

## **Epidemiologia do cancro do castanheiro. Dinâmica da distribuição espacial de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr.**

**Eugénia Gouveia<sup>1,2</sup>, Valentim Coelho<sup>2</sup>, João Azevedo<sup>1,3,\*</sup>**

1 CIMO – Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária de Bragança, Campus de Santa Apolónia - Apartado 1172, 5301-854 BRAGANÇA

2 Departamento de Fitotecnia e Engenharia Rural, Escola Superior Agrária de Bragança, Campus de Santa Apolónia - Apartado 1172, 5301-854 BRAGANÇA

3 Departamento Florestal, Escola Superior Agrária de Bragança, Campus de Santa Apolónia - Apartado 1172, 5301-854 BRAGANÇA

### **1. Introdução**

*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr., Ascomiceta da ordem Diaporthales, é um fungo da micoflora natural em castanheiros asiáticos (*C. crenata*, *C. mollissima*). Introduzido acidentalmente nos EUA rapidamente se disseminou nas áreas naturais destruindo em cinquenta anos 3,5 biliões de árvores de *Castanea dentata*, o castanheiro americano (Fulbright *et al.*, 1988). Detectado posteriormente na Europa motivou grande preocupação uma vez que o fungo evidenciou, de igual forma, elevada agressividade em *Castanea sativa*, o castanheiro europeu. Actualmente o cancro do castanheiro está presente em todas as regiões de castanheiro da Europa com excepção das pequenas manchas de castanheiro da Holanda e Reino Unido, (Robin & Heiniger, 2001). Em Portugal os prejuízos associados a esta doença foram noticiados apenas a partir de 1989. Tratando-se de uma doença associada a um parasita introduzido num ambiente ecológico onde não existem antagonistas caracteriza-se em termos epidemiológicos por uma rápida expansão. Em Trás-os-Montes a doença encontra-se dispersa em focos de maior ou menor extensão e com grau variável na incidência da doença (Gouveia *et al.*, 2001), evidenciando um padrão de dispersão e desenvolvimento semelhante ao que ocorreu nos locais onde foi introduzida na Europa (Del Guerra, 1948).

*C. parasitica* é um organismo de quarentena da lista A2 que se encontra regulamentado pela Directiva 77/93/CEE. As medidas de quarentena não foram, no entanto, suficientes para impedir a introdução do cancro do castanheiro em Portugal e com o objectivo de conter a sua dispersão iniciou-se um programa de erradicação em 1998. O programa de erradicação, normalizado pelo despacho nº 117/98, previa a eliminação do fungo pela excisão dos cancros e destruição pelo fogo dos tecidos atacados no próprio local e acções de sensibilização e divulgação junto dos agricultores.

Para que as estratégias de luta baseadas na remoção dos cancros (erradicação) atinjam os resultados pretendidos, terão que se basear no conhecimento das características biológicas, epidemiológicas e da distribuição espaço-temporal da população parasita presente nos diferentes locais.

Análises espaciais desempenham actualmente um papel fundamental na descrição e compreensão de processos biológicos e ecológicos (Real e McElhaney, 1996). Desde os anos 80 que diversos métodos de análise de padrões espaciais de agentes patogénicos são utilizados em culturas agrícolas e florestais, nomeadamente medidas de agregação (Gottwald et al., 1996; Roberto et al., 2002)) e métodos do âmbito da geoestatística (Roberto et al., 2002; Nelson et al., 1999).

Com este trabalho pretendeu-se conhecer as características biológicas da população patogénica, os mecanismos de multiplicação e dispersão espaço-temporal e o efeito da remoção do inóculo no desenvolvimento da doença, aspectos que foram estudados durante três anos consecutivos num souto de Parada-Bragança, localizado num dos focos iniciais do aparecimento do cancro em Portugal.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Caracterização da população patogénica e epidemiologia**

Com base na distribuição e incidência do cancro do castanheiro na região de Trás-os-Montes (Gouveia *et al.*, 1999; Anastácio *et al.*, 2001) seleccionou-se um souto na freguesia de Parada do concelho de Bragança, constituído por 208 árvores da variedade Judia com aproximadamente 25 anos de idade. Em 2002 as árvores foram classificadas quanto ao grau de infecção provocado pelo fungo *C. parasitica* com base na aplicação de uma escala de severidade de 1 a 5 (1 - árvore sã; 2 - presença de um cancro com área reduzida, 3 - presença de dois cancros ou um cancro de extensão razoável, 4 - presença de três ou mais cancros e/ou áreas afectadas muito extensas, 5 - árvore sem viabilidade biológica).

