

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À
Phytophthora cinnamomi Rands

Maria Eugénia Madureira Gouveia

CURSO DE MESTRADO EM PROTECÇÃO INTEGRADA

1993

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A
Phytophthora cinnamomi Rands

Maria Eugénia Madureira Gouveia

CURSO DE MESTRADO EM PROTECÇÃO INTEGRADA

1993

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A
Phytophthora cinnamomi Rands

Maria Eugénia Madureira Gouveia

Dissertação apresentada no Instituto Superior
de Agronomia da Universidade Técnica de
Lisboa, para obtenção do grau de Mestre em
Protecção Integrada.

CURSO DE MESTRADO EM PROTECÇÃO INTEGRADA

1993

À memória de meu pai

À minha mãe

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), através do projecto PMCT/C/AGR/139/90, “Resistência à doença da tinta em clones autóctones e euroasiáticos de castanheiro”.

AGRADECIMENTOS

Manifesto o meu reconhecido agradecimento a todas as entidades e pessoas que apoiaram e tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Abreu que sempre me presenteou com o seu entusiasmo, empenhamento e estima por todos os seus ensinamentos, conselhos, orientação e ajuda, assim como pela revisão crítica deste trabalho.

À Doutora Maria Eduarda Miranda Guedes Investigadora do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, com quem tive o privilégio de trabalhar, pela gentileza e disponibilidade assim como pela revisão crítica do Cap. V desta dissertação.

À Investigadora Auxiliar, Eng^a Maria do Loreto Maia, Professora Coordenadora Equiparada da Escola Superior Agrária de Bragança pelo apoio e disponibilidade sempre manifestada.

Ao Professor Doutor Jaime Sales Luís da UTAD pelo apoio prestado na análise estatística dos ensaios realizados.

Ao Professor Doutor Dionísio Gonçalves, Presidente da Comissão Instaladora do Instituto Politécnico de Bragança e ao Professor Doutor Francisco Cepeda, Presidente da Comissão Instaladora da Escola Superior Agrária de Bragança pelo apoio prestado.

Aos colegas e amigos Eng^{as} Ana Carvalho, Carlos Aguiar, Jaime Pires e Margarida Arrobas e aos Dr(s) Anabela Martins, Mário Rocha e Victor Alves pelo estímulo, amizade e apoio diversificado e valioso que sempre me dispensaram.

Ao Eng^o Técnico Agrário António Cardoso pelo apoio prestado na realização dos trabalhos experimentais.

Ao amigo Atilano Suarez que desenhou as figuras em computador e fez a montagem das fotografias.

À D. Conceição Ferreira que dactilografou este trabalho pela disponibilidade e simpatia sempre manifestada.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro em especial ao Departamento de Protecção de Plantas, onde decorreu parte dos trabalhos experimentais.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) que financiou em parte este trabalho.

A todos os meus amigos o meu sincero reconhecimento.

DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A
***Phytophthora cinnamomi* Rands**

Maria Eugénia Madureira Gouveia

(Sob a orientação do Prof. Associado Carlos Gomes Abreu)

RESUMO

É apresentada uma nova metodologia de avaliação da resistência do castanheiro à *Phytophthora cinnamomi*, fungo mais frequentemente associado à doença da tinta. Envolve a inoculação de micélio de *P. cinnamomi* em ramos destacados de castanheiro, quando os lançamentos apresentam 30-40cm de crescimento e a incubação em condições adequadas de temperatura e humidade a que se segue a avaliação da dimensão da lesão. Esta metodologia permite avaliar a resistência de árvores adultas, testar elevadas quantidades de material vegetal num período de tempo relativamente curto, é fácil de realizar e torna mais objectivos os critérios de selecção de material resistente.

Estudou-se, ainda, com base em critérios morfológicos e bioquímicos diferentes isolamentos de *Phytophthora*. A dificuldade em obter todos os caracteres morfológicos necessários para a identificação das espécies de *Phytophthora*, foi superada neste estudo, pela análise dos perfis proteicos e enzimáticos do extracto micelial em gel de acrilamida. A uniformidade dos perfis obtidos permitiu concluir que a electroforese de proteínas constitui um critério válido na identificação de *P. cinnamomi*.

Como a avaliação da resistência deve assentar no conhecimento do processo epidemiológico e nas características biológicas do parasita e do seu hospedeiro, apresentam-se ainda, com base numa revisão bibliográfica, os métodos de detecção e isolamento, o processo de patogénese e a epidemiologia dos agentes patogénicos associados à doença da tinta, assim como dos meios de luta a implementar nos viveiros e nos soutos já constituídos.

Palavras chave: doença da tinta do castanheiro; *Phytophthora cinnamomi*; melhoramento do castanheiro; avaliação da resistência.

ABSTRACT

This work reports a new inoculation method for assessing resistance of chestnuts to *Phytophthora cinnamomi*, the ink disease fungus. Micelium was inoculated in excised chestnut stems, when plant annual growth was approximately 30–40cm long. Stems were incubated in suitable temperature and humidity conditions and the lesion extension was measured. This method allows the assessment of mature trees resistance and a quick testing of large amounts of plants. Besides, it is easy to undertake and makes the selection criteria more objective.

Based on morphological and biochemical criteria, different isolates of *Phytophthora* were studied as well. Difficulties in obtaining all the morphological characters to identify the species of *Phytophthora* were overcome by the analysis of proteic and enzymatic profiles of micelial proteins on acrylamide gel electrophoresis.

Uniformity of proteic and enzymatic profiles, leads us to conclude that electrophoresis is a valid criterion to identify *P. cinnamomi*.

Since the assessment of resistance must be based on knowledge of epidemiology and on biological characteristics of both pathogen and host, the methodologies of detection and isolation, the pathogenesis process and the epidemiology of pathogens associated with ink-disease were analysed based on a literature review, as well as control practices to be implemented in nurseries and chestnut groves.

Key words: chestnut ink disease; *Phytophthora cinnamomi*; breeding of chestnut; assessing resistance.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	1
II – O CASTANHEIRO E A DOENÇA DA TINTA EM PORTUGAL	4
III – FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO – <i>Phytophthora cambivora</i> e <i>P. cinnamomi</i>	7
3.1 – Algumas Considerações	7
3.2 – Detecção e Isolamento	10
3.2.1 – Técnicas de planta-armadilha	10
3.2.2 – Meios selectivos	13
3.3 – Taxonomia e Classificação	16
3.3.1 – Critérios actuais de classificação	16
3.3.2 – Outros critérios taxonómicos	18
3.4 – Ciclo Infeccioso	20
3.4.1 – Quimiotaxia e quimiotropismo	20
3.4.2 – Colonização dos tecidos	22
3.4.3 – Expressão dos sintomas	23
3.4.4 – Bases fisiológicas da patogénese e manifestação dos sintomas	27
3.4.5 – Disseminação	27
3.4.6 – Saprofitismo e sobrevivência	28
3.4.6.1 – Classificação ecológica	28
3.4.6.2 – Sobrevivência nos tecidos do hospedeiro.....	29
3.4.6.3 – Sobrevivência na ausência do hospedeiro	29
3.4.6.3.1 – Clamidósporos	29
3.4.6.3.2 – Oósporos	30
3.4.6.3.3 – Zoósporos e Zoósporos enquistados	30

3.4.7 – Estratégias de sobrevivência	31
3.5 – Epidemiologia. Algumas considerações em <i>Phytophthora</i>	34
3.5.1 – Desenvolvimento epidémico	34
3.5.2 – Determinação dos parâmetros do modelo	34
3.5.3 – Dinâmica populacional dos agentes patogénicos policíclicos	36
3.5.4 – Principais factores ambientais de patogénese em <i>P. cinnamomi</i>	37
3.5.4.1 – Humidade do solo	37
3.5.4.2 – Temperatura	38
3.5.5 – Relação entre densidade de inóculo e incidência da doença em <i>Phytophthora</i>	38
3.5.6 – Utilização dos modelos matemáticos na avaliação das diferentes estratégias de luta	40
3.6 – Meios de luta	41
3.6.1 – Meios de luta a implementar nos viveiros	42
3.6.1.1 – Solarização do solo	44
3.6.2 – Meios de luta a utilizar na cultura já instalada	45
3.6.2.1 – Utilização de fungicidas	46
3.6.2.2 – Meios de luta biológicos e culturais	47
3.6.2.2.1 – Solos supressivos	48
3.6.2.2.2 – Introdução de antagonistas no solo	50
3.6.2.2.3 – Micorrizas	51
3.6.2.2.4 – Alteração das condições ambientais	52
 IV – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E MELHORAMENTO DO CASTANHEIRO EM RELAÇÃO À DOENÇA DA TINTA	 53
4.1 – Introdução	53
4.2 – Resistência Horizontal	55
4.3 – Mecanismos que Conferem Resistência a <i>P. cinnamomi</i>	56

4.3.1 – Mecanismos de fuga à doença	56
4.3.2 – Mecanismos de resistência	57
4.3.2.1 – Resistência à infecção	57
4.3.2.1.1 – Mecanismos de defesa físicos	58
4.3.2.1.2 – Mecanismos de defesa bioquímicos	59
4.4 – Melhoramento do Castanheiro em Relação à Doença da Tinta	60
V – IDENTIFICAÇÃO DE ISOLAMENTOS DE <i>PHYTOPHTHORA</i> OBTIDOS DE PLANTAS COM SINTOMAS CARACTERÍSTICOS DA DOENÇA DA TINTA	
5.1 – Introdução	64
5.2 – Material e Métodos	67
5.2.1 – Isolamentos de <i>Phytophthora</i>	67
5.2.2 – Caracteres morfológicos	68
5.2.2.1 – Morfologia da colónia em meio gelosado de milho (CMA)	68
5.2.2.2 – Morfologia das hifas	68
5.2.2.3 – Morfologia dos esporângios	69
5.2.3 – Observações microscópicas e medições micrométricas	69
5.2.4 – Caracteres bioquímicos – electroforese de proteínas miceliais e sistemas enzimáticos	70
5.2.4.1 – Condições culturais dos fungos em estudo	70
5.2.4.2 – Extração de proteínas miceliais totais	70
5.2.4.3 – Electroforese de proteínas miceliais	70
5.2.4.4 – Sistemas enzimáticos	70
5.3 – Resultados	71
5.3.1 – Caracteres morfológicos	71

5.3.1.1 – Morfologia e crescimento radial da colónia	71
5.3.1.2 – Morfologia das hifas	72
5.3.1.3 – Esporângios	74
5.3.2 – Caracteres bioquímicos	76
5.3.4.1 – Perfis proteicos e enzimáticos	76
5.4 – Discussão	79
VI – AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CASTANHEIRO A <i>Phytophthora cinnamomi</i>	83
6.1 – Introdução	83
6.2 – Material	87
6.2.1 – Isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	87
6.2.2 – Material vegetal	87
6.3 – Metodologia	88
6.3.1 – Inoculação em ramo destacado	88
6.3.2 – Inoculação de ramo destacado em meio de cultura	90
6.3.3 – Inoculação em discos destacados de folha	91
6.4 – Resultados e Discussão	91
6.4.1 – Inoculação em ramo destacado	91
6.4.2 – Inoculação de ramo destacado em meio de cultura	97
6.4.2 – Inoculação em discos destacados de folha	97
6.5 – Conclusões	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXO I – Clones de castanheiro resistentes à doença da tinta e vegetativamente propagados no Centro Regional de Investigação e Desenvolvimento Agrário de Bragança	115

ANEXO II – Perfil das proteínas miceliais dos 8 isolamentos de <i>Phytophthora</i> em PhastGel IEF 4-6,5 e sua ampliação fotográfica	117
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 – Sintomatologia característica da doença da tinta do castanheiro. A – Ouriços que ficaram aderentes à árvore. B – Folhas amarelecidas e sem brilho que vão murchando, acabando por cair prematuramente. C – Desenvolvimento de ramos junto do colo da planta e abaixo das pernas principais numa árvore muito atacada pela doença.	24
Fig. 2 – Sintomatologia do ataque de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em plantas jovens de castanheiro. A – Distribuição generalizada da doença da tinta no viveiro. B – Folhas amarelecidas e enroladas que rapidamente ficam necróticas.	26
Fig. 3 – Processos alternativos de germinação dos clamidósporos e esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A – Germinação de um clamidósporo pela emissão de hifas germinativas (× 400). B – Germinação de um clamidósporo dando origem a um microclamidósporo (× 400). C – Germinação directa de um esporângio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (× 400)	32
Fig. 4 – Provável ciclo infeccioso de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	33
Fig. 5 – Representação gráfica da progressão das doenças de tipo policíclico (—) e transformação logit da proporção de doença (---) ao longo do tempo (MACKENZIE <i>et al.</i> , 1987).	35
Fig. 6 – Dinâmica populacional dos agentes patogénicos de tipo policíclico (FRY, 1982).	36
Fig. 7 – Diagrama representativo do programa de melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta.	63
Fig. 8 – Aspecto característico das hifas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A – Hifas de aspecto irregular e verrucosas (× 400). B – Dilatações terminais isoladas em hifas lisas e uniformes da parte aérea da colónia (× 400). C – Dilatações terminais das hifas dispostas em grupo (× 400). As dilatações das hifas são semelhantes aos clamidósporos, diferenciando-se destes por não apresentarem septos que os separam das hifas e parede interna contínua.	73

Fig. 9 – Esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> obtidos em solução de Petri. A e B – Esporângios ovóides, não papilados e não caducos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (× 400). B – Esporângio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> corado com lactofenol azul (× 400).	75
Fig. 10 – Espectro de proteínas totais, obtidas em gel de acrilamida com gradiente de Focagem Isoelétrica 4,0-6,5.	77
Fig. 11 – Espectro de esterase em gel de acrilamida com gradiente de Focagem Isoelétrica 3,0-9,0.	79
Fig. 12 – Inoculação em ramo destacado de castanheiro. A – Micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meio gelosado de batata dextrosada. B – Ramo destacado de castanheiro, seccionamento do ápice. C – Inoculação com disco de micélio e meio de cultura. D – “Câmara húmida” obtida com a utilização de papel de alumínio.	89
Fig. 13 – Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 3 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).	92
Fig. 14 – Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 6 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).	93
Fig. 15 – Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 10 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).	93

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Área de ocupação do castanheiro em Portugal desde 1908	5
Quadro 2 – Área da ocupação do castanheiro previstas para 1980 (FERNANDES 1955a)	6
Quadro 3 – Técnicas de planta-armadilha para detecção e isolamento de <i>P. cambivora</i> e <i>P. cinnamomi</i>	11
Quadro 4 – Meios selectivos para isolamento de <i>P. cinnamomi</i>	14
Quadro 5 – Grupo químico e respectivas substâncias activas selectivas para os <i>Peronosporales</i>	47
Quadro 6 – Propriedades químicas dos solos afectados (local 1) e não afectados (locais 2 e 3) pela doença da tinta na região de Bragança (FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 1991).....	49
Quadro 7 – Microrganismos antagonistas para <i>P. cinnamomi</i> e mecânismos envolvidos	50
Quadro 8 – Caracterização sumária dos isolamentos de <i>Phytophthora</i>	68
Quadro 9 – Análise da variância dos valores referentes ao crescimento radial da colónia ao fim de 10 dias de incubação dos diferentes isolamentos de <i>Phytophthora</i>	72
Quadro 10 – Crescimento radial médio das colónias dos diferentes isolamentos de <i>Phytophthora</i> após 10 dias de incubação a 22-23°C	72
Quadro 11 – Características biométricas médias dos esporângios	74
Quadro 12 – Valores do Índice de Similaridade (bandas principais)	78
Quadro 13 – Valores do Índice de Similaridade (totalidade das bandas)	78
Quadro 14 – Características e origem dos clones de castanheiro	88
Quadro 15 – Dimensão média da lesão, nos ramos destacados de castanheiro ao 3º, 6º e 10º dia depois da inoculação com os isolamentos IMI 335 488 e IMI 335 492	92
Quadro 16 – Análise da variância dos valores referentes à dimensão da lesão (DL) apresentada ao 3º 6º e 10º dias de incubação (T) pelos clones de castanheiro (C) quando inoculados com 2 isolamentos diferentes de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (P). (5 repetições/clones)	94

Quadro 17 – Análise da variância dos valores referentes à dimensão da lesão ao 10 ^o dia após a inoculação dos 8 clones de castanheiro (C) quando inoculados com os 2 isolamentos de <i>P. cinnamomi</i> (P). (5 repetições/clones)	95
Quadro 18 – Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 488.....	95
Quadro 19 – Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 492	95
Quadro 20 – Classificação dos clones de castanheiro quanto ao nível de resistência <i>P. cinnamomi</i> avaliados pelo método de inoculação em ramo de planta intacta	96
Quadro 21 –Tempo, em horas, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas claramente visíveis.....	97
Quadro 22 –Análise da variância dos valores referentes ao número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro (C) quando inoculados com dois isolamentos diferentes de <i>P. cinnamomi</i> (P) (5 repetições/clone)	98
Quadro 23 – Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculados com o isolamento IMI 335 488 (5 repetições/clone)	98
Quadro 24 – Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculados com o isolamento IMI 335 492 (5 repetições/clone)	99
Quadro 25 – Cálculo do Índice de ELSTON e ordenação dos clones	100

I - INTRODUÇÃO

A doença da tinta é considerada pela generalidade dos autores como a principal responsável pelo declínio dos soutos, embora muitas outras causas possam estar envolvidas.

