



**Efeito do fosfonato de potássio na protecção das raízes do  
castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) contra *Phytophthora*  
*cinnamomi*.**

**Valentim Pereira dos Santos Coelho**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia

Orientado por

**Prof. Doutora Maria Eugénia Madureira Gouveia**  
**Prof. Luís Filipe de Sousa Teixeira Nunes**

**Bragança**  
**2009**

Aos meus pais,  
irmãos  
e à minha afilhada

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,  
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais  
preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)

## *Agradecimentos*

Ao entregar este trabalho, é com o maior prazer, que agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Doutora Eugénia Gouveia, da Escola Superior Agrária, pela grande ajuda ao longo do trabalho laboratorial e escrito, permanente disponibilidade, incentivo e amizade demonstrada.

Ao Prof. Luís Nunes por ter aceitado ser meu co-orientador e pela ajuda na revisão deste trabalho e sua análise de dados e pelo incentivo e amizade demonstrada.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira e à Professora Doutora Paula Baptista por todo apoio, incentivo e pela ajuda na análise de dados.

Ao Laboratório de Protecção de Plantas do Departamento de Produção e Tecnologia Vegetal (DPTV) por ter disponibilizado todos os recursos à realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Ivo Oliveira pela ajuda na revisão deste trabalho, pelo apoio, incentivo e boa disposição sempre demonstrada.

À Dona Serafina Isabel Fernandes pela amizade e ajuda na fase experimental deste trabalho.

Aos meus colegas, elementos do Laboratório do DPTV, da Escola Superior Agrária, Susana Pereira, Ricardo Malheiro e Anabela Sousa, e à Isabel Afonso do Laboratório de Biologia, pelo apoio, incentivo e boa disposição sempre demonstrada.

Aos amigos Rui Bento, Carla Costa (Passarinho), Luísa Santos, Lurdes Pires, Patrícia Pires, Domingos Campelos, Francisco Campelos (Joca), Gonçalo Meireles, Amílcar Brás (Micas), Sara Lomar, Roberto Direito pela amizade, companheirismo, pela paciência e por todo o apoio nos momentos mais difíceis.

À minha família que não poupou esforços na minha formação, especialmente pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constante e pelo apoio em mais este passo da minha vida.

A todos que directa e indirectamente me ajudaram na realização deste projecto.

## ***Lista de Quadros***

**Quadro 1** – Fungicidas ditiocarbamatos (adaptado de Hewitt, 1998)

**Quadro 2** – Fungicidas sistêmicos para o controlo de *Phytophthora* spp. (adaptado de Schwinn, 1987)

**Quadro 3** – Principais aplicações práticas dos fungicidas sistêmicos contra *Phytophthora* e outros fungos Oomicetas (Adaptado de (Erwinn & Ribeiro, 1996)

**Quadro 4** – EC<sub>50</sub> do metalaxil (concentração que inibe o crescimento micelial em 50%) de *Phytophthora cinnamomi* (adaptado de Erwin & Ribeiro, 1996)

**Quadro 5** – Alguns dos importantes termos usados para classificar os produtos fosfonatos (adaptado de Landschoot & Cook, 2005)

**Quadro 6** – Isolados de *Phytophthora* usados no ensaio

**Quadro 7** – Valores (em centímetros) do crescimento do ano, altura total e do diâmetro ao nível do colo

**Quadro 8** – Valores médios (em centímetros) do crescimento do ano, altura total e do diâmetro ao nível do colo

**Quadro 9** – Valor da biomassa da parte aérea (folhas e caules) das plantas de castanheiro nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 10** – Valores médios da biomassa total da parte aérea (folhas e caules) nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 11** – Biomassa das raízes secundárias nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 12** – Valores médios da biomassa total das raízes secundárias nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 13** – Comprimento radicular nos diferentes tratamentos (com aplicação foliar de fosfonato potássico e sem aplicação foliar de fosfonato potássico) (CRT – comprimento radicular total; CRS – comprimento das raízes sãs; CRD – Comprimento das raízes doentes; %RD – percentagem de raízes doentes)

**Quadro 14** – Valores médios do comprimento radicular total, do comprimento das raízes sãs e do comprimento das raízes doentes nos diferentes tratamentos (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 15** – Número de raízes total e o número de raízes doentes nas diferentes modalidades

**Quadro 16** – Valores médios do número de raízes e comprimento radicular nos diferentes tratamentos (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Quadro 17** – Detecção de *Phytophthora cinnamomi* nas raízes secundárias

**Quadro 18** – Valores (centímetros) do comprimento da lesão

**Quadro 19** – Valores da média da dimensão da lesão nas diferentes condições de tratamento

**Quadro 20** – Crescimento micelial (centímetros) dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804), *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135), *Pisolithus tinctorius* e *Cryphonectria parasitica*, em meio de cultura PDA acrescido de 5 µg/ml; 20 µg/ml e 50 µg/ml de fosfonato potássico e controlo.

**Quadro 21** – EC<sub>50</sub> do fosfonato potássico (concentração que inibe o crescimento micelial em 50%) em diferentes isolados de *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cambivora*, *Pisolithus tinctorius* e *Cryphonectria parasitica*

**Quadro 22** – Crescimento micelial (centímetros) dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804) e *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135) crescendo em meio de cultura PDA acrescido de 20 µg/ml; 50 µg/ml e 100 µg/ml de fosfonato potássico e sem adição de fosfonato potássico (controlo)

## ***Lista de Figuras***

**Figura 1** – Estrutura química do propamocarbe

**Figura 2** – Estrutura química do cimoxanil

**Figura 3** – Estrutura química do metalaxil

**Figura 4** – Estrutura química do fosetil de alumínio (fosetil-Al)

**Figura 5** – Disposição dos vasos na bancada

**Figura 6** – Inoculação em ramo destacado

**Figura 7** – Biomassa das folhas e caules das plantas de castanheiro tratadas com fosfonato potássico por pulverização foliar e sem aplicação de fosfonato potássico.

**Figura 8** – Percentagem de raízes doentes nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

**Figura 9** – Plantas de castanheiro crescendo em substrato inoculado com *Phytophthora cinnamomi*, nas diferentes modalidades (com e sem aplicação de fosfonato de potássio)

**Figura 10** – Sintomatologia em plantas de castanheiro (a – plantas sem aplicação de fosfonato, b – plantas com aplicação de fosfonato)

**Figura 11** – Sistema radicular sem sintomas da Doença da Tinta (a), com sintomas da Doença da Tinta (b)

**Figura 12** – Isolamento de troços de raiz de plantas de castanheiro infectadas com *P. cinnamomi*, em meio selectivo P<sub>10</sub>VPH

**Figura 13** – Comprimento médio da lesão em castanheiros inoculados com *Phytophthora cinnamomi* 25 dias após aplicação de fosfonato potássico. Barras verticais correspondem ao erro padrão.

**Figura 14** – Percentagem da inibição do crescimento dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804) e *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135) em meio PDA acrescido de fosfonato potássico. Cada ponto representa a média de cinco repetições.

**Figura 15** – *Phytophthora cinnamomi* em diferentes concentrações de fosfonato potássico (A – Controlo, B – 5 µg/ml, C – 20 µg/ml, D – 50 µg/ml)

**Figura 16** – *Phytophthora cinnamomi* em diferentes concentrações de Aliette (A - 20 µg/ml B - 50 µg/ml C - 100 µg/ml)

## **Resumo**

A Doença da Tinta do Castanheiro, é considerada como uma das principais causas do desaparecimento dos soutos. *Phytophthora cinnamomi* e *P. cambivora* são as duas espécies associadas à Doença da Tinta do Castanheiro, sendo *P. cinnamomi* a espécie preponderante na doença da tinta em Portugal. Os agentes patogénicos que causam a Doença da Tinta no Castanheiro provocam uma situação de difícil solução, pois estes possuem formas de sobrevivência e de disseminação que lhes permite manterem-se no solo quase indefinidamente. Os meios de luta disponíveis para combater as doenças provocadas por *Phytophthora*, não têm, até hoje, resolvido de forma eficiente e duradoura os problemas sanitários das culturas e das florestas atacadas por estes parasitas. Actualmente os fosfitos, sais ou os ésteres do ácido fosforoso, por estarem associados com os mecanismos biológicos de resistência e induzirem na planta mecanismos de defesa são uma forma alternativa no combate contra *P. cinnamomi*.

Com este trabalho estudou-se o efeito da aplicação foliar de fosfonato potássico em plantas jovens de castanheiro que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi*. Estudou-se ainda um método indirecto, por inoculação de *P. cinnamomi* na parte aérea da planta, para determinar o efeito protector nas raízes e o efeito *in vitro* do fosfonato potássico e fosetil-Al em diferentes isolados de *Phytophthora* e outros fungos associados com o castanheiro.

Os resultados obtidos mostram que a aplicação foliar do fosfonato potássico, protegeu as raízes dos castanheiros, não evidenciando as planta tratadas com fosfonato potássico sintomas da Doença da Tinta. Todas as plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação foliar de fosfonato potássico evidenciaram sintomas característicos da doença com epinastia e necrose das folhas. A análise estatística evidenciou diferenças significativas entre tratamentos em todos os parâmetros relacionados com as raízes. O peso seco das raízes secundárias foi o parâmetro fisiológico mais afectado, tendo as plantas sem tratamento com fosfonato potássico menor comprimento radicular e menor numero de raízes assim como grande extensão de podridão radicular.

A protecção conferida pelo fosfonato de potássio avaliada por inoculação de *P. cinnamomi* na parte aérea da planta revelou que o comprimento da lesão é superior nas plantas não tratadas com fosfonato potássico ao contrário do verificado em plantas não

tratadas tendo sido considerado uma metodologia adequada para avaliar o efeito protector da substância utilizada.

A análise da toxicidade *in vitro* revelou que os valores de EC<sub>50</sub> variam entre 0,64 µg/ml e 31,56 µg/ml para *P. cinnamomi* e 9,92 µg/ml e 22,44 µg/ml para *P. cambivora*. O fosetil-Al apresentou baixa toxicidade *in vitro* nas diferentes espécies de *Phytophthora*.

**Palavras-chave:** *P. cinnamomi*, Doença da Tinta do Castanheiro, raízes, fosfonato potássico

## ***Abstract***

Chestnut Ink Disease is considered one of the most important causes of the disappearance of the chestnut orchards. The two associated species to the chestnut ink disease are *Phytophthora cinnamomi* and *P. cambivora*, being the first one the foremost important cause of this disease in Portugal. The pathogenic agents related to the ink disease in chestnut bring out a situation of complex resolution, due to their survival and spreading ways, that allow them to remain in the soil almost indefinitely. The available control means against diseases caused by *Phytophthora*, haven't been able, so far, to resolve, in a long-lasting and efficient way the health problems of crops and forests infected by these parasites. Currently, phosphites, salts or esters of phosphorous acid, due to their relation to the biological resistance mechanisms, as well as their ability to induce defense mechanisms in plants, are an alternative way to control *P. cinnamomi*.

The aims of this work are to evaluate the effect of foliar application of potassium phosphonate in young plants of chestnut in the radicular protections against *Phytophthora*. An indirect method was also tested, by *P. cinnamomi* inoculation in the aerial part of the plant, to determine the protective effect on roots and *in vitro* effect of potassium phosphonate and fosetil-Al in different *Phytophthora* isolates and other fungi associated with the chestnut.

The achieved results showed that the plants treated with foliar application of potassium phosphonate didn't show the symptoms of ink disease, leading to the conclusion that this product did protect the chestnut roots against this disease. All the plants grown in substrate inoculated with *P. cinnamomi* and without foliar application of potassium phosphonate showed symptoms of the disease with epinasty and necrosis of leaves. A statistic analysis provides significant differences between treatments in all the root related parameters. Dry root weight was the most affected physiological parameter, and the plants without treatment with potassium phosphonate have lower root length and lower number of roots.

The potassium phosphonate protection action, evaluated with the inoculation of *P. cinamomi* in branches of the plant revealed that the length of the lesion is higher in plants not treated with potassium phosphonate due to the lack of the protection granted by this compound, thus proving to be an adequate methodology to evaluate the protective effect of the used substance.

The in vitro toxicity analyses revealed EC<sub>50</sub> ranging from 0,64 mgL<sup>-1</sup> to 31,56 mgL<sup>-1</sup> for *P. cinnamomi* and 9,92 mgL<sup>-1</sup> to 22,44 mgL<sup>-1</sup> for *P. cambivora*. Fosetyl-Al showed low toxicity in vitro in different species of *Phytophthora*.

**Key-words:** *P. cinnamomi*, Chestnut Ink Disease, roots, potassium phosphonate

## Índice

<b>Lista de Quadros</b> .....	v
<b>Lista de Figuras</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	x
<b>Índice</b> .....	xii
<b>1 – Introdução</b> .....	1
1.1 – A Doença da Tinta do Castanheiro.....	1
1.1.1 – Considerações gerais .....	1
1.1.2 – O Género <i>Phytophthora</i> .....	2
1.1.3 – <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	3
1.1.4 – Expressão dos sintomas e meios de luta.....	4
1.2 – A luta química contra Oomicetas .....	7
1.2.1 – Fungicidas preventivos .....	7
1.2.1.1 – Fungicidas inorgânicos .....	8
1.2.1.1.1 – <i>Compostos de cobre</i> .....	8
1.2.1.2 – Fungicidas orgânicos .....	9
1.2.1.2.1 – <i>Ditiocarbamatos</i> .....	9
1.2.1.2.2 – <i>Ftalimidas</i> .....	10
1.2.2 – Fungicidas sistémicos .....	10
1.2.2.1 – Carbamatos .....	11
1.2.2.2 – Oxinas cianoacetamidas (acetamidas) .....	13
1.2.2.3 – Fenilamidas.....	14
1.2.2.4 – Etilfosfitos .....	18
1.3 – A luta química no combate à Doença da Tinta do Castanheiro.....	21
1.3.1 – A luta química em Portugal .....	21
1.3.2 – Limitações e métodos alternativos de luta química no combate à Doença da Tinta do Castanheiro.....	28
1.4 – Os fosfitos na protecção vegetal.....	30
1.4.1 – O fósforo e sua influência na planta .....	30
1.4.1.1 – Fosfanato .....	31
1.4.1.2 – Fosfato .....	31
1.4.1.3 – Modo de acção do ião fosfonato.....	32
1.4.1.4 – O uso do fosfito em agricultura .....	34
1.4.1.5 – Influência do fosfito na planta.....	36

<b>2 – Objectivos</b> .....	38
<b>3 – Material e Métodos</b> .....	39
3.1 – Material biológico .....	39
3.1.1 – Isolados <i>P. cinnamomi</i> e <i>P. cambivora</i> utilizados neste estudo .....	39
3.1.2 – Outros organismos utilizados neste estudo.....	39
3.1.2.1 – <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	39
3.1.2.2 – <i>Cryphonectria parasitica</i> .....	39
3.1.3 – Plantas.....	40
3.2 – Substratos .....	40
3.2.1 – Substrato de inóculo .....	40
3.2.2 – Substrato dos vasos.....	40
3.3 – Meios de cultura utilizados.....	40
3.4 – Fosfonato de potássio .....	41
3.5 – Estudo do efeito de fosfonato potássico na protecção das raízes do castanheiro .....	41
3.5.1 – Parâmetros fisiológicos.....	42
3.5.1.1 – Altura e diâmetro ao nível do colo .....	42
3.5.1.2 – Biomassa.....	42
3.5.1.3 – Comprimento e número de raízes secundárias .....	42
3.5.2 – Sintomatologia.....	42
3.6 – Avaliação do efeito protector do fosfonato potássico por inoculação de <i>P. cinnamomi</i> na parte aérea da planta.....	43
3.7 – Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> do fosfonato potássico e fosetil-Al.....	44
3.7.1 – Toxicidade <i>in vitro</i> do fosfonato potássico .....	44
3.7.2 – Toxicidade <i>in vitro</i> do fosetil-Al .....	44
3.8 – Análise estatística .....	45
<b>4 – Resultados</b> .....	46
4.1 – Efeito de fosfonato potássico na protecção do castanheiro .....	46
4.1.1 – Parâmetros fisiológicos.....	46
4.1.1.1 – Altura e diâmetro ao nível do colo .....	46
4.1.1.2 – Biomassa da parte aérea .....	47
4.1.1.3 – Biomassa radicular .....	49
4.1.1.4 – Comprimento e número de raízes secundárias .....	50
4.1.2 – Sintomatologia.....	54
4.2 – Avaliação indirecta do efeito protector do fosfonato potássico por inoculação de <i>P. cinnamomi</i> na parte aérea da planta .....	56
4.3 – Toxicidade <i>in vitro</i> do fosfonato potássico e fosetil-Al .....	58

4.3.1 – Resposta <i>in vitro</i> ao fosfonato potássico .....	58
4.3.2 – Resposta <i>in vitro</i> ao fosetil-Al .....	61
<b>5 – Discussão e Conclusões.....</b>	<b>63</b>
<b>6 – Bibliografia.....</b>	<b>69</b>

## ***1 – Introdução***

### **1.1 – A Doença da Tinta do Castanheiro**

#### 1.1.1 – Considerações gerais

A Doença da Tinta do Castanheiro é considerada como uma das principais causas do desaparecimento do castanheiro em toda a Europa. A doença expandiu-se com grande rapidez destruindo milhões de castanheiros (Cortizo et al., 1999).

A Doença da Tinta do Castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) existirá em Espanha desde 1726 (Crandall, 1950). Em Portugal é conhecida desde 1838, quando nas margens do rio Lima se verificaram sintomas como o amarelecimento e queda prematura das folhas e ainda o aparecimento de uma podridão húmida nas raízes que mais tarde levava à morte da árvore (Fernandes, 1953). Elorrieta (1949) menciona a existência em 1859 de castanheiros doentes com sintomas da Doença da Tinta no Norte de Itália, nas províncias da Toscana, Piemonte e Ligúria, em França, nos departamentos do Gard, Lozère e Baixos Pirenéus e em Portugal no Centro e no Norte. Nos Estados Unidos a doença é referenciada a partir de 1854, tendo provocando a destruição de grandes extensões de castanheiro americano (*Castanea dentata* Marshall.) (Gravatt, 1954).

Em Portugal a área de ocupação do castanheiro tem vindo a sofrer um decréscimo acentuado desde que esta doença se instalou. O avanço da doença tem sido de tal forma devastador que hoje praticamente não existem castanheiros no Minho e as áreas de ocupação regrediram em mais de 50 % em Trás-os-Montes e Beira Alta, regiões onde segundo Marques (1988) existem ainda as maiores manchas de castanheiro em Portugal. A Doença da Tinta que invariavelmente provoca a morte do castanheiro é uma doença endémica em todas as regiões castaneícolas. Na região de Trás-os-Montes várias estimativas indicam 15 % de árvores afectadas pela doença (Carvalheira, 1997; Martins et al., 1997) mesmo nas regiões de maior aptidão para o castanheiro como a Terra Fria Transmontana.

*Phytophthora cinnamomi* e *P. cambivora* são as duas espécies associadas à Doença da Tinta do Castanheiro. Em Portugal, *P. cinnamomi* é a espécie mais frequentemente isolada e por isso considerada a espécie preponderante no desenvolvimento da Doença da Tinta em Portugal (Fernandes, 1966; Gouveia, 2004).

*P. cinnamomi*, foi isolada de castanheiro pela primeira vez, no nosso país, em 1941 por Moniz da Maia. Estes isolamentos foram confirmados por Pimentel em 1942

que também isolou e identificou *P. cinnamomi* e *P. cambivora* de castanheiro com sintomas da doença (Pimentel, 1947).

### 1.1.2 – O Género *Phytophthora*

O Género *Phytophthora* contém alguns dos mais destrutivos patogéneos de plantas, causando um largo número de doenças em muitas espécies vegetais. *Phytophthora* deriva da palavra grega ‘phyto’ (planta) e ‘phthora’ (destruidor). O Género *Phytophthora* foi assim denominado por Antón de Bary em 1876, quando descreveu *Phytophthora infestans* como a espécie tipo deste género (Cortizo, et al., 1999). Erwin & Ribeiro (1996) incluíram no género *Phytophthora* 64 espécies, todas elas parasitas de espécies vegetais. Um grande número de espécies tem capacidade de causar infecção em vários hospedeiros, podendo causar uma miríade de doenças em diferentes espécies vegetais. Recentemente foram descritas novas espécies, *P. quercina* (Jung et al., 1999); *P. europaea* E. M. Hansen & T. Jung sp. nov., *P. uliginosa* T. Jung & E. M. Hansen sp. nov., *P. psychrophila* T. Jung. & E. M. Hansen sp. nov. (Jung et al., 2002) parasitas de espécies florestais, *P. ipomoeae* Flier & Grunwald sp. nov. (Flier et al., 2002) parasita em *Ipomoea longipedunculata* e estritamente relacionada com *P. infestans*; *P. brassicae* De Cock & Man in’t Veld sp. nov. (Man in’t Veld et al., 2002) parasita do género *Brassica* e estritamente relacionada com *P. porri* a que se acrescenta ainda a associação de espécies de *Phytophthora* já conhecidas a novos hospedeiros: *P. megasperma* em oliveira (Sanchez et al., 2001), *P. cactorum* em *Carya illinoensis* (Reilly et al., 1997) e *P. boehmeriae* em algodão (Elena & Paplomatas, 1997).

O Género *Phytophthora* pertence à Classe dos *Oomycetes*. Tem sido tradicionalmente colocado no Reino Fungi, na Família *Pythiaceae* (Erwin & Ribeiro, 1996). No entanto os novos conhecimentos sugerem a inclusão da Classe dos *Oomycetes* no Reino *Stramenopila* (Wong, 2006).

As espécies de *Phytophthora* causam doenças cujos sintomas variam desde podridões radiculares, podridões do colo, cancos no caule, “blight” nas folhas e podridões dos frutos. São responsáveis por algumas das mais devastadoras doenças tais como o “dieback” dos eucaliptos na Austrália, causada por *P. cinnamomi* (Shearer & Tippett, 1989), o míldio da batata causado por *P. infestans* na Irlanda, “black pod” do cacau causado por *P. palmivora*, e muitas outras doenças com grande importância económica (Erwin & Ribeiro, 1996).

### 1.1.3 – *Phytophthora cinnamomi*

*P. cinnamomi* Rands foi isolado pela primeira vez em 1922, na ilha de Sumatra, da árvore da canela (*Cinnamomum burmanii*) (Zentmyer, 1980). Desde então, foi registada a sua presença em mais de 70 países e em quase 1000 hospedeiros os quais são predominantemente plantas lenhosas (Roberts & Boothroyd, 1984). Os hospedeiros principais incluem o abacateiro, o eucalipto, o ananaseiro, o castanheiro, varias espécies de pinheiro, muitas plantas ornamentais, e ainda de um número extraordinário de plantas australianas nativas.

A origem geográfica de *P. cinnamomi* tem sido objecto de controvérsia e discussão. Um possível foco de origem será a área que inclui o Nordeste Australiano, a Malásia, a Indonésia e a Nova Guiné (Zentmyer, 1980). Existe um estudo genético de populações de *P. cinnamomi* dessas regiões com base na análise de isoenzimas. Este estudo revelou que os isolamentos australianos possuem uma menor variabilidade, apresentando apenas quatro genótipos isoenzimáticos multilocus, enquanto que uma amostra limitada de isolamentos provenientes da Papua Nova-Guiné apresenta nove daqueles genótipos e ainda um número superior de alelos. Estes dados sugerem que os quatro genótipos australianos poderão representar clones que sofreram uma evolução isolada a partir de uma introdução de isolamentos da Papua Nova-Guiné. A discussão em torno do centro de origem de um agente patogénico não tem apenas interesse académico. O conhecimento da variabilidade genética no centro de origem poderá fornecer informações acerca de dados potenciais que seriam imputáveis a migrações adicionais e que regiões deveriam ser monitorizadas para minimizar os efeitos de futuras migrações (Goodwin, 1997). O centro de origem é também o melhor local para encontrar novas fontes de resistência. Além disso o conhecimento da ecologia de um patogéneo no seu centro de origem poderia fornecer pistas acerca das potenciais novas estratégias de controlo, como por exemplo organismos a usar na luta biológica. De qualquer modo *P. cinnamomi* foi introduzido na Austrália Ocidental, na América, Europa Ocidental e África. Encontra-se predominantemente em zonas subtropicais e tropicais, assim como em algumas regiões temperadas (Zentmeyer, 1981).

