



ÁGUA PARA O ALGARVE - INIMA, AQUAPOR E LUSÁGUA, A.C.E.

ESTAÇÃO DE DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA DO MAR DO ALGARVE

PROJECTO DE EXECUÇÃO RELATÓRIO DE CONFORMIDADE AMBIENTAL DO PROJETO DE EXECUÇÃO (RECAPE) ANEXO 15 – PROSPECÇÃO DE FITÓFLORA

Revisão 01

Lisboa, 8 de abril de 2025

REVISÃO	DATA	DESCRIÇÃO
00	24-02-2025	Edição Inicial
01	08-04-2024	Revisão com resultados laboratoriais

Esta página foi deixada propositadamente em branco

ÁGUA PARA O ALGARVE - INIMA, AQUAPOR E LUSÁGUA, A.C.E. ESTAÇÃO DE DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA DO MAR DO ALGARVE

PROJECTO DE EXECUÇÃO

RELATÓRIO DE CONFORMIDADE AMBIENTAL DO PROJETO DE EXECUÇÃO (RECAPE)

VOLUME I – RESUMO NÃO TÉCNICO

VOLUME II – RELATÓRIO BASE

VOLUME III – PEÇAS DESENHADAS

VOLUME IV – ANEXOS

ANEXO 15 - PROSPECÇÃO DE FITÓFTORA

ÍNDICE GERAL

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>3</u>
1.1	IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO, DO PROPONENTE E DA ENTIDADE LICENCIADORA.....	3
1.2	LOCALIZAÇÃO DO PROJETO E ENQUADRAMENTO GEOGRÁFICO	3
1.3	APRESENTAÇÃO DO RELATÓRIO DE ESPECIALIDADE	5
<u>2</u>	<u>PROSPECÇÃO DE FITÓFTORA</u>	<u>6</u>
2.1	ENQUADRAMENTO	6
2.2	METODOLOGIA	6
2.2.1	PARÂMETROS A MONITORIZAR	6
2.2.2	LOCAIS E FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM	6
2.2.3	TÉCNICAS E MÉTODOS DE RECOLHA DE CAMPO.....	8
2.2.4	TÉCNICAS LABORATORIAIS.....	8
2.3	RESULTADOS.....	9

ANEXO

RELATÓRIO: DETECÇÃO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EM SOLOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Enquadramento administrativo da EDAM Algarve	4
Figura 2.1 – Localização das amostras de solo recolhidas para prospeção de fitóftora	7

ÁGUA PARA O ALGARVE - INIMA, AQUAPOR E LUSÁGUA, A.C.E. ESTAÇÃO DE DESSALINIZAÇÃO DE ÁGUA DO MAR DO ALGARVE

PROJECTO DE EXECUÇÃO

RELATÓRIO DE CONFORMIDADE AMBIENTAL DO PROJETO DE EXECUÇÃO (RECAPE)

ANEXO 15 – PROSPEÇÃO DE FITÓFLORA

1 INTRODUÇÃO

1.1 IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO, DO PROPONENTE E DA ENTIDADE LICENCIADORA

O presente documento refere-se ao **Anexo 15 - Prospeção de Fitoflora** que integra o **Relatório de Conformidade Ambiental do Projeto de Execução (RECAPE)**, relativo ao **Projeto da Estação de Dessalinização de Água do Mar (EDAM) do Algarve** que se encontra em fase de Projeto de Execução, localizado no concelho de Albufeira.

O presente RECAPE decorre do procedimento de Avaliação de Impacte Ambiental (AIA) nº 3667, no âmbito do qual foi emitido o Título Único Ambiental n.º TUA 20240403001056, onde foram avaliados os impactos do projeto em fase de Estudo Prévio.

O **proponente** do projeto da Estação de Dessalinização da Água do Mar do Algarve, são as Águas do Algarve (AdA), com o NIPC 505176300, com sede em Rua do Repouso, nº 10, 8000-302 Faro.

Face ao enquadramento constante do Decreto-Lei n.º 11/2023, de 10 de fevereiro, que procedeu à reforma e simplificação dos licenciamentos ambientais, alterando e republicando o disposto no Decreto-Lei n.º 151-B/2013, de 31 de outubro, e no Decreto-Lei 152-B/2017, de 11 de dezembro, a **entidade competente para licenciamento** das diversas componentes do projeto é a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), dado que se trata de um projeto que se desenvolve em espaço marítimo.

1.2 LOCALIZAÇÃO DO PROJETO E ENQUADRAMENTO GEOGRÁFICO

O Projeto, na sua totalidade, abrange o distrito de Faro, freguesia de Albufeira e Olhos de Água, no concelho de Albufeira.