A esta doença estão associadas duas espécies do género *Phytophthora*, *P. cambivora* e *P. cinnamomi*, que de forma sistemática têm atingido todas as regiões castaneícolas do país e do mundo.

Em Portugal a doença de tinta do castanheiro, presente desde os meados do século passado, foi de tal forma devastadora que NATIVIDADE (1944) a expressou da seguinte forma “Na verdade, aquilo que ontem ainda, no meado do século passado, foi copiosa riqueza, não é hoje mais do que modesto remédio, e será poeticamente amanhã, uma saudade apenas”. Com base nessa análise, NATIVIDADE (1944) elaborou o plano “Bases para um Plano de Reconstituição Valorização e Defesa dos Soutos Portugueses”, onde indicava o caminho a seguir para evitar o desaparecimento dos castanheiros em Portugal.

Os estudos desenvolvidos no domínio de patologia do castanheiro, conduzidos por LOPES PIMENTEL e COLUMBANO FERNANDES, contribuíram decisivamente para o conhecimento dos agentes patogénicos associados à doença da tinta e para o desenvolvimento de meios de luta contra esta doença, afinal, o objectivo último dos estudos de fitopatologia.

Todavia, e pese embora a implementação do Plano de Reconstituição e de todos os esforços de investigação no domínio da fitopatologia e do melhoramento do castanheiro em relação a estes fungos fitopatogénicos, a doença da tinta continuou e continua a exercer o seu efeito devastador. Como reflexo, a área actual de ocupação do castanheiro traduz o progressivo avanço da doença e a desmotivação dos agricultores em investir na sua plantação.

Há, contudo actualmente, um renovado interesse pela cultura do castanheiro, consequência de um conjunto de factores socio-económicos e ecológicos que indicam o castanheiro como espécie de eleição para a “Terra fria” transmontana. Facto que se evidencia no elevado número de projectos de investimento, ao abrigo dos programas de apoio à agricultura e à plantação de espécies florestais pelos quais se prevê a instalação de soutos e castinçais em milhares de hectares.

Esta nova realidade, que constituirá um caminho de valorização futura da agricultura transmontana, exige que os estudos no domínio da fitopatologia do castanheiro prossigam e conduzam a um melhor conhecimento da biologia e

epidemiologia dos parasitas associados à doença de tinta e das interacções que se estabelecem entre o hospedeiro e esses parasitas.

Neste trabalho, após uma breve análise da importância do castanheiro e da doença de tinta em Portugal (Capítulo II), caracterizam-se os agentes patogénicos associados à doença da tinta, sob o ponto de vista biológico e epidemiológico, com base numa revisão bibliográfica de que se seleccionaram os aspectos de maior interesse fitopatológico (Capítulo III). Especial referência mereceram as técnicas de isolamento e de identificação das espécies de *Phytophthora*, uma vez que a bibliografia é unânime em considerar estas actividades, iniciais de qualquer estudo fitopatológico, de difícil concretização prática.

Para limitar o desenvolvimento epidémico das doenças provocadas por *P. cinnamomi*, parasita que ataca elevado número de plantas lenhosas e arbustivas, têm-se desenvolvido importantes meios de luta. No entanto, a solução deste grave problema fitossanitário parece estar, ainda, longe e só o desenvolvimento de uma filosofia de Protecção Integrada, que considere a globalidade do sistema e integre todos os meios de luta, poderá indicar caminhos que conduzam à desejada solução. Nesta perspectiva analisaram-se, ainda no Capítulo III, os meios de luta a implementar nos viveiros de castanheiros e nos soutos, tendo em consideração o desenvolvimento epidémico dos parasitas e as características biológicas do seu hospedeiro – o castanheiro.

Os meios de luta genéticos e o melhoramento do castanheiro, em relação à doença da tinta, base de partida deste trabalho, foram analisados no Capítulo IV e prosseguiram de forma indirecta ou directa nos Capítulos V e VI.

Nos estudos da resistência das plantas às doenças, torna-se necessário desenvolver metodologias que evidenciem claramente as relações que se estabelecem entre o parasita e o hospedeiro e permitam diferenciar os diferentes genótipos. Para atingir estes objectivos é necessário identificar de forma precisa o parasita. Na doença da tinta esta identificação apresenta alguma dificuldade, pois as duas espécies de *Phytophthora* associadas à doença possuem características morfológicas muito próximas, e os critérios de separação das duas espécies são por vezes dificilmente objectiváveis. Há, ainda a acrescentar dificuldades de ordem prática para obter as diferentes estruturas morfológicas com valor taxonómico. No Capítulo V, apresenta-se o estudo de identificação de diferentes isolamentos de *Phytophthora*, com base em critérios morfológicos e bioquímicos. Como primeiro critério avaliaram-se alguns caracteres morfológicos diferenciadores e como critério bioquímico, estudaram-se os perfis proteicos e enzimáticos (esterases) das proteínas miceliais, por focagem isoeléctrica em gel de acrilamida em aparelho PhastSystem Pharmacia. No último capítulo, Capítulo VI, estudou-se uma nova metodologia de avaliação da resistência do castanheiro em relação a *P. cinnamomi*, com o objectivo de obter um método que permitisse testar elevadas

quantidades de material vegetal, num período de tempo relativamente curto, expedito e fácil de realizar, tornando mais objectivos os critérios de selecção do material resistente.

II – O CASTANHEIRO E A DOENÇA DA TINTA EM PORTUGAL

O castanheiro europeu, *Castanea sativa* Mill., é uma espécie de origem muito antiga, situando-se o seu centro de dispersão, na Europa Centro Meridional (FENAROLI, 1945).

Apresenta grande variabilidade, devido às suas origens longínquas e à selecção natural operada pelas características do clima e do solo onde se desenvolveu e ainda devido à selecção feita pelo homem que desde muito cedo o cultivou (BERGOUIGNOUX *et al.*, 1978).

Por ser uma espécie cultivada desde tempos remotos, a área de distribuição primitiva é difícil de estimar (BERGOUIGNOUX *et al.*, 1978; GOMES, 1982), aparecendo desde a Europa Meridional à Ásia Menor acompanhando de perto o paralelo 40° de latitude Norte (MARQUES, 1988).

Em Portugal, o castanheiro aparece fundamentalmente a norte do paralelo 39°, encontrando-se as maiores manchas em Trás-os-Montes e na Beira Alta (MARQUES 1988).

Ainda, segundo o mesmo autor, o castanheiro exige uma temperatura média anual de 8 a 14°C, com temperatura média do mês mais frio superior a -1°C, temperatura mínima absoluta superior a -16°C e uma precipitação média anual de 800 a 1600mm, devendo a queda pluviométrica no período, Abril-Junho, ser superior a 25% do valor total anual.

A doença da tinta, considerada por muitos, como a principal causa da degradação e desaparecimento dos soutos, terá surgido em Portugal por volta de 1838 junto das margens do rio Lima (FERNANDES, 1966). Nessa época, em Portugal, a causa da morte dos castanheiros não era conhecida. A identificação dos organismos responsáveis pela doença ocorreu praticamente um século depois do aparecimento da doença, quando em 1941 MONIZ da MAIA isolou fungos de género *Phytophthora* de tecidos infectados de castanheiro. PIMENTEL, em 1942, confirmou os isolamentos identificando *P. cinnamomi* e *P. cambivora* de tecidos doentes (PIMENTEL, 1947).

O avanço da doença foi de tal forma alarmante e devastador que NATIVIDADE (1944) apresentou o documento “Bases para um Plano de Valorização Reconstituição e Defesa dos Soutos Portugueses“, no qual indicava um possível caminho a seguir para evitar a perda de uma das nossas melhores espécies florestais. O plano de NATIVIDADE, teve o apoio das instâncias governamentais da época e incluía a realização de inquéritos regionais para avaliar a situação da cultura do castanheiro, a defesa dos soutos existentes,

o apoio técnico nas novas instalações e a realização de estudos de base que permitissem dar resposta às questões técnicas e fitossanitárias que então se colocavam.

A implementação do plano de NATIVIDADE (1944) contribuiu decisivamente para o desenvolvimento de trabalhos de investigação que possibilitaram um maior conhecimento do castanheiro, tanto do ponto de vista ecológico como fitotécnico e sanitário.

No domínio da fitopatologia do castanheiro, destacam-se os trabalhos que sobre o tema foram realizados por LOPES PIMENTEL e COLUMBANO FERNANDES. LOPES PIMENTEL identificou os agentes patogénicos responsáveis pela doença da tinta e desenvolveu estudos sobre as espécies causadoras da doença, que muito contribuíram para a clarificação das espécies de *Phytophthora* envolvidas no síndrome da tinta. COLUMBANO FERNANDES, por sua vez, além de estudos biológicos e epidemiológicos, desenvolveu ao longo de muitos anos, trabalho continuado no melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta, referido em pormenor no Capítulo IV, do qual resultou a colecção de clones resistentes a esta doença existentes em Portugal.

O efeito devastador da doença de tinta do castanheiro pode ser avaliado (embora outras causas possam estar envolvidas) pela área de ocupação do castanheiro ao longo deste século.

Da análise do Quadro 1, que na ausência de melhores dados estatísticos, se construiu com base nas referências bibliográficas aí assinaladas, verifica-se que a área de ocupação do castanheiro regrediu drasticamente em todas as regiões castaneícolas do país. A situação actual exige, um novo Plano de Defesa do Castanheiro, para que esta espécie possa contribuir para a valorização e constituir uma alternativa rendível para alguns terrenos cerealíferos da “Terra Fria” transmontana.

Quadro 1 – Área de ocupação do castanheiro em Portugal desde 1908.

Autor (Ano)	Área de castanheiro (ha)		
	Trás-os-Montes e Alto Douro	Beira Alta e Beira Baixa	Total do País
SILVA TELES (1908) *	38 236	38 801	83 987
FERNANDES (1955a)	37 700	24 500	70 000
MARQUES (1988) **	8 889 ± 448 3 392 ± 278	–	–
DIRECÇÃO GERAL FLORESTAS (1989)	15 400	14 400	32 100

* cit FERNANDES (1955a)

** área de souto (castanheiro para fruto)

Em Trás-os-Montes, mais concretamente na “Terra Fria”, o castanheiro encontra as melhores condições ecológicas para o seu desenvolvimento, produzindo madeira e fruto de excelente qualidade (FERNANDES 1966). Este mesmo autor considera ainda que “a economia das populações rurais desta região tem fatalmente de estar dependente da cultura do castanheiro”.

As acções então desenvolvidas na defesa e reconstituição dos soutos e a receptividade dos agricultores, levaram (FERNANDES, 1955a), a prever, para 1980, as seguintes áreas de ocupação de castanheiro:

Quadro 2 – Área de ocupação do castanheiro previstas para 1980 (FERNANDES, 1955a).

Províncias	Área provável (ha) em 1980
Trás-os-Montes e Alto Douro	90 000
Beira Alta e Beira Baixa	50 000
Outras províncias	10 000

A realidade, todavia, é muito diferente. As áreas actuais de castanheiro (Quadro 1), estão situadas a valores inferiores aos de 1955 e muito abaixo das áreas previstas. Valores que evidenciam por um lado, a ineficiência dos métodos de luta utilizados no combate à doença da tinta e por outro o seu progressivo avanço, além de condições socio-económicas que não motivaram os agricultores para a instalação de novas áreas de castanheiro.

Actualmente, os programas de apoio à agricultura e à plantação de espécies florestais, onde o castanheiro se enquadra, os preços elevados e estáveis que a castanha tem atingindo no mercado e ainda a fraca intensificação cultural do castanheiro, que exige pouca mão-de-obra, constituem incentivos que têm motivado os agricultores na decisão de instalar castanheiros, tanto para produção de madeira como de fruto.

Esta nova realidade evidencia-se no elevado número de projectos de investimento em castanheiro que constituirão uma base segura de valorização da agricultura transmontana. As intenções de investimento em castanheiro através do programa NOVAGRI situam-se na ordem dos milhares de hectares, estando alguma dessa área já aprovada e outra em análise na Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes.

III – FUNGOS ASSOCIADOS À DOENÇA DA TINTA DO CASTANHEIRO – *Phytophthora cambivora* e *Phytophthora cinnamomi*

3.1 – Algumas Considerações

Em 1917, PETRI, isolou o organismo causador da doença da tinta do castanheiro e classificou-o como *Blepharospora cambivora*, que BUISMAN em 1927 transferiu para o género *Phytophthora* – *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman. Mais tarde, em 1932, DAY associou a esta doença outra *Phytophthora* – *Phytophthora cinnamomi* Rands (CRANDALL, 1950).

Posteriormente, o organismo responsável pela doença da tinta, foi identificado, por alguns investigadores, como *P. cinnamomi* e por outros como *P. cambivora*.

A anarquia, que reinava na classificação do género *Phytophthora* (GREUTE, 1961b) levou alguns micologistas a seguir o critério de MERHRLICH, que em 1936 propôs, que *P. cinnamomi* e *P. cambivora* fossem fundidas numa única espécie – *P. cambivora*.

Este critério foi adoptado por WHITE em 1937 e por DAY em 1938 (GREUTE, 1961b) e por CRANDALL em 1936 (CRANDALL, 1950), tornando confusa a lista de hospedeiros e a distribuição geográfica dos dois parasitas.

Nem todos os micologistas, no entanto, seguiram este critério. TUCKER (1931), PIMENTEL (1947) e URQUIJO (1947), consideraram *P. cambivora* e *P. cinnamomi* como espécies diferentes, tendo estes micologistas isolado as duas espécies de castanheiros europeus doentes.

CRANDALL (1950) depois de analisar os trabalhos de PIMENTEL em Portugal e de URQUIJO em Espanha, atribuiu a *P. cinnamomi* um papel primordial no desenvolvimento da doença da tinta, a que não são estranhas as reservas de URQUIJO (1947), que reviu os seus isolamentos e concluiu que a doença da tinta em Espanha era provocada por *P. cinnamomi* e não por *P. cambivora*, como tinha anteriormente considerado.

Também FERNANDES (1966) considera *P. cinnamomi* como o organismo preponderante no desenvolvimento da doença da tinta em Portugal, baseado no facto de apenas três dos seus isolamentos serem *P. cambivora* entre largas dezenas de culturas identificadas como *P. cinnamomi*.

O facto das duas espécies de *Phytophthora* provocarem sintomatologia semelhante no castanheiro intrigou inicialmente os investigadores, mas esta situação é

frequente em doenças provocadas por outras espécies de *Phytophthora*. Na gomose basal dos citrinos, por exemplo, a mesma sintomatologia pode ser provocada por *P. citrophthora*, *P. nicotiana* var. *parasitica* ou *P. palmivora*. Estas mesmas espécies e ainda *P. cinnamomi*, podem também provocar ataques nas raízes destes hospedeiros, originando todas um quadro sintomatológico idêntico (TELHADA, 1988).

De castanheiros jovens, GRENTE (1961b), isolou *P. megasperma* Dreschsler, além de *P. cambivora* e *P. cinnamomi*. Todavia, aquela espécie não aparece referenciada em castanheiro por mais nenhum autor.

Na doença da tinta da noqueira a situação é ainda mais diversificada, tendo sido isoladas e identificadas como espécies responsáveis pela doença, *P. cinnamomi*, *P. cambivora*, *P. cactorum*, *P. parasitica* e *P. citrophthora*, como refere GRENTE (1961b).

