelar branco*” que caracterizam esta doença (Carvalho, 1996) provocarão uma redução da massa volúmica desta madeira (Figura 3.3).

No que diz respeito ao MOE, o valor médio da amostra, 7 053 MPa (Quadro 4.3), encontra-se no limiar inferior do intervalo de valores referidos por vários autores (7 378 MPa, Sanz *et al.*, 2007 e 16 794 MPa, Santos, 2007) tal como se verificou para a madeira sã (Quadro 4.1). O coeficiente de variação do MOE de 32% (Quadro 4.3) indica existir alguma variabilidade nesta amostra, 10% superior à detetada na amostra de madeira sã (Quadro 4.1). O valor mínimo, 3 253 MPa (Quadro 4.3), é inferior em mais de 50% a valores referidos na bibliografia (Quadro 1.4). Também este facto pode estar relacionado com a já referida doença do ardido/cardido, que causa a destruição gradual da madeira, devido a uma decomposição progressiva da lenhina (Carvalho, 1996) e terá com certeza influência na resistência do material.

Numa amostra com provetes constituídos exclusivamente por borne ($n=6$), o valor da $\mu \pm dp$ do MOE é de $9\,948 \pm 543$ MPa ($p = 0,56 \pm 0,05$), um valor superior ao da amostra com todos os provetes (Quadro 4.3) e no intervalo referido na bibliografia. Nesta amostra, também os valores máximo, 10 596 MPa, e mínimo, 9 060 MPa, são superiores aos da amostra com todos os provetes (Quadro 4.3), correspondendo-lhe um coeficiente de variação de apenas 5,45%, bastante inferior aos 170% da amostra com todos os provetes (Quadro 4.3).

Testes estatísticos

Realizaram-se os seguintes testes estatísticos para as amostras representadas no Quadro 4.3. O teste de Shapiro-Wilk (teste de avaliação da normalidade para amostras reduzidas, $n < 50$) confirmou a normalidade da distribuição dos dados ($n=28$) para as variáveis ρ (SW-W=0,9527; $p=0,2317$) e MOE (SW-W=0,9333; $p=0,0746$), e rejeitou-a, como na madeira sã, relativamente à PB (SW-W=0,5587; $p=0,0000$).

O teste de Levene confirmou a homogeneidade das variâncias das amostras ($p > 0,05$) relativamente às variáveis PB, ρ e MOE nas três repetições.

4.1.3 Comparação entre as características físicas e mecânicas das madeiras sã e infetada

Realizou-se uma comparação entre os tratamentos madeira sã e madeira infetada, em relação aos valores médios das variáveis estudadas, PB, ρ e MOE. No Quadro 4.4 apresentam-se os resultados desta comparação, considerando-se também o fator repetição – 3 tábuas para cada tratamento.

Quadro 4.4 Caracterização média ($\mu \pm dp$) da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e MOE do estado de referência da madeira sã e da madeira infetada, por repetição

Tratamento	Repetições	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)	n
Madeira sã	A	0,48±0,46	0,59±0,07 ^a	7 064±751 ^a	40
	B	0,10±0,01 ^a	0,54±0,05 ^b	8 485±1 457 ^b	40
	C	0,86±0,34 ^a	0,50±0,04	5 751±705 ^c	40
Madeira infetada	D1	0,38±0,52	0,59±0,08 ^a	8 162±2 079 ^b	8
	D2	0,21±0,42 ^b	0,57±0,13 ^{ab}	6 800±2 761 ^a	10
	D3	0,19±0,40 ^b	0,56±0,09 ^{ab}	6 418±1 755 ^{ac}	10

¹ volume de borne/volume total Nota: valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, teste de Fisher LSD e ANOVA ($p < 0,05$)

Os valores médios da PB da madeira sã (Quadro 4.4) são significativamente ($p < 0,05$) diferentes daqueles da madeira infetada (teste de Fisher LSD). Estas diferenças estarão relacionadas com o facto da madeira sã provir de árvores jovens (entre 25 e 40 anos), com menor PB, enquanto a madeira infetada tem origem numa única árvore com 72 anos. A PB também é significativamente diferente ($p < 0,05$) entre a repetição A e D1 e as repetições B, C, D2 e D3 (Quadro 4.4 e Figura 4.2), confirmada pelo teste de Fisher LSD e pela análise de variância (ANOVA) para esta variável ($F=25,0495$; $gl=3$; $p=0,0000$).



Figura 4.2 Aspeto das tábuas de madeira sã: (1) repetição A, (2) repetição B e (3) repetição C

A comparação dos valores médios da ρ da madeira sã e da madeira infetada (Quadro 4.4) permite concluir que são significativamente ($p < 0,05$) diferentes (teste de Fisher LSD). Observam-se diferenças significativas com as repetições, nos valores médios da ρ da madeira sã, confirmadas pela ANOVA do modelo ($F=11,9033$; $gl=6$; $p=0,0000$) e pelo teste de Fisher LSD. Contudo, não se verificaram diferenças significativas entre as repetições da madeira infetada (Quadro 4.4). A repetição C é a única que apresentou valores médios da ρ diferentes das restantes repetições.

O MOE apenas varia significativamente ($p < 0,05$) com as repetições, não se verificando diferenças significativas entre os valores médios da madeira sã e infetada (Quadro 4.4), confirmado pelo teste de Fisher LSD e ANOVA do modelo ($F= 16,84492$; $gl=6$; $p=0,0000$).

4.2 Efeitos da infeção com NMP

Analysaram-se os tratamentos em que houve alterações da quantificação de NMP ao longo do tempo, madeira infetada e madeira inoculada, estudando-se os efeitos desta evolução em relação às características iniciais das madeiras sã e infetada. Para estas séries de dados foram realizados os testes estatísticos considerados necessários.

4.2.1 Evolução temporal na madeira infetada

Foi estudada a evolução da madeira infetada ao longo do tempo, depois da sua utilização para a inoculação da madeira sã. No Quadro 4.5 apresenta-se uma caracterização média da quantificação de NMP nas tábuas de madeira infetada analisadas. Consideraram-se todas as observações realizadas ao longo do tempo, desde o momento inicial (tempo 0) até três meses depois (tempo 4).

Quadro 4.5 Caracterização média da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas amostras das tábuas de madeira infetada, nos três meses em estudo (A) e QNMP realizada nas três repetições (D1, D2 e D3) ao longo do tempo (B)

(A)			(B)			
Estatísticos	QNMP (n.º/g ps) ¹		Tempo (dias)	QNMP no borne(n.º/g ps)		
	Borne	Cerne		D1	D2	D3
$\mu \pm dp$	49,45±57,99	0,00±0,00	0	46,54	4,09	24,44
Coeficiente de variação (%)	117,27	-	14	126,20	0,47	58,80
Máximo	207,96	0,00	28	0,16	61,56	78,51
Mínimo	0,16	0,00	56	27,09	207,96	15,01
n	15	15	82	2,92	86,22	1,81

¹número por unidade de peso seco

Foi detetado NMP apenas no borne da madeira infetada (Quadro 4.5A), tal como já havia sido verificado no estado de referência (Quadro 4.2) e referido por Yamada (2008). Observou-se uma variação considerável de valores em relação ao valor médio das 15 amostras, 49,45 NMP/g ps (Quadro 4.5A). Esta variação é ilustrada pelos valores elevados do desvio padrão, cerca de 60 NMP/g ps (Quadro 4.5) e do coeficiente de variação, cerca de 117% (Quadro 4.5).

Na Figura 4.3 está representada a variação da QNMP ao longo do período em estudo, assim como os valores médios das três repetições, em cada momento no tempo.

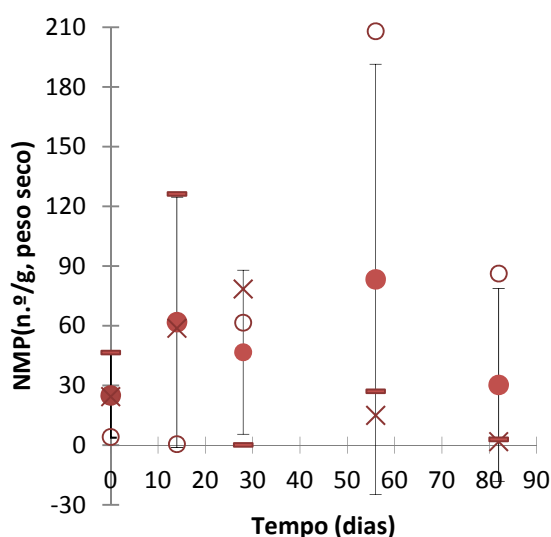


Figura 4.3 Quantificação de nemátode de madeira do pinheiro (QNMP) no borne nas amostras das tábuas de madeira infetada; valores observados por repetição: — D1, ○ D2, × D3; ● $\mu \pm dp$ (barras verticais)

A análise da Figura 4.3 e do Quadro 4.2B permite concluir acerca da grande variabilidade da QNMP nas três amostras (repetições) analisadas no mesmo momento e também ao longo do tempo. A variação observada pode dever-se à natural variação biológica e dispersão das populações de NMP na árvore e consequentemente na madeira (Sousa *et al.*, 2011). Adicionalmente, a colheita aleatória realizada para obter a quantidade de amostra necessária (100 ± 1 g de uma tábua, ver 3.4), também poderá influir na variabilidade dos resultados, principalmente porque se verificou uma variação considerável

da QNMP entre tábuas contíguas de uma mesma árvore, no mesmo momento do tempo. Em casos extremos cerca de vinte vezes (Figura 4.3).

A variação da QNMP com o tempo, representada na Figura 4.3, aponta para uma tendência, em termos médios, de aumento até aos 56 dias, momento a partir qual se observa a sua redução. Vários autores referem ter encontrado sobrevivência de NMP em estilha de madeira após 84 (Halik e Bergdahl, 1990) e 130 dias (Tomminen *et al.*, 1991). Contudo, estudos mais recentes indicam que as populações de NMP podem sobreviver até 40 semanas (aproximadamente 280 dias) em madeira serrada (Sousa *et al.*, 2011). Neste estudo, o tamanho máximo da população foi atingido entre as 12 e as 18 semanas (84 e 126 dias), tendo-se encontrado uma correlação entre o decréscimo subsequente e a descida do teor de água da madeira abaixo do PSF (Sousa *et al.*, 2011).

A madeira infetada cuja QNMP se representa na Figura 4.3, apresentava valores de teor de água, depois de retirada da câmara climática, de cerca de 20 %, que está abaixo do PSF da madeira de pinheiro-bravo e poderá ter levado ao decréscimo das populações de NMP existentes nestas tábuas.

Caracterização física e mecânica

A amostra constituída pelos provetes de madeira infetada, desde o momento inicial (tempo 0) até três meses depois (tempo 4), foi caracterizada em relação aos valores médios das propriedades físicas e mecânicas que se encontram representados no Quadro 4.6.

Quadro 4.6 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) nos provetes de madeira infetada, nos três meses em estudo (A), e valores médios das três repetições ao longo do tempo (B)

(A)				(B)			
Estatísticos	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)	Tempo (dias)	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)
$\mu \pm dp$	0,30±0,43	0,63±0,13	7 451±2 324	0	0,25	0,57	7053
Coefficiente de variação (%)	142,51	20,72	31.19	14	0,30	0,59	7970
Máximo	1,00	0,94	11 506	28	0,29	0,70	8945
Mínimo	0,00	0,41	1 861	56	0,50	0,68	8120
n	125			82	0,17	0,62	5223*

¹volume de borne/volume total *valor inferior aos restantes porque se trata de 90% de provetes do cerne com a doença do “cardido/ardido”

A amostra de madeira infetada apresentou um valor médio da PB reduzido e uma variabilidade considerável, coeficiente de variação estimado de cerca de 142% (Quadro 4.6A). A reduzida PB pode justificar-se pelo facto já explanado de que se trata de madeira proveniente de uma árvore com 72 anos. A média de valores da ρ da amostra, 0,63 g/cm³ (Quadro 4.6A), encontra-se no intervalo de valores referidos na bibliografia (0,47 g/cm³, Sanz *et al.*, 2007; 0,70 g/cm³; Santos, 2007). Contudo, o valor máximo é superior, em cerca de 34%, e o valor mínimo ligeiramente inferior, cerca de 13% ao da bibliografia. Os valores elevados da ρ podem estar relacionados com o facto de predominarem provetes com maior proporção de cerne e estes apresentarem teores muito elevados de resina (Figura 4.4) eventualmente produzida como reacção ao processo de resinagem aplicado a esta árvore (Figura 3.3).

Em relação ao valor médio do MOE da amostra, 7 451 MPa (Quadro 4.6), e à semelhança da do estado de referência, também se encontra no limite inferior dos valores referidos na bibliografia (7 378 MPa, Sanz *et al.*, 2007 e 16 794 MPa, Santos, 2007). Esta amostra apresenta um coeficiente de variação não muito elevado (Quadro 4.6), muito próximo daquele do estado de referência, 32%. Assim, parece não ter havido alterações em relação aos valores do MOE da madeira infetada quando

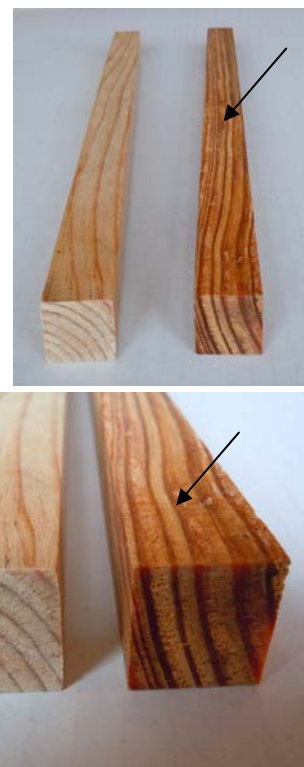


Figura 4.4 Proвете do cerne de madeira infetada, com elevado teor de resina

comparada com os valores registados da evolução da infeção com NMP ao longo do tempo. Em 4.3 – Modelação, será analisada a eventual relação entre estas variáveis.

O valor mínimo do MOE da amostra é bastante inferior aos valores referidos por vários autores e tal poderá dever-se à já referida doença no cerne – ardido/cardido – especialmente porque nesta amostra predominam os provetes de cerne, onde não foi detetado NMP.

A inexistência de NMP no cerne da madeira infetada e a doença no cerne levaram a que se considerasse uma amostra constituída por provetes exclusivamente de borne ($n=28$). Nesta amostra, o valor da $\mu \pm dp$ do MOE é $9\,191 \pm 1\,215$ MPa, um valor médio superior ao referido para todos os provetes e mais próximo daqueles encontrados na bibliografia. Esta variável mostra um coeficiente de variação de apenas 13%, inferior aos cerca de 31% do valor da amostra de madeira infetada com todos os provetes (Quadro 4.5). Os valores do máximo, 10 924 MPa, e do mínimo, 6 064 MPa, são superiores aos apresentados no Quadro 4.5, apesar do valor mínimo ainda ser, para situações comparáveis, inferior ao da bibliografia.

Testes estatísticos

O teste de Shapiro-Wilk confirmou a normalidade da distribuição dos dados representados no Quadro 4.5 para a QNMP no tempo 0 ($n=8$; SW-W=0,315; $p=0,0616$) e rejeitou-a para os tempos 1 ($n=10$; SW-W=0,9721 $p=0,1340$), 2 ($n=12$; SW-W=0,8505; $p=0,0373$), 3 ($n=15$; SW-W=0,299; $p=0,0005$) e 4 ($n=7$; SW-W=0,007 $p=0,003$). Considerando a amostra com todos os tempos ($n=52$), o teste de Kolmogorov-Smirnov também rejeitou a normalidade da distribuição ($D=0,2349$; $p<0,0100$). Tal como já referido trata-se de um fenómeno biológico muito variável, cuja distribuição, conforme se esperava e assim se confirmou, não é normal. O teste de Levene confirmou a predominância da homogeneidade das variâncias ($p>0,05$) das amostras relativamente à variável QNMP nos vários tempos.

O teste de Kolmogorov-Smirnov confirmou a proximidade à distribuição normal das amostras representadas no Quadro 4.6 ($n=125$) das variáveis ρ ($D=0,1001$; $p<0,2000$) e MOE ($D=0,1028$; $p<0,1500$) e rejeitou a normalidade da variável PB ($D=0,3426$; $p<0,0100$).

O teste de Levene confirmou a homogeneidade das variâncias das amostras ($p>0,05$) relativamente às variáveis PB e MOE nas três repetições. O mesmo não se verificou na ρ , pois não há homogeneidade de variâncias entre a REP3 e as REP1 e REP2. Contudo, caso se considere a amostra constituída pelos provetes com borne maior que zero, verifica-se a homogeneidade das variâncias das amostras para as três variáveis (pelo teste de Levene). Afinal, estas serão as amostras que irão ser utilizadas na modelação para a madeira infetada (ver 4.3.2).

4.2.2 Evolução temporal na madeira inoculada

A madeira sã foi inoculada com NMP e foi estudada a evolução do seu efeito ao longo do tempo. A caracterização da madeira inoculada em relação à quantificação de NMP (Quadro 4.7) foi realizada considerando todas as observações realizadas, desde o momento após a inoculação (tempo 1) até três meses depois (tempo 4).

