

Cancro do castanheiro: a luta cultural na redução do inóculo e manutenção sustentada dos soutos

Gouveia, E.¹; Coelho, V.¹; Portela, E.²

¹Escola Superior Agrária de Bragança. *Campus* St.^a Apolónia, 5300 Bragança.

²Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Quinta dos Prados, 5000 Vila Real.

Resumo

Cryphonectria parasitica fungo Ascomiceta da ordem Diaphortales e família Valsaceae foi noticiado pela primeira vez em Portugal em 1989. Teve uma dispersão muito rápida em todas as regiões de castanheiro existindo focos com forte incidência da doença de maior ou menor dimensão em todos os locais onde foi introduzido.

Este trabalho teve como objectivo avaliar a eficácia da extirpação dos cancros como meio de luta contra o cancro do castanheiro e estudar as características da população de *C. parasitica*.

A extirpação dos cancros quando aplicada a sistemas de exploração de castanheiros para fruto revelou ser muito eficaz, necessitando no entanto de um acompanhamento continuado para ser eficiente. A população de *C. parasitica* evidenciou grande uniformidade nas características morfológicas relacionadas com a cor e crescimento dos isolamentos e maior variabilidade na produção de esporos, evidenciando ainda uniformidade em relação à sensibilidade ao cobre. Todos os isolamentos foram incluídos no mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) e identificado como VCG 2-P o mais frequente na população de *C. parasitica* em Portugal.

Palavras-chave: *Cryphonectria parasitica*; redução de inóculo; grupo de compatibilidade vegetativa; VCG.

Abstract

Cryphonectria parasitica, ascomycete fungi order Diaphortales and family Valsaceae was first reported in Portugal in 1989. He had a very fast spread in all the chestnut areas in Portugal with focus of high incidence of the disease with variable extensions in all the places where it was introduced.

The objective of this work was to evaluate the effectiveness of the excise the cankers of the chestnut blight as mean of control the disease and to study the population characteristics of *C. parasitica*.

The excise of cankers of chestnut blight in chestnuts grooves, is very effective, however, is need a continued and specialised accompaniment. The population of *C. parasitica* evidenced a great uniformity in the morphologic characteristics related with the colour and growth of the isolates and a larger variability in the production of spores. Isolates also revealed identical sensibility to copper sulphate. All the isolations were included in the same vegetative compatibility group (VCG) and identified as VCG 2-P the most frequent in the population of *C. parasitica* in Portugal.

Keywords: *Cryphonectria parasitica*; inoculum reduction; vegetative compatibility group; VCG.

1. Introdução

A ordem Diaporthales dos Ascomicetas inclui um elevado número de fungos fitopatogénicos sendo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. associada ao cancro do castanheiro uma das espécies mais conhecidas.

O cancro do castanheiro noticiado pela primeira vez em Portugal em 1989 é já uma doença epidémica no castanheiro (*Castanea sativa* Mill.). Está presente em todas as regiões de castanheiro do país, caracterizando-se pela existência de focos de forte incidência da doença de maior ou menor extensão Gouveia *et al.* (2001). A dispersão natural do parasita a permanência dos focos de infecção nos soutos e as práticas culturais associadas à enxertia e à poda constituem factores que potenciam e agravam a situação.

C. parasitica é um fungo muito agressivo em castanheiro provocando elevada mortalidade nas árvores atacadas. Para combater esta doença vários métodos foram testados, nomeadamente a erradicação Halambek (1986), selecção de material resistente Huang (1995) e a luta biológica com a utilização de estirpes hipovirulentas do fungo (Grente, 1978; Lagaude, 1980; Vort & Grente, 1985; Anagnostakis, 1990).

A extirpação dos cancros é um meio de luta que consiste em retirar da árvore todos os tecidos doentes, até ao aparecimento de tecidos sãos para garantir que não ficam na árvore propágulos que continuam a desenvolver-se e a propagar a doença. Este meio de luta é considerado eficaz quando realizado antes da propagação dos esporos e quando executado de forma sistemática e continuada.

Este trabalho, parte integrante de um estudo mais vasto que visa conhecer o efeito da fertilização mineral na resistência do castanheiro às doenças, teve como objectivos, não só o de avaliar a eficácia da extirpação dos cancros na redução da severidade e dispersão do cancro, mas também o de caracterizar a população de *C. parasitica* presente nos soutos em estudo. Conhecer a diversidade populacional de *C. parasitica* é importante não só em termos do conhecimento da biologia do fungo mas também para se perspectivarem outras estratégias de luta nomeadamente a luta biológica baseada na utilização de estirpes hipovirulentas.

