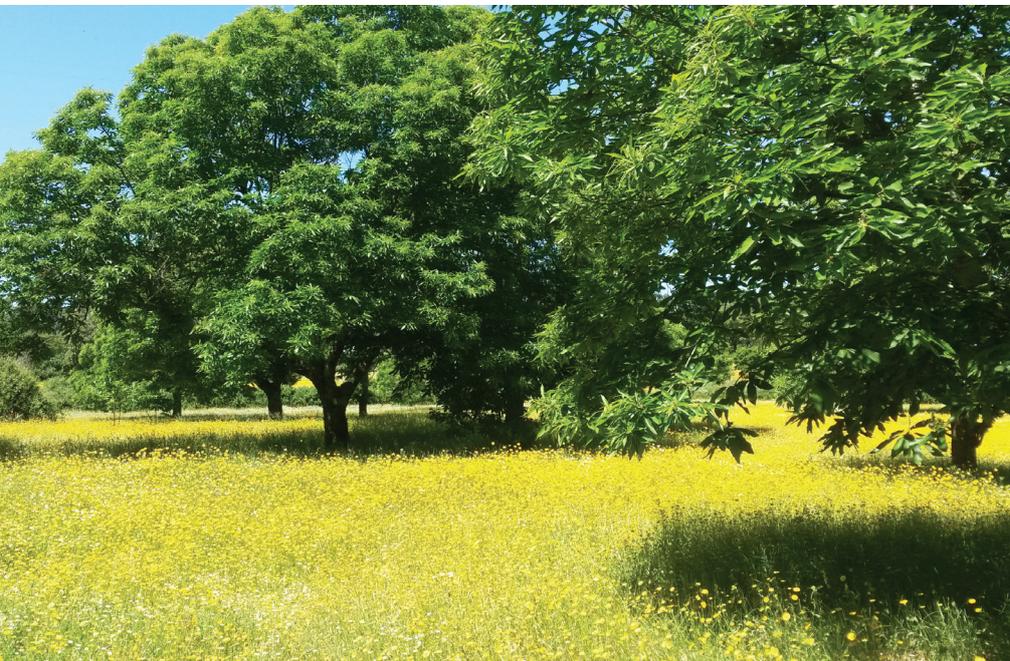


SUSCETIBILIDADE DE VARIEDADES DE CASTANHEIRO PORTUGUESAS À DOENÇA DO CANCRO



Belén Colavolpe¹, Carmen Santos²,
Patrícia Fernandes^{3,4}, Helena Bragança^{4,5},
Rita Lourenço Costa⁶

¹ Investigadora Júnior, Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária I.P. (INIAV, I.P.)

² Investigadora Júnior, Instituto de Tecnologia
Química e Biológica António Xavier,
Universidade Nova de Lisboa (ITQB – NOVA)

³ Estudante de Doutoramento, Instituto Nacional
de Investigação Agrária e Veterinária I.P. (INIAV, I.P.)

⁴ GREEN-IT Bioresources for Sustainability,
Instituto de Tecnologia Química e Biológica
António Xavier, Universidade Nova
de Lisboa (ITQB – NOVA)

⁵ Investigadora Sénior, Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária I.P. (INIAV, I.P.)

⁶ Investigadora Sénior com habilitação,
Instituto Nacional de Investigação Agrária
e Veterinária I.P. (INIAV, I.P.)

RESUMO

O castanheiro europeu, *Castanea sativa*, é uma árvore utilizada para a produção de madeira e fruto muito suscetível ao fungo *Cryphonectria parasitica*, um patógeno agressivo que gera lesões necróticas no tronco e ramos. No entanto, as espécies asiáticas, *C. mollissima* e *C. crenata* possuem maior tolerância à doença. O obje-

tivo neste estudo foi avaliar algumas variedades portuguesas de *C. sativa* no que respeita à suscetibilidade ao fungo usando as espécies asiáticas como controlos de referência. Estacas das variedades ‘Longal’, ‘Judia’, ‘Martaínha’, ‘Colarinha’, ‘Boaventura’ e ‘Bária’, foram inoculadas com *C. parasitica* e a progressão da lesão foi avaliada ao longo do tempo. A variedade ‘Longal’ mostrou-se a menos suscetível, e as variedades Bária e ‘Martaínha’ foram as mais afetadas, com maior progressão da doença. O estudo do comportamento das variedades portuguesas de castanheiro face à doença do cancro, permitirá promover a utilização preferencial das variedades mais tolerantes em campo, contribuindo assim para um melhor controlo da doença.