Quadro 4.7 Caracterização média da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) nas amostras das tábuas de madeira inoculada durante o período em estudo (A) e QNMP realizada nas três repetições (A, B e C) ao longo do tempo (B)

(A)			(B)			
Estatísticos	QNMP (n.º/g ps) ¹		Tempo (dias)	QNMP no borne(n.º/g ps)		
	Borne	Cerne		A	B	C
Moda=Mediana	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00
Proporção de zeros (%)	66,67	100	14	0,23	0,00	0,15
Máximo	30,17	0,00	28	0,00	0,00	30,17
Mínimo	0,00	0,00	56	0,00	0,00	1,07
n	12	12	82	0,00	0,00	0,00

²quantificação por unidade de peso seco. Nota: O afastamento da normalidade e a ausência de homogeneidade da variância limita a sua utilização estatística

Em relação à QNMP, e à semelhança do verificado na madeira infetada, não foi detetado NMP no cerne da madeira inoculada (Quadro 4.7A), conforme referido por Yamada (2008). Assim, no borne da madeira inoculada (Figura 4.5 e Quadro 4.7B), verifica-se uma variação considerável da QNMP, com um valor máximo de 30,17 NMP/g ps, um mínimo de 0,00 NMP/g ps, e uma proporção de zeros elevada de cerca de 67% (Quadro 4.7A).

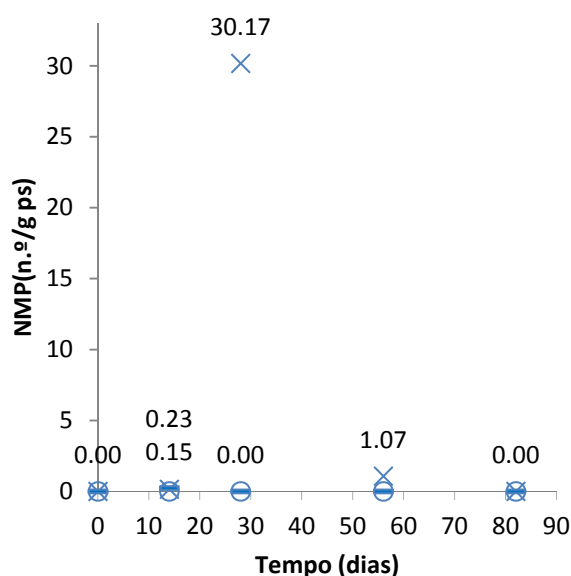


Figura 4.5 Quantificação de nemátode de madeira do pinheiro (QNMP) no borne das amostras das tábuas de madeira inoculada; valores observados por repetição: — A, ○ B, X C (n=15)

É importante salientar que apenas se detetou NMP no tempo 1 da repetição A, 0,23 NMP/g ps, e nos tempos 1 a 4 na repetição C, pois as restantes quantificações foram de valor nulo (Figura 4.5 e Quadro 4.7B). A repetição C é aquela que apresenta um valor médio da ρ mais baixo 0,50 g/cm³, significativamente diferente das outras repetições (teste de Fisher LSD) e provém de tábuas tangenciais, diferentes das tábuas radiais das repetições A e B (ver 3.2). Tal facto encontrará eventual explicação na maior quantidade de canais de resina (axiais e secções dos radiais) na repetição C, favorecendo deste modo a acessibilidade do NMP.

Caso se analise a QNMP numa amostra constituída apenas pelos valores diferentes de zero, o valor da $\mu \pm dp$ é de $7,91 \pm 14,85$ NMP/g ps. Esta amostra tem uma proporção de zeros de 50 %, que apesar de inferior aos 67 % do Quadro 4.7 (com todos os valores de QNMP), continua dificultar a interpretação dos resultados por ser demasiado elevada. O coeficiente de variação da amostra constituída apenas por valores diferentes de zero é ainda muito elevado e tem o valor de 188 %. A variação observada pode dever-se ao facto de se tratar de um fenómeno biológico extremamente variável, tal como se verificou na madeira infetada (Figura 4.3) e como referido por Sousa *et al.* (2011). Na Figura 4.6 representa-se a relação entre a QNMP da madeira dadora e a QNMP da madeira inoculada.

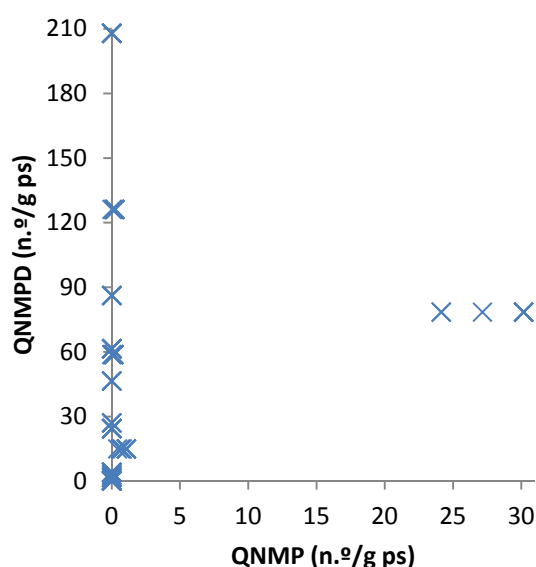


Figura 4.6 Relação entre a quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira dadora (QNMPD) e recetora (QNMP), n=99 amostras (provetes)

A observação da Figura 4.6 permite concluir a inexistência de relação entre a QNMP na madeira dadora e na madeira recetora, existindo um número considerável de valores nulos nas recetoras inoculadas por dadoras com número considerável de NMP (e.g. QNMPD 207,96 NMP/g ps e QNMP 0,00 NMP/g ps). Uma análise de todas as inoculações realizadas (n=12) e para valores da QNMP da madeira dadora sempre superior a zero, em apenas quatro das doze tábuas (33 %) se obtiveram inoculações positivas e em apenas numa das tábuas se observaram valores superiores a 2 NMP/g ps.

Adicionalmente, por se tratar de madeira inoculada, existem outros fatores que poderão influir nestes resultados. É o caso do método de inoculação utilizado, pois neste método não foram definidas claramente as zonas de contacto, ou seja, o borne das tábuas dadoras (madeira infetada) não foi sempre escrupulosamente sobreposto ao borne da tábua recetora (madeira inoculada). Agora que se confirmou que o NMP está presente apenas no borne, este seria um procedimento relevante e a considerar. Também a distribuição agregada e heterogénea de NMP que se suspeita existir nas tábuas dadoras, condicionará em grande medida o sucesso de inoculação, bem como a forma como as populações de NMP se distribuem nas tábuas recetoras. Tal como referido para a madeira infetada, pode haver interferência relacionada com o processo de colheita das amostras na madeira e com o facto de se tratar de uma amostra aleatória de toda a tábua (ver 4.2.1). A lacuna de informação que existe em relação à distribuição do NMP nas tábuas poderia ser suprida através de uma colheita de amostras criteriosamente posicionadas na tábua, por oposição à atual casualidade.

É ainda necessário mencionar outros fatores que poderão ter influenciado a inoculação, como é o caso dos teores de água das madeiras, recetora e dadora, a presença/ausência de fungos (que possibilitam o aumento rápido das populações do nemátode), e o vigor da população nas tábuas dadoras. Em relação ao teor de água no início da inoculação, a madeira dadora apresentava valores entre 50 e 80%, e a madeira recetora entre 40 e 70%, bem acima do PSF (25-30%), teor de água abaixo do qual foi observado declínio de populações de NMP (Sousa *et al.*, 2011). Como tal, este não deverá ter sido o fator que limitou o sucesso da inoculação. Contudo, em relação ao desenvolvimento da população de NMP na repetição C (Figura 4.5), o decréscimo de 30,17 NMP/g ps, aos 28 dias, para 0,00 NMP/g ps, aos 82 dias, pode estar relacionado com o teor de água de equilíbrio atingido pela madeira no interior da câmara climática, cerca de 20%. Tal como referido para a madeira infetada, o facto deste valor se encontrar abaixo do PSF limita o crescimento da população de NMP (Sousa *et al.*, 2011).

Os fungos cromogéneos do azulamento que podem ser utilizados como alimento pelos NMP na sua fase micófaga (Ye *et al.*, 1993) necessitam de teores de água da madeira acima do PSF (Viitanen, 1997; Schmidt, 2006).

No que diz respeito ao vigor da população de NMP, a madeira dadora foi recolhida do campo no mês de Maio, sugerindo, com base no conhecimento do ciclo biológico do NMP em Portugal que a população já se encontrava na árvore (e na madeira) há pelo menos 8 ou 9 meses (Naves, 2007). Este intervalo de tempo considerável poderá levar ao declínio das populações de nemátodes, pelo que seria mais favorável utilizar populações naturais no período do Outono/Inverno.

Para além de todas as razões já apontadas, seria importante verificar, pouco tempo após a inoculação, se a população de NMP sobreviveu e está instalada, caracterizando-a em relação ao número de indivíduos nos diferentes estádios, juvenis e adultos (fêmeas e machos). Neste trabalho o período de incubação utilizado foi de 1 semana, após 1 semana de inoculação, embora alguns autores refiram períodos que atingem as seis semanas (Hashimoto, 1975; Kuroda e Ito, 1992).

Por fim, mas não menos importante, será de salientar a perturbação da variabilidade deste fenómeno biológico, já verificada na madeira de forma natural e as suas consequências por via da fraca grandeza da amostra, em posteriores modelações.

Caracterização física e mecânica

Para a caracterização física e mecânica da amostra de madeira inoculada, consideraram-se tal como para a madeira infetada (4.2.1), todas as observações realizadas ao longo do tempo (Quadro 4.8). Nesta amostra estão incluídos os provetes de madeira sã antes da sua inoculação, até três meses depois (n=95+24).

Quadro 4.8 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (ρ) e módulo de elasticidade à flexão estática (MOE) nos provetes de madeira inoculada, nos três meses em estudo

Estatísticos	PB ¹	ρ (g/cm ³)	MOE (MPa)
$\mu \pm dp$	0,70 \pm 0,41	0,54 \pm 0,06	6 825 \pm 1 518
Coeficiente de variação (%)	59,21	11,51	23,61
Máximo	1,00	0,77	11 466
Mínimo	0,00	0,42	3 955
n	119		

¹volume de borne/volume total

De acordo com os resultados do Quadro 4.8 é possível verificar uma predominância da PB na madeira inoculada mas com uma variabilidade elevada, a que corresponde um coeficiente de variação de cerca de 59%. A $\mu \pm dp$ e o coeficiente de variação da madeira inoculada são próximos dos valores calculados para a madeira sã, pelas razões já apontadas na análise do Quadro 4.1.

O valor médio da ρ da madeira inoculada, 0,54 g/cm³ (Quadro 4.8), encontra-se no intervalo de valores referidos na bibliografia (0,47 g/cm³, Sanz *et al.*, 2007; 0,70 g/cm³; Santos, 2007). Também os valores mínimo e máximo da ρ (Quadro 4.8), se aproximam dos limites dessa gama de valores, apesar de se encontrarem, respetivamente, abaixo e acima deles. Esta amostra apresenta uma reduzida variabilidade da ρ , tal como é possível constatar pelos valores do desvio padrão, 0,06 g/cm³ e coeficiente de variação, cerca de 12% (Quadro 4.8). Estes resultados, tal como era esperado, são muito semelhantes aos obtidos para a madeira sã (Quadro 4.1).

O MOE médio da amostra é inferior aos referidos na bibliografia (7 378 MPa, Sanz *et al.*, 2007 e 16 794 MPa, Santos, 2007), estando o valor máximo, 11 466 MPa (Quadro 4.8), dentro desse intervalo. Porém, o valor mínimo, 3 955 MPa (Quadro 4.8), é bastante inferior e encontra-se cerca de 40% abaixo. Esta amostra apresenta uma variabilidade algo reduzida do MOE, pois o coeficiente de variação é próximo de 24% (Quadro 4.8).

Todos os resultados obtidos para as características físicas e mecânicas na amostra da madeira inoculada corroboram os obtidos na amostra da madeira sã (Quadro 4.1), não se verificando diferenças significativas entre os dois tratamentos.

Testes estatísticos

Realizaram-se testes estatísticos para as amostras representadas no Quadro 4.8. Não se verificou a homogeneidade das variâncias (teste de Levene, $p < 0,05$) nem a normalidade da distribuição da variável QNMP (teste de Shapiro-Wilk) nos tempos em que tomou valores diferentes de zero: tempo 1 ($n=23$; SW-W=0,8061; $p=0,0005$), tempo 2 ($n=23$; SW-W=0,6368; $p=0,0000$) e tempo 3 ($n=19$; SW-W=0,7007; $p=0,0001$). Estes resultados devem-se à exiguidade e heterogeneidade das observações. Considerando a amostra com todos os tempos ($n=99$), o teste de Kolmogorov-Smirnov também

rejeitou a normalidade da distribuição ($D=0,4860$; $p<0,0100$), devido à heterogeneidade das observações e ao número considerável de valores nulos (69%).

O teste de Kolmogorov-Smirnov confirmou a normalidade da distribuição dos dados representados no Quadro 4.8 ($n=119$) das variáveis ρ ($D=0,0910$; $p>0,2000$) e MOE ($D=0,0912$; $p>0,2000$) e rejeitou a normalidade da PB ($D=0,3162$; $p<0,0100$).

Foi utilizado o teste de Levene ($p>0,05$) para verificar da homogeneidade das variâncias nas amostras, para as variáveis PB, ρ e MOE, aos pares, entre as três repetições e entre os cinco níveis. Na apreciação realizada relativamente às repetições predominou a homogeneidade de variâncias na PB e ρ , o mesmo não se verificando no MOE. Por outro lado, em relação aos níveis, verificou-se a homogeneidade de variâncias apenas no MOE.

4.3 Modelos estatísticos por tratamento

Com o objetivo de estudar e quantificar a relação entre as variáveis em estudo, nomeadamente a ρ , o MOE e a QNMP ao longo do tempo (TMP), foram utilizados modelos de regressão (*forward stepwise*) para os três tratamentos, madeira sã, madeira infetada e madeira inoculada.

Para melhorar os modelos e perceber em que medida influíram nos resultados, incluíram-se variáveis utilizadas para caracterizar os provetes, tais como, as repetições (A-REPA, B-REPB e C-REPC), o nível (NV-posição relativa na tábua de origem), a distância ao centro da tábua (DC) e a proporção de borne (PB-volume de borne/volume total).

Porque existem tábuas radiais e tangenciais, tentou incluir-se esta variável nos modelos. Contudo, verificou-se existir colinearidade desta com outras variáveis e como tal não foi utilizada como variável explicativa em qualquer dos modelos criados.

Foi realizada a análise dos resíduos do modelo de regressão, tendo-se considerado os resultados aceitáveis, na generalidade dos casos. A única exceção são os resultados obtidos para o modelo de regressão da QNMP realizado para a madeira inoculada.

Conforme já foi referido e por motivos relacionados com a ausência de NMP no cerne, nas modelações da madeira infetada e da madeira inoculada excluíram-se os provetes constituídos exclusivamente por cerne (proporção de borne > 0). Outro fator que pesou nesta decisão foi a presença da doença do ardido/cardido no cerne da madeira infetada (3.2.2) que poderia enviesar os valores médios dos resultados para os ensaios mecânicos e induzir conclusões menos corretas.

4.3.1 Madeira sã

Nos modelos de regressão delineados para a amostra de madeira sã ($n=120$), selecionaram-se as variáveis MV e MOE como variáveis dependentes e as restantes características das amostras como variáveis independentes (Figura 4.7).

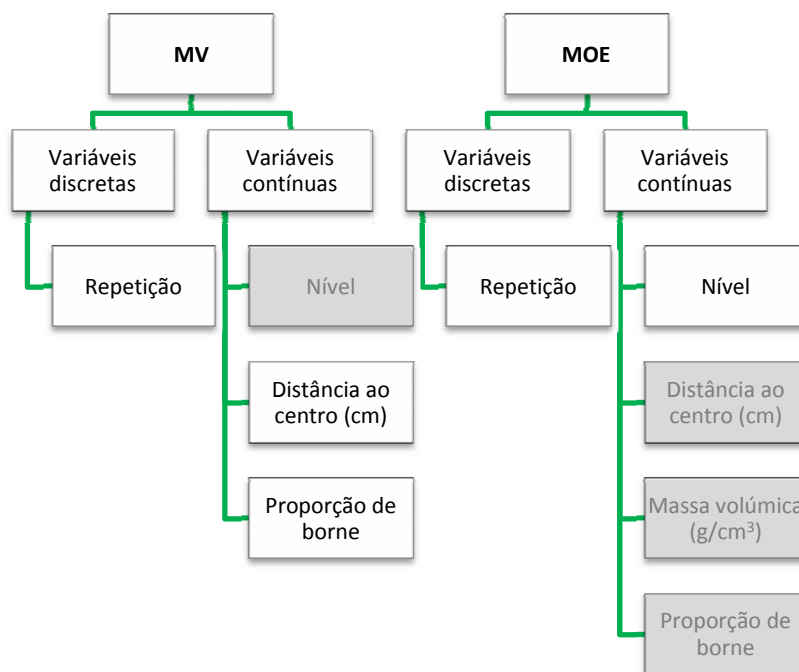


Figura 4.7 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira sã (a sombreado variáveis não significativas)

Modelo para a MV

No Quadro 4.9 apresentam-se os resultados do modelo de regressão múltipla da massa volúmica, com um R^2 ajustado=0,47. O teste de ANOVA comprova a significância global do modelo ($gl=4$; $QM=0,0633$; $F=27,2396$; $p=0,0000$) e seleciona como significativas as variáveis DC, PB e REP, cujos coeficientes se revelam no Quadro 4.9.