Em todas as árvores doentes e nos cancros que surgiram ao longo deste trabalho retirou-se material vegetal para isolamento e caracterização da população de *C. parasitica* segundo metodologia descrita em Gouveia et al. (2001).

O fungo foi eliminado de todas as árvores doentes por excisão dos cancros ou corte dos ramos. Todas as feridas foram protegidas com oxiclureto de cobre a 20%. Os tecidos retirados das árvores foram cuidadosamente recolhidos e destruídos pelo fogo. A destruição pelo fogo dos tecidos afectados é um aspecto da maior importância nesta

técnica uma vez que o fungo continua a desenvolver-se nesses tecidos que a manterem-se junto das árvores continuarão a propagar a doença. A excisão e/ou corte dos ramos foi realizada inicialmente no início da Primavera sendo repetidas, nesta mesma época do ano ou no início do Verão, sempre que as árvores evidenciavam sintomas da doença.

A eficácia da remoção dos cancos (excisão e/ou corte de ramos) foi avaliada com base na observação visual, avaliando-se o desenvolvimento de cancos nas zonas excisadas e nos cortes realizados nos ramos para eliminar tecidos ou pernas doentes.

## 2.2 Padrão Espacial

A localização de todas as árvores no souto foi efectuada com tecnologia GPS. Consideraram-se as árvores doentes no início de cada ano de observação. Uma vez que este estudo foi iniciado em 2002, assumiu-se que as árvores infectadas em 1997, ano em que ocorreu infecção na área onde este souto se localiza, são aquelas que em 2002 apresentavam grau de severidade 5. Os dados geográficos das árvores doentes em cada ano foram previamente convertidos para num sistema de coordenadas locais com uma rotação de  $-37^\circ$  em relação à orientação original para melhor ajustamento à forma da parcela de amostragem.

A dinâmica espacial do fungo no souto foi examinada com base na função K de Ripley (1976), uma análise de distribuição espacial de dados pontuais de segunda ordem com ampla utilização em ecologia (Haase, 1995). A análise univariada K de Ripley foi aplicada para conhecer o padrão espacial das árvores infectadas em cada data estudada, sendo a forma bivariada empregue no estudo da interacção espacial de árvores infectadas em datas sucessivas.

A função K de Ripley,  $K(t)$ , é estimado através de (Haase, 1995)

$$\hat{K}(t) = n^{-2} A \sum_{i \neq j} w_{ij}^{-1} I_t(u_{ij})$$

em que

$n$  é o número de indivíduos (pontos) na parcela,

$A$  é a área da parcela em  $m^2$ ,

$I_t$  é uma variável de contagem,

$u_{ij}$  é a distância entre os elementos  $i$  e  $j$ , e

$w_{ij}$  é um factor de ponderação para correcção do efeito de orla.

A forma bivariada é calculada por (Dixon, 2002)

$$\hat{K}(t) = n_1 n_2^{-1} A \sum_i^{n_1} \sum_j^{n_2} w_{ij}^{-1} I_t(u_{ij})$$

em que  $n_1$  e  $n_2$  são o número de indivíduos nas populações em comparação.

Para simplificação da interpretação dos resultados, a função K é geralmente linearizada através de  $L(t) = \sqrt{K(t)/\pi}$  e representada graficamente como  $L(t)-t$  em função de  $t$ . No caso univariado, valores de  $L(t)-t$  positivos indicam agregação dos eventos enquanto valores negativos indicam um padrão regular dos mesmos. No caso bivariado, valores positivos indicam associação entre populações de eventos em comparação e valores negativos segregação. Valores iguais a zero são indicadores de padrões aleatórios (Poisson) no caso univariado e de não existência de padrão no caso bivariado. Para testar a significância estatística do afastamento dos valores da função em relação aos esperados definem-se intervalos de confiança em torno dos valores nulos.

