

Melhoramento genético de castanheiro para a resistência à doença da tinta

Através do programa de melhoramento genético de castanheiro, para a resistência à doença da tinta, iniciado em 2006 no INIAV, desenvolvem-se cruzamentos controlados entre a espécie europeia sensível, a *Castanea sativa*, e as espécies asiáticas resistentes: a *Castanea crenata* (castanheiro japonês) e a *Castanea mollissima* (castanheiro chinês).

Rita Lourenço Costa . INIAV, I.P.



O género *Castanea* pertence à família Fagaceae, à qual também pertencem espécies do género *Quercus*, esta é uma família dominante em grande parte das florestas clímax do Hemisfério Norte (Manos et al., 2008). O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) é a única espécie nativa do género *Castanea* na Europa. Os castanheiros possuem uma aptidão múltipla: produção de fruto, de madeira e proteção da paisagem.

A produção de castanha diminuiu consideravelmente durante o século XX no sudoeste da Europa, devido principalmente ao surgimento de doenças e pragas nomeadamente: doença de tinta (*Phytophthora* spp.) e cancro americano (*Cryphonectria parasitica* (Murr) ME Barr.), introduzidas na Europa, respetivamente nos séculos XIX e XX e a vespa das galhas do castanheiro (*Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu)), introduzida na Europa em 2002.

Em Portugal, segundo o último Inventário Florestal, a área atual de castanheiro é de 34 000 hectares para a produção de fruto e 41 000 hectares de área total (incluindo floresta). No início do século XX, o castanheiro ocupava uma área de 80 000 hectares.

A castanha ocupa o sexto lugar nas exportações nacionais de frutos frescos e possui quatro denominações de origem protegida (DOP): Castanha da Terra Fria, Castanha da Padrela, Castanha dos Soutos da Lapa e Castanha de Marvão-Portalegre. Existem também povoados de castanheiro que fazem parte do habitat 9260 - 'Castanea sativa forests' da Rede Natura 2000. A produção europeia de castanha não consegue suprir as necessidades dos mercados mundiais. A Ásia produz atualmente 1,7 milhões de toneladas, contra as 170 000 toneladas produzidas pela Europa. Há 50 anos a Europa pro-

duzia 400 000 toneladas. A área nacional de castanheiro é hoje metade da que outrora existiu, antes da introdução da doença da tinta, em 1838. A produtividade por hectare é menos de metade do valor potencial, para o que muito contribui o elevado défice em materiais genéticos melhorados para a resistência às principais doenças, tanto no mercado nacional, como no internacional: a doença da tinta e o cancro do castanheiro. A tinta continua a ser a principal ameaça para o castanheiro. A luta química, que foi sendo utilizada nas últimas décadas, tem provado não ser nem eficaz nem ambientalmente aceitável. Por outro lado, não existe controlo biológico disponível, como existe já para o cancro, através da hipovirulência, ou para a praga da vespa das galhas do castanheiro, através do parasitoide *Torymus sinensis*. O mercado europeu revela um elevado défice de porta-enxertos de castanheiro melhorados, resistentes à doença da tinta.

O programa de melhoramento genético de castanheiro do INIAV

O INIAV iniciou, em 2006, um programa de melhoramento para a resistência à doença da tinta do castanheiro, causada pelo oomiceta *Phytophthora cinnamomi* Rands, baseado em cruzamentos controlados, entre a espécie europeia, *Castanea sativa*, muito sensível ao patogénio e as espécies asiáticas resistentes: *Castanea crenata* (castanheiro japonês) e *Castanea mollissima* (castanheiro chinês). Visa-se a introgressão de genes de resistência das espécies asiáticas (*C. mollissima* e *C. crenata*) em *C. sativa* (Costa et. al., 2011). Este programa possui uma vertente aplicada, que tem como objetivo selecionar e produzir uma nova geração de porta-enxertos de cas-