*P. cinnamomi* além de ter a capacidade de provocar doença em muitas espécies vegetais e invadir ecossistemas inteiros, tem ainda a capacidade de permanecer no solo e na ausência de hospedeiros por períodos de tempo muito longos, devido à formação de estruturas de resistência. Têm ainda capacidade para sobreviver como saprófita de

outras espécies de *Phytophthora* e é conhecido por sobreviver por um período de 6 anos na maioria dos solos (Zentmyer & Mircetich, 1966). Embora ocorra lise do micélio pelos microrganismos do solo, particularmente *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. (Reeves, 1975; Malajczuk, 1983), *Phytophthora* pode sobreviver por longos períodos no solo através de clamidósporos (Weste, 1983). Por outro lado, possui ainda estratégias de rápido aumento de inoculo sempre que as condições lhe são favoráveis e processos alternativos de germinação dos propágulos que respondem rapidamente às alterações ambientais. A disseminação de *P. cinnamomi* tem ocorrido principalmente através de plantas de viveiros infectadas e outros materiais vegetais.

#### 1.1.4 – Expressão dos sintomas e meios de luta

Em castanheiro e utilizando a descrição de Grente (1961), *P. cinnamomi* provoca nas raízes mais finas um enegrecimento, devido à decomposição do córtex, ficando com aspecto húmido e apodrecido. As raízes de maior diâmetro também são atacadas, evidenciando manchas enegrecidas, devido à alteração do córtex e do câmbio. O lenho não é atingido, mas pode ficar escurecido devido à oxidação da seiva que sai dos tecidos do floema.

Em correspondência com esta sintomatologia radicular, manifesta-se na parte aérea da planta um conjunto de sintomas bastante característicos, embora alguns deles estejam também associados a outras doenças de origem parasitária ou fisiológica. Fernandes (1966), um dos autores que mais estudou a Doença da Tinta do Castanheiro em Portugal, descreve como sintomas característicos da doença na parte aérea da planta, os seguintes: folhas amarelcidas e sem brilho que vão murchando, acabando por cair prematuramente; dessecamento rápido das folhas (ocorrência ocasional), que ficam firmemente agarradas nos ramos, mesmo no período de repouso vegetativo; folhas de dimensões reduzidas (quando os ataques deste parasita ocorrem na Primavera; flores masculinas de fraco desenvolvimento que caem sem ter polinizado as flores femininas que raramente se formam; ouriços de pequena dimensão e sem fruto; ouriços que ficam aderentes à árvore durante um ou mais anos; castanhas muito pequenas e sem características organolépticas; desenvolvimento de ramos junto ao colo da árvore e abaixo das pernas principais; colo da planta com uma mancha escura de contornos irregulares ou em forma de cunha, quando se destaca a epiderme (não é sintoma constante da doença, mas quando se observa, é quase certo estar a árvore infectada);

líquido escuro de aparecimento ocasional, semelhante à tinta de escrever, sintoma que deu o nome vulgar à doença e que se deve à oxidação das substâncias fenólicas que se libertam devido ao crescimento dos tecidos sãos que dilaceram os tecidos doentes que não cresceram.

Em plantas jovens de castanheiro a sintomatologia é bastante evidente, adquirindo as plantas um aspecto amarelado que rapidamente evolui para necrose e dessecação de toda a planta. As folhas ficam pendentes, enroladas e com aspecto seco. Esta sintomatologia progride rapidamente levando à morte da planta, num período de tempo relativamente curto (Gouveia, 1993).

A sintomatologia provocada por *Phytophthora* spp. que atacam as raízes, evidencia-se na parte aérea, quando o processo infeccioso se encontra já em estado avançado de evolução. Tal facto torna difícil detectar, por sintomatologia, os ataques precoces destes fungos, tornando as estratégias de luta mais difíceis de aplicar, quando se pretende actuar ao nível do hospedeiro.

Os agentes patogénicos que causam a Doença da Tinta no Castanheiro provocam uma situação de difícil solução, pois estes possuem formas de conservação e de disseminação que lhes permite a sobrevivência no solo quase indefinidamente. O controlo de *P. cinnamomi* é difícil devido à grande quantidade de hospedeiros e capacidade desta espécie em sobreviver sob a forma de clamiósporos, e nas raízes de outras plantas que por vezes não manifestam sintomas.

Como *P. cinnamomi* não pode ser erradicada uma vez que tenha infectado uma área, são necessárias estratégias de controlo de protecção integrada para minimizar a dispersão e desenvolvimento da doença. As medidas de protecção devem ser implementadas logo nos viveiros para que se produzam plantas saudáveis. Fonseca (1994) recomenda a inspecção cuidadosa dos viveiros destruindo todas as plantas doentes e circunvizinhas a estas, e ainda a promoção de boas condições de drenagem e fertilidade do solo. Hardy et al. (2001) têm delineado várias estratégias de protecção para o controlo de *P. cinnamomi* em ecossistemas naturais. Elas incluem a restrição do acesso de veículos para zonas não infectadas, limpeza de veículos e equipamentos para retirar solo aderente ou restos de plantas e impedir os movimentos de água de áreas infectadas para áreas não infectadas e minimizar a circulação de veículos e actividades florestais durante o período húmido.

Os meios de luta disponíveis para combater as doenças provocadas por *Phytophthora* que atacam as raízes não têm, até hoje, resolvido de forma eficiente e

duradoura os problemas sanitários das culturas e das florestas atacadas por estes parasitas. Sendo esta uma doença difícil de erradicar quando estabelecida no terreno, os investigadores têm-se preocupado em encontrar meios de combate eficazes no seu controlo, havendo uma intensa procura de métodos alternativos que possam resolver o problema.

## 1.2 – A luta química contra Oomicetas

### 1.2.1 – Fungicidas preventivos

Os fungicidas não sistêmicos, após aplicação, ficam na superfície das folhas e dos frutos e não penetram na planta. A redistribuição na planta ocorre através da fase de vapor ou através da acção da chuva. Em muitos casos os fungicidas não sistêmicos não são redistribuídos e a sua acção é limitada às folhas tratadas. Uma desvantagem destes fungicidas é a sua dependência da aplicação do fungicida alcançar uma completa cobertura da cultura-alvo (Hewitt, 1998).

Os fungicidas não sistêmicos são geralmente inibidores “*multi-site*”, obtendo, uma resposta através da ruptura de vários processos bioquímicos, alcançado através da capacidade em se ligarem a grupos químicos, como as moléculas tiol, comum a muitas enzimas (Hewitt, 1998).

Os fungicidas são geralmente classificados como erradicativos, protectores ou curativos. No entanto, como refere Reis & Bresolin (2007) há várias maneiras de classificar os fungicidas (fungistáticos, protectores, mesostêmicos, erradicativos, de contacto, curativos, preventivos, sistêmicos, etc.), não havendo uma classificação clara na literatura dedicada a este tema. Simões (2005) classifica os fungicidas, com base na actuação no patogéneo, como preventivos (ou protectores ou profiláticos), curativos (ou terapêuticos) e erradicantes (ou anti-esporulantes).

No caso de fungicidas preventivos a acção é protectora ou de pré-penetração. O fungicida inibe a germinação, impedindo a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. Os fungicidas curativos têm a acção confinada à pós-infecção. Nesse caso já ocorreu a penetração e ainda não são vistos os sintomas. No caso dos fungicidas erradicantes há uma inibição do crescimento micelial e da esporulação não ocorrendo regeneração ou recuperação das células ou dos tecidos mortos pois este processo é irreversível (Reis & Bresolin, 2007).

Um fungicida protector é uma substância que é aplicada profilacticamente na cultura alvo. A sua actividade ocorre numa ou em mais fases iniciais da infecção fúngica que podem ir desde a germinação dos esporos até à penetração preliminar no tecido do hospedeiro, o que impede a infecção e o desenvolvimento de sintomas da doença (Hewitt, 1998). Uma vez ocorrida a penetração do patogéneo na planta, os fungicidas protectores não conseguem impedir a invasão posterior dos tecidos pelo fungo, isto é, não têm acção curativa ou erradicativa (Reis & Bresolin, 2007).

### 1.2.1.1 – Fungicidas inorgânicos

#### 1.2.1.1.1 – Compostos de cobre

A calda bordalesa, descoberta acidentalmente por Millardet em 1982 em França foi um dos primeiros fungicidas inorgânicos a ser usado. Este fungicida consiste numa mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio e estava associada ao controlo do míldio da vinha, *Plasmopara viticola* (Hewitt, 1998). A calda bordalesa foi usada com sucesso no combate do míldio da batateira provocado por *Phytophthora infestans*, e em muitas outras doenças provocadas por outras espécies de *Phytophthora*, tendo sido usada, por exemplo, como pulverização foliar no controlo de *Phytophthora palmivora* (Butl) (Hislop, 1963). Outros sais de cobre que são usados frequentemente como preventivos por aplicação foliar incluem o oxicloreto de cobre e o óxido cuproso, embora este último não seja frequentemente usado (Heitefuss, 1989).

Os fungicidas cúpricos como a calda bordalesa e o oxicloreto de cobre continuam a ser utilizados de forma simples ou em combinação com fungicidas sistémicos como o cimoxanil para controlar algumas doenças na vinha (*P. viticola*), batata e tomate (*Phytophthora infestans*), lúpulo (*Pseudoperenospora humuli*), banana (*Mycosphaerella musicola*), café (*Colletotrichum kahawae*) e chá (*Exobasidium vexans*) (Hewitt, 1998).

Os compostos de cobre são por vezes combinados com metalaxil para alargar o espectro de acção contra patógenos alvo (por exemplo bactérias) ou impedir o desenvolvimento de isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxil (Schwinn & Margot, 1991).

O ião cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) libertado na superfície das folhas é prontamente acumulado por fungos sensíveis. Forma complexos com enzimas que possuam um grupo sulfidrilo (-SH), hidróxilo (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>) e carboxílico (-COOH) inactivando-as levando a uma perturbação geral do metabolismo (Hewitt, 1998). De acordo com Heitefuss (1989) os fungicidas cúpricos são particularmente eficazes contra fungos Oomicetas. Isto pode dever-se à natureza hidrófila dos sais de cobre. A capacidade dos fungicidas cúpricos se redistribuírem pela folhagem por acção da chuva é uma importante vantagem destes fungicidas.

Após a infecção ocorrer, uma aplicação com cobre pode não ser suficientemente eficaz. Por outro lado, o cobre que penetra nas folhas, em certa medida pode causar

crescimento retardado e necroses (“russeting”) nos frutos. Este factor fitotóxico do cobre é uma desvantagem no seu uso (Erwin & Ribeiro, 1996).

### 1.2.1.2 – Fungicidas orgânicos

#### 1.2.1.2.1 – Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos (Quadro 1) foram desenvolvidos entre 1951 e 1962 e têm sido usados extensivamente como fungicidas de largo espectro de acção, muitos dos quais têm tido sucesso para o controlo de *Phytophthora*. O ácido ditiocarbâmico é combinado com diferentes catiões para fazer fungicidas que difere em certas propriedades (Erwin & Ribeiro, 1996). O composto mais simples é o metano de sódio (Vapam), um sal de sódio que é solúvel em água. Devido a sua fitotoxicidade o metano de sódio não é usado na forma de pulverização (Erwin & Ribeiro, 1996).

Quadro 1 – Fungicidas ditiocarbamatos (adaptado de Hewitt, 1998)

Estrutura química	Nome comum
$(\text{CH}_3)_2\text{N}.\text{CS}.\text{SZnS}.\text{CS}.\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Zirame
$[-\text{SCS}.\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}.\text{S}.\text{ZN}-]_x$	Zinebe
$[(\text{CH}_3)_2\text{NCS}.\text{S}]_2\text{FeSCS}.\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Ferbam
$(\text{CH}_3)_2\text{N}.\text{CS}.\text{SS}.\text{CS}.\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Tirame
$[-\text{SCS}.\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}.\text{S}.\text{Mn}-]_x$	Manebe
$[-\text{SCS}.\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCS}.\text{S}.\text{Mn}-]_x (\text{Zn})_y$	Mancozebe

O zirame e o ferbam são dialquilo ditiocarbamatos, enquanto o nabam, o zinebe, o manebe, e o propinebe são bis(alquiloditiocarmabatos). O mancozebe é um sal de manganésio-zinco altamente estável e é mais activo que o manebe ou o zinebe sozinhos (Erwin & Ribeiro, 1996).

Como a maior parte dos fungicidas protectores, os ditiocarbamatos são fungicidas de largo espectro de acção, usados como fungicida foliar e para o tratamento de solo, das sementes e dos frutos (*Venturia* spp., *Taphrina deformans*), em vinha (*P. viticola*), em vegetais (*P. infestans*), beterraba sacarina (*Cercospora beticola*), tabaco (*Pseudoperonospora tabacina*) e lúpulo (*P. humuli*).

Os ditiocarbamatos são muito menos fitotóxicos que os fungicidas de cobre. Alguns ditiocarbamatos aumentam a cor verde das folhas, provavelmente devido à

adição de catiões como o zinco, corrigindo uma deficiência em micronutrientes (Heitefuss, 1989). Os fungicidas ditiocarbamatos têm uma função protectora mas não são translocados na folhagem. Eles são provavelmente o mais importante grupo de fungicidas no combate ao míldio da batata e do tomate (33% do mercado mundial) (Erwin & Ribeiro, 1996). Os ditiocarbamatos são ainda usados em misturas com o metalaxil pois têm um maior espectro de acção e tendem a suprimir o desenvolvimento de resistências ao metalaxil, nomeadamente em *P.infestans* (Schwinn & Margot, 1991).

Geralmente os ditiocarbamatos não são fitotóxicos, mas podem induzir danos em algumas culturas em circunstâncias excepcionais, como por exemplo o uso do mancozebe ou o zinebe em plantas sensíveis ao zinco (Hewitt, 1998).

#### 1.2.1.2.2 – Ftalimidas

As ftalimidas foram introduzidas em 1952 com o anúncio da captana e do folpete (Hewitt, 1998). Elas conferem controlo protector contra um largo número de fungos patogéneos, tendo sido usadas para o controlo de *Venturia* spp. em maçãs e pêras, *P. viticola* e *B. cinerea* em vinha e *B. cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Ascochyta* spp., *Pythium* spp., *Phoma* spp. e *Thielaviopsis basicola* em vegetais e ornamentais, *Glomerella cingulata* em café, bem como *P. infestans* e *Alternaria solani* em batata e tomate.

As ftalimidas têm sido usadas em grande medida para controlar os míldios, mas só o captafol e o folpete têm tido importância no controlo do míldio do tomateiro. Estes fungicidas exercem um efeito protector mas não são translocados (Erwin & Ribeiro, 1996). No entanto, a aplicação é suficiente para cobrir novos crescimentos (Schwinn & Margot, 1991).

A captana, o captafol e o folpete preferencialmente, reagem com enzimas do grupo sulfidril (-SH) mas podem também atacar grupos amina e inibir enzimas que não contêm grupos sulfidril (Hewitt, 1998).

#### 1.2.2 – Fungicidas sistémicos

A aparição no mercado de compostos químicos de acção sistémica abriu e melhorou as possibilidades no combate a patogéneos do género *Phytophthora*.

O desenvolvimento de fungicidas sistémicos para controlar Oomicetas, nos quais estão incluídos parasitas obrigatórios como os míldios, *Phytophthora* e *Pythium* começa

em 1976 com o cimoxanil (Serres & Carraro, 1976), seguido do metalaxil (Urech et al., 1977), furalaxil (Schwinn et al, 1977, ofurace (Lukens et al, 1978), oxadixil (Gisi et al, 1983) e fosetil-Al (Bertrand et al., 1977; Williams et al, 1977).

Schwinn (1987) classifica os fungicidas sistémicos em quatro classes diferentes de compostos: carbamatos, oxinas cianoacetamidas, acilaminas e os etilfosfitos (Quadro 2). Erwin & Ribeiro (1996) acrescentam a estes quatro grupos, os isoxazoles, dos quais faz parte o fungicida hymexazol.

Um fungicida sistémico é caracterizado como um composto que pode ser absorvido passivamente ou activamente através das raízes, ramos, folhas e flores e ser translocado para outra área da planta. A translocação pode ser através das folhas (mobilidade translaminar), no sentido ascendente para os novos crescimentos (apoplástico) ou no sentido descendente (simplástico). A maioria dos fungicidas sistémicos deslocam-se no sentido ascendente com o fluxo de transpiração, no entanto, o fosetil-Al desloca-se em ambos os sentidos (no fluxo de transpiração e no floema).

Quadro 2 – Fungicidas sistémicos para o controlo de *Phytophthora* spp. (adaptado de Schwinn, 1987).

Classe química	Nome comum	Nome comercial
Carbamatos	Protiocarbe	Previcur S70
	Propamocarbe	Previcur N
Oxinas cianoacetamidas	Cimoxamil	Curzate
Acilamina	Furalaxil	Fongarid
	Metalaxil	Ridomil, Acilon, Aprom
Etilfosfitos	Milfuram	Patafol, Caltan
	Benalaxil	Galben
	Fosetil-Al.	Aliette

Os fungicidas sistémicos são menos susceptíveis de perdas devidas à chuva que os fungicidas protectores e podem suprimir o patogénio após a infecção ter ocorrido. A eficácia de um fungicida sistémico é maior que a de um fungicida protector e durante um período mais longo. As principais aplicações práticas destes fungicidas sistémicos encontram-se descritas no Quadro 3.

#### 1.2.2.1 – Carbamatos

Os carbamatos são principalmente activos como tratamentos do solo contra doenças das raízes e caules causadas por *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., em

ornamentais (Englander et al, 1980; Favreau, 1978; Pieroh et al., 1975), algumas hortícolas, e tabaco (McIntyre & Lukens, 1977).

Quadro 3 – Principais aplicações práticas dos fungicidas sistémicos contra *Phytophthora* e outros fungos Oomicetas (Adaptado de (Erwinn & Ribeiro, 1996).

Composto	Principal uso	Principais culturas	Método de aplicação
Protiocarbe Propamocarbe	Doenças de raízes e caules	Ornamentais, vegetais	Imersão
Hymexazol	Doenças de raízes e caules em plântulas	Arroz, beterraba	Imersão, molhando as sementes, em pó
Furalaxil	Doenças de raízes e caules	Ornamentais	Imersão
Cimoxanil	Doenças foliares	Vinha, batata	Pulverização
Fosetil-Al	Folhas, caules, e doenças radiculares	Vinha, abacate, ananás, citrinos, ornamentais	Pulverização, imersão, injeção
Metalaxil e compostos relacionados	Folhas, caules e doenças radiculares	Vinha, batata, abacate, ananás, citrinos, tabaco, lúpulo, milho, sorgo e milho-miúdo	Pulverização, imersão, grânulos, molhando as sementes

O protiocarbe é translocado apoplásticamente nas plantas (Ryan, 1977). Segundo Iwan & Goller (1975), nenhuma evidência tinha sido ainda encontrada para o transporte simplástico. Apesar do transporte apoplástico ter sido estabelecido, as raízes parecem apresentar uma substancial barreira à absorção do protiocarbe (Kluge, 1978), o qual pode explicar a acção um tanto limitada destes carbamatos.

O prothiocarbe tem uma capacidade sistémica limitada e não é translocado a partir do ponto de aplicação. O prothiocarbe é activo contra *Aphanomyces*, um membro das Saprolegniales, e *Bremia*, um míldio dos Perenosporales (Schwinn & Staub, 1987).

O propamocarbe (Figura 1) é um análogo do protiocarbe no qual uma molécula de oxigénio substitui o enxofre. O propomocarbe é translocado das raízes para os novos rebentos.

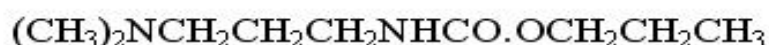


Figura 1 – Estrutura química do propamocarbe

De acordo com Schwinn & Satub (1987), o propamocarbe e o protiocarbe são usados em culturas hortícolas e ornamentais. Em aplicações ao solo em altas concentrações foram supressivos para podridões radiculares do rododendro causadas por *P. cinnamomi* (Englander et al., 1980), e para podridões radiculares do tabaco causadas por *P. parasitica* var. *nicotianae* (Reilly, 1980).

Apesar das indicações que o propomocarbe e o protiocarbe são sistémicos e activos contra *Phytophthora*, elas não foram amplamente usados comercialmente (Erwin & Ribeiro, 1996).

#### 1.2.2.2 – Oxinas cianoacetamidas (acetamidas)

Pouco tempo depois da introdução dos carbamatos, apareceu o cimoxanil (Denis, 1976; Richards & Delp, 1976; Serres & Carraro, 1976). O cimoxanil (Figura 2) foi desenvolvido pela DuPont e foi comercializado na Europa como curzate desde 1979. Este fungicida é sistémico na forma apoplástica e tem actividade selectiva contra fungos *Peronosporales*, embora dentro deste género os fungos tenham diferentes sensibilidades ao cimoxanil (Erwin et al., 1987).

O cimoxanil tem grande capacidade de penetrar a folhagem e tem mais propriedades curativas que o propamocarbe e o protiocarbe. Este fungicida é rapidamente metabolizado nos tecidos da planta e tem uma meia vida de apenas alguns dias (Klopping & Delp, 1980).



Figura 2 – Estrutura química do cimoxanil

A actividade do cimoxanil nas folhas tem demonstrado ser menor que o metalaxil ou o fosetil mas mais longa que os fungicidas protectores. (Schwinn & Staub, 1987; 1995; Schwinn & Margot, 1991). É eficaz em pulverização foliar contra o míldio da batateira, causado por *P. infestans*, e míldio da vinha causado por *Plasmopara viticola* (Douchet et al, 1977; Schwinn & Staub, 1987; 1995).

O cimoxanil é mais eficaz contra o estado de crescimento hifal do que as fases iniciais (o desprendimento dos zoóporos dos esporângios e a sua germinação). O

composto inibe a biossíntese do ácido nucleico e proteínas em *P. cinnamomi* e *Botrytis cinerea*, mas é provável que a actividade seja induzida por uma interacção com os processos metabólicos do hospedeiro (Hewitt, 1998).

O cimoxanil não é suficientemente persistente para ser usado sozinho, porque a sua acção protectora perde-se em poucos dias, no entanto tem um efeito curativo forte durante 3-4 dias após a infecção, dependendo da duração do período de incubação. Devido ao seu tempo de meia vida ser relativamente curto, o cimoxanil é usado em baixas concentrações, principalmente em combinação com um fungicida preventivo como o mancozebe ou o folpete (Erwin & Ribeiro, 1996) para induzir actividade a longo prazo e através da sua actividade curativa e prolongar o intervalo entre as pulverizações (Hewitt, 1998). Estas misturas têm um efeito sinérgico e aumentam a duração da actividade protectora (Klopping & Delp, 1980). Tem sido usado com sucesso em combinação com o oxadixil (Schwinn & Staub, 1987).

#### 1.2.2.3 – Fenilamidas

Entre os compostos fenilamidas, o furalaxil, o metalaxil e o benalaxil estão incluídos nas acilalaninas, o ofurace e o ciprofuram nas acilamino-butirolactonas, e o oxadixil nas acilamino-oxazolidinonas (Schwinn & Staub, 1987). Estes compostos tem alta actividade específica contra Oomicetas. A base desta especificidade é desconhecida (Hewitt, 1998).

As acilalaninas são altamente eficazes quer *in vitro* quer *in vivo* contra todos os fungos patogénicos da ordem *Peronosporales*. A molécula mais eficaz dentro desta classe de fungicidas é o metalaxil (Schwinn, 1987). Outro membro desta classe, o furalaxil está particularmente adaptado para uso em ornamentais (Wiertsema & Wissink, 1977).

O desenvolvimento do fungicida sistémico metalaxil [N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)alanine] (Figura 3) foi um marco na história do controlo de fungos patogénicos dentro dos *Peronosporales*, sendo também considerado por Urech et al. (1977) e Schwinn et al. (1977) como o mais activo e versátil dos fungicidas para o controlo de doenças provocadas por *Phytophthora*.

O metalaxil é formulado como um pó molhável para ser usado por pulverização foliar e como material granular para ser aplicado ao solo na altura da plantação. O

produto é comercializado com os seguintes nomes: Ridomil para aplicação foliar, Apron para tratamento de sementes e Subdue para aplicação ao solo (Erwin & Ribeiro, 1996).

O metalaxil é solúvel em água e eficaz contra todas as espécies de *Phytophthora* em doses muito baixas. No entanto nenhum dos compostos fenilamidas tem qualquer efeito em fungos não Oomicetas. Para obter um controlo destes fungos outros compostos têm de ser adicionados ao metalaxil e aos outros compostos fenilamidas (Erwin & Ribeiro, 1996).