Quadro 4.9 Modelo de regressão da massa volúmica função da distância ao centro da tábua (DC), proporção de borne (PB) e repetições (REP), para a madeira sã

	Coeficientes	Erro padrão	p	Coeficientes β
Ordenada na origem	0,5949	0,0117	0,0000	
DC (cm)	0,0038	0,0018	0,0395	0,1548
PB	-0,0877	0,0148	0,0000	-0,5241
REPA¹	0,0197	0,0077	0,0122	0,2445
REPB¹	0,0188	0,0071	0,0086	0,2337

¹a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero

A análise dos coeficientes de todas as variáveis explicativas permite concluir que têm reduzido contributo para a expressão da MV (Quadro 4.9), com erros padrão também reduzidos, ou seja, são variáveis que explicam os valores da MV com um erro reduzido.

O modelo de regressão (Quadro 4.9) aponta a variável PB como aquela que mais contribui para a explicação da MV, mas com relação inversa ($\beta=-0,5241$), ou seja, quanto maior for a PB, menor o valor da MV. Esta relação é esperada em madeiras com elevado teor de extrativos no cerne, uma vez que um maior teor de extrativos pode contribuir para uma massa volúmica superior no cerne (Tsoumis, 1991). Por outro lado, o mesmo autor refere a existência de uma tendência do aumento da

massa volúmica (Quadro 4.9) com o aumento da distância à medula. Esta tendência é confirmada por este modelo de regressão, uma vez que a DC tem nele uma relação direta ($\beta=0,1548$).

Na representação gráfica dos dados que relacionam ambas as variáveis (Figura 4.8) é possível verificar o ligeiro aumento da MV com o aumento da DC até aos 7 cm, distância a partir da qual se observa uma inversão desta tendência, apesar do menor número de observações realizadas para estas distâncias. Esta redução é descrita por Tsoumis (1991) em resinosas (não em especial para o pinheiro-bravo) com idades consideráveis (100 anos), o que não é o caso das árvores de origem da madeira sã (entre 25 e 40 anos).

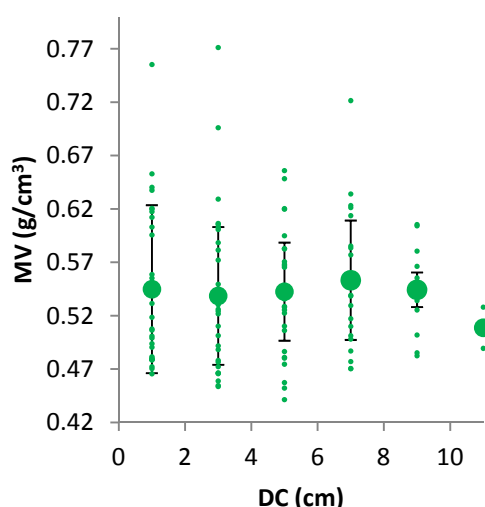


Figura 4.8 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábuia (DC) na madeira sã. • valores observados; ● valores médios \pm dp (barras verticais)

Idealmente, as repetições deveriam constituir-se como amostras duma mesma população e, assim sendo, não entrariam nos modelos como variáveis independentes significativas. Porém, pese embora os esforços que se fazem, isso nem sempre se consegue no ato da amostragem. Assim, os modelos têm muitas vezes que “suportar” estas variáveis como forma de se minimizar o erro do modelo, e traduzir mais corretamente e de forma mais completa o fenómeno em avaliação. Neste caso com coeficientes inferiores a 0,02, mas significativos para as três (Quadro 4.9).

O teste de Fisher LSD indica existirem diferenças significativas entre os valores médios da MV das três repetições, o que poderá estar relacionado com o facto de tratar de madeira proveniente de três árvores diferentes.

A variável NV foi excluída do modelo porque não atingiu o valor de p que permitisse a sua qualificação enquanto variável significativa. Porém uma ANOVA um pouco mais permissiva (e.g. p significativo 0,10) daria entrada a esta variável, que mostra um valor de $p=0,0753$. Assim, esta situação pode constatar-se pela análise gráfica da Figura 4.9, que permite verificar uma tendência para a redução da MV com a

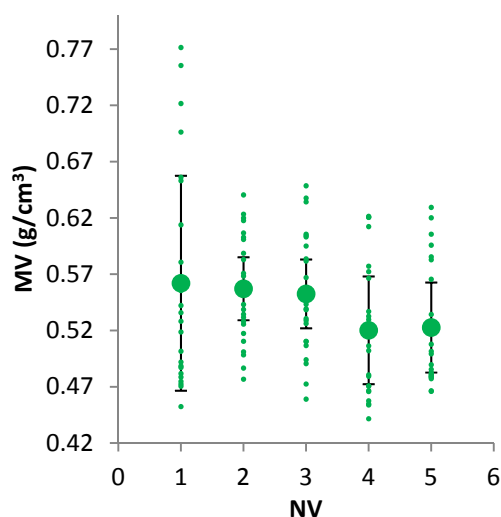


Figura 4.9 Variação da massa volúmica (MV) entre nível (NV), na madeira sã • valores observados; ● valores médios \pm dp (barras verticais)

altura na árvore, ou seja, com o aumento do NV, conforme é referido por Tsoumis (1991) (ver 1.2.2). Apesar duma maior variância da MV verificada na base (ver Figura 4.9, nível 1), a ANOVA do modelo ensaiado para estas duas variáveis ($gl=4$; $QM= 0,0095$; $F= 2,266$; $p=0,0663$) indica não existirem diferenças significativas entre os valores registados para os vários níveis. O teste de Fisher LSD agrupa os valores médios da MV dos vários níveis em dois grupos: um grupo com os níveis 1 a 3 e outro com os níveis 2 a 5. Logo, confirma-se a quase identidade dos níveis 2 e 3 que também se constata graficamente (Figura 4.9).

Modelo para o MOE

Os resultados do modelo de regressão do MOE função do NV e REP, para a madeira sã, são apresentados no Quadro 4.10. O teste de ANOVA realizado para o caso do MOE, comprova a significância global do modelo ($gl=3$; $QM=53423862$; $F=54,6403$; $p=0,0000$), e selecciona como significativos os coeficientes das variáveis como os termos da respetiva regressão múltipla, com um R^2 ajustado=0,58.

Quadro 4.10 Modelo de regressão do MOE função do nível (NV) e repetições (REP), para a madeira sã

	Coefficientes	Erro padrão	p	Coefficientes β
Ordenada na origem	6467,820	211,6907	0,0000	
NV	210,772	63,8271	0,0013	0,1974
REPA¹	-36,034	127,6543	0,7782	-0,0195
REPB¹	1385,184	127,6543	0,0000	0,7489

¹ a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero

A análise dos coeficientes das variáveis utilizadas no modelo de regressão (Quadro 4.10) permite concluir que a REPB é a variável que mais contribui para a explicação do MOE. Quanto à variável REPA, tem uma relação inversa e não significativa com o MOE (Quadro 4.10). O teste de Fisher LSD indica existirem diferenças significativas entre os valores médios do MOE para as três repetições.

A variável NV ajuda a explicar o MOE de forma direta, ou seja, com o aumento da altura na árvore, verifica-se um aumento do MOE como, de resto, mostra a Figura 4.10. Considerando a diminuição da MV com o aumento em altura na árvore (Figura 4.9), também seria expectável uma diminuição do MOE, que não se verifica senão após o nível 3.

A tendência geral de aumento do MOE com a altura na árvore que se observa na Figura 4.10, acontece com diferenças significativas entre os valores médios do nível 3 com os restantes (teste de Fisher

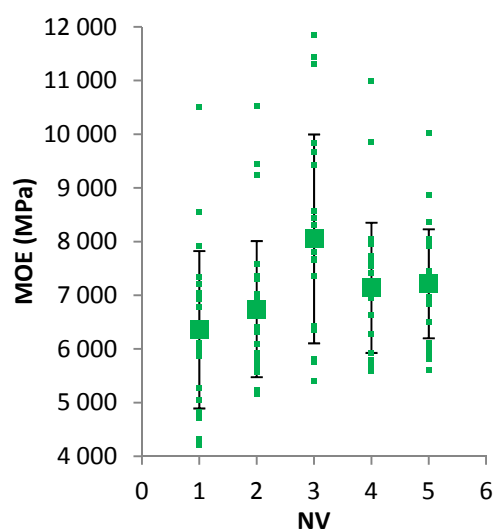


Figura 4.10 Variação do MOE entre nível (NV), na madeira sã ■ valores observados; ■ valores médios \pm desvio padrão (barras verticais)

LSD), tratando-se também do nível com maior variância. Os valores médios do MOE dos restantes níveis juntam-se em dois grupos (teste de Fisher LSD): um grupo com os níveis 1, 2 e 4 e outro com os níveis 2, 4 e 5. A Figura 4.10 mostra que são os níveis 2 e 3 os mais parecidos entre si, e os restantes os mais diferentes.

Todas as variáveis explicativas deste modelo, por apresentarem variabilidades consideráveis, mostram erros padrão elevados (Quadro 4.10).

As variáveis DC, MV e PB foram excluídas do modelo porque não atingiram o valor de p que permitisse a sua qualificação enquanto variáveis significativas.

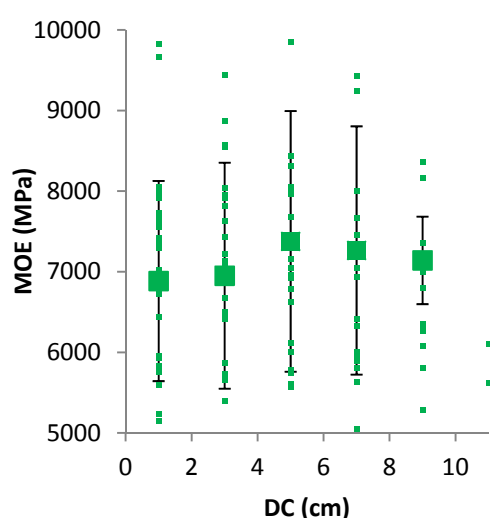


Figura 4.11 Variação do MOE com a distância ao centro da tábua (DC), na madeira sã; ■ valores observados; ■ valores médios \pm desvio padrão (barras verticais)

No modelo de regressão com todas as variáveis explicativas, as três variáveis referidas apresentavam um valor de p bastante superior a 0,05. Contudo, em relação à variável DC, a observação dos dados representados na Figura 4.11 permite verificar uma tendência global para o aumento do MOE com a DC. Note-se os valores elevados do desvio padrão registados até aos 7 cm.

Já a relação entre o MOE e a MV (Figura 4.12) são de mais difícil interpretação gráfica, devido à relação indefinida entre ambas. Quanto à relação do MOE com a PB (Figura 4.12), apesar de também ser variável e serem escassas as observações entre as

proporções de borne de 0,5 a 0,8, verifica-se uma ligeira tendência de aumento do MOE com a PB.

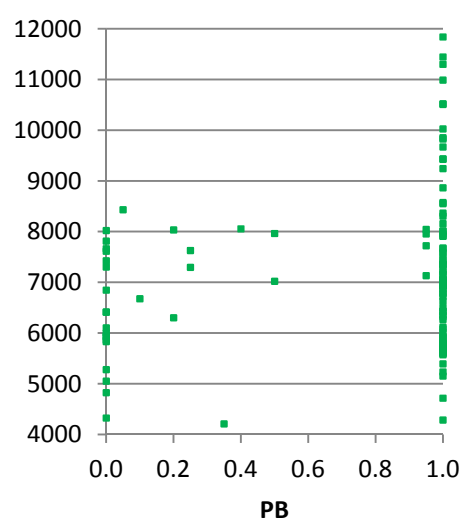
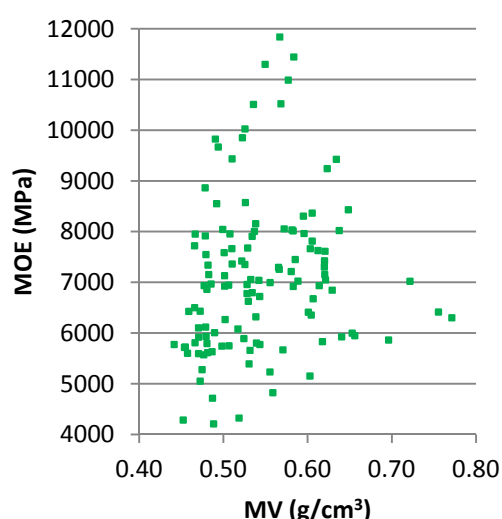


Figura 4.12 Variação do MOE com a massa volúmica (MV) e proporção de borne (PB), na madeira sã

4.3.2 Madeira infetada

As modelações realizadas para a madeira infetada utilizaram apenas os provetes com algum borne, conforme já referido no ponto 4.1.2.

Nos modelos de regressão para a madeira infetada (n=52) foram utilizadas como variáveis dependentes a MV, o MOE e a QNMP. O tempo e as restantes características das amostras foram utilizadas como variáveis independentes (Figura 4.13).

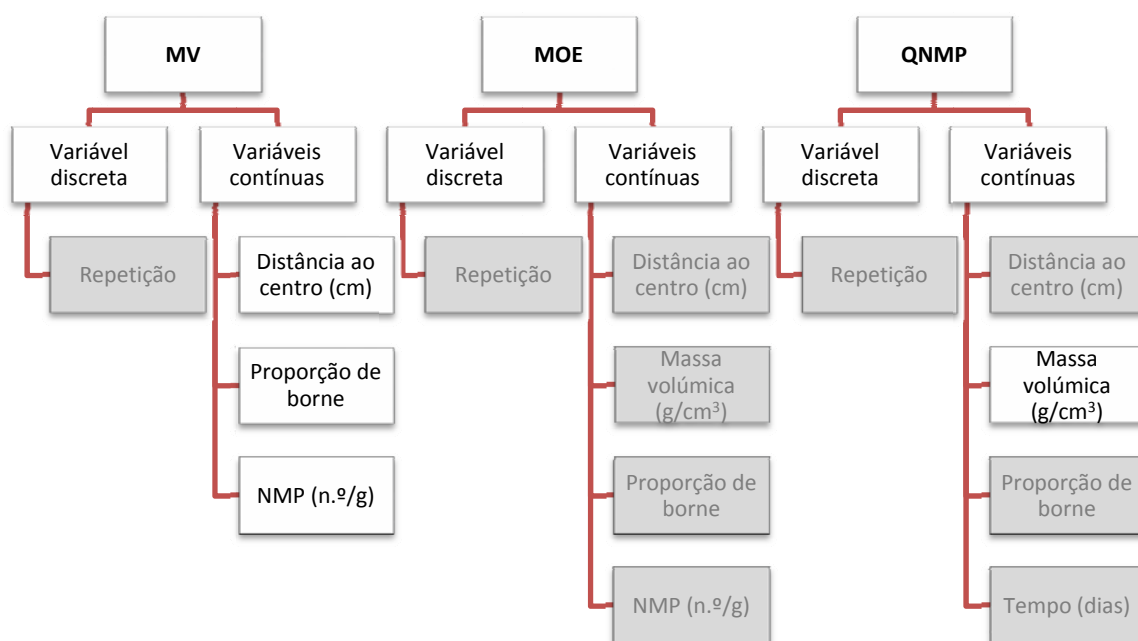


Figura 4.13 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira infetada (a sombreado variáveis não significativas)

Modelo para a MV

O modelo de regressão da massa volúmica selecionou como significativos os coeficientes das variáveis DC, PB e QNMP (Quadro 4.11), com um R^2 ajustado=0,68. A ANOVA comprovou a significância global do modelo (gl=2; QM=0,2029; F=50,8121; p=0,0000).

Quadro 4.11 Modelo de regressão da massa volúmica função da distância ao centro da tábua (DC), proporção de borne (PB) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), para a madeira infetada

	Coefficientes	Erro padrão	p	Coefficientes β
Ordenada na origem	0,8424	0,0267	0,0000	
DC (cm)	-0,0065	0,0027	0,0194	-0,2205
PB	-0,1862	0,0282	0,0000	-0,6332
QNMP (n.º/g)	-0,0004	0,0002	0,0430	-0,1756

As variáveis DC (Figura 4.15) e QNMP contribuem em pequena medida para explicar a MV da madeira infetada (Quadro 4.11), ao passo que a PB é a variável com o peso relativo mais elevado na explicação da MV ($\beta = -0,6332$). As três variáveis explicativas do modelo têm uma relação inversa com a MV, pois o aumento de qualquer delas contribui para a sua diminuição (Quadro 4.11).

Também na madeira infetada, à semelhança do verificado para a madeira sã (Quadro 4.9), a MV diminui com o aumento da PB. Contudo, no caso particular desta amostra de madeira infetada constituída apenas por provetes com borne, está a ignorar-se uma parte do fenómeno em relação a estas duas variáveis, que se pretende representar na Figura 4.14.