P. cambivora tem uma distribuição geográfica muito mais limitada que *P. cinnamomi*, aparecendo apenas nas zonas temperadas. Possui também reduzido número de hospedeiros, CRANDALL (1950) refere apenas o castanheiro na Europa, a faia na Inglaterra e o ácer na América do Norte. Trabalhos mais recentes, no entanto, indicam esta espécie como um dos agentes patogénicos envolvidos na podridão radicular da macieira (BOLAY, 1992). Por outro lado, MIRCETICH & MATHERON (1976) associaram esta espécie, conjuntamente com *P. drechsleri* e *P. megasperma*, às podridões da raiz e do colo em *Prunus persica* (L.) Batsch, *P. armeniaca* L., *P. amygdalus* Batsch, *P. domestica* L. e *Malus sylvestris* Mill..

P. cinnamomi, é considerada por CRANDALL (1950), FERNANDES (1966) e ZENTMYER (1987) como um dos organismos mais destrutivos dos vegetais. ZENTMYER (1987) considera-o ainda, como o mais difundido geograficamente e com o maior número de hospedeiros.

ZENTMYER (1980), na sua monografia sobre *P. cinnamomi*, lista como plantas susceptíveis a este parasita cerca de mil espécies vegetais. Da lista apresentada, sobressai o elevado número de plantas lenhosas e arbustivas que são susceptíveis a este parasita quando comparado com o número das espécies herbáceas. Como plantas não susceptíveis destacam-se as monocotiledóneas (que raramente são infectadas em condições naturais), a luzerna, o café e o algodão. No entanto, algumas monocotiledóneas da flora australiana do género *Xanthorrhoea*, *Lilium*, *Cordyline* e *Archontophoenix* são consideradas susceptíveis. Das plantas lenhosas consideradas resistentes, ZENTMYER (1980) destaca: *L. styraciflua*, *Cryptomeria japonica* var. *elegans*, *Cordyline australis*, *Phormium tenax* e duas espécies de *Pittosporum* e *Podocarpus*.

A distribuição geográfica de *P. cinnamomi* é muito diversificada, aparecendo nas regiões temperadas, sub-tropicais e tropicais, estando actualmente identificada em sessenta e oito países e em todos os continentes (ZENTMYER, 1980).

Em Portugal, como já se referiu, *P. cinnamomi*, foi isolada de castanheiro, pela primeira vez em 1941 por MONIZ DA MAIA. Estes isolamentos foram confirmados por PIMENTEL em 1942 que isolou e identificou *P. cinnamomi* e *P. cambivora* de castanheiro com sintomas da doença (PIMENTEL, 1947).

O estudo dos fungos responsáveis pela doença da tinta prosseguiu com FERNANDES que em 1966 refere que *P. cinnamomi* foi isolada em Portugal de *Betula alba* L., *Castanea sativa* Mill., *Castanea crenata* Sieb et Zucc., *Erica* spp., *Juglans regia* L., *Pseudotsuga menziessi* (Mirb.) Franco, *Quercus robur* L., *Quercus rubra* L., *Quercus suber* L..

O facto deste parasita causar doença em plantas como a urze, *Erica* spp., que é espontânea em todas as regiões propícias ao desenvolvimento do castanheiro, possibilita uma expansão generalizada do parasita e grande incremento da doença, pelo facto desse substrato arbustivo poder contribuir para aumentar enormemente o inóculo potencial (FERNANDES, 1966). Situação idêntica ocorre também no processo de declínio conhecido por "jarrah dieback", nos eucaliptos da Austrália, uma vez que o substrato arbustivo destas florestas, constituído por *Banksia grandis* Wild., planta muito susceptível a *P. cinnamomi* (SHEA & MALAJCZUK, 1977), proporciona um grande aumento na população patogénica, que assim, mais facilmente consegue provocar doença nas árvores de maior porte, os eucaliptos, designadamente no *Eucalyptus marginata*.

P. cinnamomi além de ter a capacidade de provocar doença em muitos 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. Por outro lado, possui ainda estratégias de rápido aumento de inóculo sempre que as condições lhe são favoráveis e processos alternativos de germinação dos propágulos que respondem rapidamente às alterações ambientais.

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. Só uma análise que considere a globalidade do sistema poderá indicar linhas de actuação que permitam minorar os efeitos devastadores destas doenças.

Neste capítulo, de forma completa mas sem pretender ser exaustiva, abordam-se as técnicas que permitem isolar e identificar os agentes patogénicos associados à doença da tinta, o seu ciclo infeccioso e epidemiológico assim como os meios de luta a implementar nos viveiros de castanheiro e nos soutos já instalados.

3.2 – Detecção e Isolamento

Os métodos e os meios de cultura utilizados na detecção e isolamento dos fungos do género *Phytophthora* que atacam as raízes, são muitos e variados. Métodos tradicionais e de rotina laboratorial, como a colocação de tecidos infectados em água, extractos de solo ou soluções salinas, ou ainda, a utilização das vulgares técnicas de isolamento em meio de cultura, permitem a detecção e o desenvolvimento em cultura axénica, caso se usem tecidos recentemente infectados e com micélio em activo crescimento. No entanto, o isolamento de *Phytophthora* de tecidos em avançado estado de infecção, degradados ou secos, situações vulgares neste tipo de doença, ou de solos naturalmente infectados, é com estas técnicas extremamente difícil (ECKERT & TSAO 1962; FERNANDES, 1966; TSAO & OCANA, 1969; ZENTMYER, 1980), ou mesmo impossível (TSAO, 1987; TSAO, 1990).

ZENTMYER (1980) atribuiu a ineficiência destas técnicas à utilização de soluções de mercúrio para esterilizar a superfície dos tecidos, dado que este produto é extremamente tóxico para algumas espécies de *Phytophthora* e ECKERT & TSAO (1962) e TSAO (1987) ao antagonismo e interferência da micoflora secundária de crescimento mais rápido e à lenta emergência dos propágulos de resistência, os clamidósporos, que se encontram nos tecidos infectados ou no solo.

Estas dificuldades, e os repetidos insucessos de isolamento destes fungos fitopatogénicos, tornaram premente o desenvolvimento de outras técnicas de isolamento, nomeadamente as que se baseiam na utilização de plantas-armadilhas e nos meios culturais selectivos.

3.2.1 – Técnicas de planta-armadilha

Estas técnicas baseiam-se na utilização de determinados órgãos de plantas susceptíveis, frutos, sementes, cotilédones, radículas ou folhas, que funcionam como meio privilegiado de desenvolvimento dos propágulos de resistência e possibilitam o isolamento selectivo das espécies de *Phytophthora*.

A eficiência destas técnicas depende da susceptibilidade do material utilizado como armadilha, do desenvolvimento de lesões características e das condições de incubação que maximizem as hipóteses de formação e libertação dos zoósporos - os propágulos primários da colonização dos tecidos vegetais.

Das revisões bibliográficas de ZENTMYER (1980) e TSAO (1987), extraíram-se alguns dos métodos de planta-armadilha utilizados no isolamento de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* que se indicam no Quadro 3.

Quadro 3 – Técnicas de planta-armadilha para detecção e isolamento de *P. cambivora* e *P. cinnamomi*.

Espécie Autor	Tecido armadilha	Características do método e condições de incubação
<i>P. cambivora</i>		
DANCE <i>et al.</i> (1975)	Agulhas de coníferas e radículas de tremoceiro	Colocar em flutuação ou parcialmente imersas numa mistura de solo e água; 16-22°C; 3 dias
MIRCETICH e MATHERON (1976)	Pêras	Submersão parcial numa mistura de solo e água; 20°C; 3 dias.
<i>P. cinnamomi</i>		
CAMPBELL (1949)	Maçãs	Em orifícios feitos nas maçãs, colocar solo humedecido ou tecidos infectados; 15-27°C; 5-10 dias.
ANDERSON (1951)	Folhas de ananás	Submersão em 800 cc de água a que se adiciona 20 cc de solo; 21-14°C; 4 dias
ZENTMYER <i>et al.</i> (1960)	Frutos e plântulas de abacate	Frutos parcialmente submersos em solo humedecido; 27°C; 2-4 dias. Plântulas em solo húmido, 2-3 dias
KLEMMER e NAKANO (1962)	Folhas de ananás e raízes da coroa	Folhas e extremidades das raízes imersas em pelo menos 5cm de uma mistura de solo e água; 18-27°C
CHEE e NEWHOOK (1965)	Radículas de tremoceiro	Extremidade das raízes imersas em água que deve estar 2cm acima da superfície do solo; 2 dias.
MARKS <i>et al.</i> (1972)	Radículas excisadas de <i>Lupinus angustifolius</i>	Fragmentos de radículas com 1-2 cm de comprimento colocadas a flutuar na água com uma altura de 2-3mm acima de 30 cc de solo em placas de Petri; 2-3dias.
PRATT e HEATHER (1972)	Radículas de tremoceiros	Raízes imersas em 150 cc de água a que se adiciona 26g de solo; 17-24°C; 5 dias
MARKS e KASSABY (1974)	Cotilédones de eucalipto	Cotilédones destacados são postos a flutuar na água com 5-10 mm de altura acima de 50-60 cc de solo; 22-24°C; 60 h.
DANCE <i>et al.</i> (1975)	Agulhas de coníferas e radículas de tremoceiro	Colocar em flutuação ou parcialmente imersos numa mistura de solo e água; 16-22°C; 3 dias

Quadro 3 (cont.) – Técnicas de planta-armadilha para detecção e isolamento de *P. cambivora* e *P. cinnamomi*.

Espécie Autor	Tecido armadilha	Características do método e condições de incubação
LINDERMAN e ZEITOUN (1977)	Discos de folhas de eucalipto	Flutuação em água a que se adiciona solo ou raízes; 20°C; 24h. <i>Pythium</i> spp. interfere com os resultados
PEGG (1977)	Folhas de abacateiro	Flutuação em água a que se adiciona solo; 4 dias.
GREENHALGH (1978)	Cotilédones de eucalipto, sementes germinadas de tremoço, pêras	Flutuação em água a que se adiciona solo em quantidades diferentes; 25°C; luz contínua; 3-7 dias
ZENTMYER e OHR (1978)	Sementes germinadas de abacate	Imersas parcialmente em grande quantidade de água sobre uma camada de solo com 1,2- 2,5cm; 5-7 dias
SHEW <i>et al.</i> (1979a)	Discos de folha de azálea, agulhas de cedro, radículas de tremoceiro	Colocar em flutuação ou imersos em 100 ml de água a que se adicionou 5-50g de solo; 20°C, 1-2 dias

Neste trabalho utilizaram-se as técnicas de planta-armadilha com o objectivo de detectar e quantificar a densidade de inóculo de *P. cinnamomi*, em sotos com grau variável de incidência da doença. Optou-se pelo método de MARKS *et al.* (1972), por utilizar como tecido-armadilha, radículas de *Lupinus angustifolius* L., de fácil aquisição e ser possível realizar várias tentativas, num período de tempo relativamente curto que nos permitiam determinar quais as melhores condições de incubação para o aparecimento da infecção e manifestação dos sintomas.

Com este método apenas se conseguiram detectar, esporângios não papilados e não caducos, em algumas radículas infectadas, mas não se obtiveram isolamentos de *Phytophthora* desses tecidos em meio gelosado de batata dextrosada (Difco, PDA 39g/l).

Com o método de CAMPBELL (1949) não logamos obter melhores resultados. Os tecidos-armadilha (as maçãs) evidenciaram manchas castanhas, mas mais uma vez, não se isolou *P. cinnamomi* dos tecidos infectados.

Os métodos de planta-armadilha, quando conjugados com manipulações adequada do solo, permitem fazer quantificação de propágulos de *Phytophthora* existentes no solo, embora proporcionem apenas valores relativos. TSAO (1960) propõe o método da diluição em série, que consiste em diluir sucessivamente solo naturalmente infectado com solo esterilizado, colocando aí os tecidos armadilha, que vão a incubar em condições previamente determinadas. Com este método TSAO (1960), apresentou o conceito de Índice de Doença Potencial (DPI) que definiu como o recíproco da maior diluição que ainda produz lesões características no tecido armadilha. Neste método, determinada diluição é considerada positiva se o fungo é detectado em qualquer das cinco

radículas das três repetições. A detecção é confirmada por observação ao microscópio, dos esporângios formados nas radículas infectadas.

Estes métodos apresentam como principal desvantagem o facto dos tecidos armadilha poderem ser infectados por outros organismos do solo, nomeadamente bactérias e fungos do género *Fusarium* spp. e *Pythium* spp., que impedem a esporulação de *P. cinnamomi*, tornando quase impossível a sua detecção. Apresentam ainda a desvantagem de dependerem de muitas condições ambientais de incubação, como a temperatura, a luz e a humidade, o que determina que a não detecção do fungo não seja indicativo de ausência de inóculo.

O elevado número de métodos, espécies armadilha e tecidos utilizados na detecção de *P. cinnamomi*, quando comparado com o de outras espécies de *Phytophthora*, não deixará de estar ligado ao elevado número de hospedeiros, à distribuição generalizada deste parasita e às dificuldades que se colocam para o seu isolamento.

3.2.2 – Meios selectivos

A utilização dos meios selectivos, por definição, tem como objectivo proporcionar o crescimento a um determinado tipo de microrganismo. Alguns, incluem na sua formulação substâncias que inibem o crescimento dos microrganismos indesejáveis, outros contêm nutrientes que favorecem especificamente o crescimento do organismo que se pretende isolar e outros, ainda, possuem os dois tipos de substâncias.

A interferência dos microrganismos da micoflora secundária dos tecidos infectados e do solo, e ainda as dificuldades no isolamento deste género de fungos já anteriormente referidas, possivelmente contribuíram para que muito cedo se tenham desenvolvido meios selectivos para o isolamento de *Phytophthora*. Estes meios contêm, além do meio de cultura base, antibióticos e fungicidas em proporções criteriosamente estudadas e testadas, uma vez que *Phytophthora* spp. e outros *Peronosporales* reagem toxicologicamente como procariotas aos antibióticos (TSAO, 1987). Alguns antibióticos como o “rose bengal”, “oxgall”, estreptomomicina, cloranfenicol, clortetraciclina e o propinato de sódio, que impedem o desenvolvimento das bactérias mas não o da maioria dos fungos, são igualmente tóxicos para *Phytophthora*, inibindo o desenvolvimento micelial e a germinação dos propágulos de resistência (TSAO, 1990).

Na bibliografia da especialidade encontra-se uma vasta gama de formulações de meios selectivos para *Phytophthora*. A composição destes meios difere de autor para autor e varia acentuadamente, tanto no meio base utilizado como nos antibióticos, fungicidas e concentrações aconselhadas. Referem-se no Quadro 4 alguns desses meios, nomeadamente os que foram desenvolvidos para o isolamento de *P. cinnamomi*.

Quadro 4 – Meios selectivos para isolamento de *P. cinnamomi*.

AUTOR	AGENTES INIBIDORES	MEIO BASE
ECKERT e TSAO (1962)	Pimaricina 100 ppm Penicilina 50 ppm Polimixina 50 ppm	CMA ¹
HENDRIX e KUHLMAN (1965)	Nistantina PCNB* 100 ppm Estreptomina 50 ppm "Rose bengal" 60 ppm	SA ² com extracto de levedura
TSAO e OCANA (1969)	Pimaricina 10 ppm Vancomicina 200 ppm PCNB* 100 ppm	CMA ¹
BROADBENT e BAKER (1974)	Pimaricina 10 ppm Penicilina 50 ppm	PDA ³ a 1/4
MASAGO <i>et al.</i> (1977)	Benomil 10 ppm Nistantina 25 ppm PCNB* 25 ppm Rifampicina 10 ppm Ampicilina 500 ppm Hymexazol 25-50 ppm	PDA ³
TSAO e GUY (1978)	Pimaricina 10 ppm Vancomicina 200 ppm PCNB* 100 ppm Hymexazol 50 ppm	CMA ¹
KO <i>et al.</i> (1978)	Pimaricina 50ppm Ampicilina 100ppm PCNB* 10ppm	V8A ⁴
SHEW <i>et al.</i> (1979b)	Pimaricina 5ppm PCNB* 35ppm cloranfenicol 10ppm Hymexazol 50ppm	SA e extracto de levedura e tiamina

* PCNB - pentacloronitrobenzeno

1 – CMA - "corn meal agar"

2 – SA "Synthetic agar"

3 – PDA "Potato-dextrose agar"

4 – V8A "V-8 juice agar"

Do conjunto das substâncias inibidoras utilizadas, salienta-se o facto dos agentes fungicidas representarem um papel importante na selectividade destes meios. ECKERT & TSAO (1962) referem, pela primeira vez, a não toxicidade da pimaricina e nistatina nos fungos do género *Phytophthora* e *Pythium*, passando estas substâncias fungicidas a fazer parte da formulação da quase totalidade dos meios selectivos de *Phytophthora*. O benomil e o pentacloronitrobenzeno (PCNB) são também frequentemente utilizados por possuírem essa mesma característica, e serem de mais fácil aquisição e utilização (TSAO, 1987).