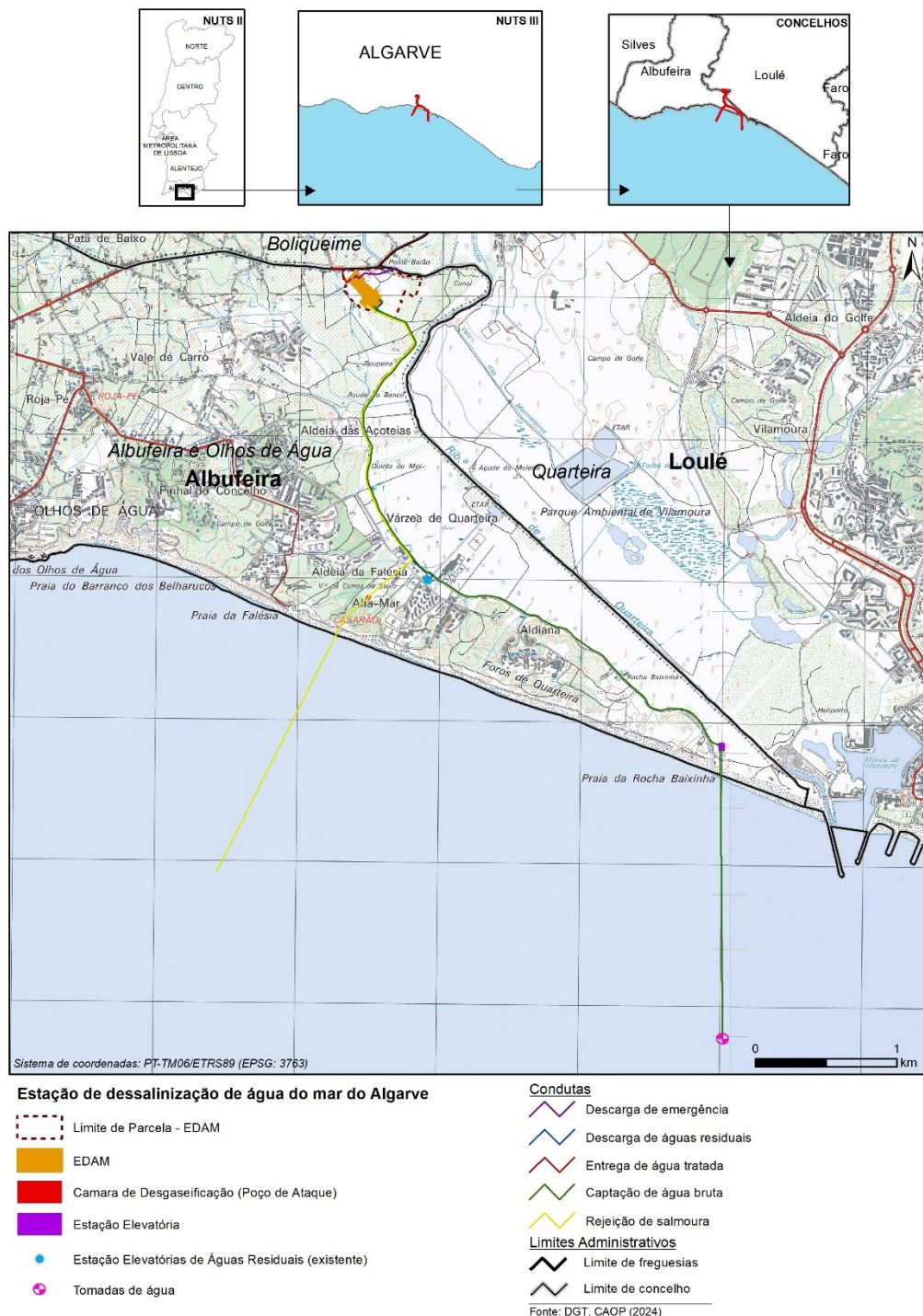


Figura 1.1 - Enquadramento administrativo da EDAM Algarve

1.3 APRESENTAÇÃO DO RELATÓRIO DE ESPECIALIDADE

O presente relatório pretende apresentar a prospeção de fitóftora (*Phytophthora cinnamomi*), dando assim resposta ao ponto 16 da DIA referente a Elementos a apresentar no Relatório de Conformidade Ambiental do Projeto de Execução (RECAPE), que refere o seguinte:

*“Relatório do resultado da prospeção para verificação da presença da Fitóftora (*Phytophthora cinnamomi*). As áreas a considerar serão todas as onde estejam presentes exemplares do género *Quercus* e sempre que sobre ela esteja previsto ocorrer ações de movimento de terras, incluindo a decapagem, sobre o solo devem ser prospetadas. A verificar-se a sua presença devem ser seguidas as orientações rigorosas e necessárias e aplicadas as devidas medidas caurtelares, pra não promover a sua disseminação. Osrelatório de obra devm refletir a informação obtida na prospeção e traduzir-se em cartografai com a localização das áreas.”*

Equipa técnica:

Bárbara Monteiro, Licenciada em Biologia e Mestre em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas

Joana Lima, Licenciada em Biologia e Mestre em Ecologia e Gestão Ambiental

2 PROSPECÇÃO DE FITÓFTORA

2.1 ENQUADRAMENTO

Embora as células da fitóftora se assemelhem ao micélio dos fungos e obtenha os seus nutrientes por absorção, não são considerados fungos verdadeiros, apresentando diferenças a nível celular e reprodutivo. Devido a estas diferenças na parede celular a maioria dos fungicidas não tem efeito sobre as *Phytophthora*.

Phytophthora cinnamomi foi detectada pela primeira vez na árvore da canela (*Cinnamomi burmamii*). A partir do final dos anos 80 houve grandes surtos de mortalidade entre os *Quercus* decorrentes desta espécie. Contribuindo este patógeno para o declínio da espécie, associado a outras condições debilitantes, como a seca, encharcamento do solo e acções antropogénicas, como más práticas de gestão do mato.