A função foi calculada com o programa RIPPER (Feagin, Feagin, & Wu, comunicação pessoal) que usa a correção de orla de Getis & Franklin (1987). Intervalos de confiança de 95% foram estabelecidos com base em 200 simulações de Monte Carlo.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização da população patogénica e epidemiologia de *C. parasitica*

Em 2002 observaram-se 34 castanheiros com cancos. Com base na observação visual das árvores doentes classificaram-se nove árvores com grau de severidade 5, três com grau 4, 8 com grau 3, 14 com grau 2 e as restantes 168 árvores com grau 1. No início deste estudo a população de *C. parasitica* apresentou grande uniformidade morfológica quanto à cor e crescimento dos isolados em PDA (54 isolados) e maior variabilidade na produção de esporos. Todos os isolados de *C. parasitica* foram classificados no mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) (P-2) quando testados pelo método de Bissegger *et al.* (1997) (Gouveia *et al.*, 2003). Os isolados obtidos nos cancos das novas infecções ocorridos ao longo deste estudo foram analisados em 2004 tendo evidenciado características morfológicas semelhantes e o mesmo VCG da população inicial o que indica que a dinâmica das infecções no soute resulta do inóculo presente no foco da doença.

No início do ensaio removeram-se todos os cancros presentes nas árvores doentes dos quais resultaram 49 áreas de excisão. Numa primeira avaliação, 4 meses após a remoção dos cancros, o número de cancros que não evidenciavam sintomas foi de 91,83 %, tendo-se desenvolvido sintomas da doença apenas em 4 cancros dos 49 inicialmente removidos. Um ano após a remoção dos cancros a eficácia é de 80,39 %, valor que foi progressivamente diminuindo até atingir 46,93 % no final do ensaio. A diminuição progressiva da eficácia de extirpação ao longo do tempo, ou seja, o desenvolvimento de cancro nas zonas contíguas à zona de extirpação ou no calo de cicatrização das feridas, pode resultar de uma remoção deficiente dos tecidos infectados que proporcionam o desenvolvimento da doença ou resultarem de novas infecções que ocorrem nesses mesmos tecidos por serem zonas de maior vulnerabilidade da árvore.

O aparecimento de novas infecções e portanto de novos cancros noutras locais da árvore fez com que a eficácia da extirpação não coincida com a eficácia do método na recuperação das árvores, entendendo-se como recuperadas as árvores que não evidenciaram sintomas de cancro até ao final período em análise.

Outro factor a considerar na eficácia de recuperação das árvores está relacionado com o grau de severidade inicial da doença. O grau de severidade inicial da doença influenciou a eficácia da recuperação das árvores (Quadro 1). Os valores indicam que quanto maior é o grau de severidade menor é a hipótese de recuperação das árvores. Nos castanheiros classificados com grau 5, a extirpação foi efectuada por decisão do agricultor, mas devido à grande remoção de tecidos do tronco e pernas a viabilidade biológica das árvores ficou desde logo muito afectada.

Apesar do esforço em eliminar o inoculo dos soutos em estudo, tal objectivo não foi atingido uma vez que as árvores classificadas inicialmente como grau 5, que correspondem às árvores em que o cancro se encontrava muito difundido e já com estruturas de frutificação, foram mantidos no souto durante algum tempo o que aliado à presença de inoculo na área envolvente do souto fez com que a pressão de inoculo fosse muito elevada e continuassem a ocorrer novas infecções durante todo o período de duração do ensaio.

Considerando o souto na sua totalidade, detectaram-se novos casos de cancro em todas as épocas de observação tanto em árvores inicialmente doentes como nas árvores consideradas sãs. Os novos cancros apareceram com mais frequência no Verão e no Inverno. Este padrão de aparecimento de novos cancros indica que as novas infecções ocorrem predominantemente na Primavera e no Outono. A taxa das novas infecções nas

árvores inicialmente doentes foi muito elevada, tendo aparecido novas infecções em 58,84 % das árvores, com uma média de 1,88 cancro por árvore. Nas 168 árvores consideradas sãs no início do ensaio ocorreram 37 novos cancros distribuídos por 31 árvores. A taxa de infecção acumulada foi de 18,66 % com uma média de 1,19 cancros por árvore, o que evidencia a grande pressão de inóculo e a agressividade *C. parasitica* em castanheiro.