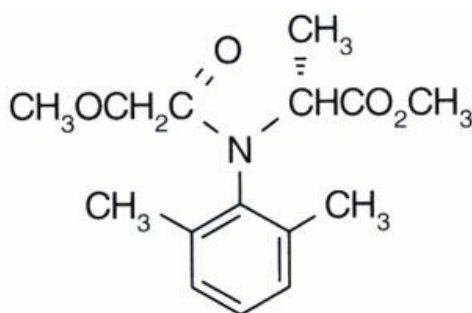


Figura 3 – Estrutura química do metalaxil

Estudos sobre a resposta de crescimento de várias espécies de *Phytophthora* a diferentes doses de metalaxil em meio de cultura CMA (Corn Meal Agar) mostraram diferentes sensibilidades das espécies de *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro, 1996), variando os valores do EC<sub>50</sub> entre os 2-30 ng/ml para *P. boehmeriae* (Bailey & Coffey, 1984) e os 19 µg/ml para *P. drechsleri* f. sp. *cajani* (Chauhan & Singh, 1987). A dose de resposta (EC<sub>50</sub>) de *P. cinnamomi* ao metalaxil é apresentada no Quadro 4.

Quadro 4 – EC<sub>50</sub> do metalaxil (concentração que inibe o crescimento micelial em 50%) de *Phytophthora cinnamomi* (adaptado de Erwin & Ribeiro, 1996)

	Dose mínima	Referência
<i>P. cinnamomi</i> (A1 e A2)	EC <sub>50</sub> 0,07-0,29 µg/ml	Coffey et al. (1984)
	EC <sub>50</sub> 0,075 µg/ml	Coffey & Bower (1984)
	EC <sub>50</sub> 0,11 µg/ml	Benson (1979)
	EC <sub>50</sub> 0,9 µg/ml	Fuller & Gisi (1985)
	90 % da inibição da formação dos zoósporos a 10 µg/ml (furalaxil) e 25 µg/ml (metalaxil)	Geissler & Katekar (1983)

Um estudo efectuado por Gouveia (2004) sobre a sensibilidade ao metalaxil de isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, associadas à doença da Tinta do Castanheiro, revelou diferentes sensibilidades destas duas espécies, tendo *P. cambivora* revelado menor sensibilidade ao metalaxil. Os isolados de *P. cinnamomi* apresentaram grande variabilidade quanto aos valores de EC<sub>50</sub> tendo variado entre 0,09 µg/ml para o isolado mais sensível e 14,8 µg/ml para os isolados mais tolerantes. Um isolado apresentou o valor de EC<sub>50</sub> de 14,8 µg/ml, o que pode ser considerado um valor elevado podendo ser indicativo da possibilidade do aparecimento da resistência em relação ao fungicida metalaxil.

O metalaxil movimenta-se apoplasticamente a partir de sementes, raízes e folhas para os novos crescimentos (Staub et al 1978; Zaki et al, 1981; Gupta et al, 1985); por isso o efeito sistémico e curativo que o metalaxil exerce nas plantas faz com que seja mais vantajoso que os fungicidas curativos (protectores) especialmente quando a infecção ocorreu antes da aplicação. Alguns estudos descrevem a translocação simplástica (basipetal) do metalaxil (Staub et al., 1978; Zaki et al., 1981) embora este movimento seja de menor importância. Sendo o metalaxil solúvel em água, ele pode ser aplicado ao solo onde é prontamente transportado pelas raízes e translocado apoplasticamente nos tecidos das plantas (Schwinn, 1983; Bruck, et al., 1980, Schwinn & Staub, 1987). O metalaxil é um exemplo de um fungicida com acção no interior da planta, sendo tóxico contra *Phytophthora* quando esta infecta e cresce em plantas (Schwinn & Staub, 1987, 1995).

O metalaxil tem um efeito supressivo específico no RNA ribossomal (rRNA) (Davidse, 1987, 1995; Davidse et al, 1983). Davidse (1987) explica que a inibição da síntese de rRNA em última análise leva à inibição do desenvolvimento do fungo pois a redução do rRNA priva as células dos ribossomas que regulam a síntese de proteínas. Assim, o metalaxil normalmente não inibe a germinação dos esporângios ou dos esporos enquistados tão eficazmente como o faz com o crescimento micelial porque os esporos intactos aparentemente têm suficientes ribossomas para formar o tubo germinativo (Erwin & Ribeiro, 1996); no entanto, quando os tubos germinativos de *Phytophthora* penetram a folha, o metalaxil que tem sido translocado dentro da folhagem tratada é capturado pelo micélio. O metalaxil causa depois malformação e cessação do crescimento do micélio infectado.

Bruck et al (1980) e Staub et al. (1980) comparam os locais de acção do metalaxil no ciclo de vida do patogénio *P. infestans* com um fungicida residual como o

manebe. Enquanto o manebe inibe a formação de zoósporos a partir dos esporângios, a germinação dos zoósporos e a penetração inicial, o metalaxil inibe a formação secundária dos haustórios, o crescimento micelial dentro da folha e a formação de lesões e esporulação. Um fungicida preventivo como o manebe, no entanto, mata os esporos germiantivos em poucas horas na folha, mas não tem efeito no micélio após este ter penetrado nas folhas (Erwin & Ribeiro, 1996). Uma vez que a infecção tenha ocorrido os fungicidas preventivos têm pouco ou nenhum efeito no progresso da doença porque *Phytophthora* pode progredir sem impedimentos se tiver infectado as células internas das folhas antes da aplicação do fungicida. O metalaxil afecta o desenvolvimento do micélio na folha só após penetração (Grohmann & Hoffman, 1989).

Torna-se evidente que o metalaxil interfere muito mais com o desenvolvimento do fungo durante grande parte do ciclo da doença que o manebe, devido à sua rápida penetração no tecido hospedeiro. O metalaxil é eficaz contra todos os estados de desenvolvimento da doença dentro do tecido hospedeiro, ao passo que um fungicida residual de contacto interfere unicamente com a fase inicial, por exemplo a formação de zoósporos a partir dos esporângios ou a germinação dos esporângios (Schwinn, 1987).

*In vitro*, o metalaxil inibe o crescimento micelial e a formação de clamidósporos e esporangios. A concentração requerida para inibir a formação de esporângios é 25 vezes mais baixa do que a inibe a formação de clamidósporos e 100 vezes mais baixa que a necessária para inibir o crescimento micelial (Schwinn, 1987).

Como o metalaxil é solúvel em água e é absorvido pelas raízes, tem sido utilizado com sucesso usado em imersão ou em grânulos em culturas tais como a soja (Schmitthenner, 1985) e muitas plantas ornamentais crescendo em contentores em viveiros (Benson, 1979, 1990). Devido ao longo tempo de meia vida do metalaxil nos solos (15 a 30 dias) e a sua alta mobilidade, a sua actividade no solo é excelente (Cohen & Coffey, 1986).

Para culturas como a batata, o tomate e culturas hortícolas nas quais ocorrem doenças foliares simultaneamente com doenças provocadas por *Phytophthora*, as acilalaninas são mais eficientes misturadas com outros fungicidas alargando-lhe o espectro de actividade (Urech et al, 1977). Similarmente estas misturas melhoram o nível de controlo nas folhas senescentes, nas quais as acilalaninas são menos eficazes, por razões desconhecidas que nos tecidos mais jovens (Schwinn, 1987). Estas misturas são consideradas uma ferramenta valiosa para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência em populações de *Phytophthora* spp.

Quando o metalaxil é usado repetidamente em alguns solos ele degrada-se rapidamente devido à acção de fungos e da flora bacteriana (Bailey & Coffey, 1984). Bailey & Coffey descobriram que o tempo de meia vida do metalaxil era marcadamente reduzido em solos tratados com metalaxil, estando as bactérias e fungos associados com a biodegradação do metalaxil.

No início da década de oitenta do século XX, em plantações de batatas, na Europa Ocidental, especialmente na Holanda e Irlanda e depois progressivamente no resto do mundo, foram aparecendo casos de resistência ao metalaxil em isolados de *P. infestans* (Schwinn, 1987). O repetido uso do metalaxil aplicado no campo estabeleceu uma contínua e alta pressão de selecção que favoreceu o desenvolvimento da resistência (Hewitt, 1998). Para evitar este problema, as empresas começaram a comercializar misturas de acilalaninas com fungicidas convencionais como os ditiocarbamatos e ftalamidas para uso contra patogénios das folhas (Schwinn, 1987). Tais misturas não foram desenvolvidas para patogénios do solo porque o risco da resistência era considerado baixo. Apesar de não terem aparecido casos de resistência em espécies de *Phytophthora*, que sejam patogéneos do solo, as evidências genéticas demonstradas pela investigação em *P. infestans* sugerem que um aumento da resistência nestes patogénios pode ocorrer (Erwin & Ribeiro, 1996).

#### 1.2.2.4 – Etilfosfitos

Os alquil-fosfonatos são uma classe de fungicidas sistémicos com boa actividade contra doenças causadas por fungos pertencentes à ordem *Peronosporales*, particularmente o míldio da videira, o míldio do lúpulo e muitas doenças da raiz e do colo causadas por *Phytophthora* spp.

Os fungicidas fosfonatos incluem o fosetil-Al e os produtos da sua decomposição, o ácido fosfórico. O desenvolvimento do fosetil-Al é um marco na luta química contra doenças causadas por *Phytophthora*, apesar da sua actividade relativamente fraca contra o míldio da batateira causada por *Phytophthora infestans*, e a podridão radicular da soja, causada por *P. sojae*. Fosetil-Al e o ácido fosfórico, quase sempre referido como fosfitos, mas mais correctamente denominados por fosfonatos, (Coffey & Ouimette, 1989), são notavelmente eficazes para o controlo de doenças radiculares causadas por *Phytophthora* em abacaxi (Rohrbach & Schenck, 1985), abacate (Coffey et al., 1984; Darvas et al., 1984; Pegg et al., 1985; Coffey, 1987; De

Boer et al, 1990), citrinos (Laville, 1979; De Boer et al, 1990; Le Roux et al., 1991) e noqueira (Matheron & Mircetich, 1985).

O fosetil-Al (Aliette) (Figura 4) é quimicamente conhecido como alumínio Trís-O-ethyl fosfonato e foi descrito pela primeira vez em França (Bertrand et al., 1977; Williams et al., 1977). Em 1977 iniciou-se a sua comercialização sob patente da Rhone-Poulenc Agrochemie Company. O Aliette foi inicialmente rotulado para o controlo de doenças provocadas por *Pythium* em campos de golfe e usado nos relvados como tratamento preventivo (Landschoot & Cook, 2005).

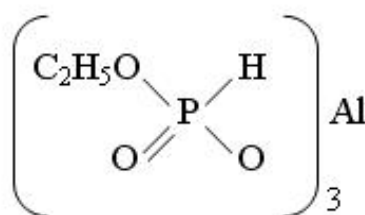


Figura 4 – Estrutura química do fosetil de alumínio (fosetil-Al)

O fosetil-Al tem alta actividade fungicida na maioria das espécies do grupo *Peronosporales*, no entanto algumas espécies, tais como *P. infestans*, são relativamente insensíveis (Erwin et al, 1987). Por outro lado alguns patogéneos, como *Guignardia spp.*, *Alternaria spp.*, e *Cercospora spp.*, outros grupos taxonómicos que não os *Peronosporales* são também controlados (Bertrand et al., 1977; Chalazet et al, 1977).

Este produto inibe a formação de esporângios e zoósporos em *P. citrophthora*, *P. parasitica*, *P. cactorum* e *P. citricola*, e a produção de oósporos e clamidósporos em *P. citricola* e *P. cinnamomi*. *P. megasperma* e *P. infestans* são comparativamente insensíveis (Farih et al., 1981).

O fosetil-Al é o primeiro fungicida comercial que é verdadeiramente sistémico. É translocado quer por movimento acropetal (raiz-copa) quer por movimento basipetal (copa-raiz) após aplicação foliar (Bertrand et al., 1977). Isso resulta numa acção curativa e leva à protecção temporária das novas folhas formadas após a aplicação. No entanto, este efeito parece ser obtido à custa da sua concentração nas folhas pulverizadas, o que diminui o efeito protector destas folhas (Schwinn, 1987). O fosetil-Al é recomendado contra doenças foliares em misturas com fungicidas residuais como o folpet e mancozebe. Estas combinações mostram um efeito sinérgico que permite

prolongar os intervalos entre as aplicações (Chalazet et al., 1977; Lafon et al., 1977; Marais & van der Walt, 1978).

O fosetil-Al rapidamente se converte a ácido fosfórico ou sal de fosfato ou outro componente menor (Fenn & Coffey, 1984; Saindrenan et al., 1985; Cohen & Coffey (1986); Coffey & Ouimette, 1989; Guest & Grant, 1991; Griffiths et al., 1992). A toxicidade *in vitro* do fosetil-Al contra as diferentes espécies de *Phytophthora* em meio convencional é relativamente baixa (1000 µg/ml ou superior) (Clerjeau & Beyries, 1977; Bompeix et al., 1980; Farih et al., 1981); no entanto a fungitoxicidade para *P. cinnamomi* num meio sintético (Ribeiro et al., 1975) no qual o nível de fosfito é baixo (0,084 mM) ocorre a concentrações tão baixas como 10 µl/ml para o ácido fosfórico e 50 µl/ml para o fosetil-Al.

A descoberta que o ião fosfonato era o princípio activo do fosetil-Al (Bompeix & Saindrenan, 1984; Bower & Coffey, 1985; Fenn & Coffey, 1984, 1985; Coffey & Joseph, 1985) estimulou a investigação do fosfonato como um fungistático e também como um meio de controlo de doenças causadas por *Phytophthora*. O fosetil-Al é eficaz no controlo de doenças após *Phytophthora* se ter estabelecido (Griffith et al., 1992). Guest & Grant (1991) relatam em alguns estudos que injeções no tronco do abacateiro com fosfonato controlaram com sucesso a podridão radicular causada por *P. cinnamomi*.

A introdução do fosetil-Al melhorou marcadamente a luta química contra doenças de folhas, frutos, caules e raízes provocadas por *Phytophthora*. Esta substância química é particularmente valiosa contra alguns patogénios do solo em culturas anuais, culturas perenes, e em ornamentais anuais e perenes (Schwinn, 1987).

### 1.3 – A luta química no combate à Doença da Tinta do Castanheiro

#### 1.3.1 – A luta química em Portugal

A primeira referência que se conhece no combate à Doença da Tinta do Castanheiro é dos finais do século XIX e deve-se ao italiano Gandolfo. Consistia em abrir uma cova à volta do castanheiro afectado pela doença pondo a descoberto as raízes principais e a sua inserção no colo do tronco. Para Gandolfo, as baixas temperaturas do Inverno provocariam a morte do agente causador da doença, e isso curaria o castanheiro (Cortizo et al, 1999). Este método, tendo obtido resultados positivos, só podia ser aplicado em regiões de invernos rigorosos, onde as temperaturas se mantinham durante um longo período de tempo abaixo de zero. Nas regiões de invernos temperados a eficácia seria duvidosa. Experiências deste tipo foram realizadas no Nordeste Transmontano, e apesar de os invernos serem bastante frios os fracassos do tratamento eram frequentes pois mais cedo ou mais tarde os castanheiros acabavam por morrer (Fernandes, 1979). A idêntica conclusão chegou Urquijo (1941) depois de diversas observações feitas na região da Galiza.

Este processo manteve-se até a década de 30 do século XX quando o agrónomo espanhol Urquijo Landaluze modificou o procedimento de Gandolfo ao aplicar fungicida às raízes e ao tronco que ficam descobertas, o qual ficou conhecido como “Método Urquijo”. O método só em 1941 viria a ter um maior incremento depois de Urquijo ter realizado várias experiências para determinar o poder fungicida dos diversos sais de cobre com possibilidade de aplicação no combate contra a doença, de modo a encontrar um sal de cobre mais eficaz e que tornasse o tratamento económico, permitindo-lhe melhorar bastante o seu método. Para Urquijo, a solubilidade dos produtos cúpricos a utilizar nos tratamentos era o principal factor a considerar, razão pela qual empregou nos seus ensaios, sais de cobre pouco solúveis não só porque asseguram um maior período de eficácia, mas também porque evitam o perigo de intoxicações das árvores (Fernandes, 1947). De todos os produtos cúpricos ensaiados, o óxido cuproso mostrou-se ser o mais activo, tendo-se usado em Espanha a seguinte mistura:

Carbonato ou oxiclreto de cobre a 17% .....	2 partes
Óxido cuproso .....	1 parte
Caulino ou gesso .....	2 partes

O “Método Urquijo” consistia em três operações (Suarez, 1989): 1) descasque do tronco e raízes mais grossas até 40-50 cm de profundidade, pondo-as a descoberto e limpando-as com uma escova de arame para não ficar terra aderente; 2) molhar todas as partes descobertas com água, ou com um aderente. Usou-se, como aderente, cola de carpinteiro ou produtos à base de resina. Fernandes (1947) refere o uso em Espanha do produto “Ipem” feito à base da resina, na proporção 1:1000; 3) Aplicação do produto cúprico de forma a constituir-se uma camada uniforme de pó em volta da base do tronco e das raízes. Depois de bem espalhado, de modo que cubra todas as raízes e o tronco na sua parte enterrada, cobre-se novamente com terra, tapando com cuidado para que o produto aderido à raiz não seja arrastado por terra. Urquijo (1971) aconselhava esperar um pouco antes de se cobrir as raízes com terra, mas era aconselhado cobrir sempre que se esperasse chuva.

Urquijo aconselhava a não se tratarem árvores com mais de 1/3 do perímetro infectado de modo a evitar fracassos. Como preventivo, o método mostrou ser dos melhores no combate à doença da tinta, pois raramente os castanheiros tratados apareciam infectados (Fernandes, 1947). Segundo o mesmo autor, os estudos efectuados pelo micologista Urquijo Landaluze permitiram assim salvar muitos castanhais tendo as árvores tratadas reagido muito bem aos tratamentos e muitas delas voltaram a dar fruto após a aplicação do sal de cobre.

O carácter epidémico da Doença da Tinta e os sucessivos anos de destruições que levaram ao desaparecimento de um elevado número de soutos de Norte a Sul de Portugal levaram, no início da década de 40 do século XX, os poderes públicos a agir para se estudar o problema da Doença da Tinta em Portugal e encontrar soluções para o seu combate. Os Serviços Florestais nomearam nessa década Lopes Pimentel para estudar a doença e encontrar métodos de luta eficazes. Apoiando-se nestes estudos Vieira Natividade elabora em 1944 o Plano de Valorização e Defesa do Castanheiro. Com base neste plano e nos resultados obtidos em Espanha, inicia-se em 1945 uma campanha de tratamento contra a doença da tinta do castanheiro, com a utilização de sais de cobre pouco ionizáveis seguindo o “Método Urquijo”, com ligeiras modificações, para melhor se adaptar às condições agro-climáticas e possibilidades económicas e sociais de Portugal.

O método, aparentemente simples, exigia cuidados especiais para que o êxito do tratamento fosse assegurado e compreendia as seguintes fases (Fernandes, 1966): 1) abertura de uma cova ou caldeira à volta da árvore a uma profundidade de 40 a 50 cm;

2) limpeza de todo o sistema radicular posto a descoberto e cerca de 20 cm do tronco, a partir do colo, com uma escova de arame de aço; 3) lavagem e aplicação de um aderente molhante nas raízes e tronco; 4) polvilhamento das mesmas regiões com um sal insolúvel de cobre; 5) aterro da caldeira alguns minutos após o tratamento.

Após vários estudos sobre os produtos aderentes a utilizar, Fernandes (1949) conclui que o aderente «P» era o único que reunia as melhores qualidades, pois além de não ser cáustico, tinha uma aderência perfeita na concentração de 3/1000.

Os tratamentos contra a Doença da Tinta do castanheiro tiveram início no concelho de Vinhais, por se tratar de uma das regiões de maior interesse para a cultura do castanheiro e onde a doença mostrava tendências para alastrar (Fernandes, 1953), tendo depois continuado os tratamentos por outros concelhos do distrito de Bragança, Vila Real, Viseu e Guarda.

Relativamente ao período de tratamento, enquanto que em Espanha se realizavam tratamentos em qualquer época do ano, Fernandes (1947) aconselhava a fazer-se os tratamentos na época de Julho a Novembro, pois as condições climatéricas durante o Inverno, nas regiões onde se iam efectuar esses mesmos tratamentos não eram as mais favoráveis para a realização destas operações.

Aplicado no primeiro ano sem o sucesso esperado, pois os tratamentos incidiram sobre árvores muito doentes, o método viria a ser alterado nos anos seguintes com a aplicação de tratamentos em árvores até 1/3 dos ramos da copa com sintomas evidentes, segundo a recomendação de Urquijo, e de forma preventiva em árvores suspeitas ou sem sintomas da doença.

Fernandes (1952) evidenciava que os castanheiros sujeitos a tratamento tinham reagido favoravelmente pelo que poderia considerar bom o método seguido, e que quando o método era aplicado como preventivo mostrava-se mais eficaz pois a percentagem de indivíduos que não reagiam ao tratamento era de 1%, enquanto que quando era aplicado como curativo as falhas eram de quase 5%.

Com base nos resultados obtidos, Fernandes (1953) considerava o método bom e que se devia continuar a usar enquanto não existam outros métodos mais expeditos e económicos e não existam plantas resistentes em número suficiente para distribuir pelas regiões infectadas pois os tratamentos apesar de inicialmente dispendiosos, cerca de 10\$00 por árvore, as árvores salvas compensavam toda a despesa num só ano de produção e também pelo efeito dos tratamentos que ultrapassava o limite previsto (mais de 7 anos), quando aplicado como preventivo.

A luta contra a Doença da Tinta foi também seguida em viveiros que se encontravam contaminados. A aplicação da solução de sulfato de cobre a 2% e a 4% ou da aplicação de carbonato de cobre em pó à razão de 100 g/m<sup>2</sup>, além do arranque e queima de todas as plantas mortas ou com sintomas de doenças, permitiu a produção de plantas sãs.

No início da década de 50, apesar dos resultados obtidos, o custo dos tratamentos era ainda elevado devido ao preço dos fungicidas que encarecia de ano para ano e ao preço da mão-de-obra. De modo a tornar o método mais económico e eficiente foram realizados ensaios quer em laboratório quer no campo com o objectivo de se estudarem diversos produtos cúpricos. Em laboratório estudaram-se vários fungicidas sólidos quanto à solubilidade e à acção repulsiva aos parasitas, tais como *carbonato de cobre*, *Coppesan*, *Cobre Sandoz*, *Vericuivre*, *Dithane Z-78*, *Dithane M-45* e *Cupertane* (Fernandes, 1966), tendo-se verificado a eficácia de todos os fungicidas. Em 1951 foram experimentadas as misturas cúpricas de cobre Sandoz (óxido cuproso) e gesso (1:2) e Perenox e gesso (1:1), tratando os castanheiros pelo método de Urquijo, uns sãos e outros em vários estados de infecção. Segundo Fernandes (1955), o tratamento com as duas misturas cúpricas acima mencionadas era mais vantajoso sob o ponto de vista económico do que com a mistura anteriormente utilizada (2:1:2).

Além dos métodos de defesa directa referidos, Taveira Fernandes desenvolveu um novo método onde se experimentou a aplicação da mistura cobre Sandoz e gesso (1:2) incorporada no terreno por meio de uma cava funda, até uma profundidade de 30 cm, sobre toda a superfície correspondente à projecção da copa e à razão de 100 g/m<sup>2</sup> (Fernandes, 1955).

O novo método desenvolvido por Taveira Fernandes, de fácil aplicação, revelou ser mais económico, pois as despesas com a mão-de-obra eram em média bastante inferiores que o tratamento realizado pelo método Urquijo o que permitiu reduzir o custo dos tratamentos por árvore tratada.

Fernandes (1966) refere também a vantagem de este método poder ser aplicado com certo êxito aos povoamentos em regime de talhadia, desde que o solo não seja muito pedregoso e em viveiros.

Além destes métodos foram também ensaiados o processo de injeção de fungicidas líquidos, e a aplicação de fungicidas líquidos por pressão em castanheiros de madeira explorados em regime de talhadia, tendo-se utilizado soluções de sulfato de cobre em diferentes concentrações, mas sem grandes resultados na época em causa

(Fernandes, 1970), pois havia dificuldades em introduzir perfeitamente o fungicida na seiva e em encontrar doses mínimas letais para o parasita sem prejudicar o normal desenvolvimento da planta.

Desde 1945 até 1973 foram tratados contra a Doença da Tinta cerca de 1000000 de castanheiros. Pelo método Urquijo ou pelo processo de incorporação de uma mistura cúprica por meio de uma cava funda manteve-se a produtividade de centenas de milhar de castanheiros a maioria dos quais sucumbiram sem os tratamentos. Inúmeras regiões das províncias de Trás-os-Montes, Alto Alentejo, Beira Alta e Beira Baixa mantiveram os seus soutos em plena produção graças aos tratamentos aplicados (Fernandes, 1970). Fernandes (1974) afirmava que embora muitas árvores sucumbissem, os êxitos alcançados com os tratamentos aplicados eram significativos para se continuar as campanhas de tratamento contra a Doença da Tinta do Castanheiro. No entanto, apesar dos êxitos descritos por Fernandes, os trabalhos realizados no combate à Doença da Tinta ficavam aquém do esperado, pois as verbas atribuídas para a defesa dos soutos eram insignificantes em relação ao que seria necessário para tratar todas as regiões onde o castanheiro tinha interesse económico e onde a doença causava prejuízos bastante significativos. As dificuldades no recrutamento da mão-de-obra para a realização das operações que eram cada vez maiores e o agravamento do preço dos fungicidas, impediam também que fosse tratado um maior número de árvores.