Palavras-chave: *Cryphonectria parasitica*, Variedades portuguesas de castanheiro, Suscetibilidade de variedades de castanheiro.

INTRODUÇÃO

O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) é uma espécie com importância económica nas regiões montanhosas do Norte de Portugal, principalmente na região de Trás-os-Montes pela produção de fruto.

Existem inúmeras variedades de castanheiro europeu, sendo ‘Longal’ a variedade mais antiga que se distribuiu por todas as regiões produtoras do país (principalmente região norte e centro) e também em Espanha (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2011). ‘Longal’ é considerada uma boa variedade para a indústria alimentar devido ao seu fruto pequeno. Por outro lado, as variedades ‘Judia’ e ‘Martaínha’ são geralmente preferidas para a comercialização do fruto fresco, devido ao seu maior calibre.

O castanheiro europeu é suscetível a vários stresses bióticos que ameaçam a produção de fruto. O cancro causado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr é uma das principais doenças do castanheiro, que se traduz no aparecimento de lesões necróticas no tronco e ramos de árvores hospedeiras suscetíveis. Em Portugal esta doença está amplamente disseminada e acompanha toda a distribuição do castanheiro (Bragança *et al.*, 2007, 2008). A doença está disseminada praticamente por toda a Europa, sendo eventualmente os principais focos de infeção sotos antigos sem uma gestão adequada (Rigling e Prospero, 2017).

A doença caracteriza-se pela presença de cancos sobre o tronco e ramos, muitas vezes com pústulas amarelo-alaranjadas que contêm frutificação do patógeno e/ou cirros de esporos. A presença de tecido do fungo (micélio) creme ou castanho-claro, em forma de leque na parte interior da casca e o fendilhamento longitudinal ao longo de tronco e ramos são também sinais e sintomas frequentes da presença do cancro do castanheiro (Robin e Heiniger, 2001). Na zona inferior à zona afetada, a árvore pode produzir rebentos epicórmicos, também conhecidos como ramos ladrões e rebentos de raiz. Em caules e ramos jovens, os cancos são geralmente alaranjados-castanho-avermelhados na superfície, mas em troncos mais antigos, essa coloração é geralmente menos acentuada tornando-se os tecidos afetados enegrecidos com o tempo. As folhas dos galhos infectados murcham, ficam amarelas ou castanhas e geralmente permanecem penduradas (Rigling e Prospero, 2017). Os cancos superficiais ou com calosidades são geralmente

associados à hipovirulência induzida por micovírus (Faruk *et al.*, 2008). Este fenómeno natural reduz significativamente a virulência e a esporulação de *C. parasitica* nas árvores, que desta forma, podem recuperar da doença (Bragança *et al.*, 2007).

As espécies de castanheiro 'Japonês' (*Castanea crenata* Siebold e Zucc.) e 'Chinês' (*Castanea mollissima* Blume) têm manifestado resistência ao cancro do castanheiro, e têm sido utilizadas nos programas de melhoramento genético como dadoras de resistência para produção de porta-enxertos com compatibilidade com variedades de castanheiro europeu. Este trabalho tem como objetivo avaliar a suscetibilidade de ao cancro, causado por *C. parasitica*, de seis variedades de castanheiro europeu comercializadas em Portugal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Estacas das variedades 'Bária', 'Colarinha', 'Judia', 'Martainha', 'Longal' e 'Boaventura', foram colhidas aleatoriamente de diferentes árvores durante o Inverno (fase de dormência dos gomos). Como controlos de tolerância foram utilizadas estacas das espécies asiáticas *Castanea mollissima* e *C. crenata* (Tabela 1). O diâmetro das estacas foi semelhante em todas elas, sendo que o número utilizado para cada variedade/especie variou entre 8-20 (Tabela 1).

Inoculação com *Cryphonectria parasitica*

A estirpe de *C. parasitica* utilizada neste trabalho, C0671 (MEAN 1047), pertence ao grupo de compatibilidade vegetativa EU-11, o mais comum em Portugal (Bragança *et al.*, 2007). O micélio de *C. parasitica* foi cultivado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com 20 ml de meio Potato Dextrose Agar (PDA) marca Difco em câmara de cultura (25 °C, no escuro) durante sete dias.

