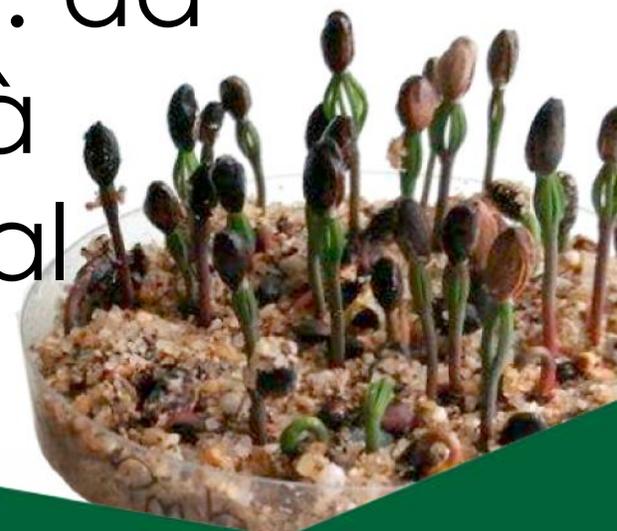


Webinar Final do Grupo Operacional
Desenvolvimento de Estratégias Integradas para a
Prevenção de Cancro-resinoso-do-pinheiro

Desinfeção da água de rega: da
investigação laboratorial à
aplicação em contexto real

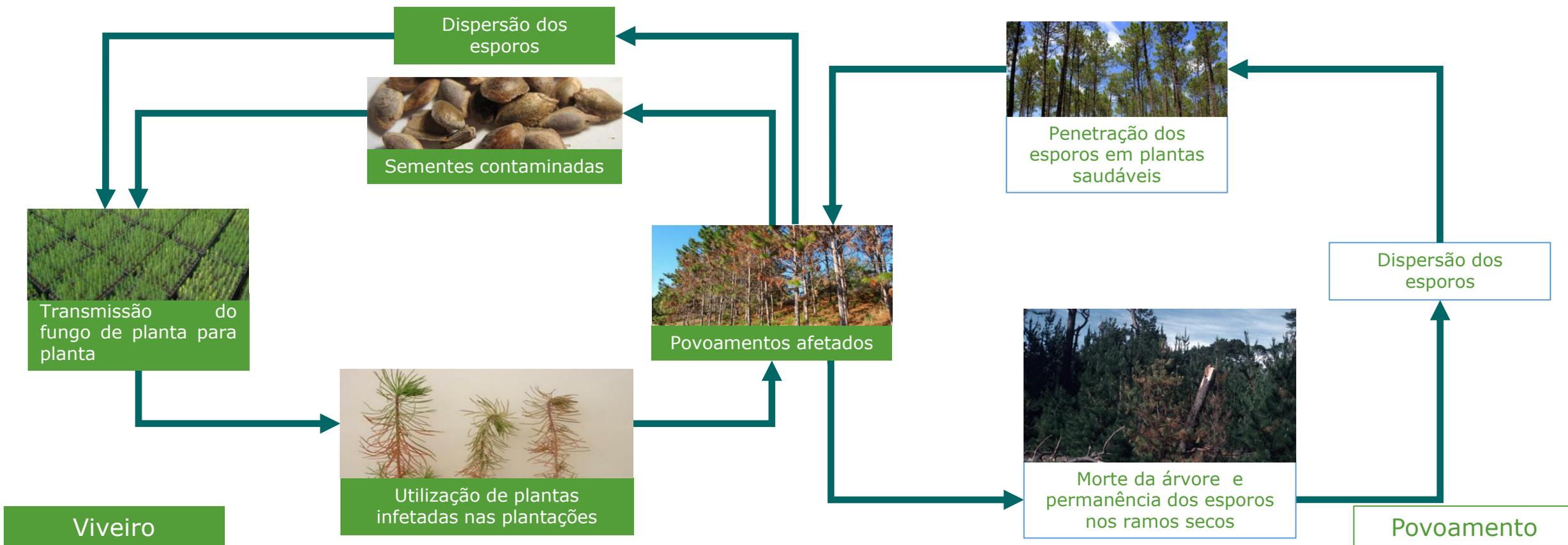


LUÍS FERNANDES IVO ROXO DIANA PAIVA ANTÓNIO PORTUGAL

15 de Dezembro de 2021

Introdução

O problema da água de rega



Introdução

O problema da água de rega

- Enquanto potencial veículo de dispersão de esporos de *Fusarium circinatum*, há a necessidade de desenvolver tratamentos eficazes na eliminação dos mesmos.
- Estes tratamentos terão de:
 - Diminuir consideravelmente ou, preferencialmente, eliminar os esporos de *F. circinatum*;
 - Não comprometer a integridade e viabilidade das plantas.