Fernandes afirmava que as despesas dos tratamentos deviam continuar a cargo do estado devido á dificuldade de aplicação do método e ainda de o castanheiro ser uma cultura de regiões agrícolas deficitárias pois se assim não fosse que o país se arriscava a ver num período não muito longo os soutos totalmente destruídos pela doença. O autor afirmava também que o custo médio por árvore tratada era insignificante quando comparado com o seu rendimento em fruto, realçando as vantagens que se alcança não só pelo valor da castanha que sendo um fruto seco de alta qualidade tem mercado assegurado, tanto interno como externo, mas também pela madeira que se desvaloriza consideravelmente pela acção da doença.

No entanto, como a luta directa contra a doença da tinta só interessa para a defesa dos soutos em exploração, fica por resolver o problema da sua reconstituição em terras grandemente infectadas e da expansão da cultura pois não se consideram regiões imunes ao parasita.

Os custos muito elevados de mão-de-obra impediram que desde 1975 o método de Urquijo pudesse continuar a ser aplicado no nosso país no combate preventivo e curativo contra a doença da tinta do castanheiro (Dias, 1991).

Na década de 90 foi adoptado um novo método de combate à doença da tinta do castanheiro nos soutos portugueses, denominado GAFEX. Segundo Dias (1991), o método GAFEX é sequência natural dos métodos anteriormente referidos e tem como base trabalhos desenvolvidos por Magalhães et al (1985) sobre a redistribuição do ião cobre exógeno nos perfis de alguns solos vitícolas onde foi demonstrado que aplicações repetidas de cobre a superfície do solo formavam uma fase cúprica no perfil do solo, resultante da percolação ou lixiviação dos depósitos superficiais do cobre até uma profundidade determinada, variando a concentração de cobre desde os 117,8 ppm de Cu total à superfície e 38 ppm entre os 45 e os 100 cm de profundidade.

O método desenvolvido por Dias (1991) descreve-se nos passos seguintes:

a) O ião cobre é aplicado à superfície do solo na zona envolvente do tronco e na própria base deste, sem que o solo tenha sido removido.

b) Da superfície o cobre migra até uma determinada profundidade. A percolação é feita pela água da chuva que o arrasta e o redistribui.

c) O método GAFEX não é um método curativo antes um método preventivo, admitindo-se que em infecções localizadas haja possibilidade de se suspender a progressão do processo infeccioso geral.

d) O ião cobre utilizado é o que se encontra no oxiclreto de cobre da formulação GAFEX, sendo de 5 miligramas de Cu por litro de água (5 ppm), a dose letal, LD<sub>100</sub>, para os zoósporos de *P. cambivora* (Viennot-Bourgin, 1949).

e) A preferência dada ao pó molhavel GAFEX reside no facto de uma calda deste preparado aplicado sobre o tronco até um metro de altura constituir uma reserva de cobre para redistribuição agregada ao ritidoma do castanheiro. Este deposito é arrastado gradualmente para o terreno, podendo levar meses essa lavagem.

f) Excluiu-se o carbonato de cobre, por não existir no mercado nacional e o sulfato de cobre devido às possíveis reacções químicas características dos sais solúveis de cobre.

g) Uma vez que o ião cobre não é colocado directamente nas zonas a defender, o processo de percolação ou redistribuição é lento e depende das quedas pluviométricas inverno-primaveris.

O autor recomendava iniciar as aplicações um ano após as plantações e repetir-se durante 5 anos seguidos ou, no caso de soutos, adultos proceder a uma série de aplicações anuais durante 5 anos com o objectivo de concentrar o ião cobre na zona colo-raízes principais devendo atingir os 5 ppm ou mais na zona envolvente do colo. Dias (1991) admitia que aplicando uma calda de GAFEX a 2,5 % uma vez por ano em anos sucessivos (até cinco anos) no tronco até um metro de altura e na terra num raio de 1 a 1,25 metros à volta do tronco conseguia obter os 5 ppm na zona envolvente do tronco.

A aplicação devia fazer-se de Janeiro a fins de Março com a terra já saturada de água. Dias (1991) salientava o facto de o método ter um carácter preventivo e que as aplicações muito precoces em soutos recém plantados eram as que melhores resultados poderiam garantir a longo prazo.

O método deveria ser acompanhado por medidas complementares, importantes no combate à doença da tinta, tais como, recurso às mobilizações mínimas, adopção de herbicidas e recolha dos ouriços e sua queima. A folhada devia ser deixada à superfície do solo.

O método GAFEX, de carácter preventivo, consistia nas seguintes operações:

1º - No início do ano, se necessário, fazer uma caldeira de poucos centímetros de fundo, à volta das árvores a tratar à distância de 1 metro ou 1,5 metros do tronco.

2º - Em qualquer data de Janeiro a Março fazer o tratamento.

3º - Para o tratamento preparar uma calda de 2,5 kg de GAFEX em 100 litros de água e aplicar 1 ou 2 ou mais litros desta calda por cada árvore.

4º - A aplicação da calda faz-se com um regador ou pulverizador até à altura de 1 metro no tronco e no terreno à volta do mesmo até 1 ou 1,5 metros de distância.

5º - Repetir este tratamento durante 5 anos seguidos e voltar a repetir o processo durante outros 5 anos após um intervalo de 5 anos.

6º - Tratar sempre e desde o segundo ano de plantação os castanheiros novos que deverão vir sãos do viveiro.

7º - Não fazer lavouras nem gradagens no souto. Para combater as ervas, silvas e rebentos de castanheiro recomendava-se a utilização de herbicidas. Retirar os restos de ouriços ou queima-los e deixar a folhada no terreno sem a enterrar.

Posteriormente, estudos de avaliação da eficácia do metalaxil e foseil-Al aplicados ao solo para combater *P. cinnamomi* em castanheiro foram realizados pela Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes (DRATM) com vista a

homologação destes produtos fitofarmacéuticos. Os resultados preliminares apresentados por Mantas & Sousa (1991) sobre as primeiras observações no controlo químico, com o fosetil-Al e o metalaxil num souto infectado por *P. cinnamomi* revelaram-se satisfatórios. Os mesmos autores referem que o tratamento com o fosetil-Al parece apenas provocar uma paragem na evolução dos sintomas na árvore, enquanto que o tratamento com o metalaxil, para além da paragem na evolução dos sintomas, provocavam uma melhoria de vigor e uma reconstituição dos tecidos afectados.

O fosetil-Al (Aliette) e o oxiclureto de cobre estão actualmente com autorização de venda em Portugal, pela Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (<http://www.dgadr.pt/>) estando incluídos na lista de substâncias activas homologadas pela DGADR para o castanheiro (actualizada a 31/03/2009). Durante algum tempo estas duas substâncias activas estiveram aconselhadas pela DGADR para Protecção Integrada do Castanheiro no combate à Doença da Tinta.

### 1.3.2 – Limitações e métodos alternativos de luta química no combate à Doença da Tinta do Castanheiro.

Os fungicidas sistémicos oferecem grande flexibilidade de uso no controlo de doenças foliares devido à sua alta actividade fungitóxica, à deslocação rápida para folhas e ramos após aplicação foliar ou aplicação ao solo e à sua actividade curativa. No entanto o aparecimento de resistência limitaram o uso de alguns destes fungicidas como é o caso das acilamidas. O uso de fungicidas químicos vem também sofrendo uma série de restrições, principalmente devido ao seu efeito residual, aparecendo todos os anos nova legislação sobre a colocação de produtos fitofarmacéuticos no mercado que permitam uma utilização sustentável destes pesticidas.

Os meios de luta disponíveis no combate à Doença da Tinta do Castanheiro não têm, até hoje, resolvido de forma eficiente e duradoura os problemas sanitários das culturas atacadas por este parasita. O controlo da doença baseia-se em impedir a infecção e limitar a dispersão do patógeno mediante medidas culturais, biológicas e químicas (Smith et al., 1992). Os tratamentos químicos propostos são muito diversos: pulverização da copa das árvores infectadas com fungicidas e adubações foliares, injeções no tronco das árvores doentes e aplicação de diferentes produtos fungistáticos às raízes doentes e ao solo (Navarro et al., 2004).

Actualmente estão a se investigadas formas alternativas para o controlo desta doença, como por exemplo, a aplicação de produtos à base de fosfitos.

Os fosfitos são os sais ou os ésteres do ácido fosforoso, não são tóxicos para a planta e têm propriedade fungicida (Cohen & Coffey, 1986). A sua acção sobre os fungos pode-se dar de uma forma directa (Fenn & Coffey, 1985; Rohrbach & Schenck, 1985) ou através da activação de mecanismos de defesa da planta, como o estímulo à produção de fitoalexinas (Guest & Grant, 1991; Jackson et al., 2000). O tratamento com fosfitos induz a planta a apresentar resposta imediata ao ataque de patogéneos (Guest & Bompeix, 1990).

Na Austrália, o uso de fosfitos têm produzido bons resultados sobre o controlo de *P. cinnamomi* em ecossistemas naturais, (Shearer & Tippett, 1989; Hardy et al., 2001). A aplicação de fosfito reduziu significativamente a extensão da doença em florestas de *Banksia* (Shearer et al., 2004). Estudos de Pilbeam et al. (2000) e Tynan et al. (2001) mostram o sucesso dos tratamentos de fosfito na redução da colonização de *P. cinnamomi* em plantas nativas do Oeste da Austrália. Em Espanha, Navarro et al. (2006) têm demonstrado a eficácia do fungicida fosfonato no controlo de *P. cinnamomi* em *Quercus* spp.

Perante estes resultados os fungicidas fosfonatos poderão ser uma mais-valia na luta contra a doença da tinta do castanheiro.

## 1.4 – Os fosfitos na protecção vegetal

### 1.4.1 – O fósforo e sua influência na planta

O fósforo é um dos principais elementos necessários para o crescimento e desenvolvimento de todas as espécies vivas. O fósforo não ocorre naturalmente como elemento livre, pois é muito reactivo, combinando-se rapidamente com outros elementos, como o oxigénio e o hidrogénio. O ciclo global do fósforo ocorre pela oxidação e redução de compostos de fósforo por reacções de transferência de electrões (McDonald et al., 2001). Embora as bactérias estejam envolvidas na reacção redox do fósforo (Adams & Conrad, 1953; Imazu et al., 1998), o mecanismo bioquímico e genético dessas transformações não estão ainda bem compreendidos. Quando o fósforo é oxidado, o produto é um ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), no qual quatro átomos de oxigénio estão ligados a um único átomo de fósforo. A pH neutro o ião ortofosfato está presente como uma mistura de  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . É na forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  que o ião ortofosfato é normalmente transportado no interior das células das plantas. O ião  $\text{PO}_4^{3-}$  está intimamente envolvido com a bioenergética celular e a regulação metabólica, e é também um importante componente estrutural das macromoléculas tais como os ácidos nucleicos e fosfolípidos. Desempenha um papel crítico em praticamente todos os principais processos metabólicos nas plantas, incluindo fotossíntese e respiração. Ao contrário do que acontece em algumas células bacterianas (Adams & Conrad, 1953; Imazu et al., 1998) o fosfato não pode ser reduzido no interior das células de plantas ao seu estado de oxidação mais baixo. Em vez disso, o ião  $\text{PO}_4^{3-}$  é sequestrado no interior dos vacúolos das células ou incorporado na forma orgânica (ex: inicialmente como ATP) via foto- ou por fosforilação oxidativa. A fosforilase de fosfato de certos ésteres altamente energéticos por enzimas amido fosforilase também resulta na incorporação directa do fosfato nos compostos orgânicos (Plaxton, 1998).

Apesar da sua importância para o metabolismo das plantas, o fosfato é um dos nutrientes menos disponíveis em muitos ecossistemas aquáticos e terrestres. A maior parte do fósforo na crosta terrestre ocorre numa forma mineral insolúvel que é largamente indisponível para as plantas (Plaxton, 1998). O uso maciço de fosfatos em fertilizantes (90% do fosfato mineral usado mundialmente), demonstra que o teor de fosfato livre na maioria dos solos está em níveis sub-óptimos para o crescimento das plantas. É largamente aceite que o fosfato é o único nutriente, contendo fósforo, importante para o óptimo crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, ao

longo dos últimos 20 anos uma forma reduzida de fosfato conhecida como fosfito ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ) tem sido usada cada vez mais, para melhorar o rendimento de muitas culturas, embora, o uso extensivo de fosfitos e seus produtos relacionados, na agricultura, tenha levantado controvérsia na comunidade científica (McDonald et al., 2001).

#### 1.4. 1.1 – Fosfanato

No sentido mais lato, o termo fosfonato descreve qualquer composto contendo uma ligação carbono-fósforo. Alguns exemplos de compostos fosfonatos incluem os insecticidas organofosforados, medicamentos antivirais, retardadores de chama e alguns herbicidas. Os compostos fosfonatos também podem ocorrer de forma natural em algumas formas de vida, incluindo os *Protozoa*, moluscos, coelenterates e Oomicetas (Guest & Grant, 1991). Os fosfonatos foram inicialmente estudados como fertilizantes na Alemanha e nos Estados Unidos durante as décadas de 1930 e 1940 (Guest & Grant, 1991). Alguns dos termos usados para identificar produtos fosfonatos encontram-se descritos no Quadro 5.

#### 1.4.1.2 – Fosfato

Os fungicidas e fertilizantes fosfonatos não devem ser confundidos com os fosfatos derivados de fertilizantes tais como o fosfato de amónio e o tri-superfosfato, apesar de os fosfonatos e os compostos de fosfato serem quimicamente muito similares, eles diferem significativamente na forma como actuam na planta e no fungo (Landschoot & Cook, 2005).

O fosfato ( $\text{HPO}_4^-$ ) é transportado nas plantas e incorporado no interior das células, onde forma uma importante molécula de energia (ATP) e componentes estruturais das membranas das células e ADN. É essencial para o crescimento radicular, fotossíntese e respiração nas plantas. Os fungicidas e fertilizantes fosfonatos são absorvidos pela planta e incorporados no interior das células como iões fosfito ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ). Este ião tem menos um átomo de oxigénio que o fosfato e por isso não actua da mesma maneira que o fosfato na planta. Embora o ião fosfito possa ser transportado para o interior das células das plantas, não parece estar envolvido em qualquer fase do metabolismo do fósforo (produção de ATP, fotossíntese ou respiração). No solo, ao longo do tempo, o fertilizante fosfonato no solo pode ser convertido por bactérias podendo depois ser translocado e metabolizado pelas plantas. Esta conversão não é

considerada um meio muito eficiente de libertação de fósforo para a planta quando comparado com os fertilizantes com fosfato. O ião fosfito tem efeito fungitóxico directo em certos patógenos de plantas, um benefício que não é encontrado com o ião fosfato (Landschoot & Cook, 2005).

Quadro 5 – Alguns dos importantes termos usados para classificar os produtos fosfonatos (adaptado de Landschoot & Cook, 2005).

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>
Fosfonato	Qualquer composto contendo uma ligação carbono-fósforo. Normalmente usado para descrever produtos feitos de sais ou ésteres do ácido fosforoso.
Ácido fosforoso	Substância sólida anídrica. Composto químico descrito pela fórmula $\text{HPO}(\text{OH})_2$ ou $\text{H}_3\text{PO}_3$ . O ingrediente básico dos produtos fosfonatos.
Ácido fosfónico	Ácido forte produzido por dissolução de ácido fosforoso em água. O termo ácido fosfónico é mais comumente conhecido como ácido fosforoso.
Fosfito	Os fosfitos são os sais ou os ésteres do ácido fosforoso. O fosfito mais comum é o fosfito de potássio e é feito por mistura de uma solução de hidróxido de potássio com ácido fosfónico. O fosfito de potássio é também referido como um sal mono e di-potássio do ácido fosforoso em alguns produtos fosfonatos. As plantas transportam iões fosfito ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ) mas eles não são usados no metabolismo do fósforo. Os fosfitos têm propriedades fungicidas.
Etil fosfonato	Composto orgânico ligado a um ião alumínio formando alumínio tris (O-Etil fosfonato) ou fosetil-Al, o ingrediente activo do Aliette.
Ácido fosfórico	Ácido forte usado no fabrico do fertilizante fosfato.
Fosfato	Principal componente do fertilizante fosfato, usado na forma de fosfato de amónio, fosfato de potássio ou fosfato de cálcio. As plantas translocam-no e usam os iões fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ou $\text{HPO}_4^-$ ) para ATP, ADN, fotossíntese, respiração e outras funções metabólicas. O fosfato não tem propriedades fungicidas.

#### 1.4.1.3 – Modo de acção do ião fosfonato

O modo de acção dos fungicidas fosfonatos tem sido uma longa fonte de controvérsia e mistério. Alguns cientistas acreditam que a maior parte do efeito fungicida destes produtos é exercido directamente sobre o fungo patogénico enquanto outros acreditam na combinação do efeito directo sobre o fungo e da estimulação das defesas do hospedeiro na prevenção da doença (Landschoot & Cook, 2005). Afek & Szejnberg (1989) sugeriam a existência de que o ião fosfonato tinha uma dupla forma de acção para o controlo de doenças produzidas por Oomicetas: a) *acção indirecta*: potenciando os mecanismos de defesa naturais da planta; b) *acção directa*: actuando como fungistático. Estudos com fungicidas fosfonatos incorporados em meio de cultura não mostraram efeito directo em *Pythium aphanidermatum*. Portanto, foi assumido que o modo de acção não envolve a morte do fungo directamente mas antes a estimulação

de defesas químicas e físicas da planta contra as doenças (Sanders et al., 1983). No entanto, estudos posteriores mostraram que meios com fungicidas fosfonatos não inibiam fungos porque a concentração de fosfato no meio de cultura era demasiado alta. Baixando a quantidade de fosfato no meio de cultura permitia ao ião fosfito inibir directamente o fungo. Aparentemente, quer o fosfito quer o fosfato competem pelo mesmo transporte na membrana celular e o fosfato tende a competir com o fosfito por esses locais, bloqueando assim a captação de fosfito pelo fungo (McDonald et al, 2001). Esta descoberta conduziu os cientistas a explorar o modo como os fungicidas fosfonatos perturbam o metabolismo dos fosfatos no fungo.

Num estudo usando três espécies de *Phytophthora*, cientistas australianos descobriram que os fungicidas fosfonatos interferem com o metabolismo do fosfato por acumulação de dois composto, polifosfato e pirofosfato, nas células do fungo. Pensa-se que a acumulação deste composto desvia ATP para outros processos metabólicos resultando num decréscimo do crescimento do fungo (Landschoot & Cook, 2005).

Mais recentemente foram encontrados fungicidas fosfonatos que inibiam algumas enzimas-chave necessárias para o crescimento e desenvolvimento em *Phytophthora palmivora* (Stehmann & Grant, 2000). Esses estudos sugerem que o modo de acção é pelo menos parcialmente, se não maioritariamente, inibidor directo de fungos. Além disso, o modo de acção dos fungicidas fosfonatos parece ser suficientemente amplo pelo que o potencial de desenvolvimento de resistência não é tão forte como com outros fungicidas sistémicos (Landschoot & Cook, 2005).

Considerando que o ião fosfito tem pouco ou nenhum efeito no metabolismo do fósforo na planta, parece improvável que possa prevenir doenças por estimulação das defesas do hospedeiro. Todavia, alguns estudos revelam que quando certas espécies de *Phytophthora* infectam determinadas espécies de plantas tratadas com fungicidas fosfonatos, são produzidos inibidores químicos do fungo chamados de fitoalexinas (Landschoot & Cook, 2005). Um recente estudo envolvendo *Eucalyptus* mostrou que a concentração de ião fosfito na planta pode determinar a dimensão da activação das defesas do hospedeiro. Quando a concentração do ião fosfito nas raízes era baixo, as enzimas de defesa do hospedeiro eram estimuladas, mas quando a concentração do ião fosfito era alta as enzimas de defesa do hospedeiro continuavam inalteradas e os iões fosfito inibiam o crescimento do patógeno antes de ele causar doença (Jackson et al., 2000).

Estudos da estimulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro são difíceis de conduzir e requerem a capacidade de detectar minúsculas quantidades de compostos complexos na planta. Portanto, muito pouco é conhecido acerca do modo de acção em comparação com o efeito directo dos fungicidas fosfonatos.

#### 1.4.1.4 – O uso do fosfito em agricultura

Na década de 30 do século XX, foram realizados estudos usando uma variedade de diferentes compostos contendo fósforo, para determinar a sua eficácia como meio de fornecer fósforo para suportar o crescimento vegetal. Determinou-se que o fosfito era uma fonte de fósforo muito pobre, e a conversão, no solo, de fosfito para fosfato era muito lenta para ser agronomicamente relevante (MacIntire, et al., 1950; Guest & Grant, 1991). Plantas cultivadas em solos nos quais o fosfito tinha sido acrescentado ao suplemento natural dos níveis de fosfato, tinham um crescimento mais fraco do que as plantas cultivadas em solos adubados com fosfonato. Em alguns casos, quando as plantas foram replantadas no mesmo solo um ano após a aplicação inicial, elas cresciam melhor que as plantas plantadas no ano da aplicação. Isso deve-se à lenta conversão do fosfito em fosfato no solo (MacIntire, et al., 1950). No entanto, o aumento da produtividade nunca foi equivalente à observada quando as necessidades em fósforo foram fornecidas directamente às culturas pelo fosfato. Estes resultados, em conjunto com o facto de o fosfito ser um meio mais caro para fornecer fósforo do que o fosfato na forma de superfosfato, levou ao desinteresse por parte dos agricultores na aplicação dos fosfitos. No entanto o fosfito viria a retornar à agricultura quando na década de 70 do século XX se verificou que o fosfito reagia com o etanol para formar etil-fosfonato reprimindo eficazmente algumas doenças radiculares causadas por fungos da ordem dos Oomicetas, particularmente *Phytophthora* sp. (Guest & Grant, 1991, Smillie et al., 1989). O etil-fosfonato tornou-se naquela época amplamente comercializado sob o nome comercial Aliette® ou fosetil-Al. A parte Al do nome deriva do uso de iões de alumínio ( $Al^{3+}$ ) para neutralizar a única carga do ião etil-fosfonato, de modo que o fosetil-Al tem três iões etil-fosfonatos que são ionicamente ligados a um ião Al. O fosfito, libertado na planta por hidrólise do etil-fosfonato, é o responsável pela protecção das plantas contra fungos patogéneos (Smillie et al., 1989; MacIntire, et al., 1950; Fen & Coffey, 1984; Guest & Grant, 1991; Grant et al., 1992). O sal de potássio do fosfito é um agente igualmente eficaz para controlar infecções em plantas

provocadas por *Phytophthora* sp. (Smillie et al., 1989; MacIntire, et al., 1950; Fen & Coffey, 1984; Guest & Grant, 1991; Grant et al., 1992, Niere, et al., 1994). Assim, tanto o K-fosfito como o fosetyl-Al foram largamente empregues para o controlo contra um grande número de doenças provocadas por *Phytophthora* (McDonald et al, 2001).

Observações de Fen & Coffey (1984, 1989) demonstraram que o local de acção dos fungicidas fosfitos está dentro do fungo patogénico e não na planta hospedeira, em que 0,1 a 3 mM de fosfito inibiram marcadamente o crescimento de micélio de *Phytophthora* em culturas estéreis (Fen & Coffey, 1984; Grant et al., 1992, Griffith et al., 1992; Niere, et al., 1990, 1994). Estudos de espectroscopia  $^{31}\text{P}$ -NMR revelaram que o fosfito perturba o metabolismo do fósforo em *Phytophthora* causando uma acumulação massiva de polifosfato (poly-P) e pirofosfato (PPi) (Guest & Grant, 1991; Niere, et al., 1990; 1994). A toxicidade do fosfito em *Phytophthora*, sugerida em grande parte, pela sua capacidade em aumentar pirofosfatos, e por conseguinte, indirectamente inibir reacções pirofosforilase-chave, essenciais ao anabolismo (Griffith et al., 1992). A eficácia do fosfito em suprimir *Phytophthora* depende em certa medida da concentração de fosfato que está presente (Grant et al., 1992). Isto foi explicado quando foi mostrado que o ião fosfato e ião fosfito competem pelos mesmos transportadores em *Phytophthora* e que o fosfato é melhor competidor por esses locais que o fosfito (Griffith et al., 1992). Concentrações relativamente altas de fosfito também inibiram as actividades de algumas enzimas da via glicolítica e oxidativa das pentose-fosfatos em extractos clarificados de *Phytophthora* (Stehmann & Grant, 2000). Isto suporta a hipótese de que o fosfito pode inibir algumas enzimas que actuam num único sítio em *Phytophthora*. Actualmente existe ampla concordância de que esses efeitos deletérios directos dos fosfitos no metabolismo de *Phytophthora* são importantes no controlo de doenças causadas nas plantas. No entanto, este caminho pode não ser o único meio através do qual o controlo é exercido (Guest & Grant, 1991; Smillie et al., 1989; Jackson et al., 2000).