### 3.1. Padrão espacial

As infecções por *C. parasitica* mais antigas ocorridas no souto em análise e consideradas como tendo ocorrido em 1997 (Figura 1), encontram-se aleatoriamente distribuídas tal como se pode inferir da análise da Função K de Ripley (Figura 2). Este padrão pode indicar que a contaminação do souto tenha tido origem na dispersão natural do fungo a partir de focos existentes na área. Em 2002, 2003 e 2004 verificou-se agregação significativa das árvores doentes a escalas superiores a 10 m, a distância média a que as árvores se encontravam no souto (Figuras 1 e 2). Tal padrão deverá dever-se a contaminação a partir de árvores doentes no interior do souto, particularmente das classificadas inicialmente como grau 5 que permaneceram no souto. Apesar de ter ocorrido a eliminação mecânica de tecidos infectados, o padrão espacial não parece ter sido alterado de forma pronunciada. Observou-se, no entanto, uma ligeira diminuição da agregação em 2004, possivelmente pelo facto de se terem retirado numerosas fontes de inóculo por excisão dos cancros em anos anteriores (Figura 2) ou pelo facto de ter ocorrido a dispersão da doença à generalidade do souto.

A análise bivariada revelou existir associação significativa de árvores doentes em 1997 e 2002 acima de distâncias de 10 m (Figura 3). Tal parece indicar, tal como no caso univariado, que a infecção de novas árvores no souto em 2002 tenha tido origem nas primeiras árvores doentes no souto. Entre 2002 e 2003 não se observou uma relação espacial entre árvores doentes abaixo da escala de sensivelmente 30 m, acima da qual se verifica uma associação significativa. O facto de se terem removido cancros das árvores doentes em 2002, que se encontravam agregadas, e terem sido revelados novos cancros em árvores afastadas pode explicar este padrão. Entre as árvores doentes em 2003 e 2004 observou-se associação significativa a escalas situadas entre os 10 e os 20 m e acima dos 40 m, aproximadamente. Este lapso de significância entre os 20 e os 30 m poderá dever-se à remoção de cancros no ano anterior. A associação significativa dos 10

aos 20 m poderá indicar em 2004 um efeito de infecção das árvores mais próximas de árvores doentes em 2003.

#### **4. Conclusões**

Os resultados obtidos evidenciam que a remoção dos cancro por extirpação ou corte de ramo é um método eficaz para eliminar as fontes de inoculo de *C. parasitica* tendo-se obtido valores de 91,83 %, 4 meses após a sua realização. Os valores de eficácia decrescem ao longo do tempo devido ao desenvolvimento do cancro na zona contígua às extirpações ou no calo de cicatrização o que se traduz na prática pela necessidade de se repetirem as operações de extirpação para garantir a remoção do inóculo.

Os resultados indicam ainda que a extirpação e corte de ramos para remoção do cancro é mais eficaz quando realizada em árvores com cancro pouco extensos e em pequeno número ou seja com menor grau de severidade da doença e ainda quando realizados no final do Inverno.

A evolução do estado sanitário dos castanheiros evidenciou, no entanto, um panorama bem mais complexo do que a avaliação da eficácia poderia sugerir. O aparecimento de novos cancro noutros locais da árvore determinou que a eficácia do método de remoção dos cancro não se traduzisse numa recuperação definitiva das árvores. A presença de novos cancro foi evidente durante todo o período do ensaio tendo em parte determinado a baixa percentagem de recuperação das árvores inicialmente intervencionadas com valores de apenas 3,22 % no final do ensaio. A taxa de novas infecções foi muito elevada tendo 31 dos 168 castanheiros considerados sãos no início do ensaio ficado doentes o que corresponde a uma taxa acumulada de novas infecções de 18,45%. A taxa de infecção foi ainda superior nas árvores inicialmente doentes com uma taxa acumulada de 103,22 % e com uma média de 1,88 cancro por árvore o que mostra a elevada pressão de inoculo durante este período.