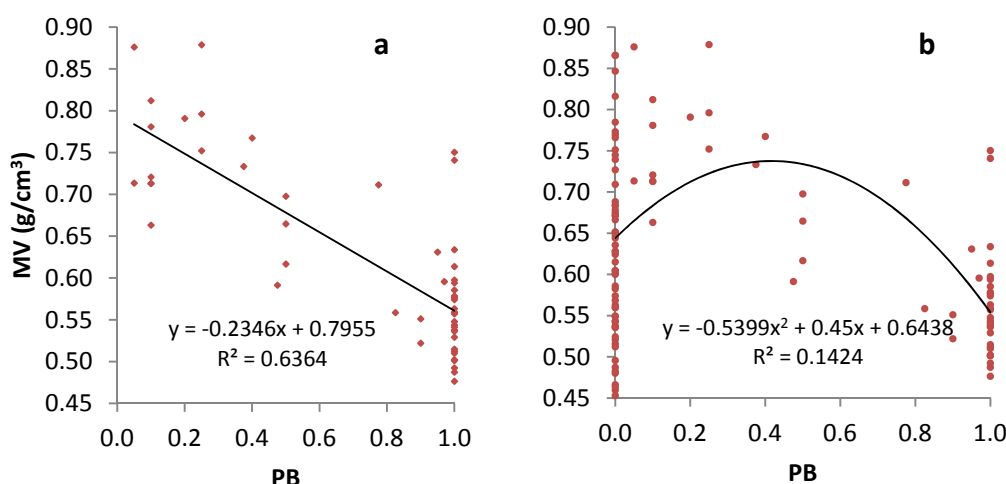


Figura 4.14 Variação da massa volúmica (MV) com a proporção de borne (PB) na madeira infetada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes

A comparação dos gráficos na Figura 4.14a e Figura 4.14b permite verificar as tendências diferentes para os dois conjuntos de dados. Na Figura 4.14a, verifica-se o descrito no parágrafo anterior e na Figura 4.14b, com dados de todos os provetes (os da Figura 11a adicionados das massas volúmicas dos provetes apenas com cerne), observa-se uma tendência de aumento da MV até uma PB de 0,5, a que se segue um decréscimo. Este aumento seguido de redução está de acordo com o descrito por Tsoumis (1991) para resinosas com idades consideráveis (cerca de 100 anos). Esta madeira provém de uma árvore de pinheiro-bravo com 72 anos.

Por outro lado, ao contrário do verificado na madeira sã (Quadro 4.9), na madeira infetada a MV tende a diminuir com o aumento da DC (Quadro 4.11 e Figura 4.15a). Também para esta variável se simulou a inclusão dos dados de todos os provetes (Figura 4.15b), permitindo identificar uma tendência semelhante aquela verificada para a relação das variáveis MV e PB. Este fenómeno é análogo ao descrito para a variável PB, uma vez que a uma maior PB corresponde uma maior DC.

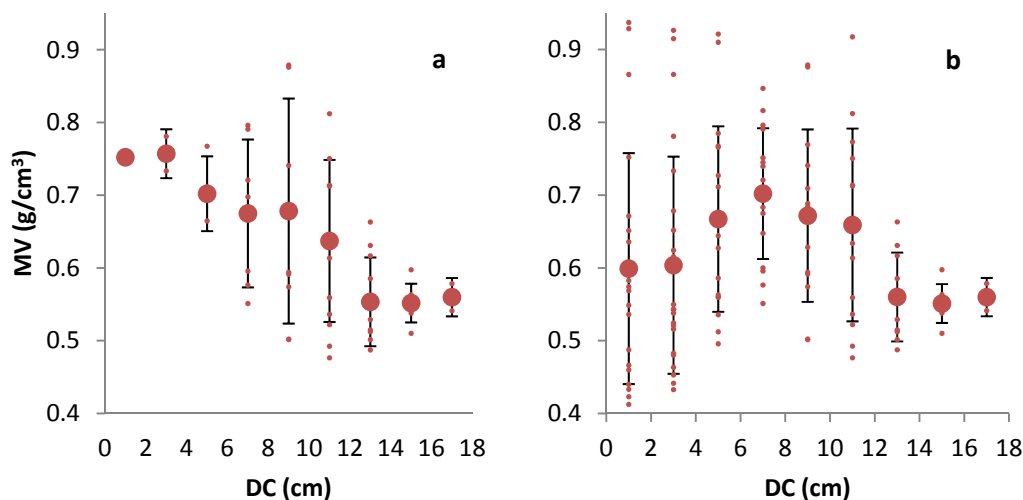


Figura 4.15 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábua (DC) na madeira infetada (a) amostra com provetes com proporção de borne > 0; (b) amostra com todos os provetes • valores observados; $\bullet \pm dp$ (barras verticais) de todas repetições

Os erros padrão das variáveis explicativas apresentam valores reduzidos (Quadro 4.11), tratando-se, portanto, de variáveis que explicam os valores da MV com erro reduzido.

Aqui, a variável REP foi excluída do modelo porque não ser significativa. Adicionalmente, o teste de Fisher LSD indica não existirem diferenças significativas entre os valores médios da MV das três repetições. Tal como seria de esperar pois trata-se de madeira proveniente de uma mesma árvore.

Modelo para o MOE

No modelo de regressão delineado para a variável MOE na madeira infetada (esquema da Figura 4.13), não é significativa a relação desta variável com qualquer das variáveis explicativas consideradas. Assim, não é possível concretizar um modelo de regressão para a variável MOE através dos dados disponíveis para a madeira infetada.

Tal como se verificou para a MV e conforme esperado, pois trata-se de madeira proveniente de uma mesma árvore, não existem diferenças significativas entre os valores médios do MOE das três repetições (teste de Fisher LSD).

Na Figura 4.16 apresentam-se os dados referentes às relações do MOE com as variáveis QNMP, MV, DC e PB, sendo possível observar a enorme variabilidade que lhes está associada e que explica a sua exclusão do modelo para o MOE da madeira infetada.

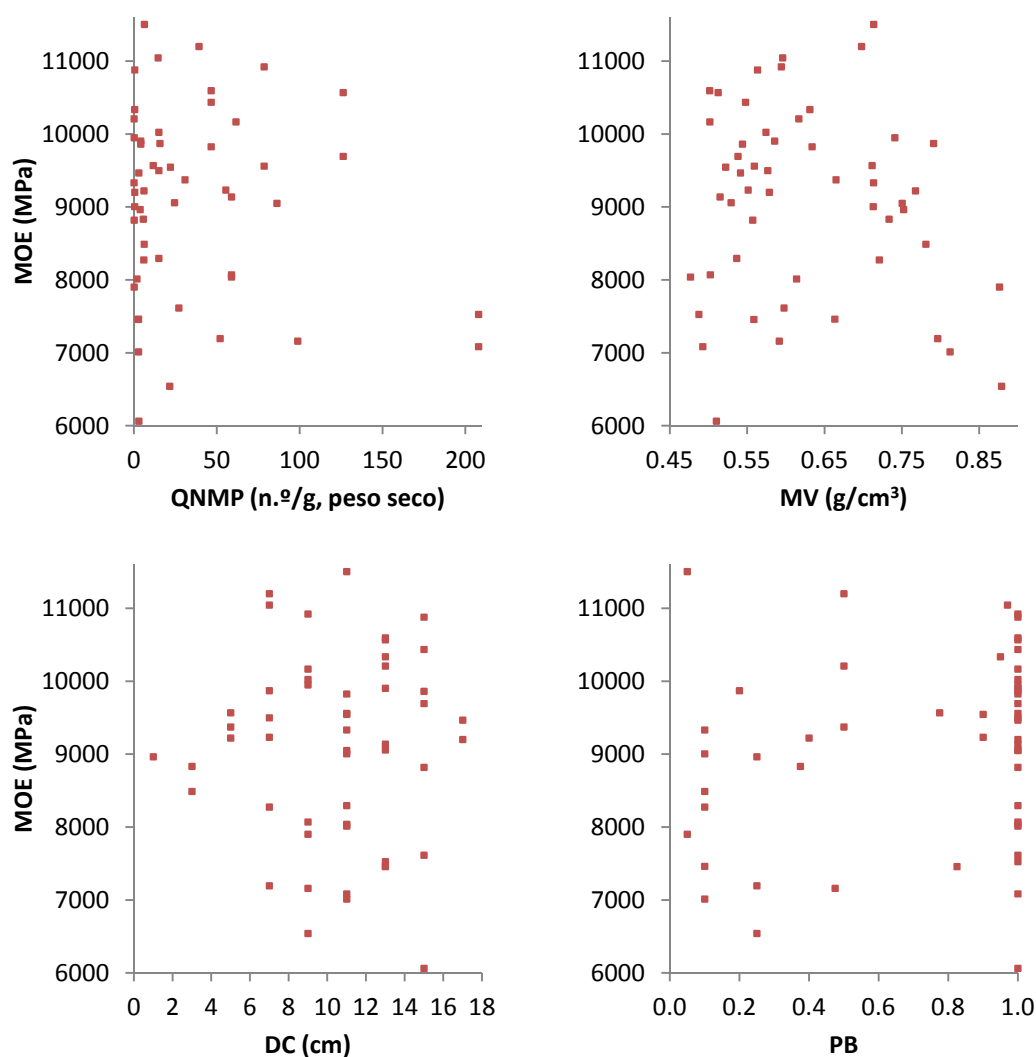


Figura 4.16 Variação do MOE com a quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), massa volúmica (MV), distância ao centro da tábua (DC) e proporção de borne (PB), na madeira infetada

Modelo para a QNMP

Os resultados do modelo de regressão da QNMP função da MV para a madeira infetada apresentam-se no Quadro 4.12. O teste de ANOVA realizado, comprova a significância global do modelo ($gl=1$; $QM=19418,88$; $F=9,868917$; $p=0,0028$) e seleciona como significativos os coeficientes da variável MV como o termo da respetiva regressão múltipla com um R^2 ajustado=0,15.

Quadro 4.12 Modelo de regressão de quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função da massa volúmica (MV), para a madeira infetada

	Coeficientes	Erro padrão	p	Coeficientes β
Ordenada na origem	147,110	36,2913	0,0002	
MV (g/cm ³)	-179,687	57,1981	0,0028	-0,4060

O coeficiente associado à variável MV deste modelo, indica que a variável NMP diminui fortemente com o aumento desta variável explicativa (Quadro 4.12). Eventuais razões para esta variação poderão radicar no facto de a provetes com mais cerne corresponder uma MV superior, mas também, exatamente por isso, uma menor QNMP.

O valor do erro padrão é elevado e acusa a variabilidade de valores já verificada para a variável dependente QNMP (ver Figura 4.3).

Na Figura 4.17 representa-se graficamente a relação entre as variáveis QNMP e MV.

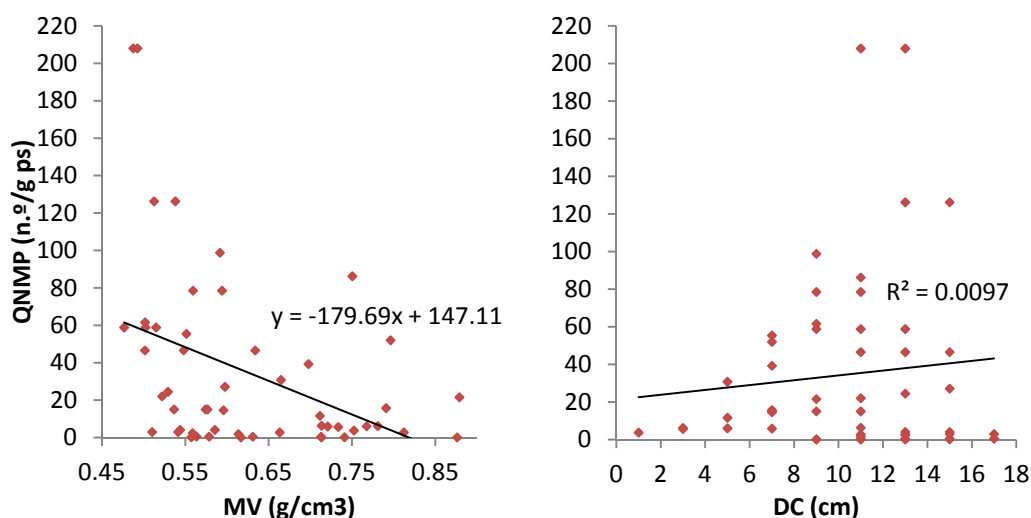


Figura 4.17 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) com a massa volúmica (MV) e com a distância ao centro da tábua (DC), na madeira infetada

Considerando que estamos a falar da amostra sem os provetes do cerne (Quadro 4.11), a MV diminui com o aumento da DC (Figura 4.15a). Assim, o aumento da QNMP está associado não só a uma diminuição da MV mas também a um aumento da DC (variável não incluída no modelo, $p > 0,05$).

Sousa *et al.* (2005) referem que as maiores densidades populacionais de QNMP se encontram até à profundidade de 6 cm, observando-se uma redução em número, à medida que aumenta a profundidade de colheita de uma amostra na árvore. Este tipo de variação aponta no mesmo sentido dos resultados obtidos (Quadro 4.11). Na Figura 4.17, em que se representa a relação da variável QNMP com a variável DC, o coeficiente de determinação diminuto ($R^2 = 0,0097$) pode dever-se a alguma casualidade.

Também as variáveis PB, TMP e REP foram excluídas do modelo por não atingirem o valor de p mínimo. A relação da variável QNMP com a PB é semelhante à encontrada para a DC, particularmente porque a uma maior PB corresponde, necessariamente, uma maior DC. A variação da QNMP com o TMP já foi representada na Figura 4.3 e analisada no ponto 4.2.1.

O teste de Fisher LSD indica não existirem diferenças significativas entre os valores médios da QNMP das três repetições.

4.3.3 Madeira inoculada

Nas modelações realizadas para a madeira inoculada, conforme já referido para a madeira infetada e pelas razões apontadas no ponto 4.1.2, apenas se incluíram na amostra provetes com algum borne (PB > 0).

Nestes modelos de regressão (n=99) foram utilizadas como variáveis dependentes a MV, o MOE e a QNMP (Figura 4.18). Como variáveis independentes foram utilizadas o TMP e as características das amostras referidas nos modelos para a madeira sã e infetada. Complementarmente, e por se tratar de madeira inoculada, utilizaram-se também algumas características da madeira dadora (madeira infetada), tais como, a quantificação de NMP (QNMPD) e a proporção de borne (PBD).

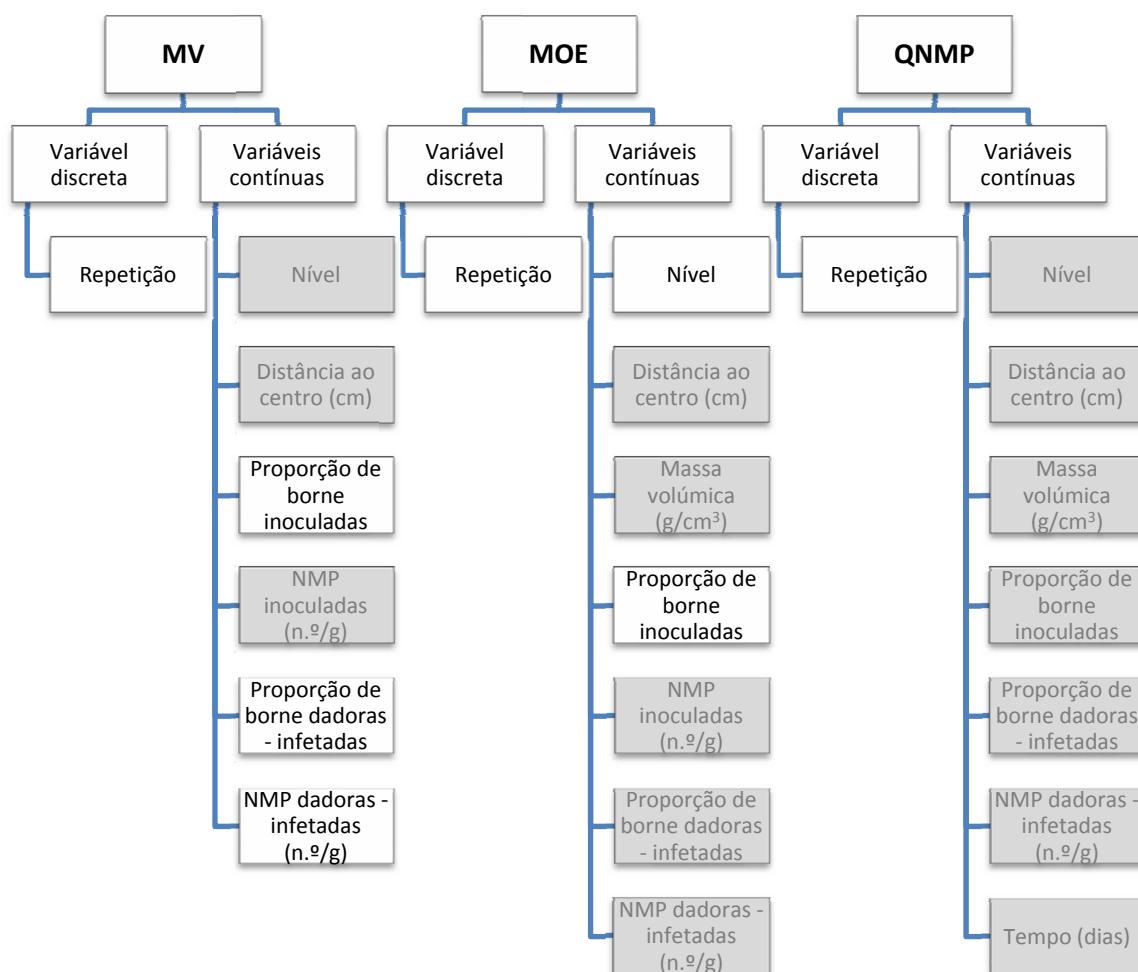


Figura 4.18 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira inoculada (a sombreado variáveis não significativas)

Modelo para a massa volúmica

No Quadro 4.13 apresentam-se os coeficientes das variáveis PB e REP seleccionadas como significativas no modelo de regressão múltipla para a MV da madeira inoculada (R^2 ajustado=0,36). O teste de ANOVA realizado para este modelo, comprova a sua significância global (gl=3; QM=0,0401; F=19,0331; p=0,0000).