Figura 1 – Plantas jovens com sintomas de CRP. Fonte: ICNF, I.P.

Ensaio Laboratoriais

Os tratamentos - Desogerme

- Agente esterilizante de superfícies comercial com um composto de amónio quaternário (cloreto de benzalquidimetilamónio) como princípio ativo.
- Eficácia fungicida já comprovada contra outras espécies do género *Fusarium* (Nel *et al.*, 2007).
- Atua ao nível da membrana citoplasmática, causando a sua distorção e alterando assim a permeabilidade da mesma (Vieira *et al.*, 2006).

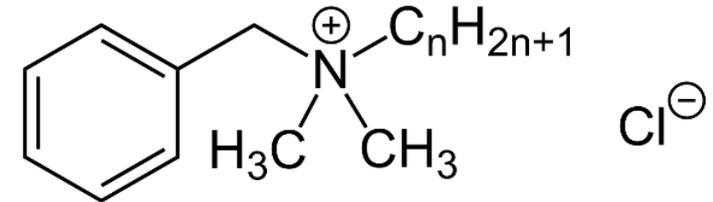


Figura 2 - Estrutura base do Cloreto de Benzalquidimetilamónio. Adaptado de (i).

Ensaaios Laboratoriais

Os tratamentos - Hipoclorito de Sódio (NaClO)

- Composto químico não residual de fácil acesso.
- Efeito fungicida já comprovado em *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Nel *et al.*, 2007) e outros fungos fitopatogénicos (Macnish *et al.*, 2010).
- Em solução aquosa gera ácido hipocloroso (HClO), que possui um efeito de degradação oxidativa em membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos.

Ensaaios Laboratoriais

Os tratamentos - Hydrocare

- Composto comercial contendo peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 49,9% e nanopartículas de prata.
- Peróxido de hidrogénio, na presença das nanopartículas de prata, gera radicais hidroxilo (OH^\bullet).
- Estes radicais interagem e inibem o funcionamento de quase todas as biomoléculas, desde proteínas até ao próprio DNA.
- As próprias nanopartículas de prata também têm efeitos biocidas, podendo causar danos diretos na membrana celular ou até mesmo impedir a produção de ATP e replicação de DNA.

Ensaio Laboratoriais

Protocolo de Desinfeção

- Produziu-se uma suspensão de esporos de *F. circinatum* de modo a mimetizar uma água de rega contaminada com estes propágulos do fungo.
- Esta suspensão foi então sujeita aos diversos tratamentos anteriormente referidos, às concentrações apresentadas (Tabela 1).
- A solução resultante da suspensão de esporos com cada um dos tratamentos foi plaqueada em meio PDA e foram contabilizadas as UFCs.

Tabela 1 - Tratamentos a testar em contexto laboratorial para desinfeção de água de rega.

Tratamento	Concentrações
Hipoclorito de Sódio (lixívia comercial)	1%, 2% e 2,5%
Hydrocare	1%, 2%, 3%, 4% e 5%
Desogerme	1%