O maior número de novos casos de cancro foi observado no Verão e no Inverno o que indica que as infecções ocorrerão predominantemente na Primavera e Outono.

A presença de inóculo do parasita determina que as podas realizadas no final do Inverno ou início da Primavera sem desinfecção das ferramentas e protecção das feridas de corte são potenciadoras de dispersão e re-infecção por *C. parasitica*.

A análise espacial das árvores infectadas através da função K de Ripley fornece informação importante para a compreensão da contaminação na área e no interior do

souto. Numa primeira fase ocorre a infecção de indivíduos no souto de forma aleatória sendo estes responsáveis pelo alastramento da doença internamente no souto nos anos subsequentes. As operações de remoção dos cancos parecem ter afectado temporariamente o padrão de dispersão da doença, concretamente a escalas particulares, mas a presença de inóculo nos soutsos assim como na área envolvente e a existência de novas infecções ainda em período de incubação (não detectáveis por observação visual) é determinante do estado sanitário dos castanheiros mesmo quando se realizam operações de remoção dos cancos. Para eliminar as fontes de inoculo será necessário a remoção dos cancos em toda a extensão do foco da doença e assim prevenir o aparecimento de novas infecções. As acções de erradicação realizadas em toda a extensão do foco da doença serão de primordial importância para reduzir o inóculo e evitar o aparecimento de novas infecções e a dispersão da doença.

## 5. Referências Bibliográficas

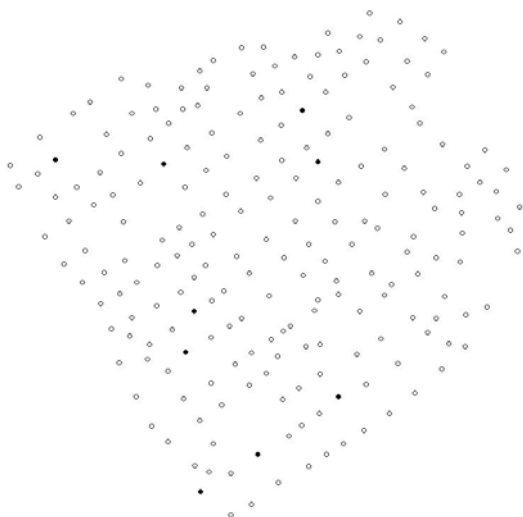
- Anastácio, M.L., Mesquita, M. e Ponteira, D., 2001. Programa de erradicação do cancro do castanheiro. Jornadas transfronteiriças do castanheiro. Bragança, 11-12, Maio.
- Caetano, M.F.F., 1990. O «Cancro do castanheiro» uma ameaça já presente nos soutsos e castiçais portugueses. *Vida Rural* 5:26-30.
- Dixon, P.M., 2002. Ripley's K function. P. 1796–1803 in *Encyclopedia of Environmetrics*, Volume 3, A.H. El-Shaarawi e W.W. Piegorsch (Eds.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Fulbright D.W., Paul, C. P., & Garrold, S. W., 1988. Hypovirulence: A natural control of chestnut blight. P. 122-139 in *Biocontrol of Plant Disease*, Vol II, K G. Mukeiji and K.L. Garg (Eds). CRC Press, Boca Raton.
- Getis, A. & Franklin, J., 1987. Second-order neighborhood analysis of mapped point patterns. *Ecology* 68: 473-477.
- Gottwald, T.R., Cambra, M., Moreno, P. Camarasa, E. & Piquer, J., 1996. Spatial and temporal analysis of citrus tristeza virus in eastern Spain. *Phytopathology* 86:45-55.
- Gouveia, M.E., Cardoso, P, Monteiro, M.L., 2001. Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatible types of *Cryphonectria parasitica* in Trás-os-Montes (Portugal). *Forest Snow and Landscape Research* 76(3): 387-390.
- Gouveia, M.E., Monteiro, M.L., Anastácio, M.D. & Cardoso, P., 1999. Cancro do castanheiro: Um programa de erradicação em curso. V Encontro de Protecção