Quadro 4.13 Modelo de regressão da massa volúmica (MV) função da proporção de borne (PB) e repetições (REP), para a madeira inoculada

	Coefficientes	Erro padrão	p	Coefficientes β
Ordenada na origem	0,5884	0,0141	0,0000	
PB	-0,0619	0,0161	0,0002	-0,3169
REPA*	0,0361	0,0070	0,0000	0,5026
REPB*	-0,0041	0,0064	0,5280	-0,0609

* a REPB entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero

A inclusão da variável REP neste modelo reflete a variabilidade existente entre a MV dessas amostras, e o teste de Fisher LSD indica existirem diferenças significativas entre os valores médios da MV das três repetições.

Neste modelo (Quadro 4.13), a REPA é a variável que mais contribui e de forma direta ($\beta=0,5026$) para explicar a MV da madeira inoculada. A REPB entra no modelo, mas não é significativa (Quadro 4.13) e apresenta um coeficiente quase nove vezes inferior à variável REPA, logo, contribui em muito menor medida ($\beta=-0,0609$) para explicar a MV.

A variável PB também contribui para a explicação da MV mas de forma inversa ($\beta=-0,3169$), ou seja, um aumento da PB na madeira inoculada provoca uma diminuição da sua MV (Quadro 4.13).

Fazendo uma análise semelhante à realizada para a madeira infetada (Figura 4.14), ou seja, incluindo na amostra de madeira inoculada os provetes do cerne (Figura 4.19b), mantém-se a já referida relação inversa da MV com a PB da madeira inoculada.

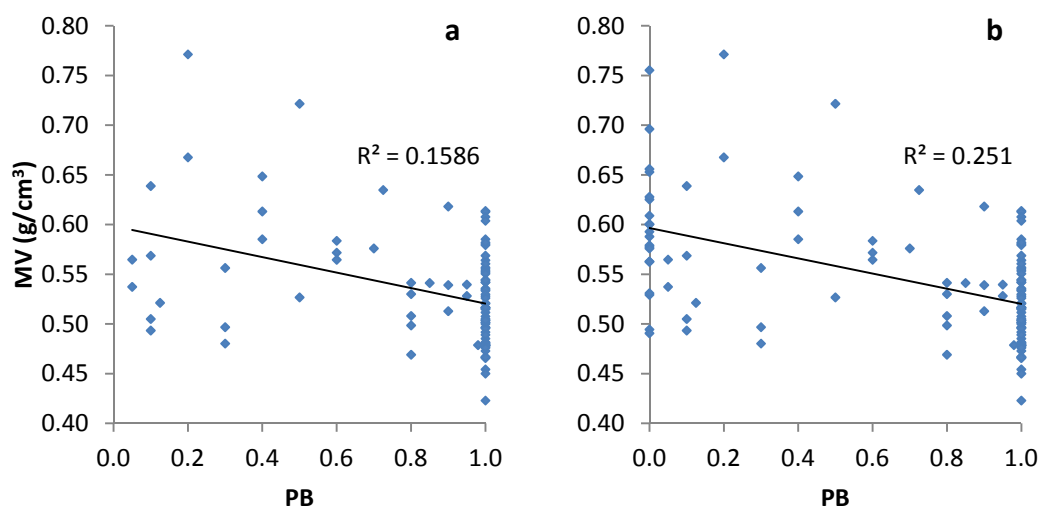


Figura 4.19 Variação da massa volúmica (MV) com a proporção de borne (PB) na madeira inoculada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes

Ambas as amostras, na Figura 4.19a e Figura 4.19b (que inclui também os provetes de cerne), apresentam comportamentos semelhantes na relação entre as variáveis. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para a madeira sã (Quadro 4.9) e já foram discutidos no ponto 4.3.1.

Os erros padrão das variáveis explicativas do modelo são reduzidos (Quadro 4.13), portanto também é reduzido o erro do modelo.

As variáveis NV, DC, QNMP, PBD e QNMPD foram excluídas do modelo por não atingirem o valor de p da sua significância.

As variáveis DC e NV foram as que estiveram mais próximo ($p \sim 0,10$) de se qualificarem como significativas ($p < 0,05$) e são aquelas que se representam na Figura 4.20.

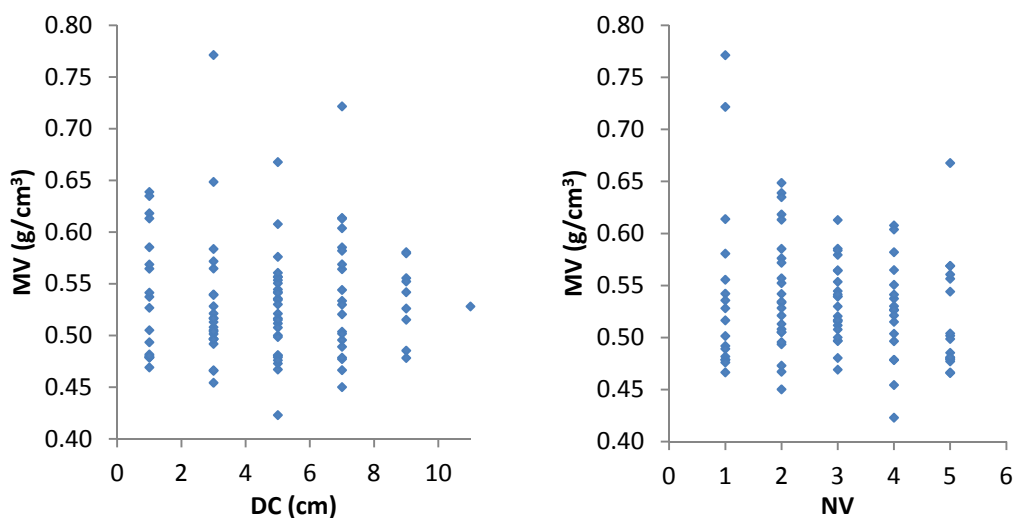


Figura 4.20 Variação da massa volúmica (MV) com a distância ao centro da tábua (DC) e nível (NV), na madeira inoculada

A enorme dispersão de valores para ambas as variáveis explicita as razões porque não foram incluídas no modelo.

Modelo para o MOE

Ao contrário do verificado para a madeira infetada (ver 4.3.2) para a madeira inoculada foi possível seleccionar algumas variáveis para explicar o MOE desta madeira. O modelo de regressão múltipla do MOE da madeira inoculada seleccionou a PB e REP como variáveis significativas, com os coeficientes apresentados no Quadro 4.14 e um R^2 ajustado=0,54). O teste de ANOVA comprovou a significância global do modelo ($gl=5$; $QM=28707730$; $F=24,2633$; $p=0,0000$).

Quadro 4.14 Modelo de regressão do MOE função da proporção de borne da madeira recetora (PB) e repetições (REP), para a madeira inoculada

	Coeficientes	Erro padrão	p	Coeficientes β
Ordenada na origem	6392,525	352,0754	0,0000	
PB	802,533	400,4533	0,0479	0,1459
REPA *	972,289	173,8457	0,0000	0,4815
REPB *	636,162	159,7218	0,0001	0,3390

* a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero

As variáveis explicativas do modelo de regressão para a variável MOE (Quadro 4.14) são as mesmas que foram incluídas no modelo para a MV da madeira inoculada (Quadro 4.13). Também neste caso, a inclusão da variável REP reflete a variabilidade existente entre o MOE das amostras, pois os valores médios do MOE nas REPA e REPB são significativamente diferentes da REPC (teste de Fisher LSD). Isto porque, como atrás foi referido, as primeiras são radiais e a última tangencial.

Neste modelo (Quadro 4.14), as variáveis REPA ($\beta=0,4815$) e REPB ($\beta=0,3390$) são aquelas que mais contribuem e de forma direta para explicar o MOE da madeira inoculada, com erros padrão reduzidos. O coeficiente da variável PB, indica que o MOE é superior nas amostras com maior PB, com um erro padrão elevado, portanto com reduzida relevância no modelo.

Procedendo a uma análise idêntica à feita para a MV da madeira inoculada (Figura 4.19), apresentam-se na Figura 4.21 os gráficos da amostra sem e com os provetes do cerne.

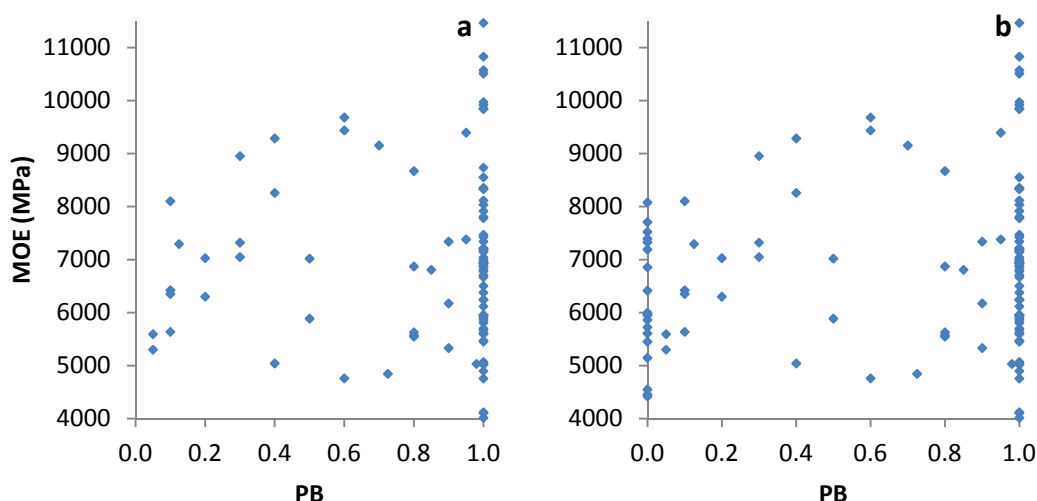


Figura 4.21 Variação do MOE com a proporção de borne (PB) na madeira inoculada (a) amostra com provetes com PB>0; (b) amostra com todos os provetes

A relação entre as variáveis é muito semelhante para ambas as amostras, na Figura 4.21a e Figura 4.21b (que inclui também os provetes de cerne), que apresentam comportamentos semelhantes na relação entre as variáveis. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para a madeira sã (Figura 4.12).

A variável NV foi aquela que apesar de excluída do modelo ($p \sim 0,08$), mais se aproximou de uma qualificação de significativa ($p < 0,05$) e a sua relação com o MOE está representada na Figura 4.22. A variabilidade observada aclara as razões pelas quais esta variável não foi incluída no modelo.

As restantes variáveis excluídas do modelo, DC, MV, QNMP, PBD e QNMPD, afastaram-se ($p > 0,10$) da sua qualificação como variáveis significativas. Na Figura 4.22 apresentam-se as relações entre o MOE e estas variáveis.

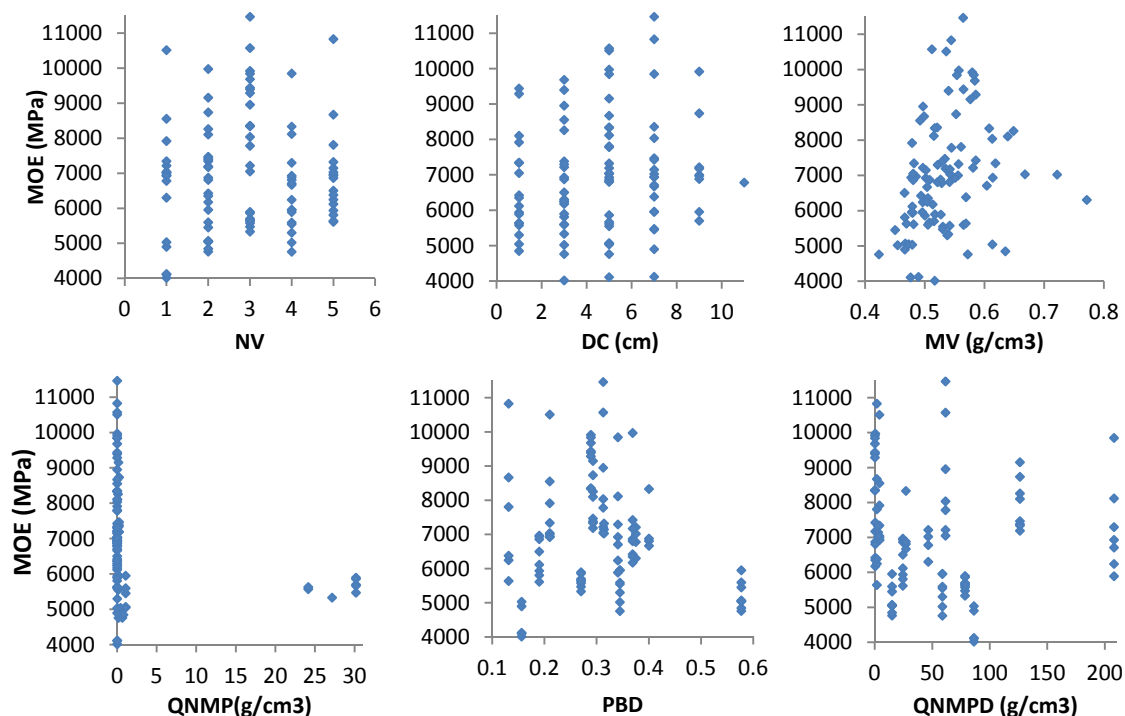


Figura 4.22 Variação do MOE com a distância ao centro da tábua (DC), massa volúmica (MV), quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira recetora (QNMP) e dadora (QNMPD), e proporção de borne da madeira dadora (PBD), na madeira inoculada

A grande variabilidade associada às variáveis DC, MV, PBD e QNMPD, explica a sua exclusão do modelo. No caso da variável QNMPD, para a sua exclusão contribuem não só a sua variabilidade, como a proporção muito considerável de zeros, já referida no ponto 4.2.2.

Modelo para a QNMP

O do modelo de regressão da QNMP função da REP para a madeira inoculada apresentou um R^2 ajustado=0,15. No Quadro 4.15 mostram-se os coeficientes das variáveis significativas, tendo-se comprovado a significância global do modelo pelo teste de ANOVA (gl=2; QM=481,6452; F=9,3669; p=0,0002)

Quadro 4.15 Modelo de regressão da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função das repetições (REP), para a madeira inoculada

	Coeficientes	Erro padrão	p	Coeficientes β
Ordenada na origem	2,1863	0,7273	0,0034	
REPA*	-2,1341	1,0788	0,0508	-0,2191
REPB*	-2,1863	1,0026	0,0316	-0,2415

* a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero

Apenas a variável REP se qualificou para serem variáveis explicativas do modelo da QNMP, qualquer delas com uma relação inversa com a variável dependente e com erros padrão elevados (Quadro 4.15). Os valores médios da QNMP das REPA e REPB são significativamente diferentes dos valores médios da REPC (teste de Fisher LSD), porque esta foi a repetição inoculada com maior sucesso relativamente ao número de nemátodes.

As restantes variáveis, NV, DC, MV, PB, PBD, QNMPD e TMP foram excluídas do modelo porque não atingiram o valor de p que lhe garanta a significância. Na Figura 4.23 encontram-se as representações gráficas das relações da QNMP com estas variáveis. A observação das suas variabilidades e diferenças consideráveis entre valores máximo e mínimos (ver Figura 4.5 e 4.2.2) da QNMP ao longo do tempo, ajuda a compreender a dificuldade no estabelecimento de relações com outras variáveis potencialmente explicativas.

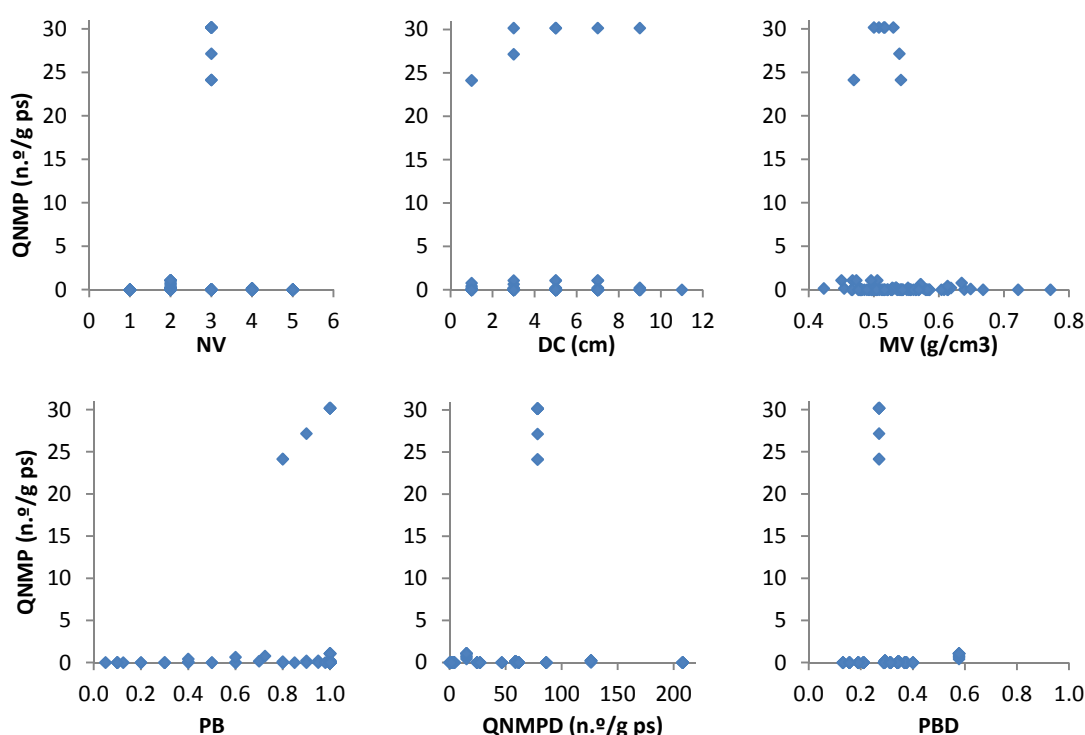


Figura 4.23 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira recetora (QNMP) com o nível (NV), distância ao centro da tábuia (DC), massa volúmica (MV), proporção de borne da madeira recetora (PB) e dadora (PBD) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro na madeira dadora (QNMPD), na madeira inoculada

Também a presença de um número considerável de valores zero (Figura 4.23) para a QNMP condiciona, em grande medida, a análise e interpretação dos resultados. Adicionalmente, conforme já havia sido referido no ponto 4.1.2, existe uma grande variabilidade de valores no estado de referência das tábuas dadoras (madeira infetada, Quadro 4.2) que se reflete na QNMP na madeira inoculada (recetora) (ver justificações relacionadas com a inoculação no 4.2.2).