Figura 1 – Geração F1 com 10 anos e produção de semente da geração F2, através de polinização aberta entre os indivíduos da geração F1

tanheiro com resistência melhorada à doença da tinta. Noutra vertente deste programa pretende-se conhecer e compreender os mecanismos moleculares e genéticos de resistência ao agente patogénico *P. cinnamomi*, para identificação de marcadores ligados à resistência. Este conhecimento permitirá a ulterior seleção assistida por marcadores moleculares (MAS – Molecular Assisted Selection). O objetivo é lançar no futuro próximo, nos mercados nacional e internacional, **um novo produto com valor acrescentado, uma nova geração de porta-enxertos resistentes com “pedigree” e entidade genética determinada**. Desta forma, contamos conseguir impulsionar o setor produtivo da castanha nacional.

A vertente de investigação aplicada tem sido financiada pelo programa PRODER e tem sido desenvolvida em parceria com investigadores da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, com a Escola Superior Agrária de Coimbra e com as empresas Certifruiteiras – a empresa líder da parceria –, a Greenclon e EFAO.

A vertente de investigação fundamental tem sido financiada pela FCT, juntamente com o PRODER, e tem sido desenvolvida em parceria com investigadores dos Estados Unidos da América, nomeadamente da The American Chestnut Foundation (TACF), Clemson University, University of Kentucky e Fundação da Faculdade de Ciências de Lisboa. A TACF tem também em curso um programa de melhoramento para castanheiro americano, já com 30 anos, orientado para a resistência ao cancro. Nesta vertente de investigação estão a ser produzidos mapas genéticos para identificação de zonas no genoma ligadas à resistência – QTL (Quantitative Trait Loci), para identificação de marcadores moleculares que possibilitem a seleção precoce de genótipos resistentes. Neste momento, a seleção dos clones faz-se através da inoculação das raízes com o agente patogénico, o que é um processo moroso e caro. Assim que estes marcadores estiverem disponíveis, conseguiremos saber, com uma simples extração de ADN, quais os genótipos mais resistentes, que vão sendo produzidos anualmente a partir dos cruzamentos controlados, e, dessa forma, poderemos agilizar o processo de seleção de materiais genéticos melhorados. Do programa de melhoramento em curso, já com 10 anos, que possui uma geração F1, obtida a partir de polinizações controladas, entre *C. sativa* e *C. crenata* e *C. mollissima* e uma geração F2, obtida a partir de polinização aberta entre os indivíduos da geração F1 (Figura 1), foram selecionados, até ao momento, sete genótipos que revelaram elevada resistência ao agente patogénico da doença da tinta, *P. cinnamomi*, após inoculação de raízes de réplicas de cada genótipo (clones). Os genótipos selecionados estão a ser propagados em massa, utilizando a técnica de micropropagação (Figura 2) e ulterior engorda em viveiro (Figura 3), para plantação dos primeiros campos de ensaio, a realizar em janeiro de 2017, onde vai ser testada a sua resistência em condições naturais de

campo, bem como o vigor vegetativo e compatibilidade de cada um com as principais variedades para produção de castanha (Longal, Martainha, Judia, Bária e Colarinha).

Todos os anos são realizados novos cruzamentos controlados com a consequente seleção de novos genótipos com resistência. O objetivo final é produzir um catálogo com diferentes genótipos, com "pedigree" e identidade genética determinada com marcadores moleculares, contendo informação sobre qual o melhor porta-enxerto para cada região e qual a variedade com melhor compatibilidade para cada porta-enxerto.