- Integrada, A prática da protecção integrada no limiar do milénio. Escola Superior Agrária de Bragança, 27-29 de Outubro, 1999.
- Haase, P., 1995. Spatial pattern analysis in ecology based on Ripley's K-function: introduction and methods of edge correction. *Journal of Vegetation Science* **6**: 575-582.
- Heiniger U. & Rigling, D., 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 581-599.
- Nelson, M.R., Orum, T.V., Jaime-Garcia, R. & Nadeem, A., 1999. Application of geographic Information Systems and Geostatistics in Plant Disease Epidemiology and Management. *Plant Disease* **83**:308-319
- Real, L.A. & McElhaney, P., 1996. Spatial pattern and process in plant-pathogen interactions. *Ecology* **77**: 1011-1025.
- Ripley, B.D., 1976. The second order analysis of stationarity processes. *Journal of Applied Probability* **13**: 255-266.
- Roberto, S.R., Farias, P.R.S. & Bergamin Filho, A., 2002. Geostatistical analysis of spatial dynamics of Citrus variegated chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 599-604.
- Robin, C. & Heiniger, U., 2001. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*. **76**, (3): 361-367.

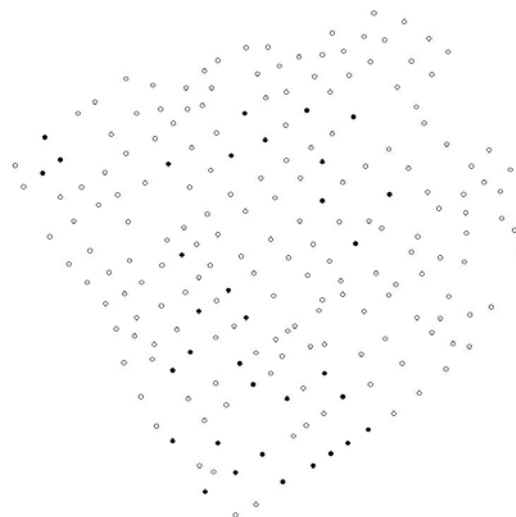
Quadro 1 – Percentagem de árvores sãs nas diferentes observações segundo o grau de severidade inicial (Parada)

Observação	2-7-02	21-3-03	30-6-03	28-11-03	6-4-04	16-6-04	18-12-04
Grau 2	100	66,66	40	53,33	73,33	53,33	28,57
Grau 3	50	64,29	50	57,14	28,57	14,29	7,14
Grau 4	100	0	33,33	0	0	0	0
Grau 5	0	0	0	0	0	0	0

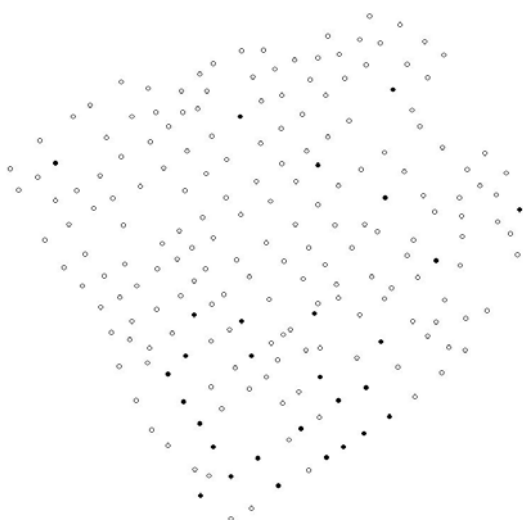
1997



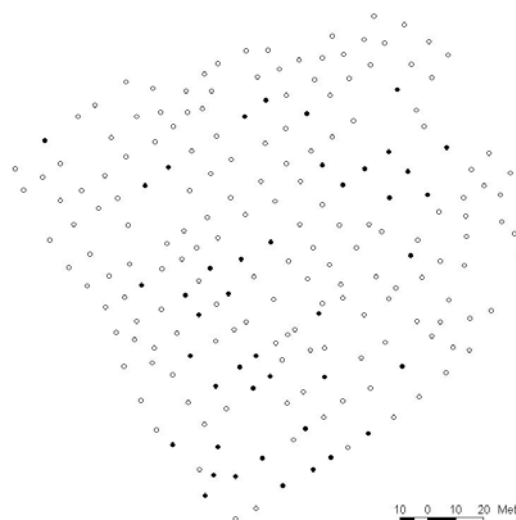
2002



2003



2004



- Sem infecção
- Com infecção

Figura 1 – Localização das árvores sãs e doentes em datas consecutivas num souto em Parada, Bragança.