Ensaio Laboratoriais

Protocolo de Desinfeção

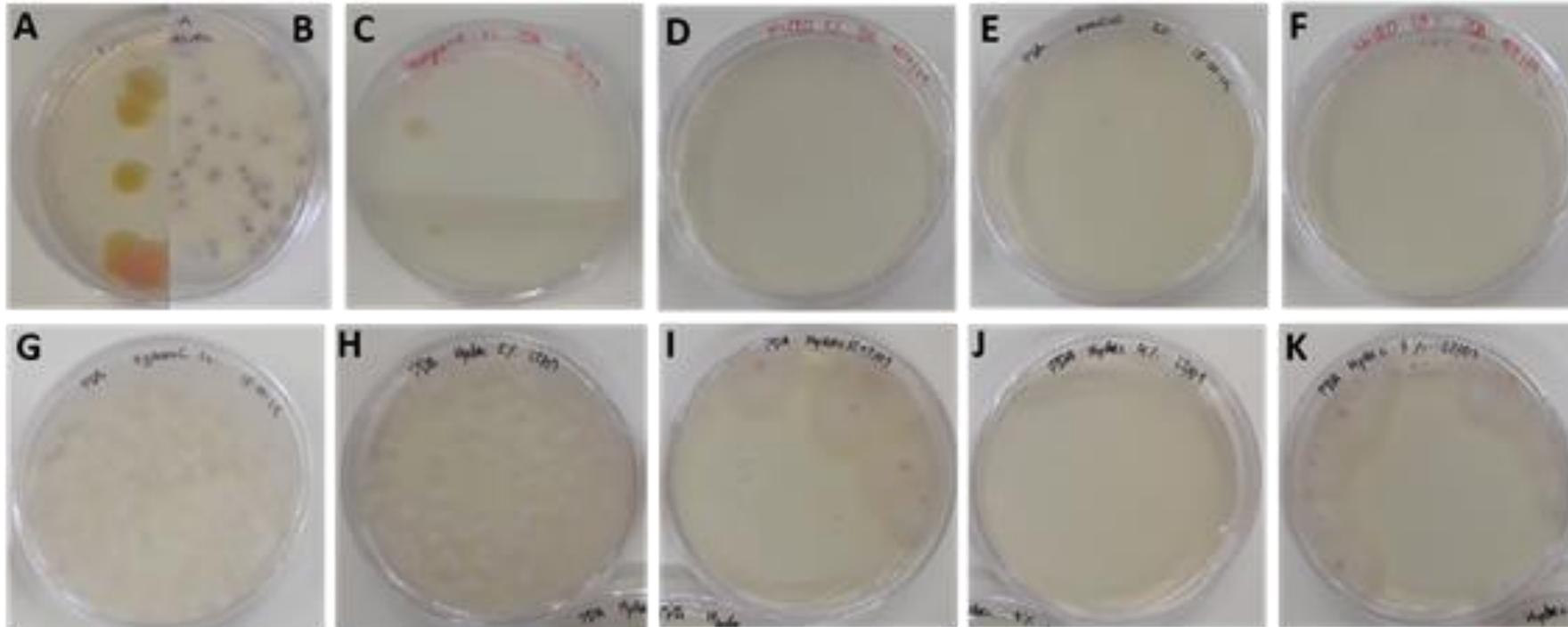


Figura 3 - Caixas inoculadas com os tratamentos de água de rega, 7 dias após inoculação. A) C-; B) C+diluído 1:1000; C) Desogerme 1%; D) NaClO 1%; E) NaClO 2%; F) NaClO 2,5%; G) a K) Hydrocare 2% a 5%

Ensaio Laboratoriais

Protocolo de Desinfeção - Resultados

- Tratamentos com NaClO e Desogerme (em todas as concentrações testadas), e com Hydrocare a 4% foram **100% eficazes** na eliminação de *F. circinatum* em água de rega.