A fitóftora causa podridão radicular nos seus hospedeiros, reduzindo-lhes a capacidade de absorção de água e nutrientes. Na parte aérea os sintomas são amarelecimento das folhas, desfoliação, morte da extremidade dos ramos, exudações no tronco. Estes sintomas são pouco específicos e característicos de stress hídrico e má nutrição, surgindo apenas quando a parte radicular já está seriamente afectada. Solos ricos em matéria orgânica permitem que a microflora antagonista de *Phytophthora* ssp. se desenvolva e suprima este “fungo” patógeno.

A fitóftora precisa de água para desenvolver o seu ciclo biológico pelo que o teor de humidade e temperatura do solo é fundamental para o seu estabelecimento, dispersão e sobrevivência. De facto, em presença de água livre no solo a fitóftora desenvolve estruturas assexuadas (esporângios) que produzem esporos móveis (zoósporos) que são atraídos para as raízes jovens e finas das árvores. Os esporos invadem os tecidos vasculares das raízes que são os responsáveis pela captação e transporte de água e nutrientes nas plantas. Ao ficarem inoperacionais, as raízes comprometem o abastecimento de água e nutrientes às copas, que começarão, sobretudo na parte superior, a mostrar sintomas progressivos de perda de vitalidade como a alteração de cor das folhas passando da verde-escura a amarelo e castanho e a desfoliação (copas mais transparentes).

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 PARÂMETROS A MONITORIZAR

No caso da prospecção de fitóftora, os parâmetros a recolher serão a presença ou ausência da espécie nas amostras recolhidas.

2.2.2 LOCAIS E FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM

Foram identificadas na área prospectada um total de 45 azinheiras, localizando-se grande parte das mesmas em pequenos núcleos e outras em zonas que não serão alvo de

intervenção. Como tal, foram seleccionadas para amostragem 10 localizações junto a árvores isoladas e por cada área de 10m² em núcleos de azinheira (Figura 2.1).

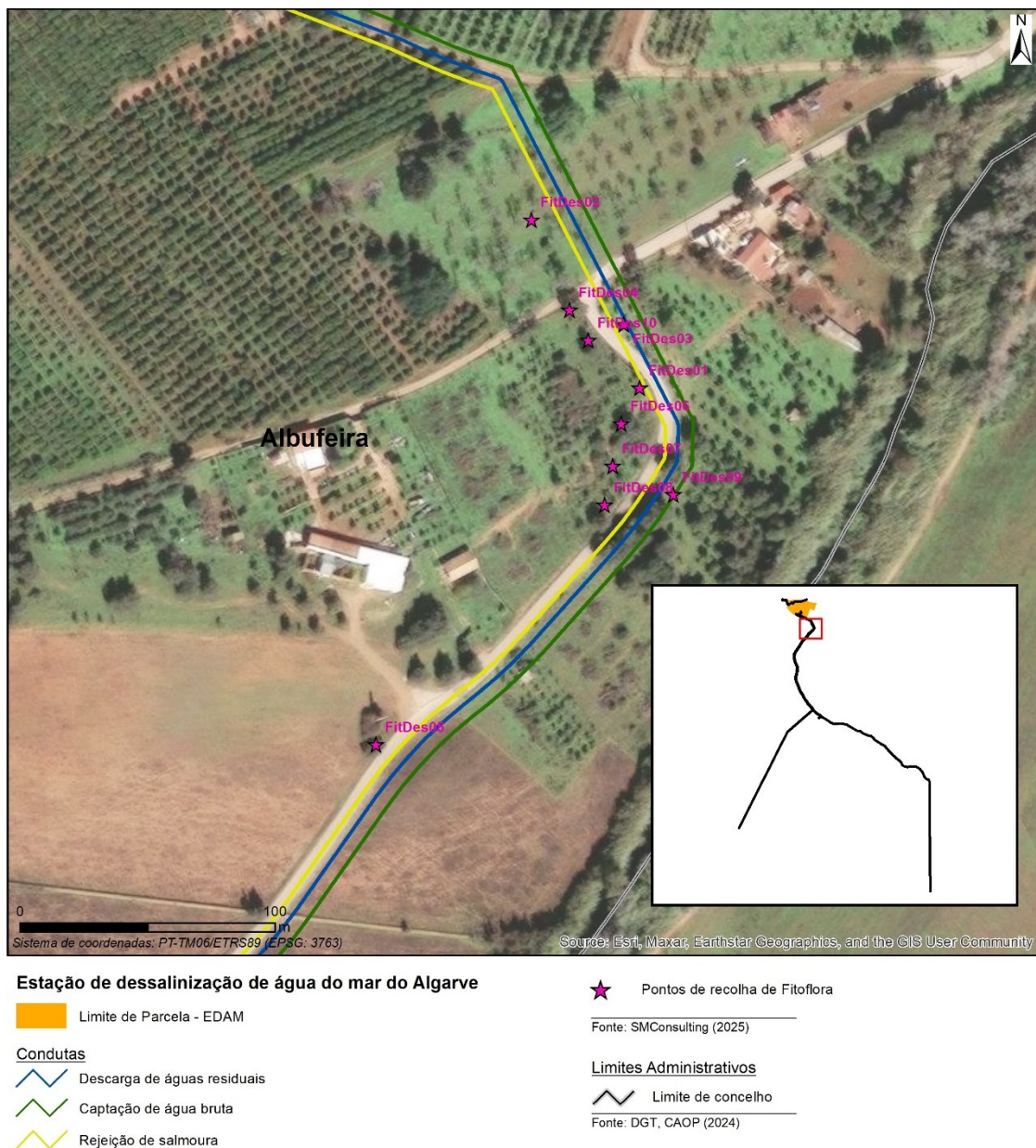


Figura 2.1 – Localização das amostras de solo recolhidas para prospeção de fitóflora

As amostras foram recolhidas em fevereiro de 2025.