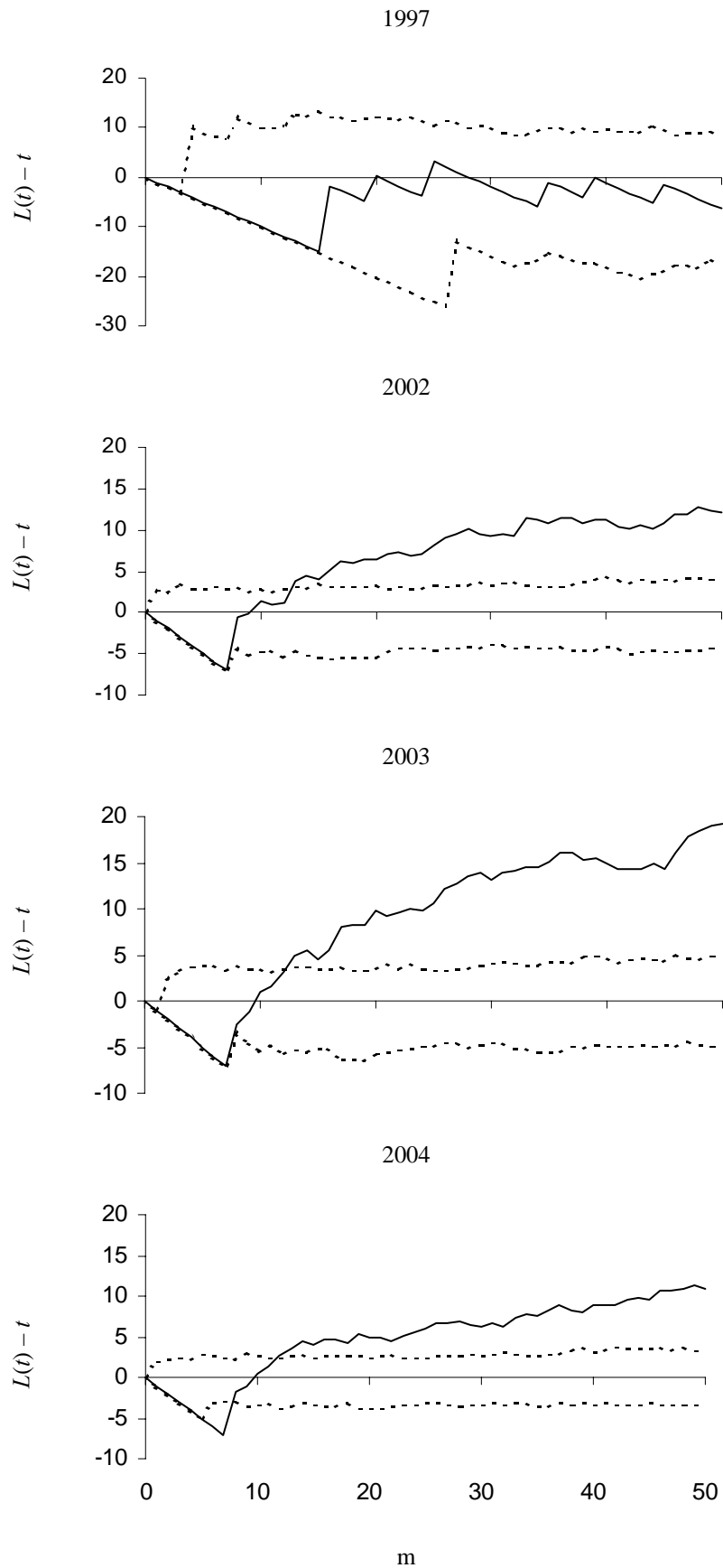


Figura 2 – Análise do padrão espacial de árvores com cancro do castanheiro num souto em Parada, Bragança, pela função K de Ripley. A linha sólida indica o valor da função  $L(t)-t$ . As linhas tracejadas indicam os limites do intervalo de confiança de 95%.