2. Material e métodos

2.1. Luta cultural

Com base em trabalhos anteriormente efectuados sobre a distribuição e incidência do cancro do castanheiro na região de Trás-os-Montes (Gouveia *et al.*, 1999; Anastácio *et al.*, 2001) seleccionaram-se soutos na freguesia de Parada do concelho de Bragança. As árvores foram identificadas quanto à variedade (Judia, Longal) e classificadas quanto ao grau de infecção provocado pelo fungo *C. parasitica*. O grau de infecção foi avaliado 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 procedeu-se à extirpação do cancro até três a quatro centímetros da zona sã, utilizando material cortante que era desinfectado sempre que se mudava de árvore. Procedeu-se ao corte do ramo ou pernada sempre que isso não afectasse a viabilidade da árvore. Todas as feridas, devido à extirpação ou corte de ramos e pernas foram protegidas com oxiclreto de cobre a 20%. Todos 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 eficácia da extirpação foi avaliada com base na observação visual dos cancro extirpados, no desenvolvimento de novos cancro na mesma árvore ou em árvores anteriormente consideradas sãs na proximidade da árvore intervencionada.

2.2. Caracterização da população de *C. parasitica*

Isolamentos do fungo

Nas árvores com sintomas visíveis de cancro do castanheiro foi retirado material vegetal da zona central e da extremidade do cancro para isolamento do fungo em laboratório.

Depois de seleccionados os tecidos vegetais estes foram desinfectados em álcool a 30% e colocados em PDA (Potato Destroxe Agar, Difco, 39 g^l⁻¹). Depois de incubados a 23-25°C durante quatro dias observaram-se as características morfológicas e fez-se a identificação das colónias de *C. parasitica*. Os isolamentos puros de *C. parasitica* foram obtidos por repicagem em meio PDA e conservados em tubos de ensaio com PDA inclinado à temperatura de 4°C.

Características morfológicas

Para avaliação das características morfológicas retirou-se inóculo directamente do isolamento em “stock”, e por inversão foi colocado no centro de placas de Petri e posto a incubar a 23-25°C. As culturas foram examinadas ao sétimo, nono e décimo segundo dias, tendo-se avaliado as seguintes características morfológicas: organização e crescimento do micélio; presença de micélio aéreo; cor da colónia; presença, cor e organização dos picnídios.

Grupos de compatibilidade vegetativa

Para determinar os grupos de compatibilidade vegetativa efectuaram-se pareamentos de todos os isolamentos com os “testers” portugueses (1-P, 2-P, 3-P, 4-P, 5-P). Para a realização dos pareamentos produziram-se conídios de todos os isolamentos em estudo incubando-se as culturas de *C. parasitica* a 25°C com um fotoperíodo de 16 horas durante 10 -14 dias. O pareamento de isolamentos foi realizado com os esporos pelo método de Bissegger *et al.* (1997). O grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) foi determinado com base na resposta compatível (*merging*) ou incompatível (*barrage*) dos pareamentos.

Sensibilidade dos isolamentos de *C. parasitica* ao cobre (Cu²⁺)

Esporos de 5 isolamentos de *C. parasitica*, escolhidos ao acaso dentro da população em estudo, foram transferidos para placas de Petri com meio agarizado de batata (PDA) adicionado com uma solução de sulfato de cobre (Cu SO₄.5H₂O) de forma a obterem-se as seguintes concentrações: 10⁻⁴ M (25 µg.ml⁻¹); 10⁻³ M (250 µg.ml⁻¹) e 2 × 10⁻³ M (500 µg.ml⁻¹). Realizaram-se três repetições por isolamento e concentração e colocaram-se as placas a incubar a 25°C às escuras.

O padrão de referência para o crescimento do fungo foi obtido em PDA sem adição de qualquer substância. O crescimento dos isolamentos foi avaliado pela

medição do diâmetro da colónia em duas direcções perpendiculares, efectuadas com intervalos de 48 horas durante 10 dias.

A concentração de substância que causa 50% de inibição do crescimento (EC50) de cada isolamento foi estimada pela recta de regressão linear obtida da relação entre a transformação probit da percentagem de inibição e a transformação logarítmica (log10) da concentração da substância fungicida.