2.2.3 TÉCNICAS E MÉTODOS DE RECOLHA DE CAMPO

Para a colheita de amostras de solo para análise foram utilizadas luvas descartáveis e limpa a superfície do solo com auxílio da escova de limpeza. Cada amostra de solo, foi colhida de baixo de uma árvore ou núcleo, e é composta por quatro sub amostras correspondentes a quatro quadrantes da árvore debaixo da canópia da planta sintomática ou de várias plantas/zonas numa área de cerca de 10 m² (núcleos).

Cada amostra de solo foi recolhida a cerca de 30 cm de profundidade e tem um peso total de cerca de 800 a 1000 gramas de solo e raízes finas. Foram retiradas da amostra pedras de grande dimensão.

As quatro sub amostras dos quatro quadrantes foram misturadas bem e colocadas num saco de plástico resistente, estéril, fechado com uma abraçadeira, e marcado o saco com um marcador permanente com a referência da amostra de forma a que esta seja claramente visível. Foi também efetuada a recolha das coordenadas GPS do local de cada amostra.

Os sacos foram guardados a uma temperatura estável até serem entregues no laboratório para análise (entre 10°C e 30°C).

Todo o material foi limpo usando um pulverizador com etanol a 70% entre amostras e trocas as luvas entre amostras, de forma a evitar contaminação.

2.2.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS

As amostras foram recebidas em laboratório num período máximo de 24h desde a recolha.

A detecção de *Phytophthora cinnamomi* em amostras de solo será realizada através de uma combinação da metodologia de baiting e análise molecular. O processo de baiting será realizado de acordo com os protocolos estabelecidos internamente.

Resumidamente, as amostras de solo são colocadas em recipientes com água MiliQ e 15 folhas/ recipiente de plantas hospedeiras de *Phytophthora* spp. são colocadas à superfície. Quatro a cinco dias depois, as folhas são observadas num estereó microscópio para avaliar os sintomas e o potencial crescimento de hifas. Para cada amostra, as zonas nas folhas com sinais de infeção, são destacadas, agrupadas e o DNA genómico extraído.

A detecção de *P. cinnamomi* é realizada através de análise molecular por PCR com três conjuntos de oligos: um que amplifica uma região comum a fungos/oomicetas e plantas e que será usado como controlo positivo para o PCR (região ITS), outro que amplifica uma região do DNA específica do género de *Phytophthora* spp. e outro que amplifica uma região do DNA específica de um gene específico da espécie virulenta *Phytophthora cinnamomi*.

As análises laboratoriais encontram-se a decorrer no laboratório da InnovPlantProtect. As metodologias laboratoriais encontram-se descritas em maior detalhe no relatório do laboratório que se encontra em anexo.

2.3 RESULTADOS

Por cada amostra de solo, foram recuperadas entre 8-10 folhas e as zonas com sinais de necrose foram removidas com um bisturi, agrupadas e o DNA genómico extraído para análise molecular. Amplificação por PCR com oligos específicos para *P. cinnamomi* (gene LPV3) não gerou amplicões nas amostras de baits dos diferentes solos indicando que, nas condições utilizadas para este ensaio, não foi detetada a presença do oomiceto *P. cinnamomi*.

Amplificação por PCR com oligos específicos para o género *Phytophthora* spp. (gene YPT1) gerou um amplicão na amostra de baits da amostra de solo número 5, indicando que, nas condições utilizadas para este ensaio, foi detetada a presença de oomicetos pertencentes ao género *Phytophthora* spp. na amostra de solo número 5. Tal como esperado, verificou-se a amplificação dos controlos positivos, colunas 13 e 14, correspondentes a DNA genómico de *P. cinnamomi* e *P. cactorum*, respetivamente.

De forma a determinar quais as espécies presentes na amostra dos baits da amostra de solo número 5 a banda com presença do género *Phytophthora* spp., foi extraída do gel de agarose, e enviada para sequenciação pelo método Sanger. A análise bioinformática da sequência obtida revela uma identidade de 88,81% com *Phytophthora acerina* e de 84,48% com *Phytium splendens*, não sendo desta forma possível determinar com garantia a espécie(s).

Em conclusão, **não foi detetada a presença de *P. cinnamomi*** em qualquer uma das amostras de solos rastreadas.