Na segunda vertente deste programa de melhoramento foram sequenciados os transcriptomas de *C. sativa* e *C. crenata*, desenvolvidos a partir de raízes inoculadas e não inoculadas com *P. cinnamomi*, permitindo a identificação de genes putativamente envolvidos na resistência à doença da tinta (Serrazina et al., 2015) e de marcadores moleculares (microssatélites) que foram desenhados nesses genes (Santos et al., 2015). Foi também estabelecido um método de fenotipagem para determinar o nível de resistência a *P. cinnamomi* de cada híbrido da geração F1 (Santos et al., 2015). Por último, foi construído o primeiro mapa genético entre *C. sativa* × *C. crenata*, permitindo a identificação de Quantitative Trait Loci (QTL) ligados à resistência a *P. cinnamomi* (publicação em preparação). Está também implementado o estudo da progressão do agente patogénico em clones com diferentes suscetibilidades a *P. cinnamomi*, por histopatologia. A integração de todos os resultados constitui as bases para a compreensão dos mecanismos de resistência do castanheiro à doença da tinta. Existe um forte potencial para uma franca expansão do setor da castaneicultura, com a introdução no mercado desta nova geração de porta-enxertos com resistência a *P. cinnamomi*. Em Portugal, os clones híbridos comercializados com alguma resistência ao agente patogénico têm origem nos programas de melhoramento franceses dos anos 60 (Ferosacre, vulgo Ca90, Marsol, Mari-goule e Bouche de Bétizac), a maior parte dos quais são importados diretamente de França. Mais recentemente, foi iniciada a



Figura 3 – Engorda de clones selecionados em viveiro

comercialização do híbrido ColUTAD, obtido do programa de melhoramento liderado pelo Investigador Columbano Fernandes, também nos anos 60 do século XX, na Estação de Fruticultura de Alcobaça e retestado pela UTAD nos anos 90. Estes clones, originários de programas de melhoramento muito antigos, têm uma adaptação limitada às condições atuais de solo e clima das diferentes áreas de produção de castanheiro e são manifestamente insuficientes para suprir as necessidades dos mercados nacional e internacional. Mesmo em França, os produtores de castanheiro consideram que

a falta de materiais melhorados é uma forte limitação para a cultura do castanheiro, já que consideram ser a doença da tinta a principal ameaça dos soutos franceses. ☺

Referências

- Costa, R.; Santos, C.; Tavares, F.; Machado, H.; Gomes-Laranjo, J.; Kubisiak, T. and Nelson, C.D. (2011) Mapping and transcriptomic approaches implemented for understanding disease resistance to *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea* sp. In: *BMC Proceedings*, p. 018.
- Kubisiak, T.L.; Nelson, C.D.; Staton, M.E.; et al. (2013) A transcriptome-based genetic map of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) and identification of regions of segmental homology with peach (*Prunus persica*). *Tree Genetics & Genomes*, vol. 9, p. 557-571.
- Manos, P.S.; Cannon, C.H. and Oh, S.-H. (2008) Phylogenetic Relationships and Taxonomic Status Of the Paleoendemic Fagaceae Of Western North America: Recognition Of A New Genus, *Notholithocarpus*. *Madroño*, vol. 55, p. 181-19.
- Santos, C.; Zhebentyayeva, T.; Serrazina, S.; Nelson, C. Dana; Costa, R. (2015) Development and characterization of EST-SSR markers for mapping reaction to *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea* spp. *Scientia Horticulturae*, 194: 181-187 doi.org/10.1016/j.scientia.2015.07.043
- Santos, C.; Machado, H.; Correia, I.; Gomes, F.; Gomes-Laranjo, J.; e Costa, R. (2015) Phenotyping *Castanea* hybrids for *Phytophthora cinnamomi* resistance. *Plant Pathology* doi: 10.1111/ppa.12313.
- Serrazina, S.; Santos, C.; Machado, H.; Pesquita, C.; Vicentini, R.; Pais, V.; Sebastina, M.; Costa, R. (2015) *Castanea* root transcriptome in response to *Phytophthora cinnamomi* challenge. *Tree Genetics and Genomes*, doi: 10.1007/s11295-014-0829-7.



Figura 2 – Propagação em massa de genótipos selecionados, por micropropagação