As plantas possuem mecanismos endógenos eficazes e altamente sofisticados para combater as infecções. Elas são capazes de reconhecer a maior parte dos organismos invasores e responder à presença deles gerando poderosos produtos antimicrobianos na zona circundante da tentativa de invasão.

Plantas tratadas com fosfito parecem ser capazes de gerar compostos antimicrobiano mais eficazes do que aquelas não tratadas com o produto químico (Guest & Grant, 1991; Smillie et al., 1989). Existe uma estreita relação entre a concentração de

fosfito presente no local de invasão e o ponto em que os genes de defesa da planta são expressos (Jackson et al., 2000). Assim, foi argumentado que a capacidade do fosfito em controlar a patogenicidade em *Phytophthora* sp. resulta da sua influência na planta, tornando-a capaz de responder mais eficazmente ao organismo invasor. Outros têm mantido que o fosfito não tem nenhum efeito sobre as plantas, mas sobre o fungo restringindo directamente o crescimento do fungo patogénico, e obrigando-o a alterar a sua estrutura de tal forma que é melhor reconhecido como um invasor pela planta hospedeira. Um reconhecimento mais eficiente permite uma resposta de defesa mais rápida e, conseqüentemente, mais eficaz (McDonald et al., 2001). Estudos de Jackson et al. (2000) parecem ter reconciliado estas duas hipóteses. Ensaio com *Eucalyptus marginata* inoculados com *P. cinnamomi* mostraram que o efeito do fosfito em controlar o patógeno é determinado pela concentração de fosfito na interface hospedeiro-patogénico. Quando a concentração de fosfito nas raízes era baixa, o fosfito interagia com o local de ingresso para estimular enzimas de defesa do hospedeiro (Jackson et al., 2000). Quando a concentração de fosfito nas raízes era elevada, as defesas mantiveram-se inalteradas, e o fosfito pareceu actuar directamente no patógeno para inibir o seu crescimento antes

#### 1.4.1.5 – Influência do fosfito na planta

Independentemente do mecanismo pelo qual os fosfitos actuam para restringir *Phytophthora* durante a sua invasão em plantas, trabalhos recentes têm revelado que os fosfitos têm efeitos directos sobre as plantas, independentemente de eles terem sido modificados por *Phytophthora* ou não. Plantas tratadas com fosetil-Al ou fosfito rapidamente acumulam fosfito no interior das suas células (Carswell et al., 1996; Fen & Coffey, 1984; Forster et al., 1998). O fosfito é móvel no floema e acumula nos tecidos em crescimento (Carswell et al., 1996, Guest & Grant, 1991). Como as plantas são incapazes de metabolizar o fosfito (Carswell et al., 1996, Guest & Grant, 1991, Carswell et al., 1996), ele persiste nos seus tecidos por longos períodos. No entanto, tem sido geralmente assumido que os níveis de fosfito utilizados para controlar *Phytophthora* não interferem com o crescimento ou o metabolismo das plantas hospedeiras (Mcintire et al., 1950). No entanto estudos recentes demonstraram que concentrações relativamente baixas de fosfito (ex: 1-2 mM) quebram drasticamente o desenvolvimento de mecanismos de compensação de deficiência de fosfato mas não em

plantas de *Brassica nigra* fertilizadas com fosfato (Carswell et al., 1996, Guest & Grant, 1991). Análises  $^{31}\text{P}$ -NMR revelam que os níveis intracelulares de fosfato geralmente decrescem em *Brassica* sp. tratada com fosfito, e que o fosfato acumulado em folhas e raízes desce para níveis até 6 a 16 vezes mais baixo em plantas fertilizadas com fosfato. Além disso, os tratamentos com fosfito reduzem a indução de enzimas (Ex: APase) e transportadores (ex: transportadores de fosfato na membrana plasmática) característicos da resposta por déficit de fosfato em *Brassica* sp. (Carswell et al., 1996, 1997). A redução de 75% da indução da APase causada por tratamentos com fosfito de células de *B. napus* com deficiência de fosfato foi correlacionada com um decréscimo similar da quantidade da proteína APase imunoreactiva (Carswell et al., 1997). Um aumento da razão raiz:caules, o padrão da resposta morfológica da planta à limitação de nutrientes não foi observado quando plantas de *B. nigra* privadas de fosfato cresceram na presença de 1,5 mM de fosfito (Carswell et al., 1996). No entanto o mecanismo preciso pelo qual os fosfitos exercem esse efeito é desconhecido, pondo-se a hipótese que os fosfitos interferem com o sinal da cadeia de transdução pelo qual *Brassica* sp. detecta e responde à deficiência de fosfato a nível molecular.

O anião fosfito parece representar uma ferramenta útil com a qual continuar a investigar a “via do sinal de transdução” pelo qual as plantas respondem à falta de fosfato a nível molecular.

## 2 – Objectivos

A Doença da Tinta do Castanheiro é uma das principais causas do desaparecimento dos sotos. Os meios de luta disponíveis para combater as doenças provocadas por *Phytophthora* que atacam as raízes não têm, até hoje, resolvido de forma eficiente e duradoura os problemas sanitários das culturas e das florestas atacadas por estes parasitas.

Os fosfitos e em particular o fosfonato de potássio têm sido utilizados com sucesso no controlo de *P. cinnamomi* em várias espécies florestais.

O efeito dos fosfonatos na protecção dos castanheiros deve também ser estudado de forma a melhorar as possibilidades de luta contra a Doença da Tinta do Castanheiro.

Com este trabalho pretende-se avaliar o efeito da aplicação foliar de fosfonato potássico em plantas jovens de castanheiro na protecção radicular associada a *P. cinnamomi*. Para concretizar este objectivo geral foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos que a seguir se indicam:

- avaliar a eficácia dos tratamentos de fosfonato potássico por aplicação foliar e com carácter preventivo em castanheiro;
- avaliar o efeito protector do fosfonato potássico por inoculação de *P. cinnamomi* na parte aérea da planta como medida indirecta da protecção radicular;
- estudar o efeito *in vitro* do fosfonato potássico e fosetil-Al em diferentes isolados de *Phytophthora* e outros fungos associados com o castanheiro.

### 3 – Material e Métodos

#### 3.1 – Material biológico

##### 3.1.1 – Isolados *P. cinnamomi* e *P. cambivora* utilizados neste estudo

Os isolados de *Phytophthora* utilizados neste estudo foram obtidos de castanheiros com sintomas da Doença da Tinta, na região de Trás-os-Montes (Gouveia et al., 2004), e mantidos na colecção de *Phytophthora* da Escola Superior Agrária de Bragança (Quadro 6). Os isolados são mantidos em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar - Difco, 39 g/L) a 25°C no escuro.

Quadro 6 – Isolados de *Phytophthora* usados no ensaio

Espécie	Código	Hospedeiro	Ano de isolamento
<i>P. cinnamomi</i>	Pr 120	<i>Castanea sativa</i>	2001
	Pr 125	Solo	2001
	804	<i>Castanea sativa</i>	1998
	810	<i>Castanea sativa</i>	1998
<i>P. cambivora</i>	Ar 102	<i>Castanea sativa</i>	2001
	Pr 135	Solo	2001

##### 3.1.2 – Outros organismos utilizados neste estudo

###### 3.1.2.1 – *Pisolithus tinctorius*

O fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius*, é uma espécie habitante do solo e da rizosfera que estabelece relações de simbiose com as raízes do castanheiro. *P. tinctorius* cresceu em meio de cultura sólido Melin & Norkans (MMN) (Marx, 1969), sendo depois repicado para placas em PDA (Potato Dextrose Agar, 39g/l).

###### 3.1.2.2 – *Cryphonectria parasitica*

*Cryphonectria parasitica* é o fungo responsável pelo cancro do castanheiro. O isolado de *C. parasitica* utilizado encontra-se na colecção de *C. parasitica* da Escola Superior Agrária de Bragança sendo mantido em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar - Difco, 39 g/L) a 25°C no escuro.

### 3.1.3 – Plantas

Para a realização dos ensaios utilizaram-se plantas de castanheiro com um ano de idade. A estratificação das castanhas foi feita antecipadamente em areia, e mantida com humidade para que ocorra a germinação. As castanhas germinadas são plantadas em tabuleiros alveolados com a dimensão de 6cm x 6cm x 20cm para o normal crescimento das plantas de castanheiro.

## 3.2 – Substratos

### 3.2.1 – Substrato de inóculo

A quantidade de *P. cinnamomi* utilizada para a inoculação dos substratos foi conseguida por subcultura do isolado Pr120. *P. cinnamomi* (Pr120) foi previamente colocado a crescer em placas de Petri com PDA (Potato Dextrose Agar – Difco, 39 g/L), a 25°C no escuro, sendo depois todo o conteúdo do crescimento micelial colocado em sacos com um litro de uma mistura de vermiculite humedecida, antecipadamente esterilizada por autoclave (120 °C/ durante uma hora). Os sacos de vermiculite inoculados foram selados para evitar contaminações e colocados a incubar em estufa a 20-22°C e regularmente homogeneizado para uniformizar o crescimento do parasita no substrato.

### 3.2.2 – Substrato dos vasos

Utilizou-se um substrato de terra vegetal e areia na proporção de 3:1 previamente desinfestado com formol e inoculado com 0,5 % (v/v) com *P. cinnamomi*, que previamente cresceu em sacos com vermiculite. O substrato de plantação foi colocado em vasos com 15 Litros de capacidade.

## 3.3 – Meios de cultura utilizados

Para a manutenção de *P. cinnamomi* para os diferentes ensaios utilizou-se o meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar – Difco, 39 g/L).

Para o isolamento das raízes com sintomas de doença da Tinta do Castanheiro utilizou-se o meio selectivo P<sub>10</sub>VPH de Tsao e Guy (1977) tendo-se substituído o meio base por PDA (39 g L<sup>-1</sup>, Difco) mantendo-se todos os outros constituintes nas proporções indicadas (PCNB – 100 mg L<sup>-1</sup>; hymexazol – 50 mg L<sup>-1</sup>; vancomicina – 200

mg L<sup>-1</sup>; pimaricina – 10 mg L<sup>-1</sup>), sendo estes constituintes adicionados após a autoclavagem (121°C/20 minutos) e quando o meio de cultura atinge uma temperatura de cerca de 45°C.

### **3.4 – Fosfonato de potássio**

O fosfonato de potássio utilizado no ensaio é uma formulação líquida de potássio e de fósforo em forma de fosfonato (fósforo total (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 30% (p/v); potássio total (K<sub>2</sub>O) 20% (p/v)). Este produto é comercializado com o nome Atlante<sup>®</sup>. A solução stock foi preparada com água destilada à concentração de 3 ml/L. O fosfonato potássico foi aplicado aos castanheiros por pulverização através de um pequeno pulverizador.

### **3.5 – Estudo do efeito de fosfonato potássico na protecção das raízes do castanheiro**

O efeito da aplicação foliar do fosfonato potássico foi estudado em plantas de castanheiro com um ano de idade nas estufas do IPB/ESA. Os castanheiros foram colocados em vasos de 15 litros (Figura 5) de capacidade que se mantiveram em estufa durante quatro meses, com rega semanal por inundação e rega por nebulização a intervalos regulares durante o período diurno.



Figura 5 – Disposição dos vasos na bancada

Ultrapassada a crise inicial da transplantação (24 horas) aplicou-se fosfonato potássico à concentração de 3 ml L<sup>-1</sup> por pulverização foliar, ou água destilada, até as folhas ficarem molhadas pela aplicação da calda. Deixou-se secar o produto durante 24 horas e restabeleceu-se o sistema de rega. Utilizaram-se 5 vasos com 3 plantas por vaso por tratamento e de forma aleatória, na bancada da estufa.

### 3.5.1 – Parâmetros fisiológicos

#### 3.5.1.1 – *Altura e diâmetro ao nível do colo*

No final do ensaio, realizaram-se medições, do crescimento anual, do crescimento total e do diâmetro ao nível do colo, em todas as plantas.

#### 3.5.1.2 – Biomassa

A biomassa foi determinada, considerando os diferentes órgãos da planta, folhas, caules e raízes, no fim do ensaio. O material fresco foi pesado e posto a secar numa estufa a 60°C, até peso constante.

#### 3.5.1.3 – Comprimento e número de raízes secundárias

No final do ensaio retiraram-se os castanheiros dos vasos e lavaram-se as raízes cuidadosamente com água para tirar toda a terra aderente, evitando danificar as raízes para não produzir perda de biomassa radicular. Após lavagem em água corrente as raízes foram fotografadas e em seguida avaliou-se o comprimento radicular e o número de raízes secundárias.

### 3.5.2 – Sintomatologia

Avaliou-se a sintomatologia na parte aérea da planta, de 15 em 15 dias durante todo o período do ensaio. No final do ensaio as plantas foram retiradas dos vasos, retirando-se o substrato aderente às raízes com a ajuda de água corrente. Avaliou-se o sistema radicular quanto à presença e extensão de podridões radiculares, sintomas característicos do desenvolvimento de *Phytophthora*.

Adicionalmente retiraram-se segmentos de raízes doentes e com aspecto saudável para isolamento de *P. cinnamomi* no meio de cultura selectivo P<sub>10</sub>VPH de Tsao e Guy (1977). Os tecidos de raiz utilizados para o isolamento de *Phytophthora* foram desinfectados com hipoclorito de sódio a 3% durante cerca de 2 minutos sendo

posteriormente lavados com água destilada. Retirou-se o excesso de humidade com papel absorvente e colocaram-se os troços de raiz em meio selectivo P<sub>10</sub>VPH, sendo em seguida postos a incubar a 20-22°C. A presença de *Phytophthora* foi confirmada por observação microscópica, ao nível das hifas.

### **3.6 – Avaliação do efeito protector do fosfonato potássico por inoculação de *P. cinnamomi* na parte aérea da planta**

Foram seleccionadas 10 plantas jovens de castanheiro com a altura e diâmetro aproximadamente iguais e mantidas nas estufas da ESA/IPB com condições de temperatura e humidade reguladas.

A inoculação foi realizada com micélio, obtido por crescimento em PDA (Potato Dextrose Agar - Difco, 39g/L) do isolado de *P. cinnamomi* (Pr120), dividido em pequenos troços de igual diâmetro.

Para a realização da inoculação seccionou-se o ápice do ramo, transferiu-se o disco de micélio e meio de cultura e foi posto em contacto com a secção transversal previamente seccionada. Para evitar a dessecação dos tecidos e criar um ambiente húmido, cobriu-se a zona próxima da inoculação com papel de alumínio (Figura 6).



Figura 6 – Inoculação em ramo destacado

As plantas de castanheiro foram tratadas por pulverização foliar com fosfonato potássico (Atlante) à concentração de 3 mL<sup>-1</sup> enquanto que as plantas que serviram de controlo foram pulverizadas com água destilada.

A aplicação de fosfonato potássico foi feita três dias antes da inoculação dos ramos com *P. cinnamomi*.

Mediu-se o comprimento da lesão provocada pelo desenvolvimento do parasitismo nesses tecidos, evidenciada pela necrose dos tecidos da planta inoculada.

As medições da dimensão da lesão (DL), expressa em milímetros, foram realizadas ao fim de 25 dias após a inoculação, altura em que as plantas começavam a evidenciar amarelecimento das folhas.

### **3.7 – Avaliação da toxicidade *in vitro* do fosfonato potássico e fosetil-Al**

Para determinar o efeito tóxico do fosfonato potássico e do fosetil-Al, expresso pelo EC<sub>50</sub> (concentração que inibe o crescimento micelial em 50 %), realizaram-se teste de toxicidade *in vitro* em diferentes isolados de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* assim como em *Pisolithus tinctorius*, um fungo *Basidiomicete* que estabelece relações de simbiose micorrízica com as raízes do castanheiro.

#### 3.7.1 – Toxicidade *in vitro* do fosfonato potássico

O efeito tóxico do fosfonato potássico foi avaliado pelo crescimento micelial dos diferentes isolados de *Phytophthora* e pelo isolado de *Pisolithus tinctorius*, em meio PDA contendo 0, 5, 20 e 50 µg mL<sup>-1</sup> de fosfonato potássico. De cada isolado em crescimento activo retiraram-se secções circulares com 5 mm de diâmetro e colocaram-se no centro de placas de Petri. As placas (cinco por isolado) foram incubadas a 22-24 °C durante 5 dias. No final deste período mediu-se o crescimento micelial, efectuando-se medições do raio maior e raio menor, e determinou-se para cada concentração a percentagem de redução de crescimento micelial por comparação com o crescimento na ausência de fosfonato potássico.

#### 3.7.2 – Toxicidade *in vitro* do fosetil-Al

O efeito tóxico do fosetil-Al foi avaliado pelo crescimento micelial dos diferentes isolados de *Phytophthora*, em meio PDA contendo 0, 20, 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup> de fosetil-Al. De cada isolado em crescimento activo retiraram-se secções circulares com 5

mm de diâmetro e colocaram-se no centro de placas de Petri. As placas (cinco por isolado) foram incubadas a 22-24 °C durante 5 dias. No final deste período mediu-se o crescimento micelial, efectuando-se medições do raio maior e raio menor, e determinou-se para cada concentração a percentagem de redução de crescimento micelial por comparação com o crescimento na ausência de fosetil-Al.

O valor que reduz o crescimento micelial em 50% (EC<sub>50</sub>) em cada isolado em estudo foi obtido por regressão linear dos valores probit da percentagem de redução do crescimento e dos valores da concentração expressos em logaritmo.

### 3.8 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS 16.0<sup>®</sup>, recorrendo-se ao teste *t-student* para amostras independentes e procedendo-se à avaliação da significância da diferença entre os valores médios das variáveis em estudo para os dois grupos considerados. Os pressupostos deste método estatístico, nomeadamente a normalidade e a homogeneidade das variâncias nos dois grupos, foram avaliados através do teste de Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ) e do teste de Levene, respectivamente. . Pontualmente, em casos onde foram detectados ligeiros desvios relativamente à distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (não-paramétricos). Consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças das médias cujo *p-value* do teste é inferior ou igual a 0,05.

## 4 – Resultados

### 4.1 – Efeito de fosfonato potássico na protecção do castanheiro

#### 4.1.1 – Parâmetros fisiológicos

##### 4.1.1.1 – Altura e diâmetro ao nível do colo

O crescimento das plantas de castanheiro foi registado no final do ensaio, ao fim de 4 meses de crescimento.

Os valores do crescimento do ano, altura total e diâmetro ao nível do colo das plantas de castanheiro, expresso em centímetros, nas diferentes modalidades (aplicação foliar de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico), encontram-se no Quadro 7.

Quadro 7 – Valores (em centímetros) do crescimento do ano, altura total e do diâmetro ao nível do colo

Plantas	<i>Com fosfonato potássico</i>			<i>Sem fosfonato potássico</i>		
	Cres. ano	Alt. total	Diâmetro	Cres. ano	Alt. total	Diâmetro
1	4,0	32,0	0,40	6,0	27,5	0,40
2	10,0	29,0	0,50	11,0	29,0	0,85
3	12,0	31,5	0,70	6,5	25,5	0,40
4	7,5	27,0	0,60	8,0	28,5	0,50
5	19,0	32,0	0,90	12,0	31,5	0,60
6	5,0	29,5	0,60	15,5	34,0	0,55
7	6,5	25,5	0,65	7,0	21,0	0,40
8	10,0	28,5	0,50	23,5	37,5	0,50
9	12,0	30,5	0,70	12,5	32,0	0,45
10	11,5	25,0	0,65	7,5	29,0	0,60
11	10,0	30,0	0,60	6,5	22,0	0,70
12	13,0	27,5	0,65	11,0	27,5	0,40
13	11,5	31,0	0,70	18,0	34,5	0,60
14	3,5	20,0	0,70	9,5	31,5	0,50

Cres. – Crescimento, Alt. – Altura

As plantas que não foram sujeitas à aplicação foliar de fosfonato potássico apresentaram um crescimento em altura ligeiramente superior às plantas em que houve aplicação foliar de fosfonato potássico. No entanto, os valores obtidos com o teste *t*-student não evidenciaram diferenças significativas entre os crescimentos do ano ( $P=0,44$ ), para as duas modalidades ensaiadas.

A média do crescimento do ano obtida no final do ensaio nas plantas com aplicação foliar de fosfonato potássico foi de 9,68 cm, e nas plantas sem aplicação de fosfonato potássico foi de 11,04 cm (Quadro 8).

As alturas médias obtidas no final do ensaio para cada um dos tratamentos foram de 28,50 cm para as plantas com aplicação de fosfonato potássico e 29,35 cm para as plantas sem aplicação de fosfonato potássico. A análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre as modalidades (teste *t*-student,  $P=0,57$ ).

Quadro 8 – Valores médios (em centímetros) do crescimento do ano, altura total e do diâmetro ao nível do colo

	<i>Crescimento ano</i>	<i>Altura total</i>	<i>Diâmetro</i>
	média±sd	média±sd	média±sd
Com fosfonato	9,68±4,14 a	28,50±3,33 a	0,63±0,11 a
Sem fosfonato	11,04±5,07 a	29,36±4,62 a	0,53±0,13 b

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Em cada coluna, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

As plantas tratadas com fosfonato potássico por aplicação foliar apresentaram um maior diâmetro ao nível do colo que as plantas sem aplicação foliar de fosfonato potássico.

O diâmetro médio ao nível do colo médio registado para as plantas sujeitas a tratamento foliar com fosfonato potássico foi de 0,63 cm, enquanto que para as plantas onde não houve tratamento por aplicação foliar com fosfonato potássico foi de 0,53 cm. Como esta variável apresentou ligeiros desvios da distribuição normal (apenas no grupo de plantas não sujeitas à aplicação do fosfonato), utilizou-se o teste de Mann-Whitney para avaliar a significância da diferença de médias. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $P=0,043$ ).

#### 4.1.1.2 – Biomassa da parte aérea

Os valores da biomassa da parte aérea das diferentes modalidades tratadas encontram-se no Quadro 9.

As plantas sem tratamento com fosfonato potássico obtiveram um valor de biomassa da parte aérea (folhas e caules) ligeiramente superior às plantas tratadas com fosfonato potássico por aplicação foliar. No entanto a análise estatística (teste *t*-student) não revelou diferenças significativas entre os valores de peso seco da biomassa das

plantas tratadas com fosfonato potássico por aplicação foliar e os valores das plantas em que não houve aplicação foliar de fosfonato potássico.

Quadro 9 – Valor da biomassa da parte aérea (folhas e caules) das plantas de castanheiro nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

Plantas	<i>Com fosfonato potássico</i>			<i>Sem fosfonato potássico</i>		
	Folhas	Caules	Total	Folhas	Caules	Total
1	0,94	1,57	2,51	1,63	1,50	3,13
2	1,37	2,59	3,96	2,78	3,59	6,36
3	3,05	3,99	7,04	1,09	1,21	2,23
4	1,19	2,06	3,25	1,80	2,16	3,95
5	1,86	2,61	4,47	3,34	2,90	6,24
6	2,41	3,35	5,75	3,14	3,11	6,24
7	1,95	3,10	5,05	1,42	1,14	2,56
8	2,35	2,19	4,54	3,42	3,67	7,09
9	2,35	2,73	5,08	1,39	2,15	3,55
10	1,75	2,26	4,01	2,24	2,73	4,97
11	1,72	0,87	2,58	1,46	1,43	2,89
12	2,58	3,71	6,29	2,10	2,19	4,29
13	1,05	1,36	2,40	3,03	3,80	6,82
14	-	-	-	1,99	2,94	4,94

- sem dados

Na Figura 7 registam-se os resultados da biomassa da parte aérea expressos em gramas.