ANEXO



INNOVPLANTPROTECT

RELATÓRIO

REF052025

SMCONSULTING

**Deteção de *Phytophthora*
cinnamomi em solos**

ELVAS, 4 DE ABRIL DE 2025

Tabela de revisão

Autoras	Data	Versão	Aprovação
Megan Braga	2025/04/04	1	Cristina Azevedo

INNOVPLANTPROTECT CoLAB

-  Estrada de Gil Vaz, 7350-148 Elvas
-  Estrada de Gil Vaz Apartado 72, 7351-901 Elvas
-  inpp@iplantprotect.pt
-  **WWW.IPLANTPROTECT.PT**

SUMÁRIO

SUMÁRIO3

INTRODUÇÃO.....4

1. Objetivo5

2. Materiais, Métodos e Resultados5

 ○ Material biológico.....5

 ○ Métodos.....5

 ○ Resultados.....8

REFERÊNCIAS..... 10

RESULTADO DA ANÁLISE

- Não foi detetada a presença de *P. cinnamomi* em qualquer uma das 10 amostras de solos rastreadas

INTRODUÇÃO

O InnovPlantProtect (InPP) é uma associação privada sem fins lucrativos, criada em Janeiro de 2019, constituída por iniciativa da Universidade Nova de Lisboa e que congrega 12 fundadores e quatro sócios comuns: o INIAV, o Município de Elvas, a Universidade de Évora, a Syngenta Crop Protection, a Bayer CropScience Portugal, a Fertiprado, o CEBAL, a Casa do Arroz, a ANPOC, a ANPROMIS, a FNOP, o Instituto Politécnico de Portalegre, o Politécnico de Santarém, a Lusosem e a Hubel Verde.

O InnovPlantProtect é uma instituição de hélice quádrupla que tem como missão desenvolver, até TRL 5-6 (*proof of concept* /protótipo), soluções inovadoras, biológicas e digitais, para promover modos de produção agrícola mais seguros, inteligentes e produtivos, ajustáveis às variações introduzidas pelas alterações climáticas, e mais amigos do ambiente.

O InPP visa assim produzir:

- novos biopesticidas para pragas e doenças;
- novas variedades resistentes a pragas e doenças;
- novos métodos de monitorização e diagnóstico;
- novos métodos de análise de risco de aplicação de pesticidas.
- novas formulações para a agricultura.

Recursos Humanos

Integram a equipa do InPP recursos humanos altamente qualificados. A equipa multidisciplinar e multicultural dispõe de um leque variado de competências ao nível de: biologia molecular de plantas, fungos e bactérias patogénicos, e de pragas; bioquímica e microbiologia; biotecnologia e melhoramento molecular; bioinformática e bioestatística; formulações e nano-/micro-tecnologia; desenvolvimento de produtos; sistemas de Informação geográfica; ciências da computação e inteligência artificial e gestão de projetos e de comunicação.

Equipa afeta a esta prestação de serviços

Cristina Azevedo, Diretora do Departamento de Novos Biopesticidas, doutorada em Patologia Vegetal, com mais de 20 anos de experiência em biologia celular e molecular.

Megan Braga, Investigadora com mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, com experiência em biologia molecular e microbiologia.

1. Objetivo

Deteção de *Phytophthora* spp. em amostras de solo através da técnica de baiting com folhas de *Eucalyptus* sp.

2. Materiais, Métodos e Resultados

MATERIAL BIOLÓGICO

No dia 19 de Março de 2025 foram recebidas no laboratório do InPP em Elvas dez amostras de solo (Tabela 1).

Tabela 1-Descrição das amostras de solo.

Código Smconsulting	Descrição	Origem	Localização	Tipo de solo	Código InPP
01	FitDes01		37.1035775 -8.1583072	Solo	01
02	FitDes02		37.1041663 -8.1587769	Solo	02
03	FitDes03		37.103803 -8.158370	Solo	03
04	FitDes04		37.1038507 -8.1586699	Solo	04
05	FitDes05		37.1023028 -8.1594756	Solo	05
06	FitDes06		37.1034406 -8.1583820	Solo	06
07	FitDes07		37.10329227 -8.1584222	Solo	07
08	FitDes08		37.1031582 -8.1584571	Solo	08
09	FitDes09		37.1031967 -8.1581613	Solo	09
10	FitDes10		37.1037443 -8.1585248	Solo	10

MÉTODOS

As amostras de solo foram armazenadas à temperatura ambiente antes de serem processadas. O método de deteção de *Phytophthora* spp. utilizado foi o Método de baiting com folhas de plantas hospedeiras do género *Eucalyptus* sp. através de um protocolo previamente otimizado pelo InPP. Resumidamente, as amostras de solo foram limpas dos detritos maiores, colocadas em caixas de plástico pré-desinfetadas e com aproximadamente 1/3 do solo para 2/3 da água

MiliQ. Os detritos em suspensão foram removidos com ajuda de papel de filtro. Folhas de *Eucalyptus* sp, colhidas de plantas saudáveis, no próprio dia, foram cortadas, esterilizadas superficialmente com 75% de etanol e colocadas à superfície da água (15 folhas/caixa; Figura 1). Numa das caixas colocaram-se as folhas em água (sem solo), como controle do estado fitossanitário das folhas de bait utilizadas (Figura 1 (0)).