Para a inoculação foram feitos orifícios circulares nas estacas (5 mm de diâmetro), onde se colocaram posteriormente discos de igual dimensão, destacados de uma cultura de *C. parasitica* em crescimento ativo. As estacas inoculadas foram colocadas em câmaras de cultura individuais com uma base de papel de filtro humedecida (Figura 1A). Como controlo negativo foram utilizados discos de meio PDA sem agente patogénico. Em cada estaca foram efetuadas quatro inoculações.

As culturas foram mantidas no escuro, a 24 °C, durante 21 dias. O comprimento de cada lesão (mm) foi medido aos 10, 14, 17 e 21 dias após a inoculação (dai). O cálculo da taxa de progressão (TP) da lesão foi feito de acordo com a seguinte fórmula: $TP = ((C1/DI) + (C2/DC1) + (C3/DC2) + (C4/DC3)) / N^{\circ} \text{medições totais}$ (n=4), em que C1, C2, C3 e C4 são o comprimento da lesão 10, 14, 17 e 21 dai, respetivamente. DI corresponde aos dias até a primeira medição após inoculação; DC1, DC2 e DC3 correspondem aos dias após a primeira, segunda e terceira medição respetivamente.

Análise Estatística

Os resultados foram obtidos através do cálculo da média \pm desvio padrão (DP) no caso do comprimento da lesão. O número (n) utilizado para cada variedade/especie variou entre 8-20 (Tabela 1). Para comparar diferenças na progressão da lesão (mm/dia) entre as variedades testadas e as espécies asiáticas, foram efetuadas análises de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Tukey, usando o software GraphPad Prism 6 (La Jolla California USA, www.graphpad.com). As diferenças estatísticas (p < 0.001) no comprimento da lesão e taxas de progressão de acordo com o teste Tukey são apresentadas com letras diferentes.

Com o objetivo de verificar quão forte é a relação entre as duas variáveis estudadas, foram avaliadas correlações de Pearson (r) com os valores p correspondentes ($\alpha=0.05$) entre o comprimento da lesão aos 21 dai e a progressão da lesão, também com o software Graph Path Prism 6. Os valores r variam de -1 a 1, um coeficiente de correlação próximo de zero indica que não há relação entre as duas variáveis, e quanto mais se aproximam de 1 ou -1, mais forte é a correlação.

RESULTADOS

A Figura 1B mostra a lesão observada 21 dai em condições controladas (temperatura de 24°C no escuro). No final da inoculação (21 dai), as variedades que apresentaram lesão com menor comprimento foram *C. mollissima* e *C. crenata* (aproximadamente 20 mm), enquanto as variedades 'Bária' e 'Martainha' apresentaram o maior comprimento de lesão (aprox. 60 mm). As restantes variedades apresentaram comprimentos intermédios, variando entre 40 e 50 mm. *C. mollissima* apresentou diferenças signifi-

TABELA 1. Desenho experimental do ensaio realizado com estacas de diferentes genótipos de castanheiro.

Variedades e espécies	N° de árvores	N° de estacas/árvore	N° total estacas	Diâmetro médio (mm) e desvio padrão
Bária	5	4	20	7,18 \pm 1,31
Colarinha	3	4	12	7,51 \pm 1,28
Judia	3	4	12	7,47 \pm 1,94
Martainha	3	4	12	7,73 \pm 1,45
Longal	3	4	12	7,83 \pm 1,57
Boaventura	3	4	12	9,18 \pm 2,05
<i>C. mollissima</i>	2	4	8	8,42 \pm 1,28
<i>C. crenata</i>	3	4	12	8,43 \pm 1,15

TABELA 2. Correlação de Pearson (r) e valor p ($\alpha=0.05$) entre o comprimento da lesão aos 21 dias após inoculação e a progressão da lesão nas variedades 'Bária', 'Colarinha', 'Judia', 'Martainha', 'Longal' e 'Boaventura', e as espécies *Castanea mollissima* e *C. crenata*.

Variedades e espécies	Valor r	Valor p
Bária	0.8961	0.0001
Colarinha	0.7703	0.0034
Judia	0.6739	0.0230
Martainha	0.9751	0.0001
Longal	0.9885	0.0001
Boaventura	0.9355	0.0001
<i>C. mollissima</i>	0.9905	0.0001
<i>C. crenata</i>	0.9562	0.0001