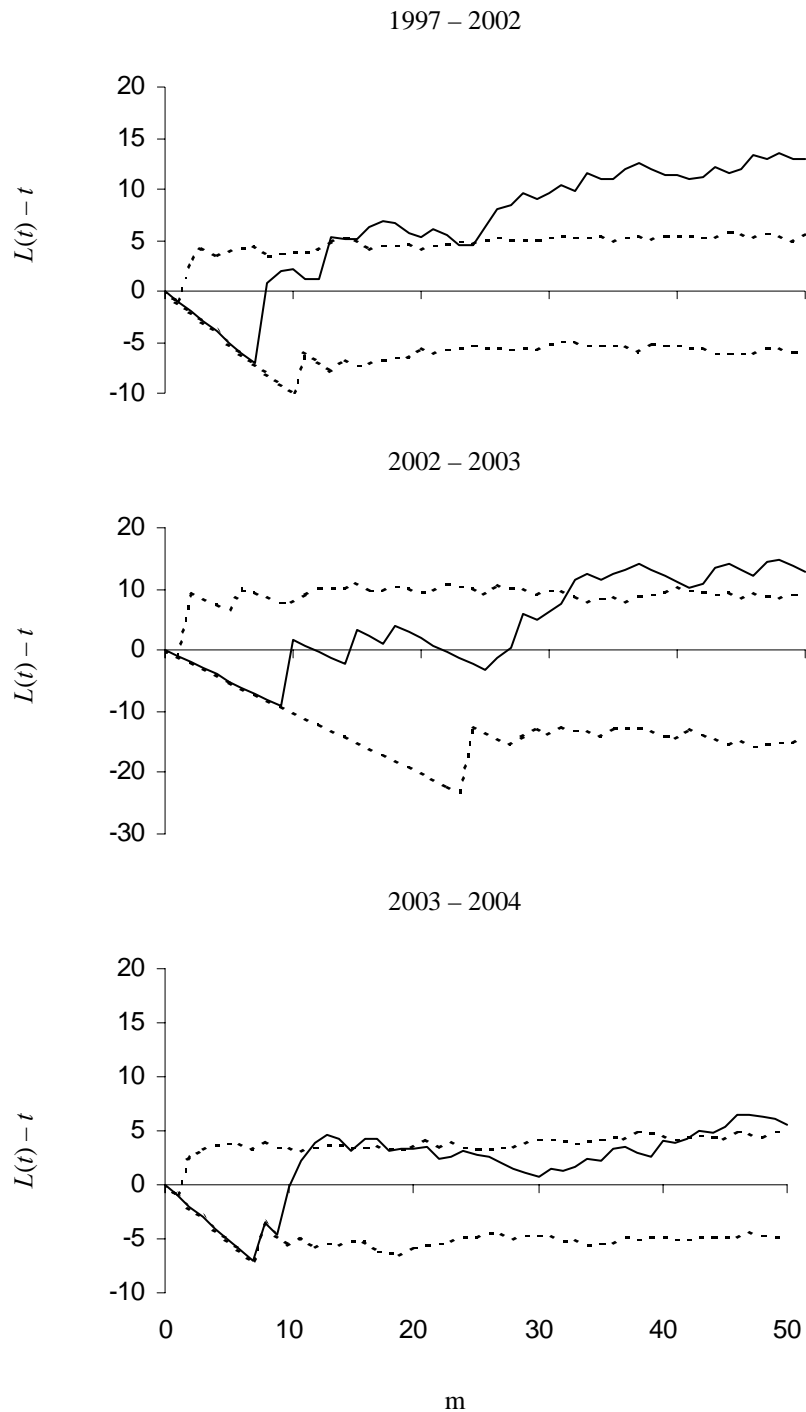


Figura 3 – Análise da interacção espacial de árvores infectadas em datas sucessivas com cancro do castanheiro num souto em Parada, Bragança, pela função K de Ripley, forma bivariada. A linha sólida indica o valor da função  $L(t)-t$ . As linhas tracejadas indicam os limites do intervalo de confiança de 95%.