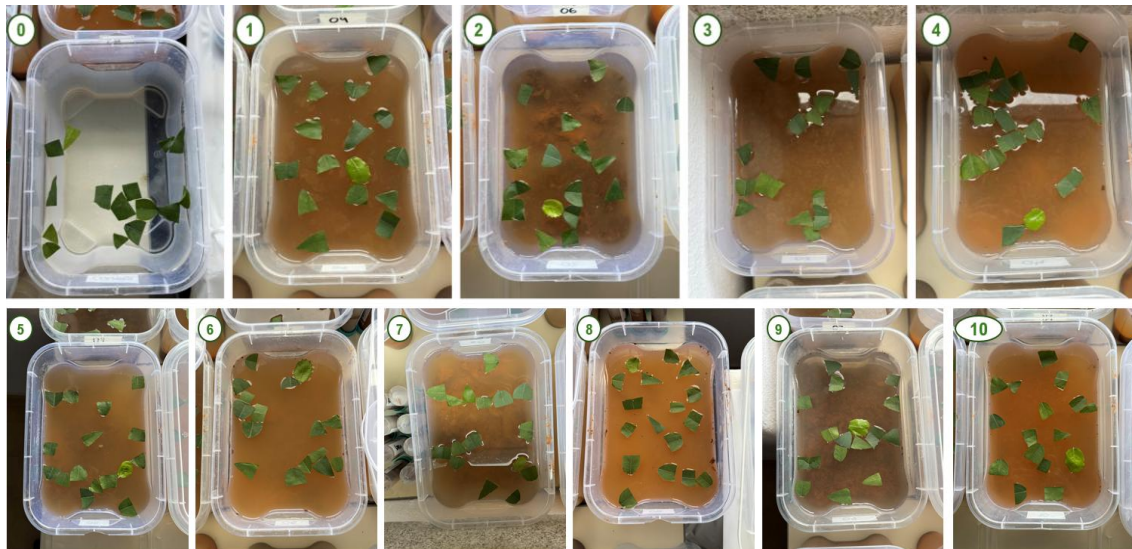


Figura 1- Técnica de baiting do solo com folhas de *Eucalyptus* sp. – dia 0; Legenda: **0-** Controle de água. **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04. **5-** FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10.

Cinco dias depois, as folhas foram retiradas das caixas, observadas à lupa para avaliar os sintomas e o potencial crescimento de hifas (Figura 2). Para cada amostra de solo, foram retiradas 8-10 folhas, as áreas com sinais de infecção removidas com um bisturi, agrupadas e o DNA genómico extraído de acordo com as instruções do kit DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen; Figura 3).

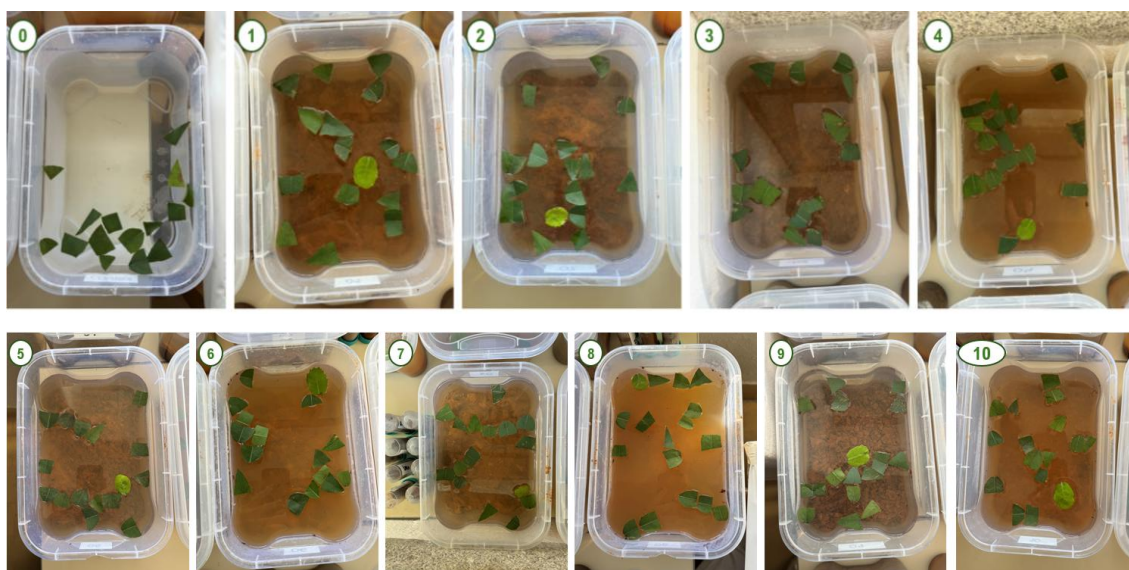


Figura 2- Técnica de baiting do solo com folhas de *Eucalyptus* sp. – dia 5; Legenda: **0-** Controle de água. **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04. **5-** FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10.

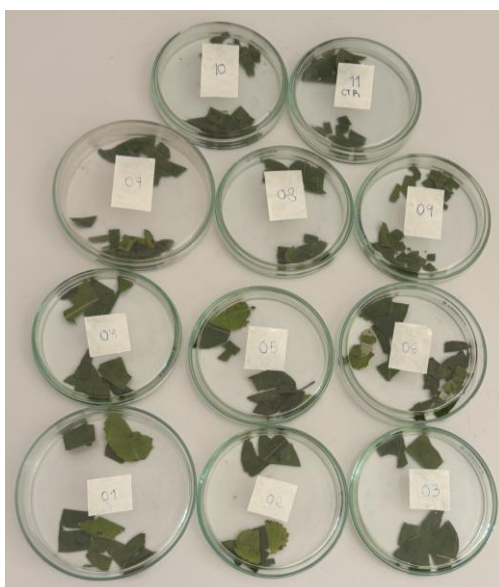


Figura 3- Exemplos de folhas de *Eucalyptus* sp. 5 dias após a baiting; Legenda: **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04. **5-** FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10; **11-** Controle de água.