MASAGO *et al.* (1977) verificaram que o 5-methylisoxazol-3-ol, fungicida de síntese com nome vulgar hymexazol, inibia os fungos do género *Pythium* mas não era tóxico para *Phytophthora spp.*, surgindo assim um meio verdadeiramente selectivo para o seu isolamento. TSAO & GUY (1977) adiantam que este produto inibe também *Mortierella spp.* e que algumas espécies de *Phytophthora* são mais sensíveis ao produto do que outras, acontecendo o mesmo com as espécies de *Pythium*.

As concentrações dos agentes fungicidas foram inicialmente bastante elevadas, tendo TSAO & OCANA (1969) verificado que essas concentrações, embora não inibissem o desenvolvimento do micélio, impediam a germinação dos propágulos de resistência. Estes estudos levaram estes investigadores à formulação do meio P₁₀VP, possivelmente o meio selectivo de utilização mais generalizada.

TSAO (1987), refere ainda, que as espécies de *Phytophthora* possuem graus de susceptibilidade diferente aos antibióticos e que uma determinada concentração pode ser inibitória para uma espécie e não o ser para outra.

A utilização dos meios de cultura semi-selectivos (PDA, Difco 39g/l) acidificado com ácido láctico, conduziu-nos, apesar das insistentes tentativas, a fracassos repetidos na detecção e isolamento de *P. cinnamomi*, tanto de tecidos infectados de plantas jovens como adultas. Esta situação só foi ultrapassada com a utilização do meio selectivo P₁₀VP de TSAO & OCANA (1969), com o qual facilmente obtivemos isolamentos de *P. cinnamomi*, tanto do solo como dos tecidos infectados.

Os meios selectivos, P₁₀VP e P₁₀VPH, tornam possível a quantificação directa da população de propágulos existentes no solo, podendo utilizar-se o método da diluição de placas ou espalhando directamente uma determinada quantidade de solo, geralmente 20-50 mg, sobre o meio de cultura já solidificado.

A identificação das colónias de *Phytophthora* baseia-se nas características macroscópicas das colónias e na observação microscópica das hifas, devendo as observações ser realizadas ao segundo e quarto dias depois da inoculação que deve ocorrer às escuras e a 25°C (TSAO & OCANA, 1969).

3.3 – Taxonomia e Classificação

3.3.1 – Critérios actuais de classificação

A identificação das espécies do género *Phytophthora* foi, desde sempre considerada difícil, como refere BARRACHINA (1977) citando autores como ROSENBAUM (1917), PETRI (1917), TUCKER (1931), BLACKWELL (1949). Da mesma opinião são igualmente GREENTE (1961b), WATERHOUSE *et al.* (1987) e GALLEGLY (1987a; 1987b).

GALLEGLY (1987a) atribuiu essa dificuldade ao facto da variabilidade ser a regra em *Phytophthora*. Neste género existe homotalismo, heterotalismo, anterídios paragíneos e anfigíneos, espécies que exigem meios de cultura e condições especiais para produzirem, em laboratório, esporângios, clamidósporos, zoósporos e oósporos, e ainda espécies com elevado ou restrito número de hospedeiros.

A variabilidade do género *Phytophthora* e a importância das doenças causadas por algumas das suas espécies, fizeram com que muitos investigadores se tivessem dedicado à taxonomia deste género e tenham surgido ao longo do tempo vários critérios de classificação. Realçam-se os trabalhos de WATERHOUSE (1963) que, baseando-se em caracteres morfológicos e introduzindo o estudo em cultura pareada como fundamental no aspecto taxonómico, desenvolveu um sistema de classificação que estabeleceu a ordem numa altura em que muita confusão existia (GALLEGLY, 1987a). A classificação proposta por WATERHOUSE em 1963, foi aceite por todos os investigadores de *Phytophthora* e dela derivam todas as chaves de identificação hoje utilizadas.

Nesta classificação o género *Phytophthora* é dividido em seis grupos (I -VI) com base nos seguintes critérios morfológicos: papila terminal do esporângio; abundância de esporângios em meios de cultura sólidos; caducidade dos esporângios; proliferação interna do esporângio; natureza do anterídeo; presença ou ausência de oósporos no hospedeiro e em cultura; dimensões dos esporângios; tipo de esporangióforo; micélio com ou sem vesículas; presença ou ausência de clamidósporos em cultura; tamanho do oogónio; ornamentação da parede do oogónio; especialização parasitária e temperaturas cardiais de crescimento (WATERHOUSE *et al.*, 1987).

Esta chave foi revista por WATERHOUSE e seus colaboradores, NEWHOOK e STAMPS em 1978, aparecendo um novo tipo de chave - a chave tabular de NEWHOOK *et al.* (1978). Os critérios de classificação são os utilizados por WATERHOUSE em 1963 e as espécies continuam separadas nos mesmos seis grupos (I-VI).

A estabilidade desta chave, na classificação, identificação e descrição das espécies assenta, segundo os seus autores, na divisão dos caracteres em caracteres estáveis para a definição dos grupos principais, caracteres estáveis ao nível de espécie,

caracteres importantes para algumas espécies, caracteres utilizados só numa ou duas espécies e ainda nos caracteres indicativos (WATERHOUSE *et al.*, 1987).

A caducidade e morfologia dos esporângios, mais especificamente o comprimento do pedicelo e a dimensão do espessamento apical, são os caracteres morfológicos que conjugados com o carácter de anterídeo paragíneo, anfigíneo ou ambos, dão origem aos seis grupos (I-VI) em que se divide actualmente o género *Phytophthora*. Dentro de cada grupo, características morfológicas adicionais dos esporângios, das estruturas sexuais, dos clamidósporos e do micélio são usados para a identificação das espécies. Alguns critérios não morfológicos como a temperatura máxima de crescimento o aspecto da colónia em determinados meios de cultura e estudos de patogenicidade, tanto em condições naturais como de inoculação artificial, são também utilizados na delimitação específica de algumas espécies.

Em 1990, estes mesmos autores, publicaram uma chave tabular revista, STAMPS *et al.* (1990), que mantendo os critérios de classificação da chave tabular anterior, possibilita a identificação das espécies aquáticas, todas elas incluídas num novo grupo – o grupo VII da chave, e incluíram ainda catorze espécies ou variedades, entretanto identificadas ou transferidas para o género *Phytophthora* como aconteceu com *Pythium undulatum* que passou ao género *Phytophthora* como *Phytophthora undulata* do grupo VI.

P. cinnamomi e *P. cambivora* por possuírem esporângios não papilados com espessamento apical muito fino, oósporos formados por pareamento com micélio compatível, ou por pareamento com *P. cryptogea* e *P. parasitica*, respectivamente e os anterídeos serem sempre anfigíneos, são incluídos, pelos critérios de WATERHOUSE (1963), NEWHOOK *et al.* (1978) e STAMPS *et al.* (1990) no grupo VI, conjuntamente com *P. cryptogea* Pethyler & Laff., *P. drechsleri* Tucker var. *drechsleri*, *P. drechsleri* var. *cajani* Pal, Grewal & Sarbhoy, *P. cajani* Amin, Baldev & Williams, *P. melonis* Katsura, *P. sinensis* Yu & Zhuang, *P. erythroseptica* Pethybr. var. *erythroseptica*, *P. erythroseptica* var. *pisi* Byw. & Hickman, *P. richardiae* Buisman, *P. gonapodyides* (Peterson) Buisman, *P. japonica* Waterh., *P. undulata* (Petersen) Dick.

P. cinnamomi foi descrita pela primeira vez por RANDS em 1922 e mais tarde WATERHOUSE & WATERSTON (1966) caracterizam-na da seguinte forma: “hifas coraloides (em agar malte), bastante largas (8µm) e muito rijas; dilatações das hifas tipicamente esféricas (diâmetro médio 42 µm, máximo 60 µm) e em grupo; paredes não muito espessas. Os esporângios formam-se só em meio líquido e os esporangióforos são estreitos (3 µm) e ocasionalmente ramificados. Esporângios grandes, elipsóides ou ovóides (57 × 33 µm com 100 × 40 µm como dimensões máximas), não papilados, com diminuto espessamento apical e não caducos. Órgãos sexuais raramente produzidos em meios com agar e em cultura simples, mas abundantes quando pareadas com *P. cryptogea*

ou com micélio compatível. Oogónios com diâmetro médio de 40 µm e máximo de 58 µm, parede lisa tornando-se amarela ou dourada com a idade. Anterídios sempre anfigíneos e alongados com dimensões 21-23 × 17 µm. Os óosporos praticamente ocupam todo o oogónio e tem parede hialina e com 2 µm de espessura. Culturas muitas vezes com forma de roseta e com micélio aéreo. Temperaturas cardiais de crescimento com mínimo de 5 °C, óptimo de 24-28 °C e máximo de 32-34° C”.

HO (1981), publicou um novo tipo de chave para identificação das espécies de *Phytophthora*. Tal chave, chave sinóptica, tem, segundo o seu autor, o objectivo de facilitar a identificação das espécies patogénicas em cultura axénica, das que só são conhecidas no hospedeiro e ainda das espécies aquáticas. As chaves sinópticas, que McCAIN (1988) prefere chamar chaves de múltipla entrada, são mais fáceis de utilizar que as dicotómicas em espécies de grande variabilidade ou em espécies onde não estão disponíveis todos os caracteres taxonómicos. A facilidade da utilização resulta de se poder iniciar a identificação por qualquer caracter e a movimentação na chave ser apenas dependente das características disponíveis da espécie em estudo. Nos fungos que produzem diferentes tipos de esporos ao longo do ciclo de vida, estas chaves, que possuem uma secção para cada fase do desenvolvimento, facilitam a manipulação do material biológico no processo de identificação.

As espécies “não conhecidas” podem ser identificadas por comparação com os taxa conhecidos, com base na avaliação da totalidade dos caracteres (HO, 1981). O autor da chave utiliza o conceito de “coeficiente de similaridade” de SNEATH & SOKAL (1973), para avaliar o grau de proximidade entre as espécies.

Para se obter um valor quantitativo e ponderado o autor associou a cada caracter um determinado valor em função do seu valor no diagnóstico. Atribuiu valor 3 aos caracteres morfológicos mais estáveis, 2 aos caracteres de estabilidade intermédia e 1 aos caracteres menos estáveis e a todos os caracteres não morfológicos.

O coeficiente ponderado de similaridade (WSC) definido como:

$$WSC = \frac{\text{Somatório dos valores do diagnóstico dos caracteres em concordância}}{\text{Somatório dos valores do diagnóstico de todos os caracteres a observar}}$$

permite atribuir ao isolamento em estudo o nome do taxa da chave, se a similaridade é elevada ou optar por outro epíteto se as diferenças são suficientemente grandes.

3.3.2 – Outros critérios taxonómicos

Estudos serológicos, citológicos e de electroforese de proteínas têm sido utilizados como critérios taxonómicos na diferenciação das espécies de *Phytophthora*.

Alguns destes estudos foram já incluídos nas chaves de identificação, nomeadamente o número de cromossomas – caracter taxonómico utilizado na chave de NEWHOOK *et al.* (1978) como critério estável ao nível de espécie. O número de cromossomas, pequenos e difíceis de contar (WATERHOUSE *et al.*, 1987), é frequentemente de nove-dez ou doze com algumas excepções que são utilizadas na diferenciação específica. A forma dos cromossomas tem também valor no diagnóstico, por apresentarem aspecto característico em algumas espécies, nomeadamente em *P. megakarya* e *P. meadi*. (WATERHOUSE *et al.*, 1987).

A electroforese de proteínas e o estudo da variabilidade dos perfis proteicos e enzimáticos, foram utilizados como critério de identificação específica de fungos desde que CLARE, em 1963, verificou que esta técnica permitia distinguir as espécies do género *Pythium*. Esta mesma técnica foi aplicada ao género *Phytophthora* por CLARE & ZENTMYER (1966), tendo estes autores concluído que esta metodologia permitia igualmente separar as espécies neste género.

A utilização desta metodologia no género *Phytophthora* tem como objectivo, segundo a generalidade dos autores, obter uma identificação fiável e rápida das espécies, eliminando as dificuldades devidas à grande variabilidade das estruturas morfológicas. Por outro lado, evita também a necessidade de avaliar elevado número de caracteres morfológicos, por vezes difíceis de obter em cultura axénica (CLARE, 1963; CLARE & ZENTMYER, 1966; HALL *et al.* 1969; GILL & ZENTMYER, 1978).

Outras áreas do conhecimento, como a imunologia, com a obtenção de reacções serológicas diferentes entre o género *Pythium* e *Phytophthora* e entre algumas espécies de *Phytophthora*, foi também explorada no aspecto taxonómico. No entanto, a obtenção de anti-soros específicos, continua a ser um objectivo a atingir. Quando conseguido proporcionar, além de um critério taxonómico estável, um meio de fácil utilização na avaliação do inóculo no solo (GALLEGLY, 1987a).

Para confirmar esta posição estão os recentes e encorajadores resultados obtidos por BENSON (1991) na detecção de *P. cinnamomi* em azáleas utilizando soros preparados comercialmente.

Outros estudos no domínio da taxonomia experimental, nomeadamente a hereditabilidade de caracteres, a avaliação da interacção genótipo × ambiente, as diferenças bioquímicas e estruturais e a microscopia electrónica, poderão contribuir para um melhor conhecimento das espécies e possivelmente conduzir a uma redefinição dos critérios de classificação.

3.4 – Ciclo Infecioso

3.4.1 – Quimiotaxia e quimiotropismo

P. cinnamomi é um fungo do solo que ataca as raízes das plantas e todo o seu ciclo de vida ocorre no ambiente solo.

O processo infeccioso inicia-se, segundo ZENTMYER (1970), com a atracção dos zoósporos para as raízes do hospedeiro, processo que é mediado por um estímulo químico, denominado quimiotaxia. A mobilidade dos zoósporos e sua acumulação nas raízes são processos complexos e vários mecanismos podem estar envolvidos. Alguns investigadores atribuem este facto a fenómenos de electrotaxia, ou seja ao movimento dos zoósporos devido às cargas eléctricas das partículas; outros, a fenómenos de reotaxia positiva, apresentando, no entanto, a quimiotaxia maior evidencia experimental (CHANG-HO & HICKMAN, 1970). A quimiotaxia ocorre devido à exsudação, por parte das raízes, de diversas substâncias químicas (CHANG-HO & HICKMAN, 1970), algumas delas identificadas como aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e auxinas (ZENTMYER, 1970).

O estímulo químico pode ter origem em plantas hospedeiras ou não hospedeiras, ocorrendo a maior concentração de zoósporos na zona de alongação e imediatamente abaixo das zonas feridas, às quais corresponde também maior exsudação radicular (CHANG-HO & HICKMAN, 1970).

A importância dos fenómenos de quimiotactismo na patogénese foi estudada por diferentes autores. KHEW & ZENTMYER (1973) verificaram que os zoósporos de *P. cinnamomi* eram menos sensíveis ao estímulo químico e que as substâncias que mais influenciavam este processo eram, a asparagina, o ácido glutâmico, o ácido aspártico e a metionina, manifestando a fracção positivamente carregada maior efeito na atracção dos zoósporos.

A quantidade de exsudados radiculares varia com a espécie, tendo MALAJCZUK & McCOMB (1977) verificado que os exsudados de *Eucalyptus calophylla* (resistente a *P. cinnamomi*) e de *E. marginata* (susceptível) continham ácidos orgânicos e aminoácidos, produzindo, no entanto, a espécie susceptível o dobro da quantidade de exsudados. ERB *et al.* (1987), por outro lado, verificaram que as cultivares susceptíveis de mirtilo (*Vaccinium* spp.) atraíam maior número de zoósporos. A exsudação radicular varia ainda com as condições ambientais. ZENTMYER (1970) considerou a idade da planta, humidade do solo, temperatura e intensidade luminosa, como factores determinantes da quantidade de exsudados radiculares excretados pelas raízes.

Os exsudados radiculares, indicação de condição favorável de infecção, por promoverem a mobilidade dos zoósporos e a sua acumulação nas raízes, parecem também

estimular o enquistamento dos zoósporos (CARLILE, 1987). Processo que é descrito por este autor da seguinte forma: “os zoósporos deixam de se movimentar, perdem os flagelos, adquirem uma forma arredondada e sintetizam rapidamente (10 minutos) uma parede de enquistamento”.