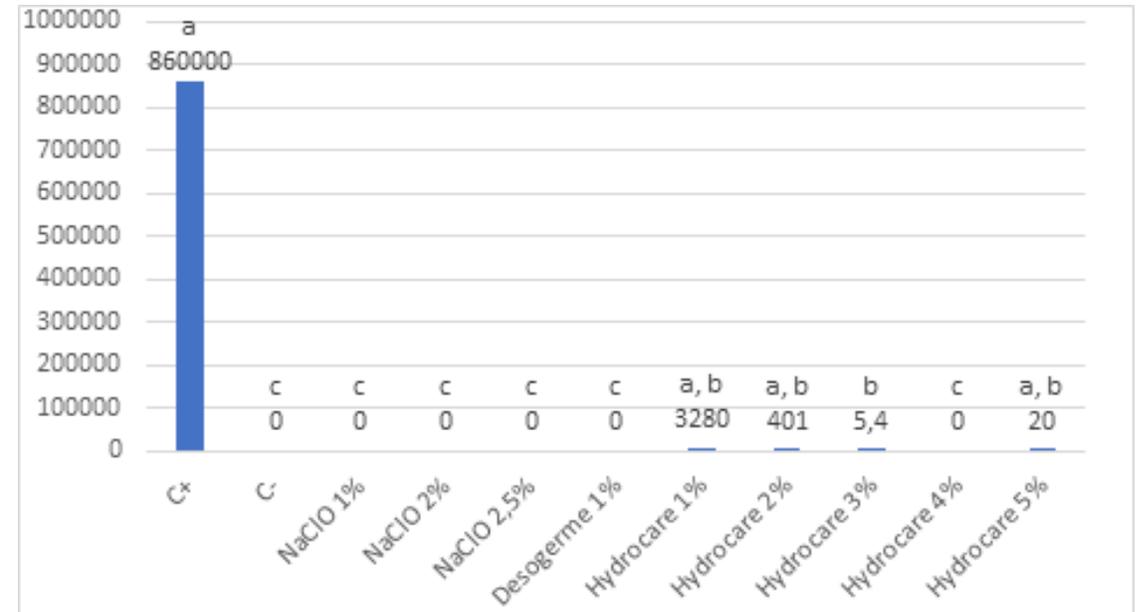


Figura 4 - Média de UFCs de *Fusarium circinatum* por tratamento. Dados (n=5) associados a letras diferentes são significativamente diferentes, segundo o teste de Dunn ($P < 0,001$).

Ensaio Laboratoriais

Ensaio preliminares em sementes

- Seleccionaram-se para estes ensaios os tratamentos NaClO 1%, Desogerme 1% e Hydrocare 4%.
- Submeteram-se sementes de *Pinus pinaster*, *P. radiata* e *P. pinea* a rega a intervalos regulares com cada um dos tratamentos referidos durante 50 dias.
- Acompanhou-se germinação e crescimento ao longo deste período.



Figura 5 - Sementes de *Pinus radiata* regadas com C-.

Ensaio Laboratoriais

Ensaio preliminares em sementes - Resultados

- Germinação não mostrou ser afetada por qualquer um dos tratamentos neste ensaio.