A detecção de *Phytophthora* spp. foi realizada através de análise molecular por PCR, com três conjuntos de oligos: ITS- Controle de qualidade de DNA (região presente em plantas e fungos/oomicetos); YPT1- Gene específico do gênero de *Phytophthora* (isto é, amplifica todas as

espécies deste género; Schena et al., 2008); e LPV3- Gene específico da espécie virulenta *Phytophthora cinnamomi* (Kong, et al, 2003). As condições de PCR foram as seguintes: Volume total de 30 µL: 1.5 µL de DNA genómico, 15 µL Nztech Taq, 1.5 µL de cada oligo (10 µM), 10 µL H₂O. O programa de PCR do ITS foi o seguinte: 1 ciclo de: 98°C durante 15 min; 40 ciclos de: 98°C durante 10 s, 51°C durante 20 s, e 72°C durante 15 s, 1 ciclo final de: 72°C durante 5 min. O programa de PCR do YPT1 foi o seguinte: 1 ciclo de: 95°C durante 5 min; 36 ciclos de: 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, e 72°C durante 20 s, 1 ciclo final de: 72°C durante 5 min. O programa de PCR do LPV3 foi o seguinte: 1 ciclo de: 95°C durante 5 min; 5 ciclos de: 94°C durante 30 s, 58°C durante 20 s, e 72°C durante 20 s, 34 ciclos de: 94°C durante 30 s, 60°C durante 20 s, e 72°C durante 20 s 1 ciclo final de: 72°C durante 5 min. Os produtos de PCR foram separados num gel de 1% (w/v) Agarose TAE.

RESULTADOS

Por cada amostra de solo, foram recuperadas entre 8-10 folhas e as zonas com sinais de necrose foram removidas com um bisturi, agrupadas e o DNA genómico extraído para análise molecular. Amplificação por PCR com oligos específicos para *P. cinnamomi* (gene LPV3) não gerou amplicões nas amostras de baits dos diferentes solos indicando que, nas condições utilizadas para este ensaio, não foi detetada a presença do oomiceto *P. cinnamomi* (Figura 4, painel A). Neste contexto só se verificou amplificação do controlo positivo, coluna 13, correspondente a DNA genómico de *P. cinnamomi*.

Amplificação por PCR com oligos específicos para o género *Phytophthora* spp. (gene YPT1) gerou um amplicão na amostra de baits do solo FitDes05 indicando que, nas condições utilizadas para este ensaio, foi detetada a presença de oomicetos pertencentes ao género *Phytophthora* spp. (Figura 4, painel B, coluna 5). Tal como esperado, verificou-se a amplificação dos controlos positivos, colunas 13 e 14, correspondentes a DNA genómico de *P. cinnamomi* e *P. cactorum*, respetivamente.

Todas as amostras amplificaram os controlos positivos, isto é, o amplicão correspondente à região ITS presente em todas as plantas e fungos/oomicetos (Figura 4, painel C).

O limite estimado de deteção deste ensaio é de 10 pg de DNA genómico (Figura 5).