Este mesmo autor considera como factores de enquistamento, os valores extremos de temperatura e de pH, presença de exsudados radiculares, disponibilidade de nutrientes e as colisões ocasionais, sendo mais sensíveis aos factores de enquistamento quanto maior tiver sido o seu deslocamento no solo. Ainda, segundo este autor, os zoósporos no início do processo de enquistamento possuem a característica de aderirem com facilidade a uma superfície sólida, ficando firmemente ligados a ela. Se, essa superfície sólida for uma raiz, os zoósporos ficarão em situação privilegiada para infectar os tecidos radiculares quando da sua germinação.

Os zoósporos enquistados podem germinar directamente por tubo ou tubos germinativos ou pela emissão de um zoósporo secundário (HO & ZENTMYER, 1977a).

ZENTMYER (1970), verificou por outro lado, que os tubos germinativos evidenciam quimiotropismo para a região de elongação e para os exsudados radiculares, o que promove ainda maior eficiência ao processo de invasão dos tecidos radiculares através dos zoósporos.

Os zoósporos que não enquistam na superfície das raízes poderão, através do processo quimiotrófico, atingi-la e constituírem assim inóculo potencial viável para o processo de infecção.

Os exsudados radiculares, além do efeito directo que exercem na atracção dos zoósporos, promovem ainda a germinação dos clamidósporos de *P. cinnamomi*, as estruturas primárias de sobrevivência deste fungo fitopatogénico.

A germinação dos clamidósporos de *P. cinnamomi*, segundo MIRCETICH & ZENTMYER (1970), só ocorre na presença de adequadas quantidades de nutrientes exógenos, que por sua vez influenciam no tipo de germinação, que pode ocorrer:

- por tubo ou tubos germinativos com posterior desenvolvimento do micélio;
- por um tubo germinativo que desenvolve na extremidade um esporângio.

Ainda segundo estes autores, os clamidósporos de *P. cinnamomi* poderão germinar em condições naturais, na presença de exsudados radiculares de plantas hospedeiras ou não hospedeiras. Na presença de uma planta hospedeira a germinação dos clamidósporos, que pode ocorrer por um número variável de tubos germinativos em função da riqueza do substrato e que possuem grande resistência ao antagonismo microbiano, conduzem à infecção dos tecidos e à perpetuação do parasita. Se o estímulo provém de plantas não hospedeiras o processo de germinação ocorre, mas o processo de infecção não se desenvolve. Esta situação pode contribuir para diminuir o período de

sobrevivência do agente patogénico, se as condições nutritivas e ambientais não forem adequadas ao desenvolvimento saprofítico do fungo.

Para além destes propágulos, envolvidos no processo inicial de infecção, MARX & BRYAN (1970), consideram que qualquer condição que favoreça o desenvolvimento micelial de *P. cinnamomi* na superfície radicular, na rizosfera ou no rizoplane poderá levar à invasão das raízes pelas hifas. Razão pela qual, segundo estes autores, a fase micelial de *P. cinnamomi* não deve ser considerada como a fase não parasitária do seu ciclo de vida. Acrescentam ainda que as hifas de *P. cinnamomi*, são mesmo mais tolerantes aos antibióticos produzidos pelas micorrizas do que os zoósporos, o que lhes proporciona uma maior longevidade no solo, podendo desta forma desempenhar um papel importante no processo de infecção.

3.4.2 – Colonização dos tecidos

MALAJCZUK *et al.* (1977), estudaram a colonização das raízes de *E. marginata* e *E. calophylla* por *P. cinnamomi* utilizando micélio/clamidósporos como inóculo. Verificaram que, doze horas após a inoculação, as hifas se orientavam predominantemente ao longo da junção das paredes celulares, embora existissem outras distribuídas ao acaso na superfície das raízes.

Cortes histológicos mostraram que após um dia de inoculação ocorria a penetração dos tecidos na zona de junção da parede celular de duas células contínuas – penetração intercelular – aparecendo, passados catorze dias, abundante micélio com vesículas nos tecidos corticais e do cilindro central. Nestes mesmos tecidos apareciam ainda clamidósporos e era evidente uma descoloração acentuada.

Estudos de microscopia electrónica, realizados nestes tecidos e por estes mesmos autores, confirmaram a penetração intercelular inicial das hifas. As hifas sofrem uma expansão do seu diâmetro quando se encontram no interior dos tecidos e originam a dissolução da lamela média das células vegetais na sua proximidade. MALAJCZUK *et al.* (1977) atribuem a dissolução da lamela média das células à acção enzimática das pectinases, que desta forma possibilitaria a penetração e colonização intracelular dos tecidos. As hifas sofrem uma constrição no local de penetração da parede celular, mas uma vez no interior da célula, adquirem a sua dimensão normal, podendo formar estruturas vesiculares que, por vezes, ocupam todo o lúmen da célula.

Estudos semelhantes foram realizados por HO & ZENTMYER (1977b) em várias espécies de *Persea*, usando zoósporos como inóculo inicial. Verificaram que, uma hora depois do processo de acumulação dos zoósporos, os tubos germinativos invadiam as raízes por penetração da epiderme. A penetração ocorria inter e intracelularmente, aparecendo as lesões na região de alongação passadas vinte e quatro horas após a

inoculação. A zona cortical ficava colonizada passadas quarenta e oito horas, provocando um rápido colapso das células do parênquima. Observaram ainda formação de clamidósporos e de oósporos passados 4-6 e 6-11 dias, respectivamente

Em abacateiro, *P. cinnamomi* invade principalmente as raízes jovens, mas pode também dar origem a lesões corticais nas raízes de maior diâmetro e no tronco, que se podem desenvolver rapidamente se houver inoculação por ferida (ZENTMYER, 1981).

Em castanheiro, o processo infeccioso desenvolve-se de forma semelhante ao indicado para as espécies anteriormente referidas, datando os estudos nesta espécie, do início dos anos sessenta, altura em que esta doença foi extensivamente estudada em Portugal, Espanha, França e Itália onde o castanheiro é espécie vegetal de eleição em determinadas zonas destes países.

3.4.3 – Expressão dos sintomas

P. cinnamomi ataca as raízes das plantas hospedeiras, desenvolvendo-se posteriormente uma sintomatologia característica, tanto na parte radicular como na parte aérea da planta.

Em castanheiro e utilizando a descrição de GREUTE (1961a), *P. cinnamomi*, provoca nas raízes mais finas um enegrecimento, devido à decomposição do cortex, ficando com aspecto húmido e apodrecido.

As raízes de maior diâmetro também são atacadas, evidenciando manchas enegrecidas, devido à alteração da cortex 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.

Sintomatologia evidente e denotando um estado avançado da doença da tinta pode ser observada na Fig. 1 (A, B e C) em castanheiros atacados por esta doença na região de Bragança.

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 amareladas e sem brilho que vão murchando, acabando por cair prematuramente;
- dessecação rápida das folhas (ocorrença ocasional), que ficam firmemente agarradas aos ramos, mesmo durante o período de repouso vegetativo;



Fig. 1 – Sintomatologia característica da doença da tinta do castanheiro. A – Ouriços que ficaram aderentes à árvore. B – Folhas amarelecidas e sem brilho que vão murchando, acabando por cair prematuramente. C – Desenvolvimento de ramos junto do colo da planta e abaixo das pernas principais numa árvore muito atacada pela doença.

- folhas de dimensões reduzidas (quando os ataques do fungo 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 organoléticas;
- desenvolvimento de ramos junto ao colo da árvore e abaixo das pernadas 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 á 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.

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.

Alguns investigadores referem que a morte das árvores provocada por *P. cinnamomi*, se evidencia acentuadamente em determinados períodos, para depois ocorrer uma certa “acalmia” na expressão dos sintomas em que apenas se manifesta ligeiro declínio. Em França, GRENTE (1978) considera que a doença da tinta passou a doença de segundo plano a partir de 1957 e SHEA & BROADBENTE (1987) referem também este facto em eucalipto e pinheiro na Austrália. Atribuem este comportamento ao facto destas plantas não dependerem das raízes superficiais para o equilíbrio hídrico e só quando as raízes de maior diâmetro e o caule são invadidos é que ocorrerá a morte da árvore.

Em plantas jovens de castanheiro a sintomatologia é bastante evidente, adquirindo as plantas um aspecto amarelecido que rapidamente evolui para necrose e dessecamento 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 (Fig. 2, A e B).

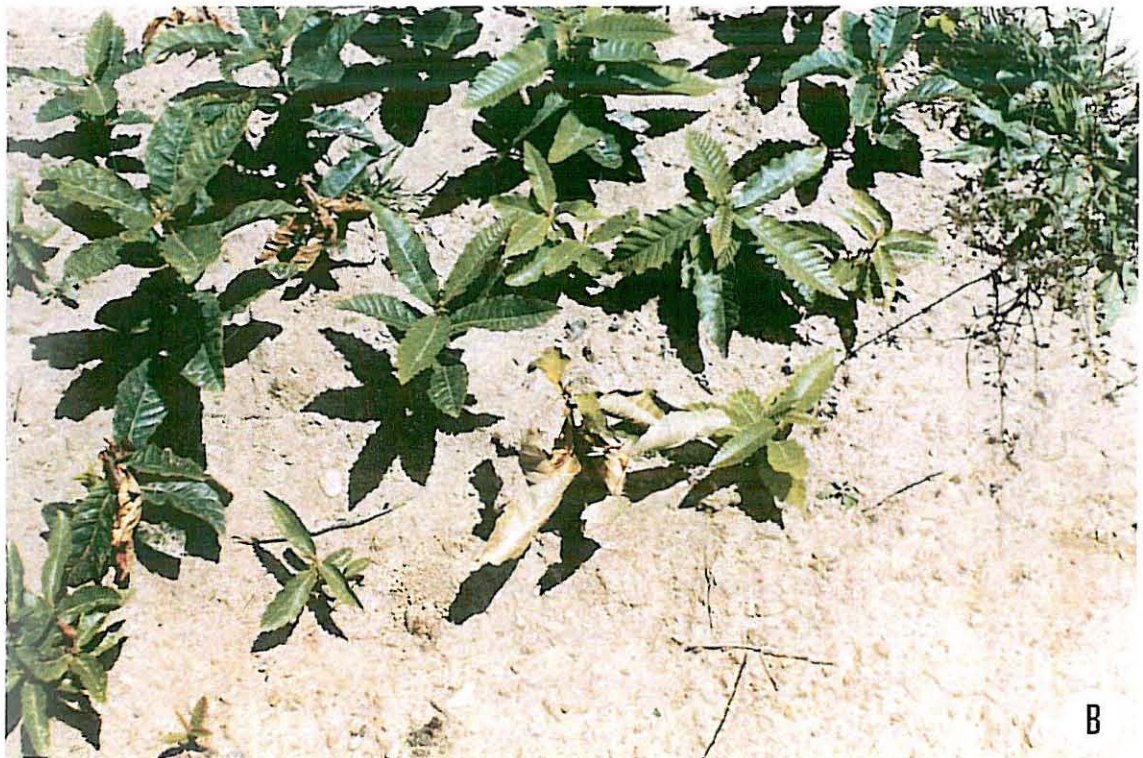


Fig. 2 – Sintomatologia do ataque de *Phytophthora cinnamomi* em plantas jovens de castanheiro. A – Distribuição generalizada da doença da tinta no viveiro. B – Folhas amarelecidas e enroladas que rapidamente ficam necróticas.

3.4.4 – Bases fisiológicas da patogénese e manifestação dos sintomas

As bases bioquímicas da patogénese e indução dos sintomas devidos aos ataques de *P. cinnamomi*, são ainda pouco conhecidas. Existe, no entanto, uma relação directa muito próxima entre a destruição das raízes e a deterioração da parte aérea.

WOODWARD *et al.* (1980), no único trabalho que foi possível reter na bibliografia consultada, referem que a manifestação dos sintomas na parte aérea do *E. marginata* não poderá ser explicada apenas pela quantidade de raízes atacadas. Desempenharão, possivelmente, um papel importante certas toxinas produzidas pelo fungo. Estes mesmos autores verificaram que os compostos insolúveis em etanol, provenientes do filtrado de culturas de *P. cinnamomi*, induziam murchidão em *E. sieberi* e *E. cytellocarpa*. Concluíram, com base nas características químicas evidenciadas, que a substância em estudo seria uma β -glucana muito ramificada.

As substâncias produzidas por *P. cinnamomi* e que induzem murchidão não estão directamente relacionados com os processos de patogénese, mas podem desempenhar um papel importante na indução de sintomas, tanto mais que as raízes atacadas, mantêm a sua integridade estrutural por um período de tempo suficientemente longo, que possibilita a difusão de toxinas para outras partes da planta (WOODWARD *et al.*, 1980).

KEEN & YOSHIKAWA (1987) consideram que as toxinas e as enzimas produzidas por estes fungos podem desempenhar um papel importante na colonização dos tecidos, apresentando, no entanto, um papel diferente conforme a espécie de *Phytophthora* considerada.

3.4.5 – Disseminação

Os fungos do solo podem ser disseminados por um largo conjunto de processos. As espécies que provocam a doença da tinta, *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, produzem ao longo do seu ciclo de vida vários tipos de esporos assexuados que contribuem para uma dispersão eficiente ao longo do tempo e do espaço.

Os esporângios, que nestas espécies não se destacam dos esporangióforos e têm dimensões superiores à maioria dos espaços determinados pelo arranjo das partículas do solo, não serão facilmente agentes de disseminação da doença. Contudo, em condições favoráveis de humidade, germinam indirectamente pela libertação de zoósporos com flagelos, que em meio líquido se movimentam activamente.

Fragmentos de micélio, clamidósporos e oósporos são também transportados passivamente pela água do solo, disseminando a doença no sentido da drenagem natural dos solos e linhas de água.

A dispersão da doença no campo, em forma de mancha de óleo e no sentido do declive do terreno, torna evidente este tipo de dispersão associado ao movimento de drenagem natural da água do solo.

Outro processo de disseminação da doença está relacionado com as movimentações do solo e restos vegetais infectados que ocorrem devido às operações culturais realizadas em agricultura e nas florestas.

A existência de inóculo infeccioso na terra ou nos substratos do material de propagação, é particularmente grave e desempenhará um papel importante na dispersão da doença. É, afinal, assim que os propágulos são transportados a grandes distâncias e atingem áreas cada vez maiores. Também as movimentações de terra, incluindo a que adere ao equipamento utilizado nas operações culturais, transportado para a construção de estradas ou que ocorre devido ao simples deslocar dos animais selvagens (como acontece com os javalis que KLIEJUNAS & KO (1976) verificaram serem agentes activos de disseminação da doença) constituirão processos eficientes de disseminação da doença.

3.4.6 – Saprofitismo e sobrevivência

3.4.6.1 – Classificação ecológica

As espécies de *Phytophthora* que se desenvolvem no solo, são classificadas sob o ponto de vista ecológico como fungos do solo, possuindo a capacidade de infectar as raízes em determinadas condições e por isso incluídas nos parasitas não especializados segundo a classificação de GARRET (1970).

Quanto ao comportamento saprofítico de *P. cinnamomi* a opinião não é unânime entre os diferentes investigadores. HWANG & KO (1978) consideram este parasita como um fungo com elevada capacidade de competição saprofítica, baseados no facto de ter colonizado 52% dos fragmentos de matéria orgânica, quando a sua população era apenas de 10 clamidósporos/g de solo. Opinião que coincide com a de ZENTMYER & MIRCETICH (1966), que em condições de elevada humidade, próximo das condições de saturação, verificaram que *P. cinnamomi* colonizava elevada percentagem de fragmentos de matéria orgânica.

MARKS *et al.* (1975), no entanto, consideram-no como um parasita com sobrevivência saprofítica, uma vez que sobrevive nos tecidos que já tinha colonizado quando o hospedeiro estava vivo e SCHMITTHENER (1970) refere que nenhum grupo de *Phytophthora* é capaz de colonizar tecidos já invadidos por outros microrganismos.

MARKS *et al.* (1975), no entanto, consideram-no como um parasita com sobrevivência saprofítica, uma vez que sobrevive nos tecidos que já tinha colonizado quando o hospedeiro estava vivo e SCHMITTHENER (1970) refere que nenhum grupo de *Phytophthora* é capaz de colonizar tecidos já invadidos por outros microrganismos.

ZENTMYER (1980), na sua tão conhecida monografia sobre *P. cinnamomi*, atribui-lhe reduzida capacidade de competição saprofítica.