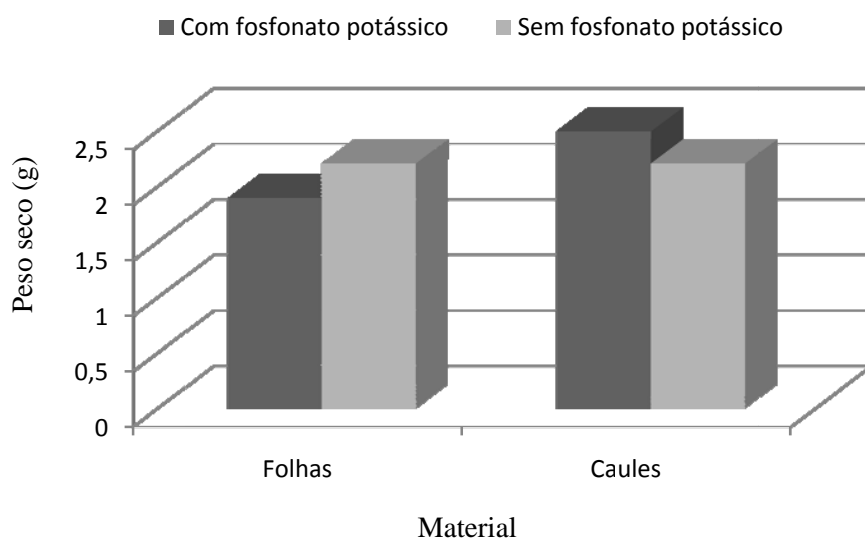


Figura 7 – Biomassa das folhas e caules das plantas de castanheiro tratadas com fosfonato potássico por pulverização foliar e sem aplicação de fosfonato potássico.

O valor de biomassa médio mais elevado foi registado nas plantas em que não houve aplicação foliar de fosfonato potássico com 4,67 g e o valor de biomassa médio mais baixo foi registado nas plantas com aplicação foliar de fosfonato potássico com 4,38 g (Quadro 10).

Quadro 10 – Valores médios da biomassa total da parte aérea (folhas e caules) nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
	média±sd	média±sd
Biomassa total	4,38±1,47 a	4,67±1,66 a

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Em cada linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

As plantas com aplicação foliar de fosfonato potássico obtiveram um valor médio de biomassa das folhas inferior (1,89 g) em relação às plantas sem aplicação foliar de fosfonato potássico (2,20 g) (Figura 7). No entanto o mesmo não se passou relativamente à biomassa dos caules, pois aqui o valor médio de biomassa registado foi superior (2,49 g) em relação às plantas sem aplicação foliar de fosfonato potássico (2,20 g).

#### 4.1.1.3 – Biomassa radicular

Os valores da biomassa das raízes secundárias das diferentes modalidades encontram-se no Quadro 11.

Os valores médios da biomassa obtidos para as raízes secundárias foram de 2,34g para a modalidade em que houve aplicação foliar de fosfonato potássico e 1,05g na modalidade sem aplicação de fosfonato de potássico (Quadro 12). A análise estatística (teste *t*-student) revelou diferenças significativas entre estes dois tratamentos ( $P=0,014$ ).

Quadro 11 – Biomassa das raízes secundárias nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

<i>Plantas</i>	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
1	1,88	1,55
2	0,70	1,83
3	3,32	0,54

Quadro 11 – Biomassa das raízes secundárias nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico) (continuação)

<i>Plantas</i>	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
4	1,47	0,81
5	-	0,92
6	5,19	0,81
7	4,97	0,38
8	2,56	1,25
9	1,58	0,86
10	2,30	1,30
11	-	0,88
12	0,32	1,25
13	2,49	1,14
14	1,29	1,16

- sem dados

Quadro 12 – Valores médios da biomassa total das raízes secundárias nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
	média±sd	média±sd
Biomassa raiz	2,34±1,52 a	1,05±0,38 b

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Na linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

O peso seco das raízes secundárias foi o parâmetro fisiológico mais afectado pela inoculação de *P. cinnamomi*. As plantas tratadas por aplicação foliar de fosfonato potássico apresentaram valores de biomassa das raízes secundárias maiores que as plantas não tratadas com fosfonato potássico, indicando assim que *P. cinnamomi* não causou danos no sistema radicular dos castanheiros que receberam o tratamento com fosfonato potássico.

#### 4.1.1.4 – Comprimento e número de raízes secundárias

No Quadro 13 apresentam-se os valores obtidos do comprimento total da raiz secundária, comprimento das raízes sãs, comprimento das raízes doentes e a percentagem de raízes doentes nas duas modalidades.

Nas plantas que cresceram no substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação de fosfonato potássico todo o sistema radicular evidenciava podridão radicular, quer considerando o comprimento radicular, quer o número de raízes.

Exceptua-se a esta situação uma única planta que, não evidenciando sintomas da Doença da Tinta na parte aérea, apresentava 70 % do total do comprimento das raízes com podridão radicular e praticamente todas as raízes infectadas.

Nas plantas tratadas por pulverização foliar com fosfonato potássico, 50% das plantas não evidenciava qualquer sintoma de podridão nas raízes, sendo que as outras 50% manifestaram sintomas, apresentando infecção radicular variando entre os 2 e os 16% do comprimento radicular.

O maior comprimento radicular foi registado nas plantas em que houve aplicação foliar de fosfonato potássico com 2046,0 cm e o menor comprimento radicular foi registado nas plantas sem aplicação foliar de fosfonato potássico com 243,0 cm.

Quadro 13 – Comprimento radicular nos diferentes tratamentos (com aplicação foliar de fosfonato potássico e sem aplicação foliar de fosfonato potássico) (CRT – comprimento radicular total; CRS – comprimento das raízes sãs; CRD – Comprimento das raízes doentes; %RD – percentagem de raízes doentes)

Plantas	<i>Com fosfonato potássico</i>				<i>Sem fosfonato potássico</i>			
	CRT	CRS	CRD	%RD	CRT	CRS	CRD	%RD
1	694,5	694,5	0,0	0,0	-	-	-	-
2	1201,5	1201,5	0,0	0,0	617,2	0,0	617,2	100
3	2046,0	2046,0	0,0	0,0	387,5	0,0	387,5	100
4	773,0	773,0	0,0	0,0	392,0	0,0	392,0	100
5	1098,0	998,0	50,0	4,55	389,0	0,0	389,0	100
6	1939,5	1939,5	0,0	0,0	545,0	0,0	545,0	100
7	954,5	794,0	160,5	16,82	243,0	0,0	243,0	100
8	1108,0	1108,0	0,0	0,0	806,5	0,0	806,5	100
9	680,5	653,5	27,0	3,97	831,0	0,0	831,0	100
10	937,5	908,5	29,0	3,09	972,5	0,0	972,5	100
11	617,5	521,0	96,5	15,63	540,5	0,0	540,5	100
12	968,5	906,0	62,5	6,45	841,0	0,0	841,0	100
13	683,5	662,5	16,0	2,34	623,5	0,0	623,5	100
14	676,0	676,0	0,0	0,0	1396,5	414,5	982,0	70,32

- sem dados

No Quadro 14 encontram-se os valores médios do comprimento radicular total, comprimento das raízes sãs e comprimento das raízes doentes. Os resultados estatísticos revelam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os dois tratamentos. Neste caso, dado o

ligeiro afastamento da normalidade por parte das variáveis num dos grupos, utilizou-se igualmente o teste de Mann-Whitney.

Quadro 14 – Valores médios do comprimento radicular total, do comprimento das raízes sãs e do comprimento das raízes doentes nos diferentes tratamentos (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
	média±sd	média±sd
Comprimento radicular	1027,04±450,11a	660,40±309,25b
Comprimento raízes sãs	991,57±31,88a	464,17±114,96b
Comprimento raízes doentes	31,54±47,54a	628,52±240,83b

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Em cada linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

Relativamente à percentagem de raízes doentes, as plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação foliar de fosfonato potássico registaram 95,17 % do total de raízes doentes, enquanto nas plantas tratadas com o fosfonato potássico esse valor foi de 3,07% (Figura 8).

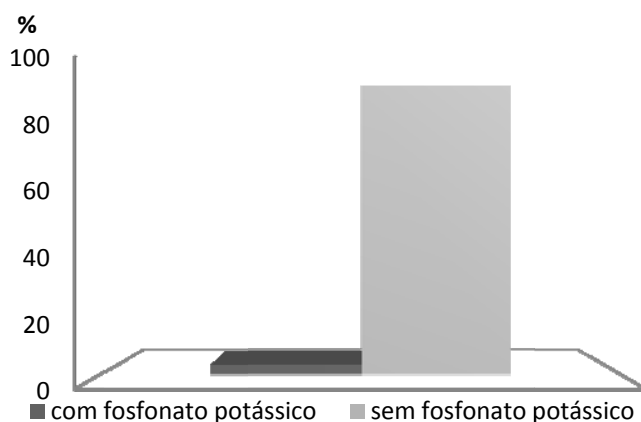


Figura 8 – Percentagem de raízes doentes nas diferentes modalidades (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

O número total de raízes e de raízes doentes encontra-se no Quadro 15. As plantas tratadas por aplicação foliar de fosfonato potássico apresentaram um número médio de 49,57 raízes (Quadro 16), enquanto as plantas não tratadas com fosfonato potássico apresentaram um número inferior de raízes (36,62) estando quase todas doentes, tendo revelado na análise estatística (teste *t*-student) diferenças significativas entre estes dois tratamentos ( $P=0,0227$ ).

Quadro 15 – Número de raízes total e o número de raízes doentes nas diferentes modalidades

Plantas	<i>Com fosfonato potássico</i>			<i>Sem fosfonato potássico</i>		
	Nº raízes	Raízes doentes	% Raízes doentes	Nº raízes	Raízes doentes	% Raízes doentes
1	55	0	0,0	-	-	-
2	54	0	0,0	34	34	100
3	92	0	0,0	27	27	100
4	36	0	0,0	28	28	100
5	45	12	26,7	36	36	100
6	65	0	0,0	36	36	100
7	41	10	24,4	21	21	100
8	58	0	0,0	37	37	100
9	38	1	2,6	56	56	100
10	23	1	4,3	46	46	100
11	48	12	25,0	40	40	100
12	63	6	9,5	45	45	100
13	34	1	2,9	41	41	100
14	42	0	0,0	29	24	82,8

- sem dados

Das plantas tratadas por aplicação foliar de fosfonato potássico, sete plantas não apresentaram qualquer raiz doente. Nas restantes raízes os sintomas de podridão variaram entre 2 e 26 % do número das raízes.

Quadro 16 – Valores médios do número de raízes e comprimento radicular nos diferentes tratamentos (com aplicação de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato potássico)

	<i>Com fosfonato potássico</i>	<i>Sem fosfonato potássico</i>
	média±sd	média±sd
Número de raízes	49,57±17,01a	36,62±9,31b
Raízes doentes	3,07±4,76a	36,23±0,38b

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Em cada linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

As plantas tratadas com fosfonato potássico por aplicação foliar evidenciaram na parte radicular sintomas de podridão em 50% das raízes variando entre os 2 e 16 % do comprimento das raízes aparecendo os sintomas apenas num número reduzido de raízes. Nas plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação

foliar de fosfonato potássico todo o sistema radicular apresentava sintomas de podridão radicular e evidenciavam um menor número de raízes.

#### 4.1.2 – Sintomatologia

A sintomatologia foi registada de 15 em 15 dias durante todo o período do ensaio. No final do ensaio verificou-se que todas as plantas de castanheiro que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e tratadas por aplicação foliar de fosfonato potássico estavam vivas sem evidenciar sintomas da Doença da Tinta. Nesta modalidade 50 % das plantas tratadas com aplicação foliar de fosfonato potássico apresentavam entre os 2 e os 17% do sistema radicular infectado sem no entanto apresentarem sintomas na parte aérea.

Todas as plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação foliar de fosfonato potássico evidenciaram sintomas característicos da doença com epinastia e necrose das folhas (Figuras 9 e 10), com excepção de uma planta que apresentava 70 % do total do comprimento das raízes com podridão radicular e praticamente todas as raízes infectadas sem no entanto evidenciar sintomas da Doença da Tinta na parte aérea.



Figura 9 – Plantas de castanheiro crescendo em substrato inoculado com *Phytophthora cinnamomi*, nas diferentes modalidades (com e sem aplicação de fosfonato de potássio).



Figura 10 – Sintomatologia em plantas de castanheiro (a – plantas sem aplicação de fosfonato, b – plantas com aplicação de fosfonato)

O sistema radicular das plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação foliar de fosfonato potássico apresentava-se com um aspecto húmido e enegrecido com grande parte das raízes destruídas, consequência da infecção por este patógeno (Figura 11).



Figura 11 – Sistema radicular sem sintomas da Doença da Tinta (a), com sintomas da Doença da Tinta (b)

Todas as plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e sem aplicação de fosfonato potássico evidenciaram presença de *Phytophthora* em todas as raízes inoculadas em meio selectivo P<sub>10</sub>VPH (Quadro 17).

A sintomatologia da parte aérea traduz a evolução da doença na parte radicular avaliada de uma forma directa neste trabalho por observação visual dos sintomas de podridão das raízes depois de confirmada a presença de *P. cinnamomi* por isolamento em meio selectivo (Figura 12).

Quadro 17 – Detecção de *Phytophthora cinnamomi* nas raízes secundárias

	Raízes com aspecto saudável	Raízes doentes
Com fosfonato potássico	-	+
Sem fosfonato potássico	+	+

(+) Isolamentos positivos, (-) Ausência de isolamentos positivos

Nas plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e com aplicação de fosfonato potássico verificou-se que apesar da presença de *Phytophthora* nas raízes que tinham um aspecto doente, a planta não manifestava os sintomas característicos desta doença.

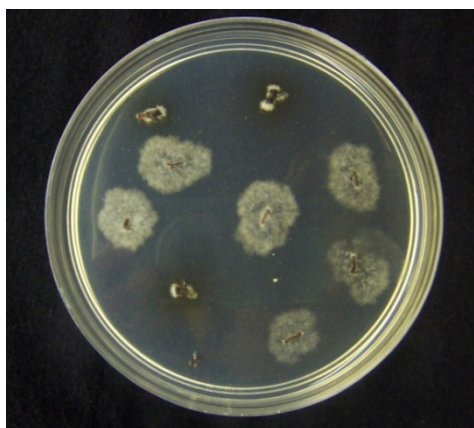


Figura 12 – Isolamento de troços de raiz de plantas de castanheiro infectadas com *Phytophthora cinnamomi*, em meio selectivo P<sub>10</sub>VPH.

#### 4.2 – Avaliação indirecta do efeito protector do fosfonato potássico por inoculação de *P. cinnamomi* na parte aérea da planta

Os valores do comprimento da lesão encontram-se no Quadro 18. O comprimento máximo da lesão nas plantas tratadas por aplicação foliar de fosfonato potássico foi de 2,0 cm e nas plantas sem qualquer tratamento o comprimento máximo da lesão foi de 10,0 cm.

Quadro 18 – Valores (centímetros) do comprimento da lesão

	Comprimento da lesão (cm)				
	1	2	3	4	5
Com fosfonato potássico	2,0	0,1	1,5	0,0	2,0
Água destilada	10,0	4,5	7,4	8,4	7,0

Os valores da média da dimensão da lesão obtida por este processo de inoculação, nas diferentes condições de tratamento (com aplicação foliar de fosfonato potássico e sem aplicação de fosfonato) encontram-se expressos no Quadro 19.

Quadro 19 – Valores da média da dimensão da lesão nas diferentes condições de tratamento

	média±sd
Com fosfonato potássico	1,12±1,00
Água destilada	7,46±2,02

sd – desvio padrão da média

O desenvolvimento da lesão é diferente nas duas modalidades estudadas. Os resultados destas inoculações revelaram que os castanheiros sujeitos a tratamento por aplicação foliar de fosfonato potássico evidenciavam um crescimento de lesão muito inferior ao das plantas sem qualquer tratamento, sendo as diferenças entre os tratamentos estatisticamente significativas ( $P=0,00023$ ) após análise pelo teste *t*-student (Figura 13).

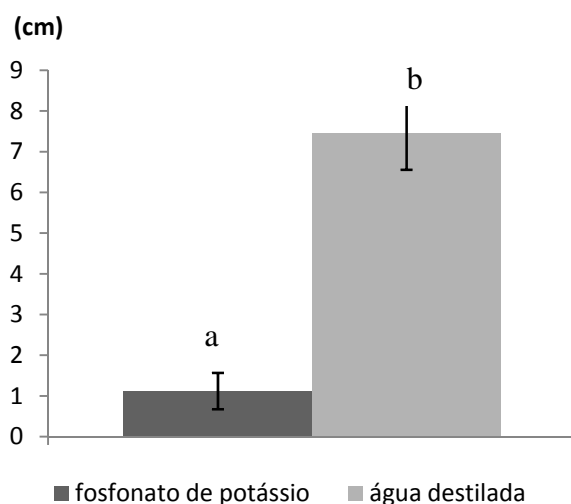


Figura 13 – Comprimento médio da lesão em castanheiros inoculados com *Phytophthora cinnamomi* 25 dias após aplicação de fosfonato potássico. Barras verticais correspondem ao erro padrão.

**Nota:** Em cada coluna, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3 – Toxicidade *in vitro* do fosfonato potássico e fosetil-Al

#### 4.3.1 – Resposta *in vitro* ao fosfonato potássico

O crescimento micelial dos diferentes isolados nas diferentes concentrações de fosfonato potássico em estudo (5 µg/ml; 20 µg/ml e 50 µg/ml de fosfonato potássico e controlo) é apresentado no Quadro 20.

Todos os isolados apresentaram um aumento da inibição com o aumento da concentração de fosfonato potássico, no entanto o grau de inibição não foi igual para todos os isolados. O isolado 804 foi aquele que foi mais inibido pelo fosfonato potássico obtendo 100% de inibição a 50 µg/ml (Figura 14). O isolado de *C. parasitica*, um fungo patogénico do castanheiro e que se desenvolve na parte aérea, foi o que apresentou menor inibição (36,61%) na concentração mais alta de fosfonato potássico.

O crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* em estudo foi inibido em função das diferentes concentrações de fosfonato de potássio em estudo (5 µg/ml; 20 µg/ml e 50 µg/ml) (Figura 15). Os isolados de *P. cambivora* (Ar102 e Pr135) apresentaram crescimentos inferiores em relação aos isolados de *P. cinnamomi* (Pr120, Pr125, 810, 804).

Quadro 20 – Crescimento micelial (centímetros) dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804), *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135), *Pisolithus tinctorius* e *Cryphonectria parasitica*, em meio de cultura PDA acrescido de 5 µg/ml; 20 µg/ml e 50 µg/ml de fosfonato potássico e controlo.

	Controlo	5 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
	média±sd	média±sd	média±sd	média±sd
<i>P. cinnamomi</i> Pr120	7,32±0,44a	1,88±0,08b	1,26±0,2c	0,34±0,22d
<i>P. cinnamomi</i> Pr125	6,80±0,44a	4,45±0,46b	3,73±0,06cb	3,10±0,75c
<i>P. cinnamomi</i> 810	7,80±0,48a	2,22±0,13b	1,86±0,19b	0,96±0,09c
<i>P. cinnamomi</i> 804	7,08±0,48a	1,78±0,16b	0,78±0,22c	0,00±0,00d
<i>P. cambivora</i> Ar102	5,18±0,38a	3,20±0,56b	3,20±0,56b	1,20±0,07c
<i>P. cambivora</i> Pr135	1,36±0,25a	0,94±0,15ba	0,72±0,08b	0,50±0,12b
<i>Pisolithus tinctorius</i>	2,03±0,21a	1,17±0,15b	0,77±0,12c	0,70±0,10c
<i>Cryphonectria parasitica</i>	7,47±0,06a	5,50±1,08b	5,10±0,44b	4,73±0,15b

sd – desvio padrão da média

**Nota:** Em cada linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

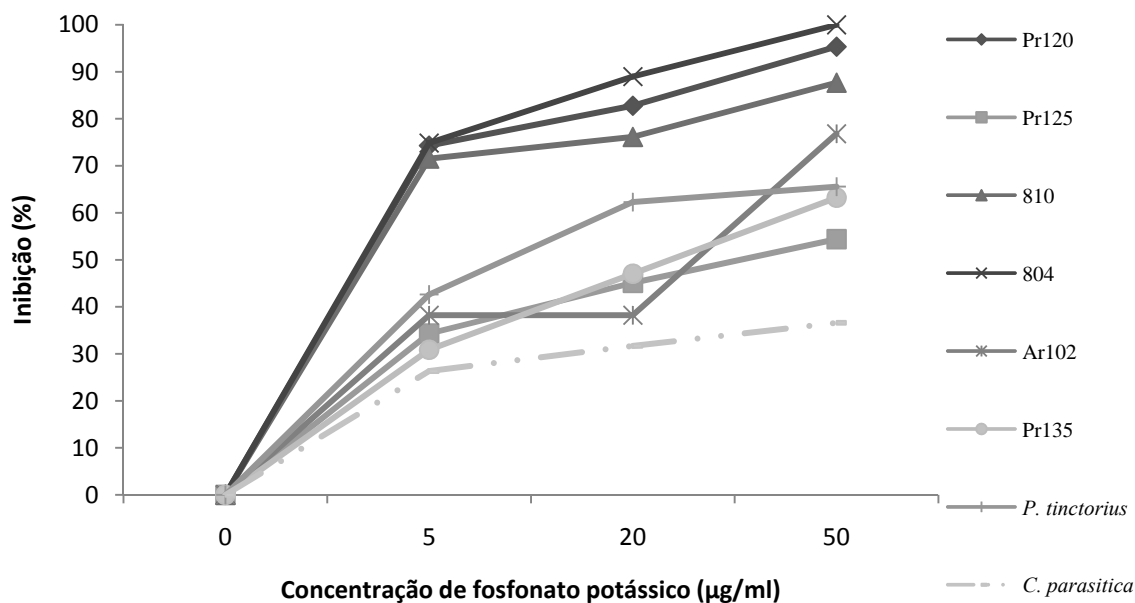


Figura 14 – Percentagem da inibição do crescimento dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804) e *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135) em meio PDA acrescido de fosfonato potássico. Cada ponto representa a média de cinco repetições.

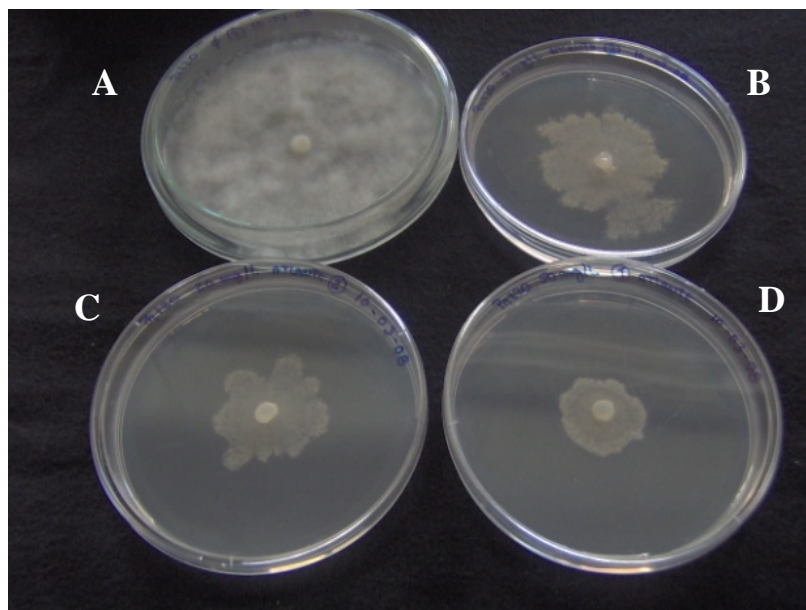


Figura 15 – *Phytophthora cinnamomi* em diferentes concentrações de fosfonato potássico (A – Controlo, B – 5 µg/ml, C – 20 µg/ml, D – 50 µg/ml)

O estudo realizado evidenciou grande variação na sensibilidade dos diferentes organismos ao fosfonato potássico. Os valores do EC50 variariam entre 0,64 mgL<sup>-1</sup> para o isolado mais sensível, um isolado de *P. cinnamomi*, e 867,36 mgL<sup>-1</sup> para o isolado mais tolerante o fungo *C. parasitica* associado com o Cancro do Castanheiro.

O EC<sub>50</sub> (concentração que inibe o crescimento micelial em 50 %) do fosfonato potássico em *P. cinnamomi* foi para os diferentes isolados inferior ou próximo de 1 mgL<sup>-1</sup> com excepção do isolado Pr 125 que apresentou valores muitas vezes superiores e da mesma ordem de grandeza nas diferentes repetições. *P. cambivora* apresentou valores superiores aos de *P. cinnamomi* e com grande variabilidade entre os isolados testados (Quadro 21).