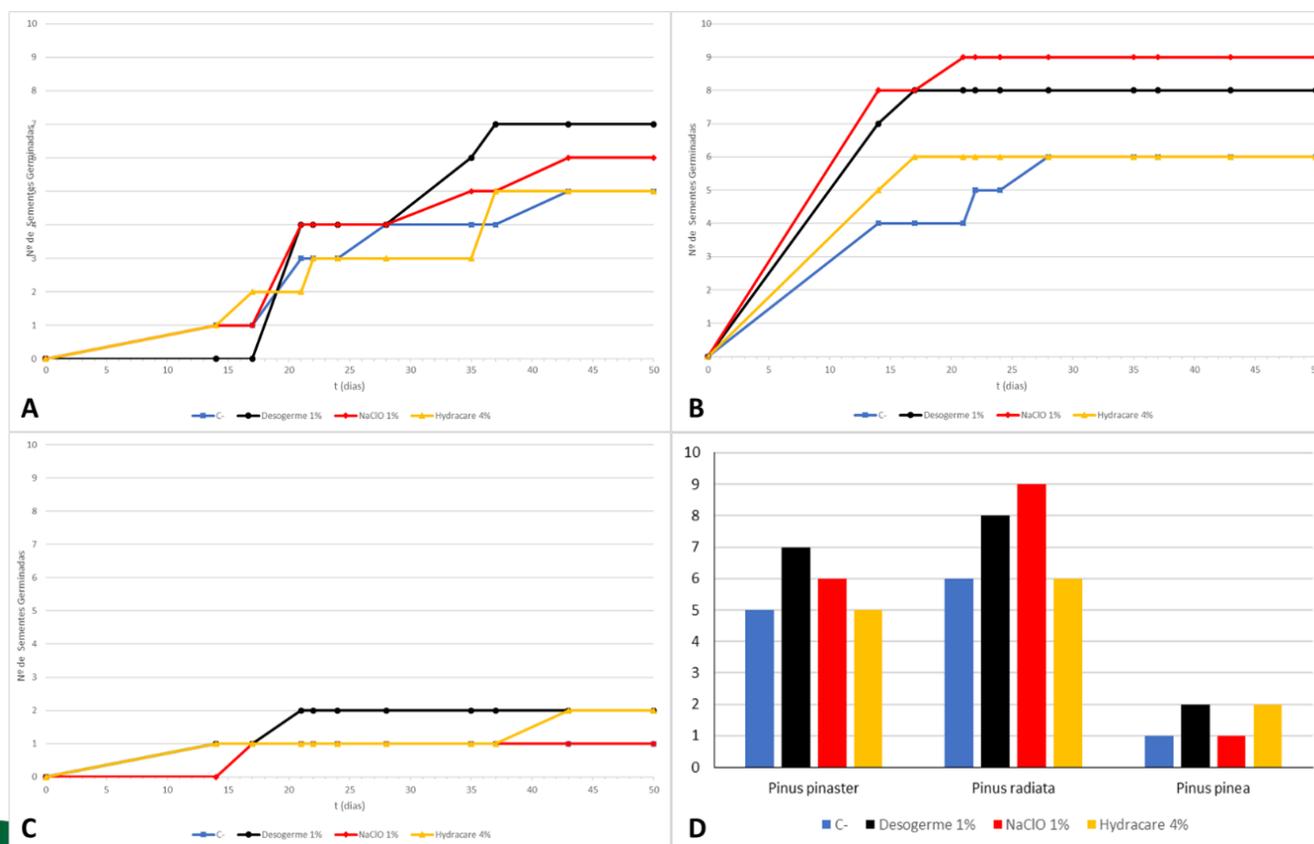


Figura 6 - Germinação das sementes de: **A)** *Pinus pinaster*; **B)** *Pinus radiata*; **C)** *Pinus pinea*, ao longo de 50 dias de rega com os tratamentos. **D)** Nº de sementes germinadas por espécie e tratamento no final de 50 dias de rega.

Ensaaios em Viveiro

Contexto Real

- Após ensaios de qualidade da água (realizados pelo ISA) aos tratamentos NaClO 1%, Desogerme 1% e Hydrocare 4%, verificou-se que o tratamento com NaClO não cumpria os padrões de qualidade pretendidos.
- Avaliação da viabilidade dos tratamentos Desogerme 1% e Hydrocare 4% em contexto real de viveiro.
- Foi possível verificar que nenhum dos dois tratamentos testados mostrou afetar significativamente a germinação das sementes das espécies de *Pinus* testadas (*P. pinaster*, *P. pinea*, e *P. sylvestris*) (Tabela 2).

Ensaio em Viveiro

Contexto Real

Tabela 2 – Taxa de germinação (em percentagem) após rega com os tratamentos em análise em contexto real, nos diversos viveiros (A-E (APFC-Equipar), G (Germiplanta), I-AI (ICNF-Alcácer do Sal), I-Am (ICNF-Amarante)). (Adaptado do Folheto informativo nº5 do GO+PrevCRP, ICNF, abril 2021)

Desinfecção	Tratamento / substrato	Pinheiro-bravo (<i>Pinus pinaster</i>)		Pinheiro-de-casquinha (<i>Pinus sylvestris</i>)		Pinheiro-manso (<i>Pinus pinea</i>)	
		Taxa de germinação após sementeira (em % arredondada à unidade)					
		1 mês	2 meses	1 mês	2 meses	1 mês	2 meses
Água de rega (AR)	Desogerme (1%)	68 (G)	79 (G)	—	—	31 (I-AI)	39 (I-AI)
	Hydrocare (4%)	73 (I-Am)	90 (I-Am)	75 (I-Am)	75 (I-Am)	0 (A-E)	51 (AE)
	Testemunha	62 (G) 85 (I-Am)	66 (G) 89 (I-Am)	82 (I-Am)	83 (I-Am)	9 (A-E) 32 (I-AI)	46 (A-E) 39 (I-AI)

Aplicação e formulação

Contexto Real

- Preparação de soluções pode ser feita com recurso a qualquer tipo de contentor ou cisterna que o viveiro tenha à disposição.
- Na aplicação dos reagentes, devem ser sempre consideradas as indicações de segurança indicadas nas fichas técnicas de cada um e deve ser sempre utilizado o EPP indicado.

Tabela 3 - Instruções de preparação dos tratamentos para a água de rega.

Tratamento	Volume de reagente a adicionar	Volume de água a tratar
Desogerme 1%	10,2 L de solução stock	1000 L
Hydrocare 4%	42 L de solução stock	

Bibliografia

Literatura

Macnish, A. J. *et al.* Sodium hypochlorite: A promising agent for reducing *Botrytis cinerea* infection on rose flowers. *Postharvest Biology and Technology* **58**, 262–267 (2010).

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection* **26**, 697–705.

Vieira, B., Carmona-Ribeiro, A. M., Sa, U. De, Lineu, A. & Butanta, P. (2006). Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 760–767.

Bibliografia

Imagens

- **(i)** https://en.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium_chloride#/media/File:Benzalkonium_chloride_Structure_V.1.svg
(visitado pela última vez a 25/11/21)

Webinar Final do Grupo Operacional
Desenvolvimento de Estratégias Integradas para a
Prevenção de Cancro-resinoso-do-pinheiro
Desinfecção da água de rega: da
investigação laboratorial à
aplicação em contexto real

OBRIGADO!