Para além da colonização saprofítica, manifestando maior ou menor capacidade de competição saprofítica em função das condições ambientais, *P. cinnamomi* sobrevive ainda, infectando outros hospedeiros e formando estruturas de resistência, nomeadamente os clamidósporos e os oósporos. Estas estruturas de resistência que possuem dormência constitutiva ou imposta por condições exteriores, constituem uma reserva de inóculo, que se mantem no solo por prolongados períodos de tempo.

3.4.6.2 – Sobrevivência nos tecidos do hospedeiro

A sobrevivência nos tecidos do hospedeiro depende primariamente da humidade. SHEA *et al.* (1980), isolaram *P. cinnamomi* de raízes de *Banksia grandis*, dois anos depois da sua morte. Concluíram que o sistema radicular e os tecidos do caule e do colo das plantas seriam locais de reserva de grande quantidade de inóculo que se encontraria mais protegido das condições adversas do meio e por isso aumentaria as hipóteses de sobrevivência. WESTE (1987), verificou também, que o fungo se mantem nas raízes mais finas, mas o tempo de sobrevivência depende das condições de humidade em que os tecidos se encontram.

Este tipo de sobrevivência saprofítica, ou seja, a colonização dos tecidos atacados quando o hospedeiro estava vivo, possibilita ao fungo um desenvolvimento com alguma vantagem em relação aos outros microrganismos do solo, devido à maior afinidade com o substrato e porque inicialmente se encontra liberto da competição de outros organismos.

3.4.6.3 – Sobrevivência na ausência do hospedeiro

3.4.6.3.1 – Clamidósporos

Os clamidósporos em cultura axénica só se conhecem em *P. cinnamomi*, representando nesta espécie a estrutura vegetativa de sobrevivência mais importante no solo.

HWANG & KO (1978) verificaram que os propágulos dominantes em pomares de abacateiro eram os clamidósporos livres, encontrando-se embebidos na matéria

orgânica nos solos florestais de *Metrosideros collina*. Verificaram ainda que, em solo húmido, o número de clamidósporos detectados pelo método da diluição de solo em meio selectivo diminuía ao longo do tempo até desaparecer ao fim de um ano. Em condições de saturação de solo o período de detecção de clamidósporos é substancialmente reduzido não indo além de três meses.

Os clamidósporos formam-se no solo ou nos tecidos infectados durante os períodos de menor humidade. Podem adquirir um estado de dormência imposta ou germinar directamente por meio de tubos germinativos dando origem a micélio que posteriormente dará origem a esporângios ou novos clamidósporos. Este ciclo poderá manter-se durante cinco anos, desde que existam condições nutritivas adequadas e a população microbiana não seja muito competitiva (WESTE, 1987).

Ainda segundo este autor, os clamidósporos não podem ser considerados como esporos de resistência que estaticamente sobrevivem no solo, mas sim como uma população que se transforma noutra tipo de propágulos ou mesmo em mais clamidósporos, possibilitando assim um aumento enorme da população de propágulos no solo.

3.4.6.3.2 – Oósporos

P. cinnamomi e *P. cambivora* são espécies heterotálicas, com hifas A₁ e A₂ (GALINDO & ZENTMYER, 1964), formando-se os oósporos - órgãos de reprodução sexuada – por conjugação de micélio compatível ou por pareamento com culturas interespecíficas. *P. cinnamomi*, predominantemente A₂ forma oósporos por pareamento com *P. cryptogea*; *P. cambivora* por pareamento com *P. parasitica*.

Em determinadas condições, *P. cinnamomi* comporta-se como homotálica, ou seja, tem a capacidade de formar esporos sexuados. Esta situação está associada a estímulos químicos, produzidos por extractos de raiz de abacateiro ou devido à presença de *Trichoderma viride* (ZENTMYER, 1980).

Os oósporos são considerados constitutivamente dormentes e a sua germinação está dependente de condições muito específicas. Porque podem germinar depois de diferentes períodos de dormência, constituirão uma reserva de inóculo que se mantém no solo por períodos de tempo muito longos.

3.4.6.3.3 – Zoósporos e zoósporos enquistados

Os zoósporos são geralmente considerados como estruturas pouco resistentes às condições adversas e por essa razão possuem um período de sobrevivência relativamente curto.

HWANG & KO (1978) determinaram um período de sobrevivência de três semanas para os zoósporos de *P. cinnamomi*, mas estes esporos assexuados, por terem a capacidade de infectar outros hospedeiros, sem que estes evidenciem sintomas, poderão aumentar o período de sobrevivência do fungo no solo.

Os zoósporos enquistados parecem ter um comportamento no solo semelhante ao dos clamidósporos (WESTE, 1987), mas com um período de sobrevivência mais reduzido.

3.4.7 – Estratégias de sobrevivência

Um patogénio que pela via saprofítica se mantém no solo, na ausência dos seus hospedeiros, possui em relação aos organismos biotróficos vantagens consideráveis.

P. cinnamomi com uma fase parasítica e uma fase saprofítica, com um elevado número de hospedeiros, capaz de se multiplicar rapidamente de forma assexuada na ausência de hospedeiros e que em determinadas condições de temperatura e humidade consegue competir com outros organismos na colonização de matéria orgânica, terá a capacidade de se manter no solo por períodos de tempo muito longos.

Para além destes atributos, *P. cinnamomi* possui ainda, o que WESTE (1987), denominou “fail-safe device”, trata-se dum processo de sobrevivência e adaptação relacionado com a capacidade dos propágulos germinarem de forma diferente e de se transformarem nouro tipo de propágulos em função das condições ambientais.

Os esporângios podem germinar directamente por meio de tubo germinativo ou indirectamente por formação de zoósporos, que depois de libertos se podem movimentar para locais mais favoráveis ao seu desenvolvimento.

Os zoósporos enquistam e o tubo germinativo pode penetrar na raiz ou pode produzir um micro-esporângio, do qual emerge novo zoósporo.

Os clamidósporos, por outro lado, germinam produzindo micélio e mais clamidósporos, ou germinam, dando origem a esporângios e zoósporos. A produção de um esporângio por um clamidósporo constituirá um processo eficiente para prolongar o período de sobrevivência e encontrar hospedeiros.

O tipo de germinação e desenvolvimento posterior dos propágulos depende das condições exteriores, constituindo assim um extraordinário processo de evolução que contribuiu decisivamente para o seu sucesso como patogénio. Alguns destes processos alternativos de germinação dos clamidósporos e dos esporângios, podem ser observados na Fig 3 (A, B e C). Todas as estruturas foram obtidas em condições laboratoriais e observaram-se um mês depois de se terem formado em extractos de terra esterilizados ou na solução de Petri.

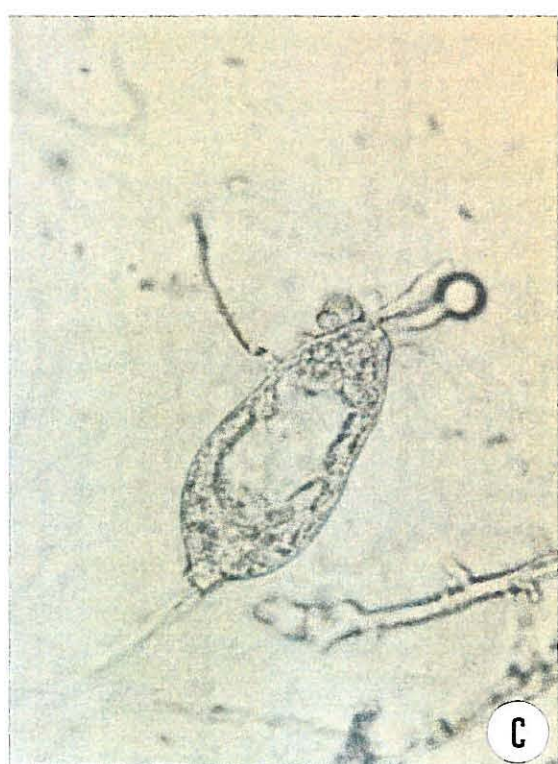
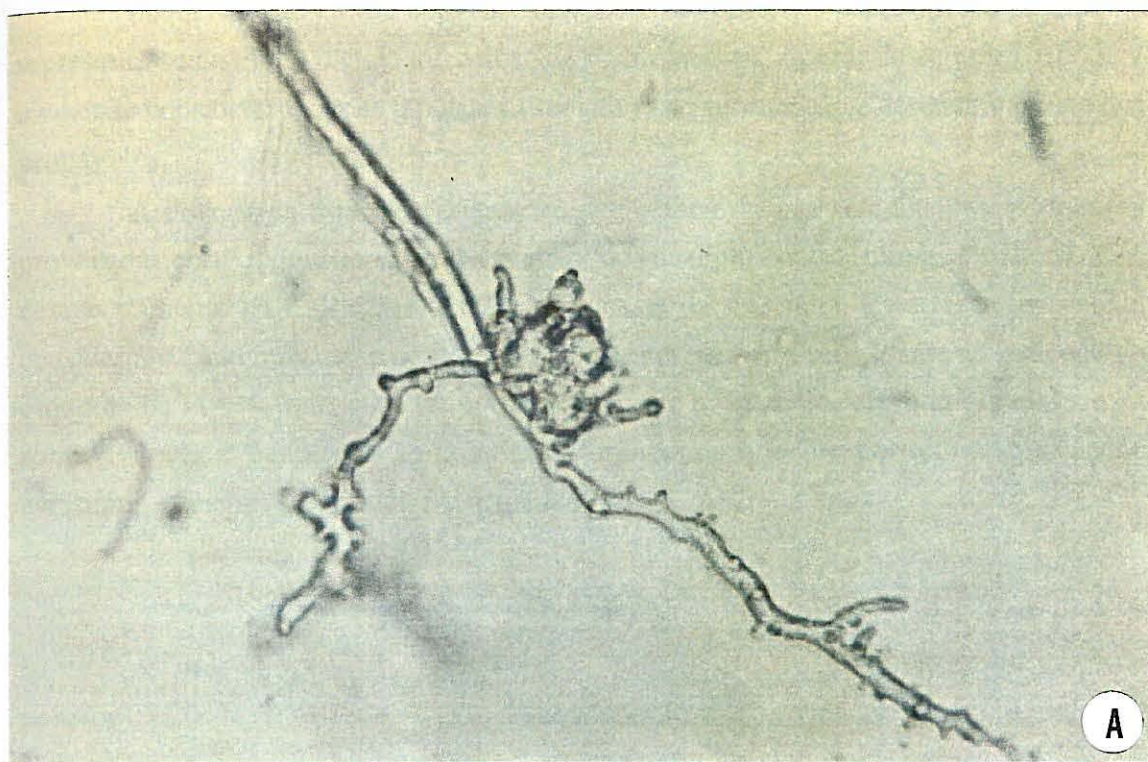


Fig. 3 - Processos alternativos de germinação dos clamidósporos e esporângios de *Phytophthora cinnamomi*. A - Germinação de um clamidósporo pela emissão de hifas germinativas ($\times 400$). B - Germinação de um clamidósporo dando origem a um microclamidósporo ($\times 400$). C - Germinação directa de um esporângio de *Phytophthora cinnamomi* ($\times 400$).

Esquemáticamente, e com base nos processos descritos pelos diferentes autores, representa-se na Fig. 4 o ciclo infeccioso de *P. cinnamomi*. Apesar de complexo, poderá ainda não considerar todas as hipóteses alternativas de germinação e desenvolvimento dos propágulos.

A doença da tinta do castanheiro tem características semelhantes às doenças provocadas por *P. cinnamomi* no abacateiro e no eucalipto noutros climas mediterrânicos designadamente na Califórnia (EUA) e Sudoeste da Austrália. Este facto leva-nos a considerar o ciclo infeccioso de *P. cinnamomi* em castanheiro semelhante ao indicado no esquema da Fig. 4, apresentando, igualmente neste hospedeiro, elevada capacidade de sobrevivência e adaptação às condições ambientais que lhe permitem uma acção parasitária eficiente, persistente e sistemática.

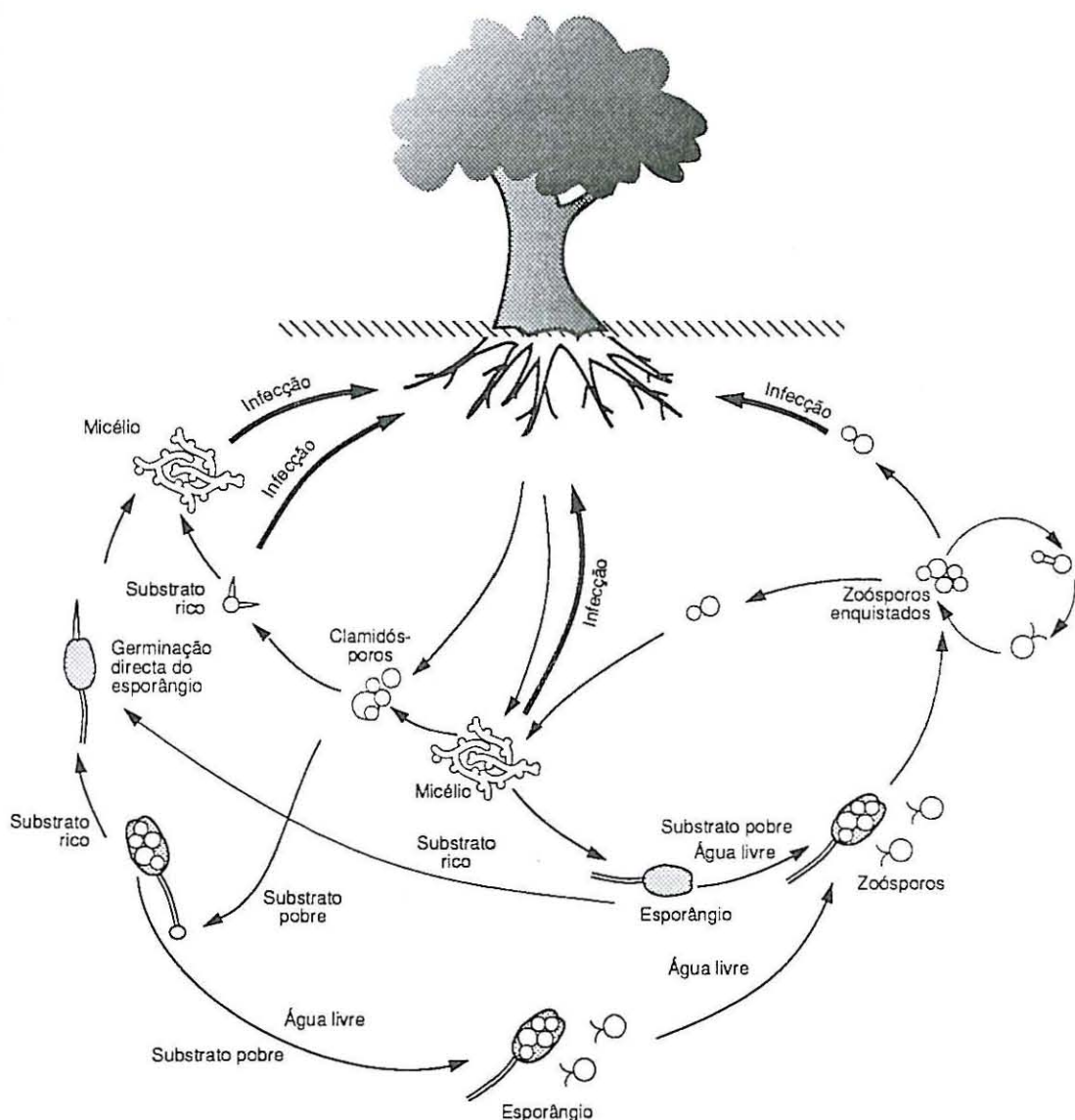


Fig. 4 – Provável ciclo infeccioso de *Phytophthora cinnamomi*.

3.5 – Epidemiologia. Algumas considerações em *Phytophthora*

3.5.1 – Desenvolvimento epidémico

Muitas doenças radiculares cuasadas por espécies de *Phytophthora*, nomeadamente *P. parasitica* (Dast) var. *nicotianae* (KANNWISCHER & MITCHEL, 1978), *P. parasitica* (NEHER & DUNIWAY, 1991) e *P. capsicum* (RISTAINO, 1991), estão epidemiologicamente englobadas nas doenças de ciclos múltiplos por terem mais de um ciclo infeccioso durante o desenvolvimento anual de uma cultura.

P. cinnamomi, por possuir a capacidade de produzir elevado número de zoósporos num período de tempo muito curto, capaz de produzir vários tipos de esporos assexuados ao longo do seu ciclo de vida e com a capacidade de alterar a evolução do processo germinativo em função das condições ambientais, tem a capacidade intrínseca de, rapidamente, aumentar o número de propágulos no solo se as condições lhe são favoráveis.