O fungo micorrízico *Pysolithus tinctorius*, um *Basidiomycete* com capacidade de estabelecer relações de simbiose com as raízes de castanheiro, apresentou um valor elevado de EC<sub>50</sub> mas inferior ao obtido no isolado de *Phytophthora* (Pr 125) com menor sensibilidade ao fosfonato potássico

O particular modo de acção dos fosfonatos não permite, no entanto, induzir o efeito deste parâmetro no grau de protecção das raízes do castanheiro e apenas ensaios com estes isolados permitirão obter essas informações.

O valor do EC<sub>50</sub> em *Pisolhitus tinctorius* indica baixa toxicidade directa do fosfonato potássico mas uma vez mais este parâmetro não é um bom indicador do seu efeito na interacção micorrízica em plantas onde se aplicou fosfonato, aspecto que é necessário avaliar antes de utilização generalizada destes produtos em castanheiro.

Quadro 21 – EC<sub>50</sub> do fosfonato potássico (concentração que inibe o crescimento micelial em 50%) em diferentes isolados de *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cambivora*, *Pisolithus tinctorius* e *Cryphonectria parasitica*.

<i>Espécie</i>	<i>Isolado</i>	<i>Valor de EC<sub>50</sub>* (mgL<sup>-1</sup>)</i>
<i>P. cinnamomi</i>	Pr120	1,34
	Pr125	31,56
	810	0,64
	804	0,97
<i>P. cambivora</i>	Ar102	9,92
	Pr135	22,44
<i>Pisolithus. tinctorius</i>		14,10
<i>Cryphonectria parasitica</i>		867,36

\* Concentração que inibe o crescimento micelial em 50%

O isolado de *C. parasitica* obteve um valor de EC<sub>50</sub> muito elevado (876,36 mgL<sup>-1</sup>). Este valor de EC<sub>50</sub> indica baixa toxicidade directa do fosfonato potássico sobre

este fungo mas cujo efeito na protecção do castanheiro contra este fungo terá de ser avaliado *in vivo* dado o particular modo de acção destas substâncias.

A avaliação da toxicidade do fosfonato potássico pela determinação do EC<sub>50</sub> em meio PDA evidenciou uma grande variabilidade entre os isolados de *P. cinnamomi* e também em *P. cambivora*, outra espécie de *Phytophthora* associada com a doença da tinta em castanheiro. A variabilidade dos valores obtidos indica susceptibilidade não uniforme da população das espécies parasitas.

#### 4.3.2 – Resposta *in vitro* ao fosetil-Al

O crescimento micelial dos diferentes isolados nas diferentes concentrações de fosetil-Al em estudo (20 µg/ml; 50 µg/ml e 100 µg/ml de fosetil-Al e controlo) é apresentado no Quadro 22.

Os isolados de *P. cinnamomi* em estudo, apresentaram um maior crescimento que os isolados de *P. cambivora*. O isolado de *P. cinnamomi* (Pr120) foi o que apresentou maior crescimento na concentração mais alta (100 µg/ml) de fosetil-Al, sendo o isolado de *P. cambivora* (Pr135) aquele que apresentou um menor crescimento nessa mesma concentração. No entanto o aumento da concentração de fosetil-Al não se traduziu numa inibição do crescimento micelial nos isolados das diferentes *Phytophthoras* (Figura 16).

Quadro 22 – Crescimento micelial (centímetros) dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* (Pr120, 810 e 804) e *Phytophthora cambivora* (Ar102 e Pr135) crescendo em meio de cultura PDA acrescido de 20 µg/ml; 50 µg/ml e 100 µg/ml de fosfonato potássico e sem adição de fosfonato potássico (controlo).

	<i>Controlo</i>	<i>20 µg/ml</i>	<i>50 µg/ml</i>	<i>100 µg/ml</i>
	média±sd	média±sd	média±sd	média±sd
Pr120	7,32±0,44a	7,02±0,64a	7,10±0,99a	7,28±0,76a
810	7,80±0,48a	7,32±0,35ba	6,88±0,22b	7,06±0,17b
804	7,08±0,48a	6,74±0,77a	6,50±0,43a	6,44±0,73a
Ar102	5,18±0,38a	4,72±0,33ba	4,34±1,11ba	5,52±0,26b
Pr135	1,36±0,25a	1,64±0,48ba	1,14±0,11b	2,08±0,15b

sd – desvio padrão

**Nota:** Em cada linha, as médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

Em geral, crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* em estudo não foi significativamente ( $P>0,05$ ) inibido pelas diferentes concentrações de fosetil-Al (20  $\mu\text{g/ml}$ ; 50  $\mu\text{g/ml}$  e 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Neste contexto, não é possível estabelecer a relação entre a dose do produto em ensaio e os efeitos tóxicos no organismo, pelo que o valor do  $\text{EC}_{50}$  não pode ser determinado com base nas concentrações em estudo. O resultado é no entanto o esperado uma vez que o fosetil-Al é considerado sem toxicidade directa nestes organismos. A acção tóxica do fosetil-Al só se manifesta *in vivo* ou seja quando aplicado na planta.



Figura 16 – *Phytophthora cinnamomi* em diferentes concentrações de Aliette (A - 20  $\mu\text{g/ml}$  B - 50  $\mu\text{g/ml}$  C - 100  $\mu\text{g/ml}$ )

## 5 – *Discussão e Conclusões*

*P. cinnamomi* é um parasita reconhecido desde 1922 quando Rands identificou o causador da doença radicular da árvore da canela (*Cinnamomum burmanii*) na região de Sumatra. Considerado como parasita vegetal de distribuição mais generalizada e com maior número de hospedeiros (Zentmeyer, 1981), está presente em todos os continentes e causa infecção em mais de 1000 espécies vegetais onde as plantas lenhosas e arbustivas estão largamente representadas (Zentmeyer, 1981). Considerado como parasita introduzido nas regiões onde actualmente provoca doenças com importância económica, o local de origem do parasita é ainda um tema com alguma controvérsia, sendo considerado a região da Malásia e do Norte da Austrália um possível centro de origem. Crandall & Gravatt (1969) referem que o parasita teria sido disperso pelos portugueses, espanhóis e franceses pelos diferentes continentes. Uma outra teoria considera o parasita um organismo frequente na microflora do solo e seriam as alterações climáticas o factor determinante no desenvolvimento deste organismo como parasita Woods (1953). Esta teoria foi considerada pouco verosímil por Zentmeyer (1980) mas a relevância actual do tema e os estudos relacionados com os efeitos das alterações climáticas poderão proporcionar uma análise mais abrangente desta teoria.

*P. cinnamomi* invade inicialmente as raízes mais finas das plantas lenhosas podendo também causar podridões nas raízes de maior dimensão e mesmo no colo da planta tendo ainda capacidade de infectar folhas e frutos em condições laboratoriais. Sendo um parasita das raízes, o controlo da doença é considerado particularmente difícil (Gouveia, 1994) e de resultados não completamente previsíveis mesmo com a aplicação de substâncias sistémicas uma vez que o parasita se encontra no solo com elevada capacidade de sobrevivência mesmo na ausência de hospedeiro. Têm ainda a capacidade de rapidamente produzir grande quantidade de propágulos (zoósporos) que vão causar infecção nas raízes. A dificuldade do tratamento do solo por substâncias de acção tóxica no parasita é igualmente pouco eficaz pela dificuldade associada ao grande volume de solo que seria necessário tratar e à necessidade de o manter isento dos parasitas durante todo o ciclo de vida do hospedeiro.

Com este trabalho estudou-se a eficácia do tratamento com fosfonato potássico, (Atlante<sup>®</sup>) com carácter preventivo e por aplicação foliar, na protecção das raízes do castanheiro em relação *P. cinnamomi*. A resposta ao tratamento foi estudada com base

nos sintomas evidenciados pela planta tanto na parte aérea como nas raízes e em parâmetros fisiológicos relacionados com o crescimento da planta.

O termo “fosfonato” refere-se a compostos contendo um corpo fósforo-hidrogénio (P-H) que confere actividade biológica contra Oomicetas (Guest et al., 1995). O modo de acção do fosfonato não está ainda bem compreendido. No entanto é geralmente aceite que mecanismos complexos são directa e indirectamente responsáveis na perturbação do metabolismo do fósforo dos patogéneos e na estimulação dos mecanismos de defesa dos hospedeiros (Guest & Grant, 1991; Guest et al., 1995; Smillie et al., 1989).

Relativamente aos parâmetros fisiológicos, as plantas que não foram sujeitas à aplicação foliar de fosfonato potássico apresentaram um crescimento em altura ligeiramente superior às plantas em que houve aplicação foliar de fosfonato potássico, sem no entanto apresentarem diferenças significativas. O diâmetro ao nível do colo das plantas com aplicação foliar de fosfonato potássico foi superior ao das plantas sem aplicação de fosfonato potássico, tendo os valores obtidos mostrado diferenças significativas entre as modalidades.

A biomassa da parte aérea, determinada em folhas e caules, não apresenta diferenças significativas entre as plantas de castanheiro tratadas com fosfonato potássico por aplicação foliar e as plantas sem aplicação de fosfonato, embora os valores das plantas sem aplicação de fosfonato potássico seja ligeiramente superior.

Os valores da biomassa radicular apresentaram diferenças significativas entre as plantas de castanheiro tratadas por pulverização foliar com fosfonato potássico e as plantas sem tratamento. As plantas que cresceram em substrato inoculado com *P. cinnamomi* e com aplicação de fosfonato potássico apresentaram todo o sistema radicular, quer considerando o comprimento radicular quer considerando o número de raízes, com podridão radicular, excepto uma planta, que apesar de apresentar 70% do sistema radicular infectado ainda não apresentava sintomas da Doença da Tinta na parte aérea. Das plantas que foram tratadas com fosfonato potássico, só 50% apresentaram sintomas da doença nas raízes, variando essa infecção entre os 2 e os 16% do sistema radicular. Os resultados obtidos mostram que *P. cinnamomi* infectou o sistema radicular dos castanheiros, sendo visíveis os sintomas nas plantas que não foram tratadas. A aplicação de fosfonato potássico protegeu o sistema radicular uma vez que passados quatro meses a grande maioria das raízes não apresentavam sintomas de podridão radicular. De referir que embora não sejam visíveis sintomas nas raízes a presença de *P.*

*cinnamomi* foi obtida por isolamento do parasita em meio selectivo no substrato e nas raízes das plantas sem sintomas.

O parâmetro fisiológico mais afectado pela inoculação de *P. cinnamomi* é o peso seco das raízes. *P. cinnamomi* actua sobre o sistema radicular em geral, mas especialmente sobre as raízes finas (Smith, 1992). Navarro et al. (2006) verificaram também que o peso seco da raiz secundária tinha sido o parâmetro fisiológico mais afectado quando estudaram o efeito do fosfonato em *Quercus ilex* e *Quercus suber*.

A protecção conferida pelo fosfonato de potássio foi também avaliada por inoculação de *P. cinamomi* na parte aérea da planta. Este método pode considerar-se um método indirecto da avaliação do efeito protector e baseia-se na capacidade do hospedeiro limitar o crescimento do parasita. Este princípio é também aceite quando se avalia a resistência do castanheiro em relação a *Phytophthora* pelo método de inoculação em ramo destacado (Gouveia 1994; Fernández-López et al., 2001). O comprimento da lesão é superior nas plantas não tratadas com fosfonato potássico uma vez que não se encontravam protegidas. O facto de o parasita ter um crescimento limitado nos tecidos do hospedeiro quando se fez a aplicação do fosfonato de potássio permite associar esta característica à protecção conferida pelo fosfonato. Apesar de o método avaliar o efeito protector de forma indirecta a facilidade da sua execução poderá ser de grande utilidade para conhecer o período de tempo em que a planta se encontra protegida e estudar a concentração necessária para que o produto seja eficaz sem causar efeitos tóxicos.

A hipótese de acção dos fosfonatos estar relacionada com os mecanismos de resistência das plantas está fundamentada em evidências experimentais a nível bioquímico (Jackson et al., 2000; Daniel et al. 2005; Daniel & Guest 2006). Jackson et al. (2000) verificaram aumento de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa nomeadamente fenilalanina amónia liase (PAL), 4- comarato coenzima A ligase (4-CL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) em *Eucalyptus marginata* enquanto Daniel & Guest (2006) verificaram rápida agregação do citoplasma e migração do núcleo das células, fenómenos associados com reacções de hipersensibilidade, produção de superóxido ( $O_2^-$ ) e acumulação de compostos fenólicos na interacção susceptível de *A. thaliana* e *P. palmivora*. Daniel & Guest (2006) consideram ainda que a quantidade de produto presente no interior da planta não será suficiente para induzir efeito tóxico directo e esse efeito estará associado à acumulação de produtos de defesa da planta tóxicos para o fungo. O efeito tóxico do anião fosfonato estará relacionada com a

competição com o anião fosfato ( $\text{H}_3\text{PO}_4^-$ ) em diferentes enzimas e a diferença de sensibilidade entre as espécies dependerá da sua capacidade em distinguir o anião fosfonato do anião fosfato ou ATP e da capacidade de excluir o anião fosfonato na presença do anião fosfato (Stechmann & Grant, 2000). A presença do anião fosfonato nos sais inorgânicos do ácido fosfórico o seu reduzido custo assim como o fim do período de patente do tris-O-ethylphosphonate (fosetil-Al) determinaram o aparecimento de muitas substâncias baseadas neste princípio activo comercializadas como fertilizantes com ou sem indicação do seu efeito fungicida. Os fosfonatos são considerados (<http://www.epa.esa.gov/pesticides/biopesticides>) biopesticidas pela EPA-US e enquadrados nos fungicidas bioquímicos em termos regulamentares dado o seu particular modo de acção e por serem substâncias muito frequentes no ambiente, pese embora, o facto destes produtos não ocorrem naturalmente na natureza.

A aplicação foliar do fosfonato potássico, protegeu as raízes do castanheiro numa situação em que é de considerar elevada pressão de inoculo do parasita durante todo o período do ensaio. O estado saudável da grande maioria das raízes, mesmo depois de 4 meses, sugere que o mecanismo de defesa se situará nas primeiras etapas do processo de infecção como acontece nas interacções incompatíveis desencadeados nos hospedeiros resistentes. As plantas tratadas com fosfonato potássico evidenciaram um comportamento semelhante às plantas resistentes, não tendo proporcionado o crescimento do parasita quando inoculadas na parte aérea, ao contrário do que aconteceu com as plantas não tratadas com esta substância. As condições de aplicação do produto fazem supor que a substância ou produtos da sua degradação ou do seu metabolismo se encontrarão na raiz quando do contacto com o parasita o que desencadeará os mecanismos de defesa.

Em várias plantas o fosfonato é rapidamente detectado nas folhas e raízes em poucos minutos ou em algumas horas após aplicação e persiste durante um período substancial contribuindo com actividade biológica nos tecidos das plantas (Guest et al., 1995). Ouimette & Coffey (1989) reportam que uma quantidade elevada de fosfonato contabilizado para um efeito directo em *P. cinnamomi* foi registada em folhas e raízes de abacate durante oito semanas. No entanto é necessário aplicar fosfonato antes da infecção para um eficaz controlo da doença porque os valores variam significativamente dependendo do tempo de aplicação. A eficácia dos fosfonatos aumenta quando aplicado com carácter preventivo. Mesmo assim Marks & Smith (1992) encontraram um efeito positivo na redução dos danos provocados por *P. cinnamomi* em *Leucadendron* quando

os tratamentos se fazem de forma simultânea à infecção, e tem-se documentado o efeito protector quando se aplica 24 horas após a infecção (Rohrbach & Schenk, 1985).

A avaliação da toxicidade do fosfonato potássico pela determinação do EC<sub>50</sub> em meio PDA evidenciou uma grande variabilidade entre os isolados de *P. cinnamomi* e também em *P. cambivora*, outra espécie de *Phytophthora* associada com a doença da tinta em castanheiro. Os valores de EC<sub>50</sub> variaram entre 0,64 mgL<sup>-1</sup> e 31,56 mgL<sup>-1</sup> para *P. cinnamomi* e 9,92 mgL<sup>-1</sup> e 22,44 mgL<sup>-1</sup> para *P. cambivora*. Estes valores indicam um efeito tóxico mais elevado do fosfonato potássico, para os isolados de *Phytophthora*, quando comparado com o EC<sub>50</sub> do fosfito (Phyto-Fos-K, 33,7g/100ml) um outro produto com base em fosfonato potássico e comercializado numa formulação sólida pela A. M. C. Chemical S. Ltda. Os valores de EC<sub>50</sub> do Phyto-Fos-K, obtidos por Coelho et al., (2005), variaram entre 2,99 e 172,39 mgL<sup>-1</sup> para *P. cinnamomi* tendo *P. cambivora* apresentado valores entre 47,23 e 237,25 mgL<sup>-1</sup>.

A variabilidade nos valores obtidos indica susceptibilidade não uniforme da população das espécies parasitas e diferenciação de susceptibilidade dos isolados. O particular modo de acção dos fosfonatos não permite, no entanto, concluir sobre o efeito da substância no grau de protecção das raízes do castanheiro e apenas ensaios com estes isolados na presença da planta permitirão obter essas informações.

O crescimento micelial dos isolados estudados não foi inibido com o aumento da concentração do fosetil-Al, o que indica baixa toxicidade directa do fosetil-Al nas espécies de *Phytophthora*. Clerjeau & Beyries (1977); Bompeix et al. (1980) e Farid et al. (1981) tinham também já demonstrado a baixa toxicidade *in vitro* do fosetil-Al em diferentes espécies de *Phytophthora*. Os resultados obtidos neste ensaio confirmam esta afirmação, pois todos os isolados em estudo apresentaram o mesmo crescimento na presença das diferentes concentrações de fosetil-Al, e da mesma ordem de grandeza do controlo ou seja sem adição de fosetil-Al.

O valor do EC<sub>50</sub> em *Pisolithus tinctorius* indica baixa toxicidade directa do fosfonato potássico mas, uma vez mais, este parâmetro não é um bom indicador do seu efeito na interacção micorrízica em plantas onde se aplicou fosfonato potássico, aspecto que é necessário avaliar directamente nas plantas antes da utilização generalizada destes produtos em castanheiro.

O isolado de *C. parasitica*, um fungo patogénico da parte aérea do castanheiro, associado com a conhecida doença do Cancro do Castanheiro, obteve um valor de EC<sub>50</sub>

muito elevado ( $876,36 \text{ mgL}^{-1}$ ). Este valor de  $EC_{50}$  indica baixa toxicidade directa do fosfonato potássico sobre este fungo não sendo, uma vez mais possível avaliar o efeito na planta e consequentemente no controlo da doença.

*P. cinnamomi* é parasita em muitas espécies lenhosas onde os fosfitos foram igualmente testados tendo evidenciado eficácia no controlo da doença. Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro aos obtidos por Wilkinson et al. (2001), Hardy et al. (2001), Barrett et al. (2003) e Navarro et al. (2006), que avaliaram a acção curativa e preventiva da aplicação do fosfonato no controlo de *P. cinnamomi*.

A aplicação dos fosfitos pela via foliar, obviamente, não remove *P. cinnamomi* do ambiente solo tendo-se confirmado a sua presença no substrato dos vasos mesmo onde as raízes não manifestaram sintomas de podridão. Este aspecto tem implicações práticas importantes uma vez que a pressão do inoculo se mantém no solo e pode ser transportado para outros locais onde iniciará novos focos da doença. Conhecer o período de tempo em que as raízes ficam protegidas e o efeito do fosfonato potássico quando a infecção está já instalada nas raízes assim como as épocas e doses de aplicação são aspectos sobre os quais é necessário obter informações para tornar eficiente e permitir a inclusão deste meio de protecção das raízes do castanheiro em programas de protecção integrada.

O efeito do fosfonato de potássio em castanheiros adultos deve também ser estudado, ajustando as doses para evitar problemas de fitotoxicidade e desenvolver os processos de aplicação mais adequados à aplicação no campo de forma simples e económica.

## 6 – Bibliografia

- Adams, F. & Conrad, J.P., 1953. Transition of phosphite to phosphate in soils. *Soil Science*, **75**:361-371.
- Afek, U., & Szejnberg, A. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology*, **79**:736-739.
- Bailey A.M. & Coffey M.D., 1984. A sensitive bioassay for quantification of metalaxyl in soils. *Phytopathology*, **74**:667-669.
- Barrett, S.R., Shearer, B.L., Hardy, G.E., 2003. The efficacy of phosphite applied after inoculation on the colonisation of *Banksia brownii* stems by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, Vol. **32**, (1):1-7.
- Benson, D.M., 1979. Efficacy and in vitro activity of two systemic acylalanines and ethazole for control of *Phytophthora cinnamomi* root rot of azalea. *Phytopathology*, **69**:174-178.
- Benson, D.M., 1990. Landscape survival of fungicide treated azaleas inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, **74**:635-637.
- Bertand, A., Ducret, J., Debourge, J. C. & Horrière, D. 1977. Etude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides: Les monoethyl phosphites métalliques. *Phytiatr. Phytopharm.* 26:3-18 in Erwin, D. C.; Bartnicki-Garcia, S. & Tsao, P. H., 1987. *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press, The American Phytopathological Society, USA.
- Bompeix, G. & Saindrenan, P., 1984. In vitro antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorus acid on *Phytophthora* species. *Fruits*, **39**:777-785.
- Bompeix, G., Ravise, A., Raynal, G., Fettouche, F. & Durand, M.C., 1980. Method of obtaining necrotic blocking zones on detached tomato leaves using aluminum tris. Hypotheses as to its mode of action in vivo. *Ann. Phytopathol.*, **12**:337-351.
- Bower L.A. & Coffey, M.D., 1985. Development of laboratory tolerance to phosphorous acid, fosetyl-Al, and metalaxyl in *Phytophthora capsici*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **7**:1-6.
- Bruck, R.I., Fry, W.E. & Apple, A.E., 1980. Effect of metalaxil, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **70**:597-601.

- Carswell, M.C.; Grant, B.R.; Plaxon, W.D., 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta*, **203**:67-74.
- Carswell, M.C.; Grant, B.R.; Theodorou, M.E.; Harris, J.; Niere, J.O.; Plaxon, W.D., 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.*, **110**:105-110.
- Carvalho, M., A., G., 1997. *Inventariação e Avaliação da Sanidade das Áreas de Castanheiro no Parque Natural de Montesinho*. Relatório Final de Estágio. UTAD, Vila Real.
- Chalazet, M., Crisinel, P., Horrière, J.D., & Thiollière, J., 1977. Résultats de l'expérimentation réalisée avec les ethyl phosphites contre différentes maladies de la vigne. *Phytiatr. Phytopharm.*, **26**:41-54.
- Chauhan V.B. & Singh, U.P., 1987. A natural occurring resistant form of *Phytophthora drechsleri* to metalaxil. *Journal of Phytopathology.*, **120**: 93-96.
- Clerjeau, M. & Beyries, A., 1977. Étude comparée de l'action preventive et du pouvoir systemic de quelques fongicides nouveaux (phosphites-prothiocarbenpyroxychlore) sur poivron vis à vis de *Phytophthora capsici*. *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**:73-83.
- Coelho, V., Coutinho, S. & Gouveia, M.E., 2005. Sensitivity to copper and phosphite of *Phytophthora* species associated with ink diseases of chestnut. III International Chestnut Congress. *Acta Horticulturae*. ISHS 2005, **639**:641-643.
- Coffey M. D. & Joseph M. C., 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology*, **75**:1042-6.
- Coffey, M.D. & Bower L.A., 1984. in vitro variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to metalaxil. *Phytopathology*, **74**:502-506.
- Coffey, M.D. & Ouimette, D.G., 1989. Phosphonates: Antifungal compounds against Oomycetes. pages 109-129. In: Nitrogen, Phosphorus and Sulphur utilization by fungi. Symposium of the British Mycological Soc. L. Boddy, R. Marchant, and D.J. Reed, eds. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK 361pp.
- Coffey, M.D., 1987. *Phytophthora* root rot of avocado: An integrated approach to control in California. *Plant Disease*, **71**:1046-1052.
- Coffey, M.D., Klure, L.J., & Bower, L.A., 1984. Variability in sensitivity to metalaxil of isolates of *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora citricola*. *Phytopathology*, **74**:417-422.