3. Resultados

3.1. Luta cultural

Depois de fixada a escala de severidade e com base na observação visual das árvores atacadas classificaram-se no Grau 5 – nove castanheiros; Grau 4 – três castanheiros; Grau 3 – oito castanheiros; Grau 2 – 13 castanheiros. Nos castanheiros classificados no Grau 5 a extirpação foi efectuada, mas devido a grande remoção de tecidos do tronco e pernadas a viabilidade biológica das árvores ficou muito afectada. A extirpação do cancro, efectuada conforme anteriormente descrito, ocorreu em Abril. Em Julho a situação em relação ao cancro do castanheiro neste souto evidenciou que todos os castanheiros classificados no Grau 5 se encontravam de facto muito debilitados devido aos cortes necessários para a extirpação do cancro, tendo mesmo morrido cinco destas árvores. As árvores classificadas com Grau 2, 3 e 4 apresentavam boa recuperação e todos os cancros extirpados tinham cessado o seu desenvolvimento e não apresentavam novos cancros em activo desenvolvimento. Exceptua-se a esta situação uma árvore classificada com Grau 3 onde se verificou o desenvolvimento de um novo cancro.

Também nesta época de observação se verificou o aparecimento de sete novas árvores com cancro, isto é, que anteriormente tinham sido classificadas como sãs, tendo sido incluídas no Grau 2 e sujeitas ao processo de extirpação como o descrito anteriormente.

3.2. Características morfológicas

C. parasitica (54 isolados) evidenciou uniformidade morfológica na primeira observação realizada ao quinto dia com crescimento a 25°C e às escuras. Todos os isolados apresentaram micélio aéreo com crescimento e cor característicos de *C. parasitica*. No 12º dia de crescimento, com sete dias de crescimento em condições de laboratório, sete isolados não apresentavam formação de picnídios apresentando três isolados uma distribuição irregular e dispersa destas estruturas de reprodução.

Grupos de Compatibilidade Vegetativa

Quanto ao tipo de compatibilidade vegetativa (VCG) existente nesta população verificou-se por pareamento que todos os isolados manifestaram um comportamento de compatibilidade com o VCG-2-P e por isso classificados como VCG-2-P.

Sensibilidade dos isolamentos ao cobre

A concentração de sulfato de cobre teve um efeito acentuado no crescimento radial do fungo em meio PDA. Para a concentração de 25 µg mL⁻¹ o efeito no

crescimento variou de 0,9 % de promoção do crescimento no isolamento PA2 210 a 8,5 % de redução do crescimento no isolamento PA2 223 (Figura 1).

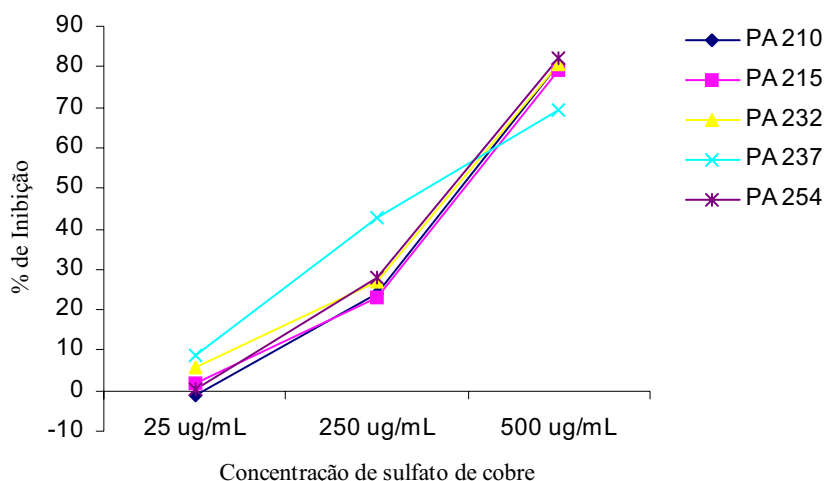


Figura 1 – Inibição do crescimento (%) de 5 isolamentos de *C. parasitica* em PDA contendo 25, 250 e 500 µg.ml⁻¹ de sulfato de cobre.

Na concentração de 250 µg.ml⁻¹ todos os isolamentos testados evidenciaram redução de crescimento que variou de 22,9% a 42,6 % e para a concentração de 500 µg.ml⁻¹ obtiveram-se valores de redução de crescimento que variaram de 69,4% a 82,4 %.

O valor de EC₅₀ determinado pelo método dos probit variou de 337,5 µg mL⁻¹ no isolamento PA2 210 a 262,5 µg mL⁻¹ do isolamento PA2 237 (Quadro 1).

Quadro 1 – Valores de EC₅₀ para isolamentos de *C. parasitica* e crescimento radial em PDA contendo 0, 25, 250, 500 µg mL⁻¹ de sulfato de cobre.