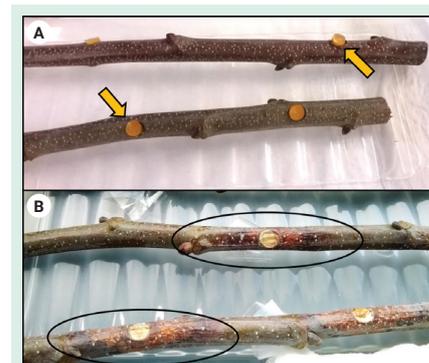


FIGURA 1. (A) Inoculação de *C. parasitica* em estacas de castanheiro. As setas indicam o ponto da inoculação com discos de PDA colonizado com o fungo. (B) Lesão causada por *C. parasitica* em estacas de castanheiro.

ficativas quando comparado com todas as variedades estudadas, com exceção de *C. crenata*. No entanto, as variedades 'Longal' e 'Judia' não diferem estatisticamente de *C. crenata* (Figura 2A). A Figura 2B mostra a progressão da lesão em mm/dia, os valores relativos às variedades variaram entre 5.99 e 8.00, enquanto *C. mollissima* e *C. crenata* apresentaram valores mais baixos de progressão da lesão (entre 2.78 e 3.47 mm/dia).

A Figura 3 mostra o comprimento da lesão observado em diferentes momentos, nomeadamente aos 10, 14, 17 e 21 dai. *C. mollissima* registou as lesões mais pequenas medidas em todos os tempos após a inoculação. As variedades com maior comprimento da lesão foram 'Bária' e 'Martainha', também nelas a lesão aumentou mais rapidamente ao longo do tempo do ensaio.

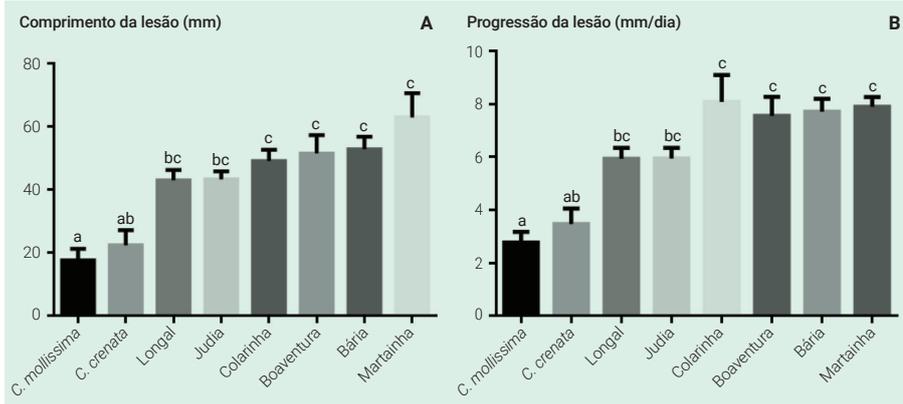


FIGURA 2. (A) Comprimento das lesões (mm) observado em estacas de diferentes genótipos de castanheiro 21 dias após a inoculação com *Cryphonectria parasitica*. (B) Progressão da lesão em mm/dia observada em diferentes genótipos de castanheiro. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.001$), de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey.

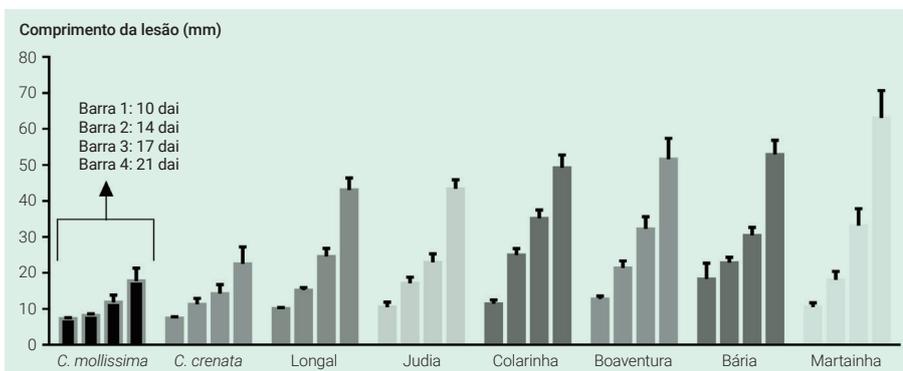


FIGURA 3. Comprimento das lesões (mm) observado em estacas de diferentes genótipos de castanheiro, aos 10, 14, 17 e 21 dias após a inoculação (dai) com *Cryphonectria parasitica*.