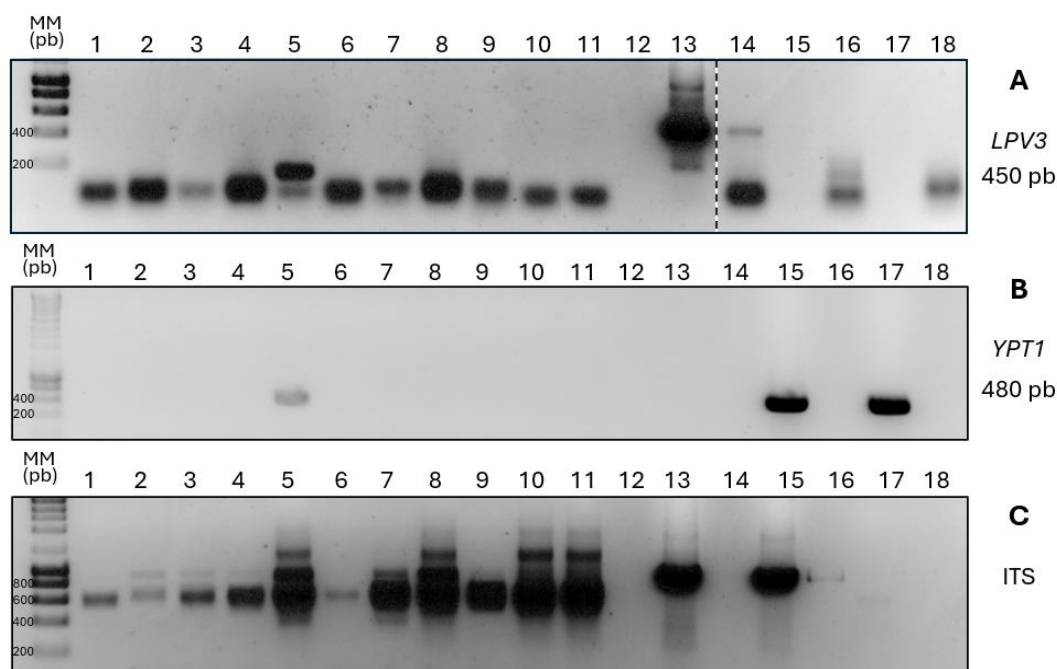


Figura 4- Análise molecular das folhas de bait de *Eucalyptus* sp. Amplicação de DNA resultante de: A- oligos específicos para a espécie *P. cinnamomi* (gene LPV3); B- oligos específicos para o género *Phytophthora* (gene YPT1); C- Oligos controle (região ITS). Gel de agarose 1% (p/v) em TAE. **Legenda Painei A** - MM- Marcador molecular de DNA (Ladder III NZytech); Legenda das colunas: **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04.5- FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10; **11-** Controle de água (Negativo); **13-** Controle de *P. cinnamomi* (Positivo); **14-** Controle de *P. cactorum* (Positivo); **16-** Controle sem DNA (Negativo); **18-** Controle de extração (Negativo). **Legenda Painei B** - MM- Marcador molecular de DNA (Ladder III NZytech); Legenda das colunas: **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04.5- FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10; **11-** Controle de água (Negativo); **15-** Controle de *P. cinnamomi* (Positivo); **17-** Controle de *P. cactorum* (Positivo); **18-** Controle sem DNA (Negativo); **Legenda Painei C**: MM- Marcador molecular de DNA (Ladder III NZytech); Legenda das colunas: **1-** FitDes01; **2-** FitDes02; **3-** FitDes03; **4-** FitDes04.5- FitDes05; **6-** FitDes06; **7-** FitDes07; **8-** FitDes08; **9-** FitDes09; **10-** FitDes10; **11-** Controle de água (Negativo); **13-** Controle de *P. cinnamomi* (Positivo); **15-** Controle de *P. cactorum* (Positivo); **17-** Controle sem DNA (Negativo).

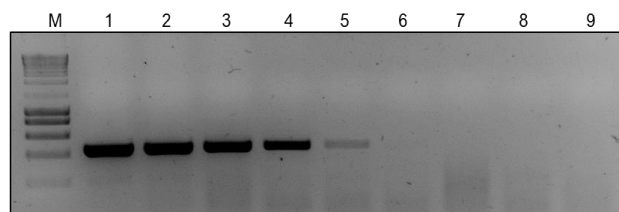


Figura 5- Limite de detecção de *Phytophthora cinnamomi*. Gel de agarose 1% (p/v) em TAE do produto de PCR resultante da amplificação do gene LPV3, com concentrações decrescentes de DNA genómico de *Phytophthora cinnamomi* de forma a determinar o limite de detecção do oligo. **Legenda:** M-Marcador molecular de DNA (Ladder III NZytech); Coluna 1-9: correspondem a concentrações decrescentes de DNA genómico: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg, 10 fg e 0, respetivamente. Limite de detecção estimado em 10 pg (coluna 5).

De forma a determinar quais as espécies presentes na amostra dos baits do solo FitDes05 a banda da Figura 4, Painel B, coluna 5, foi extraída do gel de agarose, e enviada para sequenciação pelo método Sanger. Análise bioinformática da sequência obtida revela uma identidade de 88.81% com *Phytophthora acerina* e de 84.48% com *Phytium splendens*, não sendo desta forma possível determinar com garantia a espécie/s.

Apesar não ter sido detetada a presença de *P. cinnamomi* em qualquer uma das amostras de solos rastreadas isto não significa que não possa existir. No entanto, se existir, estará abaixo do limite de deteção do ensaio. O método de deteção tem um limite de deteção de 10 picogramas de DNA, sendo que a presença do oomiceto em quantidades inferiores a este valor não será detetável. Além disso, há condições não são passíveis de controlo, que podem afetar a eficiência do método, entre elas: local da amostragem, representatividade da amostragem em relação à área total, grau de humidade do solo (quanto mais seco menos eficiente é o método), qualidade das folhas de hospedeiro usadas (nos meses de verão o método é mais ineficiente porque as folhas estão mais secas e por isso mais resistentes à infeção).

Em conclusão, não foi detetada a presença de *P. cinnamomi* em qualquer uma das amostras de solos rastreadas.

REFERÊNCIAS

Schena, L., J. M. Duncan, and D. E. L. Cooke. "Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems." *Plant pathology* 57.1 (2008): 64-75.

Kong, P., C. X. Hong, and P. A. Richardson. "Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes." *Plant pathology* 52.6 (2003): 681-693

Ginetti B, Moricca S, Squires J, Cooke D, Ragazzi A, Jung T (2014) *Phytophthora acerina* sp. nov., a new species causing bleeding cankers and dieback of *Acer pseudoplatanus* trees in planted forests in Northern Italy. *Plant Pathology* 63(4), 858-876.

Carlioni, F., Bregant, C., Linaldeddu, B.T., & Murolo, S. (2024) First report of *Phytophthora acerina* and *Phytophthora palmivora* causing root rot, bleeding cankers and dieback of English walnut in Italy. *New Disease Reports*, 49, e12259. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12259>



inpp@iplantprotect.pt



<https://iplantprotect.pt/>



Contact:

+351 268 096 127



Address:

Estrada de Gil Vaz, Apartado 72,
7350-999 Elvas, Portugal