O modelo matemático que representa a evolução deste tipo de doenças expressa-se pela fórmula,

$$x_t = x_0 e^{rt} \quad (1)$$

que de uma forma simplificada traduz as complexas interacções dos factores, que determinam a evolução de uma doença de tipo policíclico, sendo:

x_t – quantitativo da doença no tempo t

x_0 – quantitativo inicial de doença (no tempo $t = 0$)

e – base dos logaritmos naturais

r – taxa exponencial do aumento da doença

t – intervalo de tempo durante o qual hospedeiro e agente patogénico interactuam

Porque os agentes patogénicos de tipo policíclico produzem inóculo efectivo para a infecção de novos tecidos ou de outras plantas hospedeiras durante o período de desenvolvimento epidémico, VAN DER PLANK (1963), denominou as doenças que lhe estão associadas de “compound interest diseases”, devido à semelhança com os juros compostos nos investimentos de capital.

3.5.2 – Determinação dos parâmetros do modelo

Para estudar o desenvolvimento epidémico destas doenças é necessário determinar os parâmetros do modelo: x_0 e r da equação (1). A transformação logit que

se obtém substituindo a proporção da doença (X) por $\ln [X/(1-X)]$ permite obter uma recta de equação:

$$\ln \left(\frac{X}{1-X} \right) = \frac{X_0}{1-X_0} + r t$$

cujo declive é r , definido por VAN DER PLANK (1963) como taxa aparente de infecção (Fig.5).

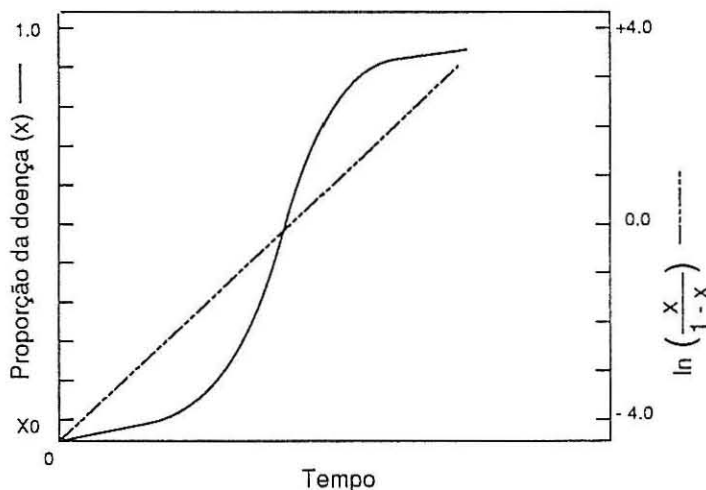


Fig. 5 – Representação gráfica da progressão das doenças de tipo policíclico (—) e transformação logit da proporção de doença (---), ao longo do tempo (MACKENZIE *et al.*, 1987).

A taxa aparente de infecção (r) traduz a rapidez do avanço epidémico ao longo do tempo, podendo ser utilizada para comparar o efeito de várias estratégias de luta, conhecer a agressividade do parasita e a resistência do hospedeiro num determinado ambiente. A este propósito, e sempre que o objectivo esteja para além do mero cálculo do valor de r , convém ter presente as limitações do método comparativo conforme é discutido por FULTON (1979).

MACKENZIE *et al.* (1987) consideram o processo epidemiológico de *P. cinnamomi* no abacateiro difícil de classificar, por não existirem dados que permitam determinar analiticamente a natureza epidemiológica desta doença. Incluíram-na, no entanto, com base no processo de dispersão e desenvolvimento da doença, nas doenças de tipo policíclico.

A doença da tinta do castanheiro é epidemiologicamente semelhante ao declínio do abacateiro, com uma dispersão associada ao movimento da água de drenagem do solo e possivelmente iniciar-se-á, como ZENTMYER (1980) também refere no abacateiro, através de material vegetal infectado. Razões pelas quais poderá ser incluída no mesmo tipo de desenvolvimento epidémico.

Nos viveiros de castanheiro a progressão da doença da tinta é muito mais rápida, estando directamente associada às condições ambientais mais favoráveis ao

desenvolvimento destes parasitas e à proximidade das plantas que proporcionam maior possibilidade de contacto entre o inóculo e as raízes do hospedeiro.

3.5.3 – Dinâmica populacional dos agentes patogénicos policíclicos

Nos agentes patogénicos policíclicos a quantidade do inóculo depende do número de gerações – ciclos de patogénese, que ocorrem durante o desenvolvimento anual do hospedeiro. O período de tempo necessário para que novo ciclo de patogénese ocorra depende, no entanto, da população hospedeira e das condições ambientais. O período de latência – espaço de tempo entre a infecção e a produção de inóculo – será tanto mais curto quanto mais favoráveis forem essas condições e mais susceptível for o hospedeiro. Porque estes factores são tão determinantes no desenvolvimento do parasita, FRY (1982) refere que, em condições especialmente desfavoráveis, agentes patogénicos policíclicos podem ter apenas uma geração no ciclo anual do hospedeiro.

O aumento de uma população de patogénios de tipo policíclico ao longo do tempo é representada por FRY (1982) como o indicado na (Fig.6), onde A, B e C representam a quantificação do inóculo ao longo dos diferentes ciclos de patogénese:

- A – população de patogénio avaliada apenas uma vez em cada geração
- B – população de patogénio avaliada várias vezes ao longo de uma geração
- C – população de patogénio avaliada continuamente, devido à sobreposição de gerações.

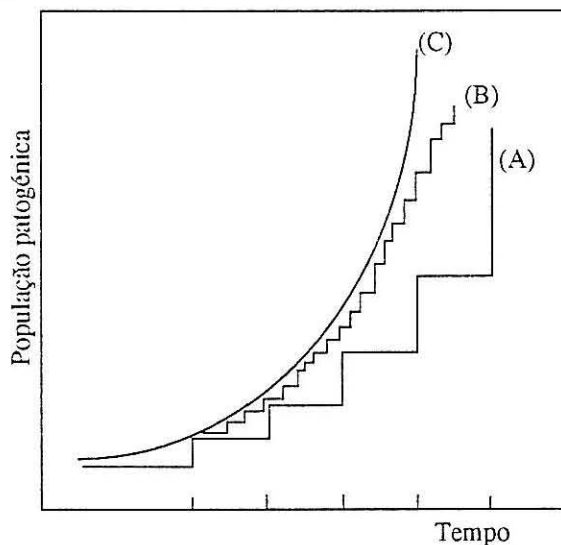


Fig. 6 – Dinâmica populacional de um agente patogénico do tipo policíclico (FRY, 1982).

Se o agente patogénico sobrevive durante muito tempo ou se a doença se desenvolve ao longo de vários anos, como acontece em algumas doenças das plantas perenes, o inóculo aumenta de ano para ano. O parasita, apresenta então, considerando

vários anos um desenvolvimento de tipo exponencial independentemente do seu desenvolvimento durante o ciclo anual da cultura. ZADOKS & SCHEIN (1979) denominaram estes agentes patogénicos como "Polyetic pathogens", podendo a evolução populacional ser observada na Fig. 6 (A), se no eixo das abcissas o tempo for considerado em anos e não em número de gerações anuais.

3.5.4 – Principais factores ambientais de patogénese em *P. cinnamomi*

Na bibliografia da especialidade não existem dados que possibilitem uma análise epidemiológica das doenças provocadas por *P. cinnamomi*. No entanto, são frequentemente analisados os factores de patogénese. Os estudos publicados sobre o efeito das condições ambientais no desenvolvimento das doenças provocadas por *P. cinnamomi* são muitos e variados, pelo que os factores aqui abordados apenas têm como objectivo caracterizar as condições ambientais determinantes do desenvolvimento epidémico.

3.5.4.1 – Humidade do solo

O excesso de água no solo é considerado factor principal no desenvolvimento das doenças provocadas por *P. cinnamomi*, aparecendo referenciado em praticamente todas as situações epidémicas originadas por este agente fitopatogénico. A importância deste factor está bem documentada pelo facto de ter sido considerado como a causa responsável pela morte das árvores, quando ainda não se conhecia a etiologia da doença.

A água desempenha um papel primordial na biologia do fungo. É necessária a presença de água livre para a formação dos esporângios e para a libertação e dispersão dos zoósporos (ZENTMYER, 1981).

Por outro lado, o excesso de água no solo actua directa e indirectamente no hospedeiro e na interacção hospedeiro/parasita. As condições de anaerobiose existentes nestes solos provocam no hospedeiro uma maior exsudação radicular, proliferação de raízes secundárias, alterações nos processos fisiológicos de lenhificação e suberização e ainda alterações nos mecanismos de defesa da planta. Estes processos contribuem para o enfraquecimento do hospedeiro, criando condições de predisposição à doença, tanto mais que nesta situação os agentes patogénicos são favorecidos pelas condições ambientais.

Os exsudados radiculares promovem a germinação dos propágulos de sobrevivência e a presença de água faz com que o fungo, rapidamente, produza grande quantidade de zoósporos que mais facilmente são atraídos para as raízes pelos processos

de quimiotaxia e quimiotropismos. O processo de infecção ficará, desta forma, mais facilitado devido ao enfraquecimento geral da planta.

3.5.4.2 – Temperatura

P. cinnamomi é directamente influenciada pela temperatura do solo, existindo uma ligação estreita entre o crescimento do micélio e a produção de esporângios com a temperatura e com o desenvolvimento da doença.

O efeito da temperatura na patogénese é geralmente indicada em termos gerais, aparecendo as temperaturas moderadas como as que mais favorecem a infecção. ZENTMYER (1981) verificou que em abacateiro a infecção de *P. cinnamomi* ocorria dos 15 aos 27°C, situando-se o óptimo acima dos 21°C, não ocorrendo infecção, no entanto, se a temperatura do solo era mantida a 33°C.

Estes valores indicam, segundo o autor referido, que os períodos mais favoráveis para a infecção nas condições da Califórnia, ocorrem no fim da Primavera – início do Verão e no Outono quando as temperaturas são suficientemente elevadas. Este mesmo autor refere ainda que as temperaturas máxima e mínima podem variar com o hospedeiro considerado e WESTE (1987) refere que, devido à interacção com outros factores de patogénese, os valores da temperatura têm apenas um valor relativo e não absoluto.

3.5.5 – Relação entre densidade de inóculo e incidência da doença em *Phytophthora*

A interrelação entre inóculo e desenvolvimento de doença, inóculo potencial, não é um tema pacífico entre os fitopatologistas que estudam as doenças radiculares.

Este conceito nem sempre teve o mesmo significado e foi definido de forma diferente ao longo do tempo por diversos investigadores, reflectindo, em parte, a dificuldade que existe em relacionar a densidade de inóculo e incidência da doença originada por agentes patogénicos do solo. Este tema foi analisado com algum pormenor por FERRAZ (1990).

Nas doenças provocadas por *P. cinnamomi* as condições ambientais que promovem o desenvolvimento epidémico aparecem, na bibliografia, directamente associadas ao efeito desses factores no agente patogénico. No entanto, não são frequentes os estudos que relacionem a densidade de inóculo com a incidência ou severidade da doença.

Os primeiros dados quantitativos foram determinadas por HENDRIX & KUHLAMAN (1965) utilizando o método da diluição de solo em meio de Kerr modificado.

Com este método obtiveram 1-30 propágulos/g de solo, quando a incidência da doença em viveiros de *Abies fraseri* era elevada. Outros processos de quantificação, como a utilização do índice de densidade populacional de TSAO (1960) foram também utilizados por MAKES *et al.* (1972), que obtiveram valores mais elevados nos locais de forte incidência de "dieback" no eucalipto.

Valores deste tipo não podem, no entanto, ser relacionados com os valores de inóculo inicial que determinam a progressão epidémica da doença por serem avaliados numa fase adiantada do desenvolvimento da doença.

Para avaliar o efeito do inóculo inicial no desenvolvimento epidémico das doenças provocadas por *Phytophthora* spp. do solo realizaram-se, mais recentemente, estudos em condições ambientais definidas, que permitiram quantificar, de forma mais precisa, esta relação.

STERNE *et al.* (1977) estudaram por este processo o efeito do potencial de matriz (ψ_m) no desenvolvimento da doença provocada por *P. cinnamomi* em *Persea indica*. Inocularam o solo com quantidades conhecidas de clamidósporos, fragmentos de micélio ou raízes infectadas. Obtiveram percentagens de infecção significativamente diferentes para os diferentes ψ_m testados (0; -0,1; -2,5 bar), mas muito semelhantes para os vários tipos de inóculo quando o ψ_m apresentava o mesmo valor. Verificaram ainda que a inoculação com 4 ou 16 fragmentos de micélio/g de solo seco não alterava a percentagem final de abacateiros afectados pela doença.

A relação entre densidade de inóculo e incidência de doença aparece referida na bibliografia noutras interacções hospedeiro/*Phytophthora* para avaliar outros factores determinantes do processo epidémico. RISTAINO (1991) estudou o efeito das condições culturais no desenvolvimento da doença provocada por *P. capsici* em *Capsicum annum* tendo verificado que densidades de inóculo inferiores a 1 propágulo/g de solo seco eram suficientes para o desenvolvimento epidémico da doença, sendo a incidência final da doença independente da densidade de inóculo inicial. Já na interacção *P. parasitica*/*Lycopersicon esculentum* a incidência da doença aparece com um valor directamente proporcional à densidade de inóculo inicial (NEHER & DUNNIWAY, 1991). Estes autores obtiveram um desenvolvimento epidémico mais rápido e maior incidência final da doença quando a quantidade de inóculo inicial era mais elevada.

KANNWISCHER & MITCHELL (1978) obtiveram severa infecção em plantas de tabaco, com 93 a 100% de mortalidade quando a densidade de inóculo de *P. parasitica* (Dast.) var. *nicotiana* era apenas 0,5 propágulos/g de solo seco, tendo verificado que o fungicida metalaxil, para este nível de inóculo, evitava o desenvolvimento da doença quando se aplicavam 50mg de metalaxil/g de solo seco.

A resistência do hospedeiro pode também ser avaliada utilizando esta relação pois permite quantificar, de forma mais rigorosa, a quantidade de inóculo utilizada em

cada planta. É, no entanto, necessário determinar previamente a densidade de inóculo que permite avaliar a resistência, ou seja, a densidade de inóculo que não origina, no hospedeiro considerado, 100% ou 0% de infecção como o indicado nas interações *P. cinnamomi*/*Pinus* por FRAEDRICH *et al.*, (1989) e em *P. megasperma* var *soja*/soja por EYE *et al.* (1978).

A densidade de inóculo inicial é utilizada em alguns modelos de previsão da severidade da doença, nomeadamente em doenças do solo causadas por agente patogénicos monocíclicos ou policíclicos com um número reduzido de ciclos de patogénese. Através destes modelos a quantificação do inóculo antes da plantação permite avaliar o risco para a cultura a instalar e as medidas de luta que devem ser implementadas para reduzir esse risco.

No caso de *Phytophthora* spp. do solo a aplicação destes modelos está ainda longe de ser utilizada em situações práticas. Porque não existem dados quantitativos que permitam clarificar o processo epidemiológico e os factores que o determinam e porque os métodos de isolamento e quantificação não são suficientemente sensíveis para detectar níveis muito baixos de inóculo no solo. Acrescenta-se, ainda, o facto da distribuição espacial dos propágulos no solo não ser bem conhecida, o que dificulta a realização de amostragens estatisticamente adequadas.

3.5.6 – Utilização dos modelos matemáticos na avaliação das diferentes estratégias de luta

A aplicação dos modelos matemáticos nos estudos epidemiológicos além de permitir identificar a natureza global do processo infeccioso e dos factores que o determinam, permite ainda avaliar o efeito das diferentes estratégias de luta utilizadas para impedir o desenvolvimento epidémico da doença.

FRY (1982) utilizou o modelo exponencial da doença, proposto por VAN DER PLANK em 1963, para avaliar o efeito no desenvolvimento epidémico quando hipoteticamente alterava a quantidade de inóculo inicial (x_0) e a taxa aparente de infecção (r). Concluiu que, nas doenças com rápido crescimento exponencial, só a redução da taxa aparente de infecção impedia o avanço da doença, tendo, nesta situação, a diminuição do inóculo inicial um efeito reduzido. Mas se a taxa aparente de infecção é baixa ou moderada ($r \leq 0,2$), a redução do inóculo inicial pode, de forma adequada, suprimir a doença.