A Tabela 2 mostra a correlação (coeficiente r) entre o comprimento da lesão aos 21 dai (mm), com a progressão da lesão (mm/dia). O r apresenta o valor máximo na espécie *C. mollissima* (0.99). As variedades 'Judia' e 'Colarinha' apresentaram valores de r de 0.6-0.7, sendo que as restantes variedades apresentaram valores superiores a 0.8. Todas as correlações foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo estudar a suscetibilidade de seis variedades Portuguesas de castanheiro à doença causada pelo fungo *C. parasitica*. Com esta primeira abordagem de investigação, conseguimos determinar que *C. mollissima* apresentou menor comprimento da lesão provocada por *C. parasitica* com diferenças significativas quando comparadas com todas as variedades estudadas. Os resultados obtidos revelam que *C. mollissima* tem maior resistência ao agente patogénico do que as restantes variedades analisadas. As duas espécies asiáticas (*C. crenata* e *C. mollissima*) são consideradas resistentes à doença da tinta e ao cancro (Crandall *et al.*, 1945; Anagnostakis, 1987) devido à co-evolução com os

patógenos (Anagnostakis, 1992). Por esta razão, a criação de tolerância nos programas de melhoramento é baseada principalmente na genética encontrada nas espécies asiáticas (Rigling e Prospero, 2017).

As variedades 'Longal' e 'Judia' revelaram ser estatisticamente semelhantes a *C. crenata*. Estes resultados sugerem que estas variedades têm uma menor suscetibilidade a *C. parasitica*, em comparação com as restantes variedades ('Bária', 'Colarinha', 'Martainha' e 'Boaventura'). Podemos sugerir com os resultados obtidos neste trabalho que a variedade 'Longal' revelou ser a mais tolerante, por apresentar a menor progressão da lesão. Ao contrário da variedade 'Longal', as variedades mais suscetíveis foram 'Bária' e 'Martainha' que apresentaram lesões maiores, juntamente com uma progressão maior da lesão observada ao longo do tempo do ensaio.

Para a maioria das variedades ('Bária', 'Martainha', 'Longal' e 'Boaventura'), verificou-se uma forte correlação entre as variáveis comprimento da lesão e a taxa de progressão. A correlação foi positiva, conforme uma variável aumenta, a outra va-

riável também aumenta. Depois da espécie *C. mollissima* (valor $r=0.99$), a variedade 'Longal' revelou o valor r mais elevado (0.98), o que significa que ambas variáveis estudadas (comprimento da lesão e a taxa de progressão da lesão) estão mais fortemente correlacionadas no caso da referida variedade ('Longal').

O conhecimento do comportamento das variedades portuguesas de castanheiro ao cancro do castanheiro, uma das principais ameaças dos soutos em Portugal, será uma mais-valia para promover a utilização preferencial de variedades mais tolerantes em campo.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que das variedades estudadas, a 'Longal' e 'Judia' apresentaram maior tolerância a *C. parasitica*, sendo a progressão da lesão semelhante à observada nas espécies asiáticas tolerantes. Mais estudos devem ser realizados, utilizando uma maior diversidade de estirpes de *C. parasitica* para determinar a real tolerância a este agente patogénico nas variedades portuguesas de castanheiro.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Projeto ALT20-03-0246-FEDER-000011 – NEW Cast Rootstocks do Programa Alentejo 2020.

BIBLIOGRAFIA

- Anagnostakis, S. L. (1987). Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79(1), 23-37.
- Anagnostakis, S. L. (1992). Measuring resistance of chestnut trees to chestnut blight. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(4), 568-571.
- Bragança, H., Simões, S., Capelo, M., Marcelino, J., & Santos, N. (2008). Survey and geographic distribution of chestnut blight in Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, 31(2), 148-158.
- Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R. and Rigling, D. (2007). *Cryphonectria parasitica* in Portugal. Diversity of vegetative compatibility types mating types and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology*, 37, 391-402. doi: 10.1111/j.1439-0329.2007.00513.x
- Crandall, B. S., Gravatt, G. F., & Ryan, M. M. (1945). Root disease of Castanea species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 35, 162-80.
- Faruk, M. I., Eusebio-Cope, A., & Suzuki, N. (2008). A host factor involved in hypovirus symptom expression in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Journal of virology*, 82(2), 740-754.
- Pereira-Lorenzo, S., Costa, R. M. L., Ramos-Cabrer, A. M., Giordina-Ara, M., Ribeiro, C. A. M., Borges, O., & Barreneche, T. (2011). Chestnut cultivar diversification process in the Iberian Peninsula, Canary Islands, and Azores. *Genome*, 54(4), 301-315.
- Riesberg, L. H. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual review of ecology and systematics* (USA).
- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 7-20.
- Robin, C., & Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3), 361-367.