Isolamento	Local	EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹)	Crescimento (mm±SE)			
			0	25 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹
PA2 210	Parada	337,5	74,00±5,65	74,66±2,08	56,33±1,53	14,33±0,58
PA2 215	Parada	315,0	73,50±2,12	72,00±1,73	56,66±1,20	15,33±0,58
PA2 232	Parada	270,0	78,00±0,00	73,33±1,53	57,00±2,50	15,00±1,00
PA2 237	Parada	262,5	78,33±1,41	71,66±8,50	45,00±10,1	24,00±1,00
PA2 254	Parada	325,0	75,50±0,70	75,33±1,52	54,33±5,00	13,50±0,71

4. Discussão

A avaliação da extirpação dos cancos, realizada ao fim de seis meses de ensaio, mostrou que a doença não se desenvolveu nas árvores onde foi executada, levando à recuperação dos castanheiros quando a extensão dos cancos não colocava em causa a viabilidade da árvore.

O aparecimento de cancos em sete novas árvores evidencia, por outro lado, a elevada capacidade de infecção do fungo em castanheiro mas também poderá estar

relacionado com o prolongado período de incubação do fungo em castanheiros adultos, podendo estas árvores estar já infectadas sem que evidenciassem os sintomas da doença.

A extirpação dos cancos é considerada eficaz pela generalidade dos autores e por isso adoptada quando se implementam programas de erradicação, como aliás aconteceu no programa de erradicação do cancro do castanheiro do Ministério da Agricultura em Portugal. Para ser eficaz é necessário que se realize antes da propagação dos esporos devendo ser efectuada de forma sistemática e continuada e por isso considerada difícil de implementar na prática em sistemas florestais e em áreas muito extensas sendo ainda considerada muito laboriosa e onerosa.

A população de *C. parasitica* apresenta grande uniformidade nas características morfológicas relacionadas com a cor e crescimento dos isolados em PDA e maior variabilidade na produção de esporos. Nesta população não se identificaram isolamentos brancos, característica morfológica muitas vezes associada à presença de estirpes hipovirulentas (Grente, 1978).

Todos os isolamentos de *C. parasitica* (54) estudados quanto ao tipo de VCG pelo método de Bissegger *et al.* (1997) são VCG-2-P. É de referir que esta classificação se reporta aos pareamentos realizados com os “testers” portugueses sendo necessário identificar estes “testers” em relação aos “testers” europeus (EU-“testers”) para que haja uniformidade de identificação. Pareamentos realizados com os EU-1, 2, 5, 6, 12 e 13, os mais comuns na Europa, manifestaram um comportamento de “barrage” com o VCG-1-P e 2-P, o que não permitiu fazer a identificação dos VCG portugueses. Este trabalho de uniformização da classificação continua a desenvolver-se em colaboração com o Institute WSL da Suíça.

O VCG 2-P está presente em grande parte da região de Trás-os-Montes aparecendo como único grupo de compatibilidade, exceptua-se a este situação uma população em Vinhais que é VCG 1-P aparecendo ainda nesta zona populações com os dois tipos de VCG (VCG 2-P e VCG 1-P), Gouveia *et al.* (2001). Esta situação é particularmente favorável à introdução da luta biológica com estirpes hipovirulentas compatíveis com o VCG presente, uma vez que a transmissão dos hypovirus terão uma dispersão muito eficiente na população de *C. parasitica* existente em Portugal. Este método de luta com possibilidade de aplicação em larga escala poderá colmatar uma das limitações da luta cultural pela extirpação dos cancos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Programa AGRO - Projecto n.º 151- A nutrição do castanheiro e a resistência às doenças.

Referências bibliográficas

- Anagnostakis, S.L., 1990. Improved chestnut tree conditions maintained in two connecticut plots after treatments with hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. *Forest Science*, 36: 113-124.
- Anastácio, M.L., Mesquita, M. & Ponteira, D. 2001. Programa de erradicação do cancro do castanheiro. Jornadas transfronteiriças do castanheiro. Bragança, 11-12, Maio.
- 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: 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.
- Grente, J. 1978. L'utilisation de l'hypovirulence contagieuse - la lutte biologique contre le chancre a endothia du châtaignier. I.N.R.A. - Station de Pathologie Végétale Clermont - Ferrand: pp. 505-511.
- Halambek, M. 1986. Chestnut blight in Yugoslavia. EPPO Bulletin, 16: 533-535.
- Huang, H., Carey, W.A., Dane, F. & Norton, J.D., 1996. Evaluation of Chinese Chestnut Cultivars for resistance to *Cryphonectria parasitica*. Plant Disease, 80: 45-47.
- Lagaude, V. 1980. Le chancre de l'écorce et la châtaigneraie française. Phytoma - Défense des cultures: 7-10
- Vrot, F. & Grente, J. 1985. Le Chancre de l'écorce du châtaignier. Phytoma - Défense des cultures: 35-37.