4.4 Modelo estatístico global

A análise global aqui realizada pretende explicar a variação da MV, MOE e NMP com o possível efeito significativo dos 3 tratamentos em apreço (madeira sã, infetada naturalmente e inoculada artificialmente). Pretende, pois, com este processo avaliar a relevância estatística daqueles tratamentos, conjuntamente com as demais variáveis já utilizadas, na explicação daquela variação. Para tal, constituiu-se uma amostra com todas as observações, incluindo todos os tratamentos e todos os momentos no tempo (n=232). Também desta amostra se excluíram os provetes constituídos unicamente por cerne, pelas razões já apresentadas no capítulo 4.2.1. O resumo das propriedades físicas e mecânicas de todos os provetes é apresentado no Quadro 4.16.

Quadro 4.16 Caracterização média da proporção de borne (PB), massa volúmica (MV) e MOE dos provetes de todos os tratamentos

Estatísticos	PB ¹	MV (g/cm ³)	MOE (MPa)
$\mu \pm dp$	0,84±0,30	0,55±0,08	7 559±1 759
Coeficiente de variação (%)	35,71	15,55	24
Máximo	1,00	0,88	11 841
Mínimo	0,05	0,42	4 016
n	232 ²		

¹volume de borne/volume total ²amostra constituída apenas por provetes com PB>0

A amostra conjunta dos três tratamentos (excluindo os provetes de cerne) apresenta uma variabilidade reduzida para a variável MV, com valores do coeficiente de variação de cerca de 16 %, e um pouco superiores para o MOE, 24 %, e PB, cerca de 36 % (Quadro 4.16).

No Quadro 4.17 apresentam-se os dados da caracterização da QNMP da amostra constituída pelo borne de todas as tábuas de todos os tratamentos (n=30).

Quadro 4.17 Caracterização biológica da amostra, borne das tábuas, de todos os tratamentos

Estatísticos	QNMP no borne (n.º/g ps) ¹
$\mu \pm dp$	25,78±47,25
Coeficiente de variação (%)	183,27
Mediana	0,77
Moda	0
Proporção de zeros (%)	36,67
Máximo	207,96
Mínimo	0,00
n	30

¹quantificação por unidade de peso seco

Na amostra do borne das tábuas de todos os tratamentos, existe uma enorme variabilidade da QNMP, com um coeficiente de variação de cerca de 183 % e um desvio padrão de 47,25 NMP/g ps, valores inevitavelmente influenciados pela elevada proporção de valores zero (Quadro 4.17).

Testes estatísticos

O teste de Kolmogorov-Smirnov confirma a normalidade da distribuição das amostras ($n=232$) da variável MOE ($D=0,0720$, $p<0,2000$) e rejeita a normalidade da MV ($D=0,1299$; $p<0,0100$), PB ($D=0,3993$; $p<0,0100$) e QNMP ($D=0,3926$; $p<0,0100$).

Foi utilizado o teste de Levene ($p>0,05$) para verificar da homogeneidade das variâncias nas amostras, para as variáveis PB, MV, MOE e QNMP, aos pares, entre os três tratamentos e as três repetições. Na apreciação realizada relativamente aos tratamentos predomina a homogeneidade de variâncias no MOE, o mesmo não se verificando para as outras três variáveis. Quanto às repetições, verifica-se a homogeneidade de variâncias apenas na MV, MOE e QNMP, e a sua predominância na PB.

4.4.1 Modelação

Foram também estudados modelos de regressão dos três tratamentos, madeiras sã, infetada e inoculada, para as mesmas três variáveis dependentes: MV, MOE e QNMP e com as variáveis independentes representadas na Figura 4.24.

Também na construção destes modelos foram excluídos os provetes constituídos exclusivamente por cerne, pelas razões já apresentadas anteriormente (ver 4.1.2).

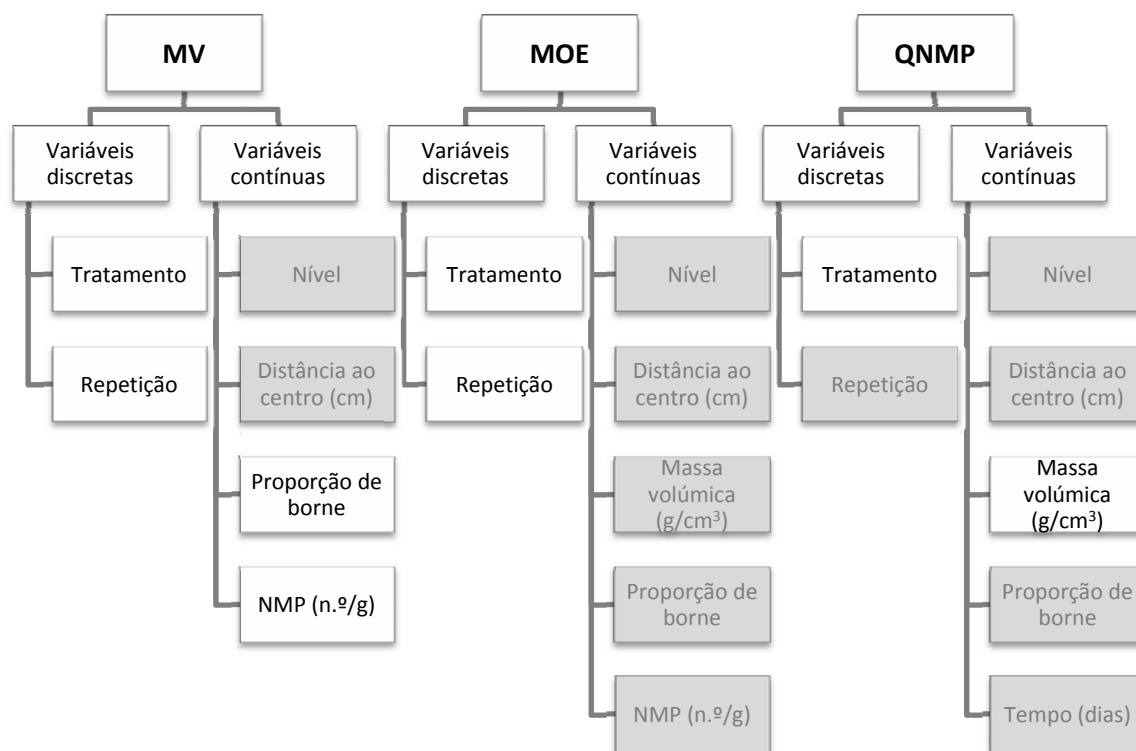


Figura 4.24 Representação esquemática das variáveis dependentes e independentes utilizadas nos modelos de regressão realizados para a madeira de todos os tratamentos (a sombreado variáveis não significativas)

Modelo para a massa volúmica

Os resultados do modelo de regressão múltipla da MV, em todos os tratamentos, função da PB, QNMP, REP e TT, estão representados no Quadro 4.18. O teste de ANOVA ($gl=6$; $QM=0,1295$; $F=41,9945$; $p=0,0000$) com um R^2 ajustado=0,52.

Quadro 4.18 Modelo de regressão da massa volúmica (MV) função de proporção de borne (PB), quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), repetições (REP) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos

	Coefficientes	Erro padrão	p	Coefficientes β
Ordenada na origem	0,6716	0,0112	0,0000	
PB	-0,1217	0,0132	0,0000	-0,4562
QNMP	-0,0006	0,0002	0,0003	-0,2014
REPA*	0,0071	0,0055	0,1997	0,0708
REPB*	0,0105	0,0051	0,0413	0,1118
TSA**	-0,0272	0,0056	0,0000	-0,2987
TINF**	0,0639	0,0071	0,0000	0,5962

* a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero ** o TINOC entra no modelo, quando o TSA e TSINF têm o valor zero

A análise dos coeficientes beta (Quadro 4.18) permite concluir que, neste modelo realizado com todos os tratamentos, as variáveis TT, PB e QNMP apresentam as maiores contribuições relativas para explicar o comportamento da MV. Todas as variáveis apresentam erros padrão reduzidos, logo, o erro do modelo também é reduzido (Quadro 4.18).

Tal como seria de esperar, os valores médios da MV da madeira sã e inoculada são significativamente diferentes dos da madeira infetada (teste de Fisher LSD), uma vez que estas madeiras provêm, em cada repetição, da mesma árvore.

A MV varia de forma inversa com a PB, tal como já se havia verificado nos três tratamentos estudados individualmente (Quadro 4.9, Quadro 4.11 e Quadro 4.13).

O aumento da variável QNMP relaciona-se, em pequena medida, com a redução da MV (Coef.= -0,0006, Quadro 4.18), tal como se verificou na madeira infetada (Quadro 4.11).

O teste de Fisher LSD indica existirem diferenças significativas entre os valores médios da MV das REPA e REPB em relação à REPC. A REPC (valor médio da $MV=0,53 \text{ g/cm}^3$) é constituída por tábuas tangenciais, diferentes das tábuas radiais das repetições A e B. Esta diferença explica-se porque as tábuas radiais têm tendencialmente mais cerne, de maior massa volúmica ($0,62 \text{ g/cm}^3$ - média de provetes com $PB \neq 0$), contra $0,53 \text{ g/cm}^3$ nos provetes do borne ($PB=1$).

As variáveis, NV e DC foram excluídas do modelo porque não atingiram o valor de $p < 0,05$. A variável NV não entrou nos modelos realizados para a MV em qualquer dos tratamentos. Quanto à variável DC, entrou apenas nos modelos da MV para a madeira sã e infetada. A representação gráfica da relação entre estas variáveis (Figura 4.25) auxilia a compreensão das enormes dispersões que lhes estão associadas.

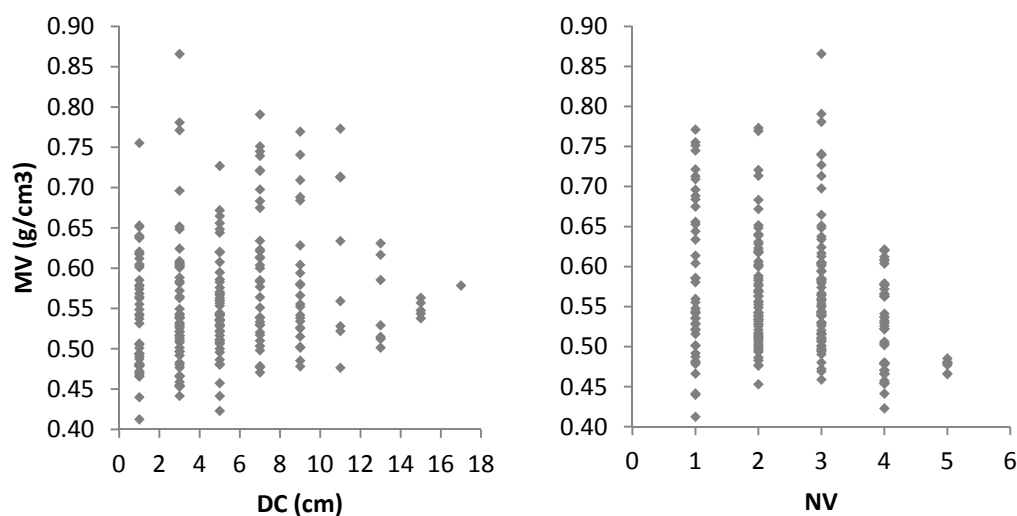


Figura 4.25 Relação da massa volúmica (MV) com o nível (NV) e a distância ao centro da tábu (DC), em todos os tratamentos

Modelo para o MOE

No Quadro 4.19 apresentam-se os coeficientes da variável repetição selecionada para o modelo de regressão do MOE de todos os tratamentos. Este modelo tem um R^2 ajustado de 0,45, e a sua significância foi testada pela ANOVA do modelo ($gl=4$; $QM=8,16 \times 10^7$; $F=47,7058$; $p=0,0000$).

Quadro 4.19 Modelo de regressão do MOE função das repetições (REP) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos

	Coeficientes	Erro padrão	p	Coeficientes β
Ordenada na origem	7799,099	89,5822	0,0000	
REPA*	398,687	127,5862	0,0020	0,1806
REPB*	754,319	119,7283	0,0000	0,3647
TSA**	-560,110	116,8226	0,0000	-0,2795
TINF**	1368,947	137,7199	0,0000	0,5791

* a REPC entra no modelo, quando as REPA e REPB têm o valor zero ** o TINOC entra no modelo, quando o TSA e o TINF têm o valor zero

De acordo com os coeficientes beta registados, os TT apresentam as maiores contribuições relativas para explicar o comportamento do MOE, no modelo de regressão com todos os tratamentos, com erros padrão reduzidos. À semelhança do verificado para a MV, não há diferenças significativas entre os valores médios do MOE da madeira sã (6 965 MPa) e inoculada (7 241 MPa) (teste de Fisher LSD). Mas, a madeira infetada apresentou valores médios do MOE (9 079 MPa) significativamente diferentes e superiores aos das madeiras sã e inoculada (teste de Fisher LSD).

As variáveis, NV, DC, MV, PB e QNMP foram excluídas do modelo porque não atingiram o valor de p que permite a sua qualificação enquanto variáveis significativas. Na Figura 4.26 pretende-se mostrar graficamente a fraquíssima relação entre o MOE e estas variáveis e as consideráveis dispersões que lhes estão associadas.

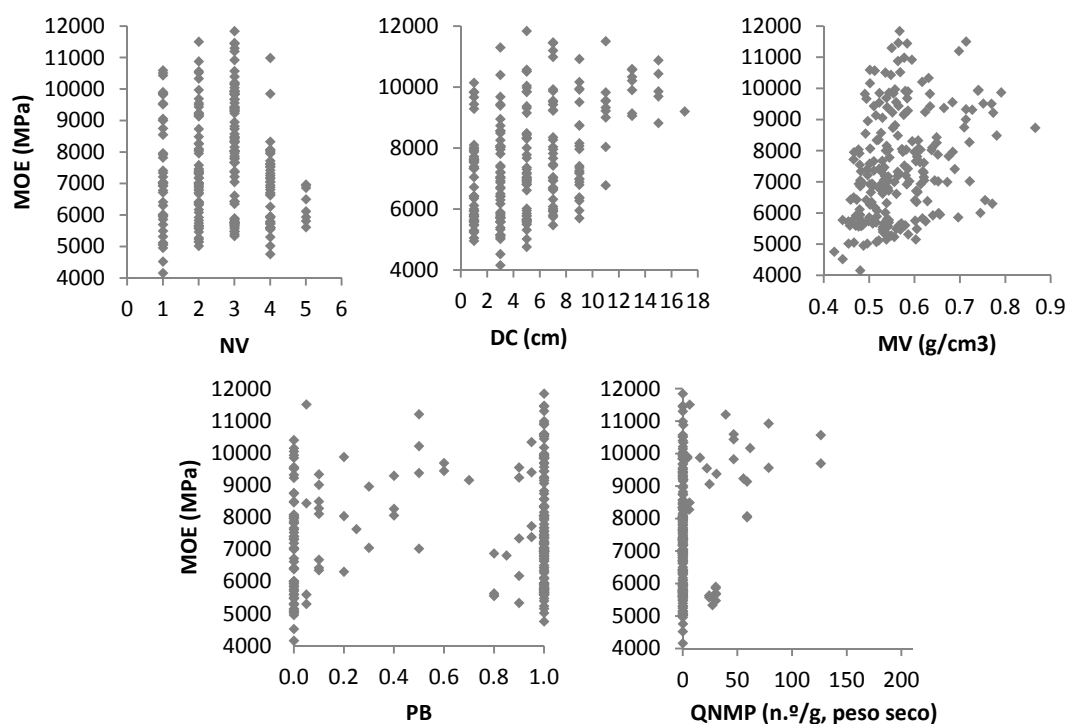


Figura 4.26 Variação da MOE com a nível (NV), distância ao centro da tábua (DC), massa volúmica (MV), proporção de borne (PB) e quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP), em todos os tratamentos

Modelo para a QNMP

O modelo da QNMP, em todos os tratamentos, função das variáveis significativas MV e TT apresentou um R^2 ajustado de 0,33. O teste de ANOVA realizado comprovou a significância global do modelo ($gl=3$; $QM=18922,83$; $F=38,41628$; $p=0,0000$) com os coeficientes das variáveis representados no Quadro 4.20.