- Cohen, M.D. & Coffey, M.D., 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, **24**:311-338.
- Cortizo, E.V., Madriñán, M.L.V., Madriñán, F.J.V., 1999. O castiñeiro: bioloxía e patoloxía. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela. 274p.
- Crandall, S.B. & Gravatt, G.F., 1967. The distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *Ceiba*, **13**:43-53.
- Crandall, S.B., 1950. The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthoras*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. *Plant Dis. Rep.*, **34**(6):194-196.
- Daniel, R.; Wilson, B., Cahill, D. 2005. The effect of potassium phosphonate on the response of *Xanthorrhoea australis* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, **34**: 541-548.
- Daniel, R; Guest, D. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*- challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **67**:194-201.
- Darvas, J.M., Toerien, J.C., & Milne, D.L., 1984. Control of avocado root rot by trunk injection with phosetyl-Al. *Plant Disease*, **68**:691-693.
- Davidse, L.C., 1987. Biochemical aspects of phenylamide fungicides – action and resistance. In: Modern selective fungicides – properties, applications, mechanisms of action. H. Lyr, ed. Longman Sci. and Tech. Co. and John Wiley & Sons, New York. 383 pp.
- Davidse, L.C., 1995. Phenylamide fungicides – Biochemical action and resistance. Pages 347-354. In: Modern selective fungicides – properties, applications, mechanisms of action. H. Lyr, ed. 2<sup>nd</sup> ed. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany.
- Davidse, L.C., Hofman, A.E. & Velthuis, G.C.M., 1983. Specific interference of metalaxil with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Exp. Mycol.*, **7**:344-361.
- de Boer, R.F., Greenhalgh, F.C., Pegg, K.G., Mayers, P.E., Lim, T.M. & Flett, S., 1990. Phosphorus acid treatment control Phytophthora diseases in Australia EPPO (Eur. Mediterr. Plant Prot.) Bull., **20**:193-197.
- Denis, S.J., 1976. DPX-3217 for control of grape downy mildew and potato/tomato late blight. (abstr.) *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* **3**:324.
- Dias, J.C.S., 1991. O novo método GAFEX para o combate preventivo à tinta do castanheiro. *Vida Rural.*, **22**: 16-19.

- Douchet, J.P., Absi, M., Hay, S.J.B., Muntan, L., Villani, A., 1977. European results with DPX-3217, a new fungicide for the control of grape downy mildew and potato/tomato late blight. British Crop Protection Conference, 9<sup>th</sup>, 2:535:540.
- Elena, K. & Paplomatas, E.J., 1997. *Phytophthora boehmeriae* boll rot: a new threat to cotton cultivation in the Mediterranean region. *Phytoparasitica*, **26** (1).
- Elorrieta, J., 1949. El castaño en España. IFIE. Madrid, p333. In: Cortizo, E.V., Madriñán, M.L.V., Madriñán, F.J.V., 1999. O castiñeiro: bioloxía e patoloxía. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela. 274p.
- Englander, L., Merlino, J.A., McGuire, J.J., 1980. Efficacy of two new systemic fungicides and ethazole for control of phytophthora root rot of Rhododendron, and spread of *Phytophthora cinnamomi* in propagation brenches. *Phytopathology*, **70**:1175-1179.
- Erwin, D.C, Ribeiro, O.K., 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S. & Tsao, P.H., 1987. *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press, The American Phytopathological Society, USA.
- Farih, A., Menge, J.A., Tsao, P.H. & Ohr, H.D., 1981. Metalaxyl and efosite aluminium for control of *Phytophthora gummosis* and root rot on citrus. *Plant Disease*, **65**: 654-657.
- Favreau, J., 1978. Lute contre *Phytophthora* et *Pythium* en culture ornamentale avec le prévicur. *L'hortic. Française*, **9**:7-8.
- Fenn, M.E.; Coffey, M.D., 1984. Antifungal activity of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid. *Phytopathology*. **74**:606-611.
- Fenn, M.E.; Coffey, M.D., 1985. Further evidence for direct mode of action of phosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology*, St. Paul, **75**:1064-1068.
- Fenn, M.E.; Coffey, M.D., 1989. Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomate tissues and its significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. *Phytopathology*, **74**:606-611.
- Fernandes, C.T., 1947. A “Doença da Tinta” do Castanheiro em Espanha. Separata das publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Vol. XIV Tomo I e II.
- Fernandes, C.T., 1949. A campanha contra a «doença da tinta» dos castanheiros no ano de 1948. *Bol. J. N. Frutas*. Lisboa, 9(1): 41-46.

- Fernandes, C.T., 1952. Oito anos ao serviço do castanheiro. Publicações dos Serviços Florestais e Aquícolas, Portugal, 19 (1 e 2).
- Fernandes, C.T., 1953. A luta contra a “doença da tinta” dos castanheiros no Norte de Portugal. Separata das publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Vol. XX Tomo II: 153-158.
- Fernandes, C.T., 1955. A luta contra a “doença da tinta” nos soutos do Norte de Portugal e ensaios diversos para a sua maior eficiência e economia. Publicação dos Serviços Florestais Portugueses. Alcobaça.
- Fernandes, C.T., 1966. *A “Doença da Tinta” dos castanheiros. Parasitas do género Phytophthora* de Bary. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça.
- Fernandes, C.T., 1970. Defesa e melhoramento do castanheiro, aspectos fitopatológicos. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Nº 253. Lisboa
- Fernandes, C.T., 1974. O castanheiro e a noqueira. Estudos e ensaios para a solução dos seus problemas em 1970. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Nº 273. Lisboa
- Fernandes, C.T., 1979. Enfermedad de la tinta del castaño. *Bol. Serv. Plagas*, **5**:59-66.
- Fernández-López, J., Ocenda, R., Vásquez, R., Lorenzo, S. 2001. Evaluation of resistance of *Castanea* sp. Clones to *Phytophthora* sp. using excised chestnut shoots. *For. Snow Landsc. Res.* **76**, 3.451-454.
- Flier, W. G., Grünwald, K. J., Kroon, L. P. N. M., Van Den Bosch, T. B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Bonants, P. J. M. & Turkensteen, L. J., 2002. *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. *Mycol. Res.*, **106** (7): 848-856.
- Fonseca, N., 1994. Doenças de viveiros florestais. In: Ferreira, M.C., Ferreira, G.W.S. & Fonseca, N. (eds), Manual de sanidade dos viveiros florestais. Inst. de Estruturas Agrárias e Desenvolvimento Rural, 492p.
- Froster, H.; Adaskaveg, J.E.; Kim, D.H.; Stanghellini, M.E., 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown in hydroponic culture. *Plant Pathology.*, **82**:1165-1170.
- Fry, W.E., 1982. Principles of disease management. Academic Press, New York. 378 pp.

- Fuller, M.S. & Gisi, U., 1985. Comparative studies of the in vitro activity of the fungicides oxadixyl and metalaxyl. *Mycologia*, **77**:424-432.
- Geissler, A.E. & Katekar, G.F., 1983. Effect of fungicides on stages of the life cycle of *Phytophthora cinnamomi*. *Pestic. Sci.*, **14**:501-507.
- Gisi, U., 1991. Synergism between fungicides for control of *Phytophthora*. Pages 361-372 in: *Phytophthora*. J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw, and L.R. Cooke, eds. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 447 pp.
- Gisi, U., Binder, H., Rimbach, E., 1986. Synergistic interactions of fungicides with different modes of action. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **85**:299-306.
- Gisi, U., Harr, J., Sandmeier, R., Wiedmer, H., 1983. A new systemic fungicide (San 731) against diseases caused by Peronosporales. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, **48**:541-549.
- Goodwin, S.B., 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopatology*, **87**:462-472.
- Gouveia, M.E., 1993. Doença da Tinta do Castanheiro. Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. Dissertação do Curso de Mestrado em Protecção Integrada. UT Lisboa – ISA, Lisboa.
- Gouveia, M.E., 2004. Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro. Doutoramento em Ciências Agrónomicas/Protecção de Plantas, UTAD. Vila Real, 163pp.
- Gouveia, M.E., Coelho, V., Sousa, N., Nunes, L. & Monteiro, M.L., 2004. Um método eficiente para a detecção de *Phytophthora cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro na rizosfera de Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) (em publicação).
- Grant, B.R.; Grant, J.; Harris, J., 1992. Inhibition of growth of *Phytophthora infestans* by Phosphate and Phosphonate in defined media. *Experimental Mycology*, **16**:240-244.
- Gravatt, G.F., 1954. Blight on chestnut and oaks in Europe in 1951. *Plant Disease Rep.*, **36**:111-115.
- Grente, J., 1961. La maladies de l'encre du châtaignier. L'étiologie et biologie. *Ann. Epiphyties*, **12**(1): 61-63.

- Griffith, J.M.; Akins, A.H.; Grant, B.R., 1992. Properties of the phosphate and phosphite transport systems of *Phytophthora palmivora*. *Archives Microbiology* **152**:430-436.
- Grohmann, U.J. & Hoffman, G.M., 1989. Blattinfektion und gewebebesiedelung durch *Phytophthora infestans* an kartoffeln unter Einflu(b) steigender dosierungen von metalaxil (leaf infection and tissue colonization in potato plants by *Phytophthora infestans* influenced by increasing dosages of metalaxyl. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, **96**:585-603
- Guest, D. I. & Grant B. R., 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews*, **66**:159-187.
- Guest, D.I. & Bompeix, G., 1990. The complex mode of action of phosphonates. *Australasian Plant Pathology*, **19**:113-115.
- Guest, D.L., Pegg, K.G. & Whiley, A.W., 1995. Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates. *Horticultural Rev.*, **17**:299-330.
- Gupta J.P., Erwin, D.C., Eckert, J.W. & Zaki A.I., 1985. Translocation of metalaxil in soybean plants and control of stem rot caused by *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology*, **75**:865-869.
- Hardy, G.E. St. J., Barrett, S. & Shearer, B.L., 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborn plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, Orange, v.30, p133-139.
- Heitefuss, R., 1989. *Crop and Plant Protection: the practical foundations*. Halsted Press, New York. 261 pp.
- Hewitt, H. G., 1998. *Fungicides in crop protection*. CAB International, USA. p221.
- Hislop, E. C., 1963. Studies on the chemical control of *Phytophthora palmivora* (butl). Butl on *Theobroma cacao* L. in Nigeria. IV. Further laboratory and field trials of fungicides. *Ann. Appl. Biol.*, **52**, 465-80.
- <http://www.epa.esa.gov/pesticides/biopesticides>
- <http://www.dgadr.pt/>. Lista de produtos fitofarmacêuticos aconselhados em Protecção Integrada da Figueira e Frutos Secos (actualização de 12-09-2007).
- <http://www.dgadr.pt/>. Lista de produtos fitofarmacêuticos com autorização de venda em Portugal (actualização de 31-03-2009).
- Imazu, K., Tanaka, S., Kuroda, A., Anbe, Y., Kato, J., Othake, H., 1998. Enhanced utilization of phosphonate and phosphite by *Klebsiella aerogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:3754-3758.

- Iwan J. & Goller, D., 1975. Behavior of SN 41703 (prothiocarbe) in soils and plants. *Environ. Qual. Saf.* 175(suppl. 3):319-321.
- Jackson, T.J.; Burgess, T.; Colquhoun, I.; Hardy, G.E.S., 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Path.*, **49**:147-154.
- Jung, T., Cooke, D.E.L., Blaschke, H., Duncan, J.M. & Obwald, W., 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.*, **103** (7): 785-798.
- Jung, T., Hansen, E.M., Winton, L., Obwald, W. & Delatour, C., 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol. Res.*, **106** (4): 397-411.
- Klopping, H.L. & Delp, C.J., 1980. 2-Cyano-N-[(ethylamino)carbonyl]-2-(methoxyimino)acetamide, a new fungicide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**:467-468.
- Kluge, E., 1978. Vergleichende untersuchungen uber die wirksamkeit von systemfungiziden gegen Oomyzeten. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*, **14**:115-122.
- Lafon, R., Bugaret, Y. & Bult, J. 1977. Nouvelles perspectives de lutte contre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* B.C.) avec un fongicide systémique, l'éthylphosphite d'aluminium. *Phytiatr. Phytopharm.*, **26**:19:40.
- Landschoot, P & Cook J, 2005. Sorting out the phosphonate products. *GCM*. 73-77.
- Laville, E., 1979. Utilisation d'un nouveau fungicide systemique: l'Aliette, dans la lutte contre la gommose a *Phytophthora* des agrumes (use of a new systemic fungicide, Aliette, in the control of citrus gummosis due to *Phytophthora*). *Fruits*, **34**:35-41. (in French).
- Le Roux, H.F., Wehner, F.C., Kotzé, J.M. & Grech, N.M., 1991. Combining fosetyl-Al trunk injection or metalaxyl soil drenching with soil application of aldicarb for control of citrus decline. *Plant Disease*, **75**:1233-1236.
- Lukens, R.J., Cham, D.C.K., Etter, G., 1978. Ortho 20615, a new systemic for the control of plant diseases caused by Oomycetes. *Phytopathology News*, 12:142.
- Magalhães, M.J., Sequeira, E.M. & Lucas, M.D., 1985. Cooper and zinc in vineyards of central Portugal. *Water Air and Soil Pollution*, 26:1-17.

- Malajczuk, N., 1983. Interaction between *Phytophthora cinnamomi* zoospores and micro-organisms on non-mycorrhizal and ecto-mycorrhizal roots of *Eucalyptus marginata*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 375-382.
- Man in't Veld, W. A, Cock, A. W., Ilieva, E. & Lévesque, C. A., 2002. Gene flow analysis of *Phytophthora porri* reveals a new species: *Phytophthora brassicae* sp. nov. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 51-62.
- Mantas, A & Sousa, A.T., 1991. Primeiras observações no controlo químico da “tinta do castanheiro” num souto. *Agricultura Transmontana*, 1:13-15 in: Gouveia, M.E., 1993. Doença da tinta do castanheiro. Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. Dissertação do Curso de Mestrado em Protecção Integrada. UT Lisboa – ISA, Lisboa.
- Marais, P.G. & van der Walt, H.S., 1978. Trials with systemic fungicide formulations for the control of grape downy mildew. *Phytophylactica* 10:89-91.
- Marks, G.C. & Smith, I.W., 1992. Metalaxyl and phosphonate as prophylactic and curative agents against stem infection of *Leucadendron* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32**:25-259.
- Marques, C. P., 1988. *Inventariação das Áreas e produções dos Soutos em Trás-os-Montes*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Martins, L.M., Abreu, C.G. & Marques, C.P., 1997. Evolução do estado sanitário do castanheiro do castanheiro numa área limítrofe à Serra da Nogueira (Trás-os-Montes). IRATI 97, I Congresso Florestal Hispano-Luso, II Congresso Florestal Español, Pamplona.
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of micorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* **60**:1472-1473.
- Matheron M.E. & Mircetich, S.M., 1985. Control of *Phytophthora* root and crown rot and trunk canker in walnut with metalaxyl and fosetyl-Al. *Plant Disease*, **69**: 1042-1043.
- McDonald, A.E., Grant, B. & Plaxton, W.C., 2001. Phosphite (phosphorus acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal Plant Nutrition*, **24**:1505-1519.
- McIntire, J. L., and Lukens, R. J., 1977. Screening chemicals to control *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant dis. Rep.*, **61**:366-370.

- McIntire, W.H., Winterberg, S.H., Hardin, L.J., Sterges, A. J., Clements, L.B., 1950. Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous, and phosphoric material by means of pot cultures. *Agronomy Journal*, **42**:543-549.
- McIntyre, J. L., and Lukens, R. J., 1977. Screening chemicals to control *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Dis. Rep.*, **61**:366-370.
- Navarro Cerrillo, R.M.; Gallo, L. & Sánchez M.E., Trapero, A., Fernández, P., 2004. Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales, Vol. **13**(3): 550-557.
- Navarro Cerrillo, R.M.; Terán Bocero, A.I. & Sánchez M.E., 2006. Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **32**: 685-694.
- Niere, J.O., DeAngelis, G.; Grant B.R., 1994. The effect of phosphonate on the acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. *Microbiology*, **140**:1661-1670.
- Niere, J.O., Griffith, J.M., Grant, B.R., 1990. <sup>31</sup>P-NMR studies on the effect of phosphite on *Phytophthora palmivora*. *Archives of Microbiology*, **152**, 430-436.
- Quimette, D.G. & Coffey, M.D., 1989. Phosphonate levels in avocado seedlings and soli following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. *Plant Disease*, **73**. 212-215.
- Pegg, K.G., Whiley, A.W., Saranah, J.B. & Glass, R.J., 1985. Control of *Phytophthora* root rot of avocado with phosphorous acid. *Australasian Journal of Plant Pathology*, **14**:25-29.
- Pieroh E.A., Koehne, S. & Ahrens, C., 1975. Erfahrungen mit prothiocarb zur bekämpfung von phycomyceten im zierpflanzenbau. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 165:933.
- Pilbeam, R.A., Colquhoun, I.J., Shearer, B.L., & St. J Hardy, G.E., 2000. Phosphite concentration; its effect on phytotoxicity symptoms and colonization by *Phytophthora cinnamomi* in three understory species of *Eucalyptus marginata* forest. *Australian Plant Pathology*, **29**:86-95.
- Pimentel, A.A.L., 1947. *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente extremamente virulento, da “Doença da Tinta” do Castanheiro. Separata da *Agronomia Lusitana*, Vol. IX Tomo III. 181-191.

- Plaxon, W.C., 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In *phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes*; Lynch, J.P., Deikman, J, Eds.; American Society of Plant Physiologist: Rockville, MD, 229-241.
- Reeves, R.J., 1975. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soils and water regimes. *Soil Biol. Biochem.*, **7**:19-24.
- Reilly, C.C., Hotchkiss, M.W. & Hendrix. F.F., 1997. Phytophthora Shunk and Kernel Rot, a new disease of pecan caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease*, **82**: 234-349
- Reilly, J.J., 1980. Chemical control of black shank of tobacco. *Plant Disease*, **64**:274-277.
- Reis, E. M., & Bresolin, A. C. R., 2007. Fungicidas: aspectos gerais. *Revista Plantio Direto*. N° **97**.
- Ribeiro, O.K., Erwin D.C. & Zentmyer, G.A., 1975. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. *Mycologia*, **67**:1012-9
- Richards, B.L. Jr., & Delp, C.J., 1976. Fungicide DPX-3217 for control of downy mildew and potato/tomato late blight. (Abstr.) *Pro. Am. Phytopathol. Soc.*, **3**:288-289.
- Roberts, D.A. & Boothroyd, C.W., 1984. Fundamentals of plant pathology. 2 ed. New York. W.H. Freeman, 432pp.
- Rohrbach, K.G. & Schenck, S., 1985. Control of pineapple heart rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora cinnamomi* with metalaxyl, fosetyl-Al and phosphorous acid. *Plant Disease*, **69**:320-323.
- Ryan, E.W., 1977. Control of cauliflower downy mildew (*Peronospora parasitica*) with systemic fungicides. *Proc. Br. Crop. Prot. Conf.* 9<sup>Th</sup>, **1**:297:300.
- Sanchez Hernandez, E., Muñoz Garcia, Brasier, M. & Trapero Casas, A., 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant Disease*, **85**: 411- 416.
- Sanders, P., Houser, W.J. & Cole Jr., H., 1983. Control of *Pythium* spp. and *Pythium blight* of turfgrass with fosetyl aluminum. *Plant Disease*, **67**:1382-1383.
- Schmitthenner, A.F., 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease*, **69**:362-368.

- Schwinn F.J., Staub, T., Urech, P.A., 1977. A new fungicide against diseases caused by Oomycetes. Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, **42**: 1181-1188.
- Schwinn, F.J. & Margot, P., 1991. Control with chemicals. Pages 225-265 in: *Phytophthora infestans*, Cause of Late Blight of Potato. Adv. Plant Pathol. Vol. 7. D.S. Ingram and P.H. Williams, eds. Academic Press. 273 pp.
- Schwinn, F.J. & Staub T., 1987. Phenylamides and other fungicides against Oomycetes. Pages 259-273. In: Modern Selective Fungicides, Properties, Applications and Mechanisms of Action. L. Horst, ed. Longman Scientific and Technical, England. 383 pp.
- Schwinn, F.J., & Staub, T., 1995. Oomycetes fungicides. Chapter 16. Phenylamides and other fungicides against *Oomycetes*. Pages 323-346 in: Modern selective fungicides – Properties, applications, mechanisms of action. 2<sup>nd</sup> ed. H. Lyr, ed. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany.
- Schwinn, F.J., 1983. New developments in chemical control of *Phytophthora*. Pages 327-334. In: *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao, eds. American Phytopathological society, St. Paul, Minn. 32 pp.
- Schwinn, F.J., 1987. New developments in chemical control of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S. & Tsao, P.H., 1987. *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS Press, The American Phytopathological Society, USA.
- Serres, J.M., & Carraro, G.A., 1976. DPX-3217, a new fungicide for the control of grape downy mildew, potato late blight and other Peronosporales. Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, **41**:645-650.
- Shearer, B.L., Crane, C.E. & Fairman, R.G., 2004. Phosphate reduces disease extension of a *Phytophthora cinnamomi* front in Banksia woodland, even after fire. *Australasian Plant Pathology*, **33**: 249-254.
- Shearer, B.L., Tippett, J.T., 1989. Jarrah dieback: The dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalytus marginata*) forest of South-Wester Australia. Research Bulletin No 3 Dept. of Conservation and Land Management Como Western Australia.
- Simões, J. S., 2005. Utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura. Sociedade Portuguesa de Inovação. 104 p.

- Smillie, R.H., Grant, B.R. & Guest, D., 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on tree *Phytophthora sp* in plants. *Phytopathology*, **79**:921-926.
- Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, D.H., Archer, S.A., 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 671 pp.
- Staub, T.H., Dahmen, H. & Schwinn, F.J., 1978. Biological characterization of uptake and translocation of fungicidal acylalanine in grape and tomato plants. *J. Plant Dis. Prot.*, **85**:162-168.
- Staub, T.H., Dahmen, H., & Schwinn, F.J., 1980. Effects of ridomil on the development of *Plasmospora viticola* and *Phytophthora infestans* on their host plants. *Z. Pflanzenschutz*, **87**:83-91.
- Stehmann, C.; Grant, B.R., 2000. Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **67**:13-24.
- Suarez, P.C., 1989. Fitopatologia del castaño (*castanea sativa* Miller). Boletín de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura, Pesca e Alimentación, nº 16. Espanha.
- Tsao, P., Guy, S. 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology*, **67**:796-801.
- Tuset, J.J. & Portilla, M.T., 1990. Control of *Phytophthora* brown rot of citrus fruits. EPPO (Eur. Mediterr. Plant Prot. Organ.) Bull., **20**:153-161.
- Tynan, K.M., Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Dell, B., Colquhoun, I.J., McComb, J.A., & Hardy, G.E. St.J. (2001). The long-term ability of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in two native plant communities of Western Australia. *Australian Journal of Botany*, **49**: 761-770.
- Urech, P.A., Schwinn, F.J. and Staub, T., 1977. CGA 48988, a novel fungicide for the control of the late blight, downy mildews and related soil-borne diseases. Proc. 9<sup>th</sup> British Crop Protection Conference, **2**:623-631.
- Urquijo, P., 1941. Nuevo método de lucha contra la "tinta del castaño". Bol. Pat. Veg. Y Entomología Agrícola. Vol. X.
- Urquijo, P., 1971. Patología Vegetal Agrícola. Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Viennot-Bourgin, G. 1949. *Les Champignons parasites des plantes cultivées*. Masson & C.<sup>a</sup> Ed. In Dias, J.C.S., 1991. O novo método GAFEX para o combate preventivo à tinta do castanheiro. *Vida Rural.*, **22**: 16-19.

- Weste, G., 1983. *Phytophthora cinnamomi*. The dynamics of chlamydospore formation and survival. *Phytopathology Z.*, **106**:163-176.
- Wiertsema, W.P., Wissink, B.H., 1977. Fongarid 50WP, a new fungicide for ornamentals. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, **29**:1189-1194.
- Wilkinson, C.J., Holmes, J.M., Tynan, K.M., Colquhoun, I., McComb, J.A., Hardy, G.E., Dell, B., 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, **30**(4): 343-351.
- Williams D.J., Beach, B.G.W., Horrière, D. & Maréchal, G., 1977. LS 74-783, a new systemic fungicide with activity against Phycomycete diseases. *Proc. Br. Crop. Conf.*, 9<sup>th</sup> **2**:565-573.
- Wong, M.H., 2006. Phosphite induces morphological and molecular changes in *Phytophthora* species. Master degree thesis. Murdoch University. Perth, Australia. 129pp.
- Woods, F.W. 1953. Disease as a key factor in the evolution of forest composition. *J. For.*, **51**:871-873.
- Zaki, A.I., Zentmyer, G.A. & LeBaron H.M., 1981. Systemic translocation of <sup>14</sup>C-labeled metalaxyl in tomato, avocado, and *Persea indica*. *Phytopathology*, **71**:509-514.
- Zentmyer, G. A., 1980. *Phytophthora cinnamomi* and Diseases it causes. Monograph n° 10. The American Phytopatological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Zentmyer, G. A., 1981. The effect of temperature on growth and pathogenesis of *Phytophthora cinnamomi* and on growth of its avocado host. *Phytopathology*, **66**:925-928.
- Zentmyer, G.A. & Mircetich, S.M., 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **55**:487-489.