Quadro 4.20 Modelo de regressão da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) função de massa volúmica (MV) e tratamentos (TT), para todos os tratamentos

	Coefficientes	Erro padrão	p	Coefficientes β
Ordenada na origem	68,969	11,8942	0,0000	
MV (g/cm³)	-100,055	20,9327	0,0000	-0,2951
TS*	-15,782	2,0886	0,0000	-0,5120
TINF*	28,347	2,6671	0,0000	0,7795

*o TINOC entra no modelo, quando o TSA e o TINF têm o valor zero

Como seria de esperar, a variável TT é aquela que apresenta uma maior contribuição relativa para explicar o comportamento da QNMP (coeficientes β , Quadro 4.20), com erros padrão reduzidos, pois o valor médio da QNMP da madeira infetada, 34,75 NMP/g ps, é significativamente diferente, dos valores médios da QNMP da madeira sã, 0,00 NMP/g, ps e inoculada, 2,98 NMP/g ps (teste de Fisher LSD).

A variável MV contribui também muito significativamente, mas com um erro padrão considerável, para explicar a QNMP de forma inversa (Quadro 4.20). Tal como se verificou no modelo de regressão da madeira infetada (Quadro 4.12), a redução da MV contribui para o aumento da QNMP.

As variáveis, NV, DC, PB e TMP foram excluídas do modelo porque não atingiram o valor de p necessário. Tal como noutros modelos anteriormente apresentados, também aqui variáveis que se esperaria fossem selecionadas, não atingiram a importância estatística suficiente, em confronto com a MV e tratamentos.

Na Figura 4.27 pretende-se mostrar graficamente a relação entre a QNMP e estas variáveis e as consideráveis dispersões que lhes estão associadas.

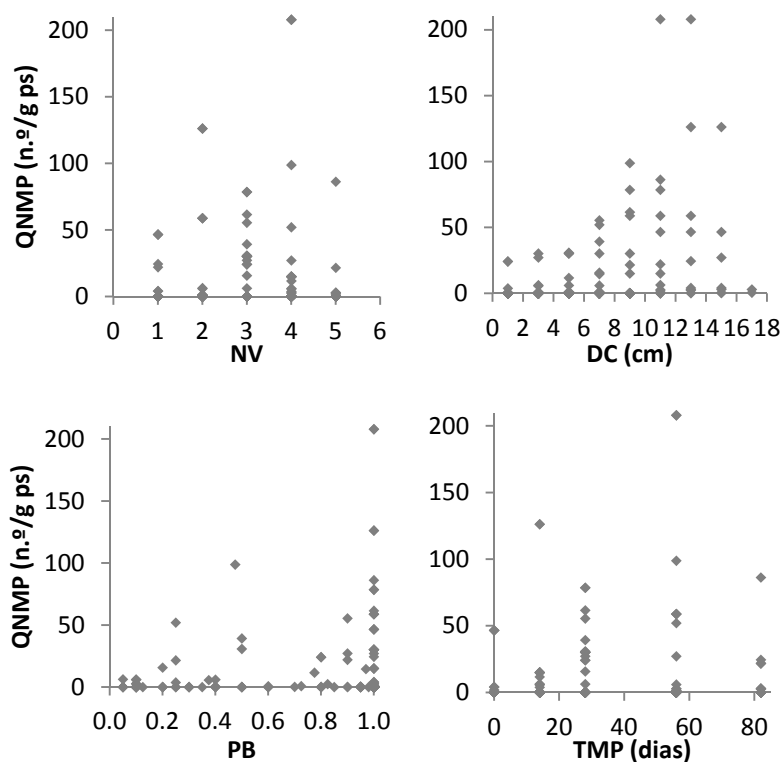


Figura 4.27 Variação da quantificação de nemátode da madeira do pinheiro (QNMP) com o nível (NV), distância ao centro da tábu (DC) e proporção de borne (PB) e tempo (TMP), em todos os tratamentos

5 Conclusões

Os estudos e testes estatísticos realizados e documentados na exposição deste trabalho, possibilitam as seguintes conclusões.

Em primeiro lugar, analisadas as amostras dos dois tratamentos em que o NMP esteve presente, madeira infetada e inoculada, destaca-se que o nemátode não foi encontrado no cerne da madeira de pinheiro-bravo.

Em segundo lugar, verificou-se existir uma variabilidade muito considerável no número de NMP no borne da madeira naturalmente infetada, facto que também condiciona, também, o estabelecimento de correlações entre o número de nemátodes, por unidade de peso seco, e qualquer outra variável. Assim, concluiu-se não existirem evidências de que o NMP afete as propriedades mecânicas da madeira de pinheiro-bravo, avaliadas pelo módulo de elasticidade à flexão estática, dado que, apesar da madeira sã apresentar diferenças significativas em relação aos valores da massa volúmica da madeira infetada, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores do MOE destes tratamentos ao longo dos três meses do estudo. Verificou-se, no entanto, que as diferenças encontradas nos valores do MOE existiam apenas entre repetições, ou seja, tábuas de madeira provenientes de árvores diferentes apresentaram valores de MOE significativamente diferentes.

A opção pela inoculação de madeira sã acabou por não servir totalmente os objetivos deste estudo, uma vez que das três repetições realizadas apenas uma foi inoculada com aparente sucesso. Na madeira inoculada, observou-se um aumento do número de NMP somente numa repetição, acabando por observar-se o seu declínio após 82 dias. A madeira desta repetição apresentava uma massa volúmica inferior às restantes e o facto de se tratar de uma tábua tangencial, com maior exposição dos canais de resina axiais e seções dos radiais, poderá igualmente ter favorecido os resultados. Do mesmo modo, não se encontraram, neste caso, evidências de que os valores do MOE tenham sido alterados de forma significativa em relação aos valores da madeira sã.

As condições em que foram mantidas as tábuas infetadas e inoculadas, 25 °C e 70% de humidade relativa, não se mostraram as ideais para o desenvolvimento do NMP, por corresponderem a um teor de água de equilíbrio da madeira demasiado reduzido de aproximadamente 13 %. Conforme foi referido, o crescimento das populações de NMP é fortemente condicionado pelo teor de água da madeira e pela presença de fungos cromogéneos do azulamento, de que se alimentam os nemátodes na sua fase micófaga. Na madeira utilizada, com teores de água iniciais entre 70 e 80%, atingiram-se, à saída da câmara climática e após 14, 28, 56 ou 82 dias, teores de água na ordem dos 20 %, valor abaixo do PSF. Deste modo, infere-se que não foram reunidas as condições ideais para uma inoculação bem-sucedida.

Para finalizar, deixam-se algumas sugestões para estudos futuros. A variabilidade observada nas quantificações de NMP realizadas, tanto na madeira infetada como na madeira inoculada, apontam para a necessidade de um maior número de observações. Assim, a grandeza da amostra é um importante parâmetro a considerar em trabalhos futuros porque são necessários mais dados para ajudar na interpretação deste fenómeno biológico. A variabilidade natural da madeira poderia ter sido resolvida com outro tipo de material a que não se teve acesso. Idealmente não deveriam existir diferenças significativas entre a massa volúmica e MOE das várias tábuas, pois facilitaria a interpretação dos resultados relacionados com a infeção e inoculações com NMP.

Por outro lado, o facto de apenas se ter encontrado NMP no cerne da madeira de pinheiro-bravo, no momento da aplicação do método utilizado para a inoculação com NMP, sugere especial atenção quanto à escolha dos locais de contacto para potenciar uma inoculação com sucesso.

Adicionalmente, a forma de colheita da amostra da madeira poderá ser melhorada de modo a obter-se um grau de precisão superior em relação à localização da quantificação de NMP realizada. Esta exatidão parece particularmente importante depois de conhecida a dispersão e variação do número de nemátodes entre tábuas contíguas de uma mesma árvore.

Paralelamente à investigação e desenvolvimento na área tecnológica da madeira, salienta-se a necessidade do aperfeiçoamento e manutenção de boas práticas de gestão florestal que evitem a dispersão do NMP e de outras pragas e doenças que afetam a floresta nacional de pinheiro-bravo. Os países que lidam com esta doença há mais tempo, apostam também num caminho de longo prazo na direção do melhoramento genético, procurando indivíduos resistentes e que produzam madeira de qualidade.

6 Referências bibliográficas

- AFN (2009). *Prospecção – Erradicação. Procedimentos de base*. Autoridade Florestal Nacional. Portugal.
- AFN (2010). *5º Inventário Florestal Nacional – Relatório final*. Direção Geral de Gestão florestal. Autoridade Florestal Nacional.
- AIFF (2010). *Relatório de Caracterização da Fileira Florestal 2010*. AIFF - Associação para a Competitividade da Indústria da Fileira Florestal, Santa Maria de Lamas, 80 pp.
- Aikawa, T. (2008). Transmission Biology of *Bursaphelenchus xylophilus* in Relation to its Insect Vector in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer, Japan, pp. 123-138.
- Alía, R. e S. Martín (2003) *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Maritime pine (Pinus pinaster)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 pp.
- Asai, E. e Futai, K. (2006) .The effect of acid rain on the defense response of pines to pinewood nematodes, in *Proceedings of IUFRO Kanazawa 2003 "Forest insect population dynamics and host influences"*. Kamata N, Liebhold AM, Quiring DT, Clancy KM (eds), Kanazawa University, Kanazawa, pp. 21–24.
- Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., Mota, M. (2010). *Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nematology 42(1):8-16.
- Barron, G.L. (2003). *Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle*. Biodiversity 4: 3-9.
- Berström, M. e Reis, N. (2011). *Prontuário Ortográfico e Guia da Língua Portuguesa*. Editora Casa das Letras, 50ª edição, Oeiras.
- Bolla, R. I., Boschert, M. (1993). Pinewood nematode species complex: interbreeding potential and chromosome number. J Nematol 25:227–238.
- Bowyer, J. L., Shmulsky, R. e Haygreen, J. G. (2007). *Forest Products and Wood Science - An Introduction*. Blackwell Publishing Professional, 5ª edição, 558 pp.
- Bruce, H. R. (1990). *Identifying wood: accurate results with simple tools*. The Tauton Press. EUA.
- Carrasquinho, I. (2010). *Resposta Biotecnológica ao Problema do Nemátodo da Madeira de Pinheiro: Genética do Hospedeiro*. Instituto Nacional Recursos Biológicos INRB, I.P./INIA Unidade de Silvicultura e Produtos Florestais. Apresentação realizada na disciplina de Genética e Melhoramento Florestal – Instituto Superior de Agronomia.
- Carrasquinho, I. (2011). Comunicação pessoal.
- Carvalho, A. (1996). *Madeiras Portuguesas – Estrutura Anatômica, Propriedades, Utilizações*. Vol. I. Direcção-Geral das Florestas, Lisboa.
- Carvalho, A. (1997). *Madeiras Portuguesas – Estrutura Anatômica, Propriedades, Utilizações*. Vol. II. Direcção-Geral das Florestas, Lisboa.
- Decisão da Comissão 2006/133/CE, de 13 de Fevereiro de 2006.
- Decreto-Lei n.º 95/2011, de 8 de Agosto.
- DGADR (2011). Site do Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural - Laboratórios reconhecidos <http://www.dgadr.pt> Consultado em 2011-07.
- Diretiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976.
- Dwinell, L. D. (1993). *First report of pinewood nematode (Bursaphelenchus xylophilus) in Mexico*. Plant Disease 77, 846.
- Dwinell, L. D. e Nickle, W. R. (1989). *An overview of the pine wood nematode ban in North America*. USDA For. Serv. Southeastern Forest Exp. Sta. Gen. Tech Report SE-55, Asheville, NC. 13pp.
- Dwinell, L.D. (sd). USDA Forest Service, www.bugwood.org, site consultado em Agosto de 2011.
- EPPO (sd). *Data Sheets on Quarantine Pests - Bursaphelenchus xylophilus*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). França.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. e Magnusson, C. (1996). *Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (asPRA area) on Bursaphelenchus xylophilus and its vectors in the genus Monochamus*. EPPO Bull/Bull OEPP 26:199–249.
- Evert, R. (2006). *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3rd edn. Wiley, New Jersey, USA.
- FAO (2009). Norma Internacional para as Medidas Fitossanitárias n.º 15 da FAO - ISPM 15.
- Fernandes, L., Pessoa, J, Aguiar, A e Carrasquinho, I. (2007). *Manual de Estacaria de Pinheiro-bravo*. Centro PINUS 18 pp.
- Fisher, R. A. (1935). *The logic of inductive inference*. Journal of the Royal Statistical Society Ser. A., 98:39-54.

- Fonseca, L., Vieira dos Santos, M. C., Santos, M. S. N. A., Curtis, R.H.C. e Abrantes, I. M. O. (2008). *Morpho-biometrical characterisation of Portuguese Bursaphelenchus xylophilus isolates with mucronate, digitate or round tailed females*. Phytopathol. Mediterr 47:223–233.
- FPL (2010). *Wood handbook - Wood as an engineering material*. General Technical Report FPL-GTR-190. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, pp. 508.
- Fuchs, A.G. (1937). *Neue parasitische und halbpasitische Nematoden bei Borkenkäfern und einige andere Nematoden*. I. Teil (in German). Zool Jahrb Abteilung Syst Ökol Geogr Tiere 70:291–380.
- Fukuda, K. (1997). Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. J For Res 2:171–181.
- Halik, S. e Bergdahl, D. R. (1990). *Development of Bursaphelenchus xylophilus populations in wood chips with different moisture contents*. Journal of Nematology 22: 113–118.
- Hashimoto, H. (1975). *Recent and future studies on Bursaphelenchus xylophilus—with reference to the interrelation between the nematode and the host pine during the process of infection and pathogenesis —* (in Japanese). Shinrin-boeki (For Pests) 10:189–19.
- Hashimoto, H. e Kiyohara, K. (1973). *Migration of pine wood nematode in pine trees (III) (in Japanese)*. Trans Ann Mtg Kyushu Br Jpn For Soc 26:330–332.
- Hillis, W. E. (1987). *Heartwood and tree exudates*. Springer, Berlin, pp 268.
- Huang, X.W., Tian, B.Y., Niu, Q.H., Yang, J.K., Zhang, L.M. e Zhang, K.Q. (2005). *An extracellular protease from Brevibacillus laterosporus G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes*. Res Microbiol 156: 719–727.
- Hunt, D. J. (1993). *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodridae—their systematics and bionomics*. CAB International, Wallingford, GB.
- Hunt, D. J. (2008). *A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina)*. J. Nematode Morphol. Syst. 10(2):99–135.
- Ichihara, Y., Fukuda, K. e Suzuki, K. (2000). *Early symptom development and histological changes associated with migration of Bursaphelenchus xylophilus in seedling tissues of Pinus thunbergii*. Plant Dis 84:675–680.
- Ichihara, Y., Fukuda, K. e Suzuki, K. (2001). *Suppression of ectomycorrhizal development in young Pinus thunbergii trees inoculated with Bursaphelenchus xylophilus*. For Path 31: 141–147.
- INE (2000). *Manual de contas económicas da agricultura e da silvicultura CEA/CES 97* (versão 1.1). Eurostat.
- INE (2011). *Contas Económicas da Silvicultura 2009*. Destaque informação à comunicação social. Instituto Nacional de Estatística. Lisboa.
- INRB (2008). Site do Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. Instituto Nacional de Recursos Biológicos http://portal.min-agricultura.pt/portal/page/portal/MADRP/PT/foco/nematodo/perguntas_frequentes_nematodo/rsp_nemat/4CA75F35BEB1007AE043C0A8C8C2007A#1 Consultado em Julho de 2011.
- INRB (2011). *Procedimento de Pesquisa e quantificação de NMP em madeira*. INRB - Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.
- Isoda, K., Watanabe, A., Kuramoto, N. e Kondo, T. (2007) *Linkage mapping of Pinus densiflora and QTL analysis for resistance to the pine wilt disease*. Plant Anim. Genomes XV Conference, p. 513. San Diego (Abs).
- Iwahori, H., Futai, K. (1990) *Propagation and effects of the pine wood nematode on calli of various plants*. Jpn J Nematol 20:25–36.
- Jones, J.T., Moens, M., Mota, M.L., Li, H., e Kikuchi, T. (2008) *Bursaphelenchus xylophilus : opportunities in comparative genomics and molecular host–parasite interactions*. Molecular plant pathology 9 (3): 357–368.
- Kanzaki, N. (2008). Taxonomy and Systematics of the Nematode Genus Bursaphelenchus (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer. Japan. 44–66.
- Kikuchi, T. (2008). Parasitism Genes of the Pine Wood Nematode in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer. Japan. 67–80.
- Kikuchi, T., Jones, J. T., Aikawa, T., Kosaka, H., Ogura, N. (2004). *A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode Bursaphelenchus xylophilus*. FEBS Lett 572:201–205.
- Kishi, Y. (1995). *The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer*. Thomas, Tokyo, 302 pp.
- Kiyohara, T. e Tokushige, Y. (1971) *Inoculation experiments of a nematode, Bursaphelenchus sp. onto pine trees* (in Japanese with English abstract). J Jpn For Soc 53:210–218.
- Kobayashi, F., Yamane, A. e Ikeda, T. (1984). *The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease*. Annu Rev Entomol 29:115–135.

- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, K., e Kiyohara, T. (2001) *Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode*. European Journal of Plant Pathology 107: 667–675.
- Kuramoto, N., Isoda, K., Watanabe, A., Fujisawa, Y. e Kondo, T. (2007) Genetic analysis of the resistance against the pine wilt disease in Japanese pines in *Plant Anim. Genomes XV Conference*, p. 500. San Diego (Abs).
- Kuroda, K. (1987). *Characteristics of enzymes produced by the pine wood nematode: lytic enzymes of polysaccharides and proteins* (in Japanese). Ann Mtg Jpn For Soc 98:128.
- Kuroda, K. (2008). Physiological Incidences Related to Symptom Development and Wilting Mechanism in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer. Japan. 204–222.
- Kuroda, K. e Ito, S. (1992). *Migration speed of pine wood nematode and activities of other microbes during the development of pine-wilt disease in Pinus thunbergii* (in Japanese with English abstract). J Jpn For Soc 74:383–389.
- Kuroda, K. e Mamiya, Y. (1986). *Behavior of the pine wood nematode in pine seedlings growing under aseptic conditions* (in Japanese). Trans Mtg Jpn For Soc 97:471–472.
- Kuroda, K., Yamada, T. e Ito, S. (1991). *Bursaphelenchus xylophilus induced pine wilt: factors associated with resistance*. Eur J For Path 21:430–438.
- Kuroda, K., Yamada, T., Mineo, K. e Tamura, H. (1988). *Effects of cavitation on the development of pine wilt disease caused by Bursaphelenchus xylophilus*. Ann Phytopathol Soc Jpn 54:606–615.
- Kusunoki, M. (1987). *Symptom developments of pine wilt disease-Histological observations with electron microscope*. Ann Phytopathol Soc Jpn 53:622–629.
- Levene, H. (1960). *Robust tests for equality of variance in I. Olkin, Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, Standfrod, pp. 278–292.
- LNEC (1963). Ficha de características – Pinho bravo, *Pinus pinaster* Ait in *Documentação de materiais e elementos de construção*, Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa.
- MADRP (2011). Site do Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas http://portal.min-agricultura.pt/portal/page/portal/MADRP/PT/foco/nematodo/perguntas_frequentes_nematodo/rsp_nemat/4CA75F35BEB1007AE043C0A8C8C2007A. Consultado em 2011-05.
- Maggenti, A. (1981). *General Nematology*. New York, Springer-Verlag.
- Malek, R. B. e Appleby, J. E. (1984). *Epidemiology of pine wilt in Illinois*. Plant Disease 68:180–186.
- Mamiya, Y. (1975). *The life history of the pine wood nematode, Bursaphelenchus lignicolus* (in Japanese with English abstract). Jpn J Nematol 5:16–25.
- Mamiya, Y. (1980). *Inoculation of the first year pine (Pinus densiflora) seedlings with Bursaphelenchus lignicolus and histopathology of diseased seedlings* (in Japanese with English abstract). J Jpn For Soc 62:176–183.
- Mamiya, Y. (1983). *Pathology of the pine wilt diseases caused by Bursaphelenchus xylophilus*. Annual Review of Phytopathology 21:201–220.
- Mamiya, Y. (1984). *Resistance of Pinus spp. against Bursaphelenchus xylophilus and B. mucronatus focusing on the host age* (in Japanese). Trans Mtg Jpn For Soc 95:475–476.
- Mamiya, Y. (1984a). The pine wood nematode in Nickle WR (ed). *Plant and insect nematodes*. pp. 589–626, New York, Marcel Dekker.
- Mamiya, Y. (1988). *History of pine wilt disease in Japan*. J. Nematology. 20:219–226.
- Mamiya, Y. (1990). *Behavior of the pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus, and disease development in pine trees* (in Japanese). Nippon Nogeikagaku Kaishi 64:1243–1246.
- Mamiya, Y. (sd). www.bugwood.org, site consultado em Agosto de 2011.
- Mamiya, Y. e Enda, N. (1979). *Bursaphelenchus mucronatus n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees*. Nematologica 25:353–361.
- Mamiya, Y. e Kiyohara, T. (1972). *Description of Bursaphelenchus lignicolus n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of nematode-infested trees*. Nematologica 18:120–124.
- Mamiya, Y., Hiratsuka, M. e Murata, M. (2005). *Ability of wood-decay fungi to prey on the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus (Steiner and Buhner) Nickle*. Japanese Journal of Nematology 35:21–30.
- Maroco, J. (2003). *Análise estatística com utilização do SPSS*. Edições Sílabo, 2ª edição, Lisboa.
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgenmeister, W., Metge, K. e Sousa, E. (1999). *First report of Bursaphelenchus xylophilus in Portugal and in Europe*. Nematology 1:727–734.
- Mullin, P (2002). <http://nematode.unl.edu/buxy21.jpg>, site consultado em Maio de 2011.

- Naves, P. (2007). *Biology of Monochamus galloprovincialis (Coleoptera, Cerambycidae) and its role as vector of the pine wood nematode Bursaphelenchus xylophilus (Nematoda, Parasitaphelenchidae) In Portugal*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 166 pp.
- Nickle, W.R., Golden, A.M., Mamiya, Y. e Wergin, W.P. (1981). *On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1971*. Journal of Nematology 13:385-392.
- Norma ASTM D 143 - *Standard Test Methods for Small Clear Specimens of Timber*. American Society for Testing and Materials.
- Norma BS 373:1957 - *Methods of testing small clear specimens of timber*.
- Norma EN 408:2003 - *Timber structures. Structural timber and glued laminated timber. Determination of some physical and mechanical properties*. Instituto Português da Qualidade.
- Odani, K., Sasaki, S., Nishiyama, Y., Yamamoto, N. (1985). *Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes—cellulase as a possible candidate of the pathogen*. J Jpn For Soc 67:366–372.
- Ohoba, K. (1976). *Breeding for resistance to pine wilt disease*. Forest Tree Breeding, 99:1–6.
- Oliveira, E.J., Rabinovitch, L., Monnerat, R.G., Passos, L.K.J e Zahner, V. (2004). *Molecular characterization of Brevibacillus laterosporus and its potential use in biological control*. Appl Environ Microbiol 70:6657–6664.
- Oliveira, H., Rodrigues, A., Casquilho, M. e Bordado, J. (2008). *Impacto do ataque do nemátodo da madeira de pinheiro na aptidão tecnológica como madeira maciça*. Silva Lusitana 16(2):149–173. Legislação
- Penas, A.C., Correia, P., Bravo, M.A., Mota, M. e Tenreiro, R. (2004). *Species of Bursaphelenchus Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with maritime pine in Portugal*. Nematology 6:437-453.
- Petty, J.A. (1970). *Permeability and structure of the wood of Sitka spruce*. Proceedings of the Royal Society of London Series B 175:149–166.
- Portaria n.º 103/2006, de 6 de Fevereiro.
- Rodrigues, A., Casquilho, M., Oliveira, H. e Bordado, J. (2009). *A statistical analysis of the impact of nematode attack symptomatology on the mechanical behaviour of Pinus pinaster Ait*. Wood. European Journal of Forest Research, volume 129, number 2, pp.145-153.
- Rodrigues, J. M. (2011). *Portuguese national action plan for pinewood nematode control - strategy, actions & results*. Autoridade Florestal Nacional. XLIII ONTA Annual Meeting, Universidade de Coimbra, Portugal.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M. e Kulinich, O. (2005). *A synopsis of the genus Bursaphelenchus Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species*. Nematology 7: 393-458.
- Santos, J. A. (2007). *Estudo de modelos e caracterização do comportamento mecânico da madeira*. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, 273 pp.
- Sanz, F., Latour, S., Neves, M., Bastet, E., Pischedda, D., Piñeiro, G., Gauthier, T., Lesbats, J., Plantier, C., Marques, A., Lanvin, J., Santos, J.A., Touza, M., Pedras, F., Parrot, J., Reuling, D. e Faria, C. (2007). *Aplicações industriais do pinheiro-bravo*. Projecto “Technical Co-operation for the Development of the Industrial Applications of Pinus pinaster” (Atlanwood-59), 248 pp.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and tree fungi. Biology, damage, protection and use*. Springer, Berlin.
- Shapiro, S. S. e Wilk, M. B. (1965). *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika. 52, 3 e 4: 591-611.
- Sousa, E. (2011). *Procedimento de inoculação de madeira com NMP*. Comunicação pessoal.
- Sousa, E., Bonifácio, L. e Naves, P. (2005). *A Doença do Nemátodo da Madeira do Pinheiro: situação da Península de Tróia*. Actas do 5º Congresso Florestal Nacional. Viseu.
- Sousa, E., Bravo, M., Pires, J., Naves, P., Penas, A., Bonifácio, L. e Mota, M. (2001). *Bursaphelenchus xylophilus (Nematoda; Aphelenchodidae) associated with Monochamus galloprovincialis (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal*. Nematology 3:89-91.
- Sousa, E., Naves, P., Bonifácio, L., Inácio, L., Henriques, J. E Evans, H. (2011). *Survival of Bursaphelenchus xylophilus and Monochamus galloprovincialis in pine branches and wood packaging material*. EPPO Bulletin 41: 203-207.
- Sousa, E., Naves, P., Bonifácio, L., Bravo, M., Penas, A., Pires, J., e Serrão, M. (2002). *Preliminary survey for insects associated with the pine wood nematode Bursaphelenchus xylophilus in Portugal*. EPPO Bull. 32:499-502.
- Sperry, J. e Tyree, M.T. (1988). *Mechanism of water stress-induced xylem embolism*. Plant Physiol 88:581–587.
- Steiner, G. e Buhner, E. M. (1934). *Aphelenchoides xylophilus n. sp., a nematode associated with bluestain and other fungi in timber*. J. Agric. Res. 48:949–51.

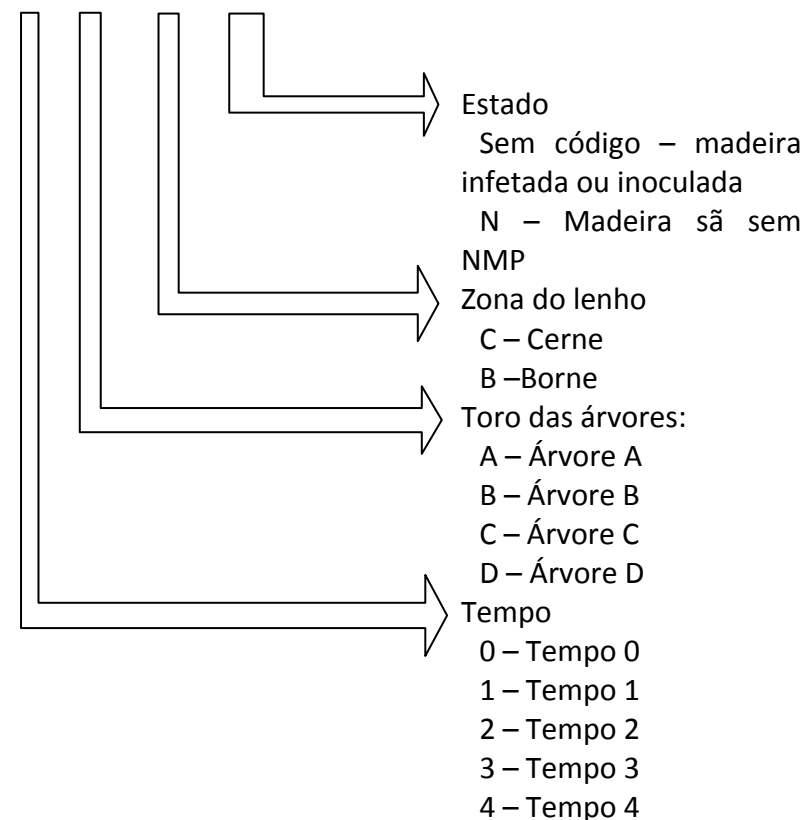
- Sutherland, J. R. (2008). A Brief Overview of the Pine Wood Nematode and Pine Wilt Disease in Canada and the United States in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer. Japan. 13-17.
- Suzuki, K. (1992). *Mechanism of wilting in pine wilt disease* (in Japanese). *Shinrin-boeki* (For Pests) 41:59–64.
- Takemoto, S. (2008). Population Ecology of *Bursaphelenchus xylophilus* in *Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer. Japan. 105-122.
- Tamura, H. e Mamiya, Y. (1979). *Reproduction of Bursaphelenchus lignicolus on pine callus tissues*. *Nematologica* 25:149–151.
- Tamura, H., Mineo, K. e Yamada T (1987). *Blockage of water conduction in Pinus thunbergii inoculated with Bursaphelenchus xylophilus*. *Jpn J Nematol* 17:23–30.
- Tamura, H., Yamada, T. e Mineo, K. (1988). *Host responses and nematode distribution in Pinus strobes and P. densiflora infected with the pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 54:327–331.
- Thorn, R.G., Barron, G.L. (1984). *Carnivorous mushrooms*. *Science* 224: 76-78.
- Thorn, R.G., Barron, G.L. (1986). *Nematoctonus and the tribe Resupinateae in Ontario, Canada*. *Mycotaxon* 25: 321-453
- Togashi, K., Matsunaga, K., Arakawa, Y. e Miyamoto, N. (2003). *The random dispersal of Bursaphelenchus xylophilus in pine twigs* (in Japanese). *Trans Jpn For Soc* 114:753.
- Tomminen, J. (1993). *Reproductive success of Bursaphelenchus xylophilus and B. mucronatus at constant and fluctuating temperatures*. *European Journal of Forest Pathology* 23: 342-352.
- Tomminen, J., Halik, S. e Bergdahl, D. R. (1991). *Incubation temperature and time effects on life stages of Bursaphelenchus xylophilus in wood chips*. *Journal of Nematology* 23:477-484.
- Trudgill, D.L. (1991). *Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:167–192.
- Tsoumis, G. (1991). *Science and Technology of Wood. Structure, Properties, Utilization*. Van Nostrand Reinhold, 494 pp.
- Tsoumis, G. (1991). *Science and Technology of Wood. Structure, Properties, Utilization*. Van Nostrand Reinhold, 494 pp.
- Tyree, M.T. e Zimmermann, M.H. (2002) *Xylem structure and the ascent of sap. 2nd edition*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 304 pp.
- Vieira, P., Burgermeister, W., Mota, M., Metge, K., e Silva, G. (2007). *Lack of genetic variation of Bursaphelenchus xylophilus in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses*. *J Nematology* 39:118–126.
- Viitanen, H. A. (1997). *Modeling the time factor in the development of brown rot decay in pine and spruce sapwood – the effect of critical humidity and temperature conditions*. *Holzforschung* 51:99-106.
- Whitehead, A.G. e Hemming, J.R. (1965). *A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil*. *Annals Applied Biology*, 55:25-38.
- Wingfield, M. J. (1987). *A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode*. In *Pathogenicity of the Pine Wood Nematode*. Wingfield, M.J, APS Press, St Paul (US) 8:1-90.
- Yamada, T. (2006). *Biochemical responses in pines infected with Bursaphelenchus xylophilus* (in Japanese with English abstract). *J Jpn For Soc* 88: 370–382.
- Yamada, T. (2008). *Biochemical responses in pine trees in Pine Wilt Disease*. Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. Springer, Japan, pp. 223-234.
- Ye, W., Zhang, Q., Hong, S. e Zhu, D. (1993). *Studies on fungi associated with Bursaphelenchus xylophilus on Pinus massoniana in Shenzhen, China*. *Afro-Asian Journal of Nematology* 3: 47-49.
- Zhang, C., Fujii, T., Abe, H., Fujiwara, T., Fujita, M. e Takabe, K. (2008). *Anatomical features of radial resin canals in Pinus densiflora*. *IWA Journal*, Vol. 29 (2): 179–187.
- Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. e Takeuchi, Y. (2008). *Pine Wilt Disease*. Springer. Japan. 459 pp.

ANEXO

Quadro I. Metodologia para marcação dos provetes para a realização dos ensaios

	Árvores	Zona do lenho	Códig o da zona	Amostras ao longo do tempo					N.º	
				t0	t1	t2	t3	t4		
Madeira sã	A	natural	cerne	ACN	0ACN	1ACN	2ACN	3ACN	4ACN	40
			borne	ABN	0ABN	1ABN	2ABN	3ABN	4ABN	
		inoculada	cerne	AC	0AC	1AC	2AC	3AC	4AC	31
			borne	AB	0AB	1AB	2AB	3AB	4AB	
	B	natural	cerne	BCN	0BCN	1BCN	2BCN	3BCN	4BCN	40
			borne	BBN	0BBN	1BBN	2BBN	3BBN	4BBN	
		inoculada	cerne	BC	0BC	1BC	2BC	3BC	4BC	32
			borne	BB	0BB	1BB	2BB	3BB	4BB	
	C	natural	cerne	CCN	0CCN	1CCN	2CCN	3CCN	4CCN	40
			borne	CBN	0CBN	1CBN	2CBN	3CBN	4CBN	
		inoculada	cerne	CC	0CC	1CC	2CC	3CC	4CC	32
			borne	CB	0CB	1CB	2CB	3CB	4CB	
Madeira infectada naturalmente	D		cerne	DC1	0DC1	1DC1	2DC1	3DC1	4DC1	36
			borne	DB1	0DB1	1DB1	2DB1	3DB1	4DB1	
			cerne	DC2	0DC2	1DC2	2DC2	3DC2	4DC2	42
			borne	DB2	0DB2	2DB2	2DB2	3DB2	4DB2	
			cerne	DC3	0DC3	1DC3	2DC3	3DC3	4DC3	47
			borne	DB3	0DB3	1DB3	2DB3	3DB3	4DB3	
Total									340	

T P Z E



Quadro II. Agrupamento de tábuas na inoculação

Dadoras	1D1	1D2	1D3	2D1	2D2	2D3	3D1	3D2	3D3	4D1	4D3	4D2
Recetoras	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C

Figura I Representação esquemática dos códigos de marcação das tábuas