Nas doenças provocadas por agentes patogénicos do solo com comportamento de tipo policíclico os estudos que utilizam este tipo de análise são em número muito reduzido. A taxa aparente de infecção (r) é apenas referida para a interacção *P. parasitica* (Dast.) var. *nicotiana* /*Nicotiana tabacum*, apresentando um valor de $r = 0,08$ a

0,11/unidades/dia, nas condições descritas por KANNAWISCHER & MITCHELL (1978), quando avaliaram o efeito da aplicação do metalaxil no desenvolvimento da doença. No entanto, referem que a análise por eles realizada deve ser vista como uma tentativa de interpretação, através da transformação logit dos dados, que é aceite para este tipo de doenças.

O efeito do inóculo secundário disperso pela água e pelo solo infectado não foi quantitativamente avaliado em nenhuma situação epidémica provocada por *Phytophthora* spp. do solo, o que possivelmente está relacionado com a dificuldade em identificar o tipo de propágulos envolvidos no processo infeccioso utilizando as técnicas de isolamento actualmente disponíveis. SHEA & BROADBENT (1987) referem mesmo a necessidade de se desenvolverem mais estudos na área da epidemiologia das *Phytophthora* spp. do solo, para elucidar as interacções que se estabelecem entre o hospedeiro e o agente patogénico ao longo do tempo. Só assim, segundo estes autores, os meios de luta a implementar limitarão eficientemente a evolução da doença.

3.6 – Meios de luta

Os meios de luta utilizados contra *Phytophthora* spp. que atacam as raízes são muitos e diversificados, podendo incidir directamente na população patogénica existente no solo ou visar directamente o hospedeiro já afectado pela doença.

Para reduzir o inóculo inicial podem realizar-se tratamentos ao solo através de processos químicos, biológicos ou culturais e utilizar material de propagação isento destes agentes patogénicos. A taxa aparente de infecção será reduzida pela utilização de plantas resistentes e pela aplicação de fungicidas que condicionam o desenvolvimento da doença.

Os agentes patogénicos que causam a doença da tinta do castanheiro provocam uma situação epidémica de difícil solução. E esta realidade terá de ser encarada tanto do ponto de vista sanitário como económico, porque são fungos que se desenvolvem num hospedeiro que ocupa o terreno durante um longo período de tempo e que têm a capacidade de sobreviver no solo quase indefinidamente, tanto pela via saprofítica como pela infecção de outros hospedeiros.

As medidas de protecção a implementar no combate a esta doença não devem ser encaradas como meros processos alternativos de luta, mas como processos complementares de defesa, cujo objectivo final é a protecção da cultura durante o prolongado período de tempo que ocupa o solo.

O desenvolvimento de uma filosofia de Protecção Integrada para a doença da tinta do castanheiro poderá conduzir à solução deste grave problema sanitário, que desde o seu aparecimento conduziu à degradação e morte dos soutos.

Os mesmos princípios devem ser implementados logo nos viveiros de castanheiro para evitar a propagação da doença para áreas cada vez maiores, através da utilização de material vegetativo infectado.

As características biológicas e epidemiológicas dos agentes patogénicos, envolvidos na doença da tinta, impõem o recurso à utilização de meios de protecção que integrem, de forma adequada, os meios de luta culturais, biológicos, genéticos e químicos.

3.6.1 – Meios de luta a implementar nos viveiros

As medidas sanitárias e de quarentena são geralmente consideradas inadequadas para prevenir as doenças provocadas por *Phytophthora* spp., porque estes fungos uma vez introduzidos no solo, rapidamente se multiplicam e disseminam. ZENTMYER (1980), MACKENZIE *et al.* (1987) e SHEA & BROADBENT (1987) consideram, no entanto, que o valor destas medidas foi sub-estimado, devendo ser implementadas mesmo nas áreas onde a doença se encontra presente, para evitar a dispersão generalizada destes parasitas.

A produção de material de propagação, obtido por semente ou por multiplicação vegetativa, isento de inóculo de *P. cambivora* e/ou *P. cinnamomi*, é assim um requisito básico para a protecção do castanheiro em relação à doença da tinta. Infelizmente, tão fácil e válido requisito quase não tem expressão em Portugal. Na verdade, uma parte importante dos novos soutos, instalados nos últimos anos, assenta em material produzido por via seminal, proveniente de campos afectados ou suspeitos de estarem afectados pela tinta.

As técnicas utilizadas nos viveiros de castanheiros incluem pelos processos clássicos, a estratificação da semente em silos a sementeira das castanhas que tenham emitido radículas vigorosas e sãs no seminário e repicagem para o plantório depois de um ano de crescimento. Quando da instalação dos povoamentos é aconselhado, pela generalidade dos autores, utilizar plantas com 2 a 4 anos de idade.

MAIA (1988) verificou que a utilização de plantas com 2 anos de crescimento no seminário, sem repicagem, proporcionava maior produtividade (acréscimo de volume ou peso) do que a utilização de plantas com apenas 1 ano de crescimento, embora o número de falhas no pegamento fosse semelhante para as duas modalidades ensaiadas.

As técnicas clássicas de produção de plantas de castanheiro exigem a aplicação de medidas sanitárias que impeçam a contaminação do solo com *Phytophthora cinnamomi* nas diferentes fases de produção de plantas, como aliás acontece noutros hospedeiros também atacados por este fungo fitopatogénico. COFFEY (1987) propõe, para a multiplicação do abacateiro, o tratamento das sementes com água quente a 48-50°C durante 30 minutos, utilização de substratos esterilizados pelo calor ou por fumigação e

utilização de solos com boa capacidade de drenagem para que o risco de encharcamento seja mínimo. Além disso, considera que os locais de multiplicação devem ser vedados, para restringir o acesso, providenciando-se para que o calçado seja limpo e desinfectado antes de entrar na zona dos viveiros.

Na multiplicação clonal, processo actualmente mais utilizado nesta espécie, o mesmo autor refere a necessidade de se fazerem tratamentos químicos ao solo do plantório com produtos químicos, devendo ainda realizar-se periodicamente testes de detecção de *P. cinnamomi*, tanto nas plantas como nos solos e substratos utilizados no processo de propagação.

FERNANDES (1966) aconselha para o tratamento de viveiros de castanheiros infectados com a doença da tinta a aplicação de sulfato de cobre a 2-4%, além do arranque e queima de todas as plantas mortas ou com sintomas do mal.

TELHADA (1988) citando outros autores, refere que, quando num seminário aparecem plântulas mal desenvolvidas que revelem sintomas de ataque de *Phytophthora* spp. é aconselhável destruir a totalidade das plantas e não tentar aproveitar as que se encontrem aparentemente sãs.

Se as medidas sanitárias que impedem a dispersão do inóculo nos viveiros podem ser facilmente implementadas, a obtenção de solos isentos de propágulos do agente patogénico é mais problemática, porque os métodos de desinfestação do solo apresentam algumas limitações.

Para obter plantas de castanheiro isentas de *P. cinnamomi* e *P. cambivora* nas condições prevalecentes nos viveiros em Portugal, seria conveniente introduzir as medidas sanitárias básicas para impedir a dispersão do inóculo, nomeadamente a desinfecção periódica do equipamento agrícola utilizado nos viveiros e a desinfecção do calçado e rodas dos veículos que têm acesso a essa zonas. Para além destas medidas elementares seria ainda aconselhável a desinfecção das sementes utilizadas na multiplicação e a adopção de substratos esterilizados no processo de estratificação das sementes.

No seminário e no plantório devem realizar-se desinfestações periódicas do solo, para evitar a instalação e multiplicação dos parasitas responsáveis pela doença da tinta e todos os solos e substratos utilizados na propagação clonal do castanheiro devem ser desinfectados.

Na desinfestação do solo, processo fundamental para a obtenção de plantas isentas de propágulos, colocam-se algumas dificuldades de realização prática, apesar de muitos métodos alternativos poderem ser aplicados. ZENTMYER (1980) refere que os fumigantes Vapan, DD, Telone e brometo de metilo eliminam ou reduzem drasticamente a população de *P. cinnamomi*, quando usados em doses elevadas e em solo onde o fumigante se expande sem dificuldade.

Os efeitos adversos deste tipo de tratamento do solo são, desde há muito tempo, conhecidos. Conduzem com frequência ao aparecimento de outras doenças (devido à destruição dos antagonistas) ao fenómeno do vácuo biológico que possibilita uma reinfestação mais severa do solo e a alterações químicas e nutricionais que se manifestam nos fenómenos de fitotoxicidade.

O tratamento do solo, como refere BAKER (1970), é mais do que simplesmente matar organismos. Deve promover o equilíbrio microbiológico do solo que mais favoreça e defenda as plantas dos agentes patogénicos. A utilização de meios de luta menos drásticos, é de facto a via de desenvolvimento a seguir nos processos de tratamento do solo, sendo a técnica da solarização, quando eficaz, o meio de luta recomendado tanto do ponto de vista económico como ecológico.

3.6.1.1 – Solarização do solo

A solarização é um método de desinfestação do solo utilizado com sucesso como meio de luta contra agentes patogénicos do solo e infestantes. Consiste na aplicação de um filme de polietileno transparente de reduzida espessura, em solos previamente humedecidos e durante as épocas de maior insolação.

O aumento da temperatura do solo e as alterações de natureza química, física e biológica que aí ocorrem são os factores considerados responsáveis pela eliminação ou enfraquecimento dos agentes patogénicos.

A elevação da temperatura do solo, conseguido através da técnica da solarização, depende das suas características físicas, das condições climáticas, da duração da exposição à radiação solar e da humidade do solo (DEVAY & KATAN, 1991).

O declínio das populações microbianas varia com a temperatura e com o tempo de exposição, parâmetros que se relacionam de forma inversa (KATAN, 1981).

Para os fungos mesofílicos, à temperatura de 37°C, são necessárias 2 a 4 semanas de exposição para eliminar 90% dos propágulos (LD₉₀), enquanto a 47°C apenas é necessário um período de 1 a 6 horas (PULLMAN *et al.*, 1981). Os fungos mais sensíveis à elevação da temperatura, onde *P. cinnamomi* se inclui, ficam inactivados a temperaturas ainda mais baixas.

BARBERCHECK & BROEMBSSEN (1986), verificaram que os clamidósporos de *P. cinnamomi*, eram inactivados quando tratados a 38°C durante 30 minutos, sendo apenas necessários 10 minutos quando expostos a 44°C. Apesar destes fenómenos não ocorrerem de forma tão linear no solo, estes autores verificaram que a solarização durante um período de 6 semanas erradicava *P. cinnamomi* de tecidos artificialmente infectados e enterrados a 5, 15 e 30cm de profundidade. A sobrevivência do fungo foi de 9% quando o período de solarização foi de 3 semanas. Verificaram ainda que em solo não solarizado

também ocorria diminuição de inóculo e de forma mais acentuada nos solos que atingiram níveis de humidade mais baixos.

Nas condições referidas por estes autores, as temperaturas máximas à profundidade de 5, 15 e 30cm e com filme de polietileno de 50 μ m de espessura foram respectivamente de 51,87°C, 46,09°C e 41,15°C. Com filme de polietileno de 150 μ m de espessura a 10 e 30cm de profundidade, as temperaturas máximas foram de 47,78°C e 35,78°C. Apesar do filme de polietileno de maior espessura ser menos eficiente na transmissão de calor, apresentou, neste estudo, a vantagem de se manter intacto durante a duração do ensaio, enquanto que o de menor espessura se degradou e foi necessário fazer a sua substituição ao fim de 3 semanas.

Ensaio realizados em Bragança utilizando a técnica de solarização do solo, obtiveram como temperaturas máximas a 15 e 30cm de profundidade, 38,1°C e 33,8°C, respectivamente (A. CÉSAR, com. pessoal, 1992), o que indica que a temperatura não será factor limitante da utilização da solarização na desinfestação dos solos de viveiros de castanheiro em Trás-os-Montes.

A eficácia deste método de desinfestação do solo pode ainda ser aumentada, utilizando dois filmes de polietileno ou combinando o método com a aplicação de produtos químicos em doses reduzidas ou outros meios de luta.

3.6.2 – Meios de luta a utilizar na cultura já instalada

O conhecimento das características biológicas e epidemiológicas dos agentes responsáveis pela doença da tinta, *P. cambivora* e *P. cinnamomi*, e as características biológicas e culturais do hospedeiro que aqui nos interessa, o castanheiro, exigem a adopção de medidas culturais que proporcionem a protecção da cultura durante o seu longo ciclo vegetativo.

Os meios de luta a implementar nos soutos devem ser encarados como processos de defesa que se complementam proporcionando, dessa forma, uma protecção superior à que se obteria pela aplicação isolada de cada um dos meios de protecção.

A defesa do castanheiro, em relação à doença da tinta, com base nos princípios da Protecção Integrada, deve assentar nos quatro princípios fundamentais que COFFEY (1987) também considerou para o abacateiro:

- higiene e medidas sanitárias;
- utilização de porta enxertos resistentes;
- utilização de fungicidas;
- meios de luta biológicos e culturais.

As questões que se colocam em relação às medidas sanitárias foram já analisadas para a situação dos viveiros de castanheiro, pelo que apenas se referem, como medidas

sanitárias a implementar nos soutos, o arranque das plantas mortas pela doença e fumigação ou aplicação de fungicidas nesse solo, para impedir a dispersão da doença pela água ou movimentações de terra.

A utilização de porta enxertos resistentes à doença da tinta, que em termos epidemiológicos conduz à redução da taxa aparente de infecção (r), *sensu* VAN DER PLANK (1963), é um meio de luta que conjugado com outros meios de defesa poderá proporcionar uma estratégia de protecção de longo prazo contra esta doença.

A resistência do castanheiro à doença da tinta será abordada em capítulo próprio, razão pela qual apenas se refere aqui a sua importância enquanto meio de luta.

3.6.2.1 – Utilização de fungicidas

Em Portugal a luta química contra a doença da tinta iniciou-se em 1945, com o uso de sais de cobre pouco ionizáveis pelo designado método de “URQUIJO”. Este método, segundo a descrição de FERNANDES (1947), tem as seguintes fases:

- descalce da árvore até cerca de 50cm de profundidade;
- limpeza perfeita das raízes com escovas de arame de aço para retirar a terra aderente;
- lavagem do colo e raízes expostas e aplicação de um aderente;
- aplicação de um produto cúprico de forma a constituir-se uma camada uniforme de pó em volta da base do tronco e das raízes.

Pelo método de “URQUIJO” trataram-se em Portugal 85 935 castanheiros até 1954. Destes, 48 199 foram tratados preventivamente e 37 736 com o objectivo de curar as árvores menos atacadas (indivíduos com cerca de 1/3 dos ramos com sintomas evidentes do mal). Do conjunto das árvores tratadas, FERNANDES (1955b) refere que “a percentagem de indivíduos que não reagiram favoravelmente ao tratamento foi respectivamente de 1 e 5%, pelo que podemos considerar bom o método seguido”.

Em relação a este método o mesmo autor, em 1953, considerava que se devia continuar a utilizar, enquanto não existissem outros métodos mais expeditos e económicos e não existissem plantas resistentes em número suficiente para distribuir pelas regiões infectadas. Considerava ainda “existir certa vantagem em o recomendar nos países onde a mão-de-obra não for cara e onde ainda não exista a *Endothia parasitica* (Murr.) And. & And.”(FERNANDES, 1953).

A “campanha” do tratamento do castanheiro inseriu-se no programa de defesa dos soutos já instalados, fazendo parte do plano geral de defesa do castanheiro que VIEIRA DA NATIVIDADE, em 1944, propôs e expressou no relatório “Bases para um Plano de Reconstituição Valorização e Defesa dos Soutos Portugueses”, que mereceu o

apoio das instâncias governamentais da época, devido à progressão assustadora da doença.

As substâncias activas, que entretanto surgiram no mercado, selectivas para os *Peronosporales* (Quadro 5), por serem sistémicas, constituem novas vias de defesa das plantas contra as *Phytophthora* spp. que causam doenças radiculares.

Quadro 5 – Grupo químico e respectivas substâncias activas selectivas para os *Peronosporales*.

Grupo químico	Substância activa
carbamatos	protiocarbe hidrocloro de propamocarbe
acilalaninas	furalaxil metalaxil milfurame benalaxil
organometálicos de alumínio	fosetil de Al

O metalaxil e o fosetil de Al mostraram ser eficientes para combater o declínio do abacateiro, doença provocada por *P. cinnamomi*. O metalaxil está mesmo homologado para esta doença na Califórnia desde 1983 (COFFEY, 1987).

O mesmo autor refere que o fosetil de Al apresenta menor eficácia quando aplicado ao solo, mas com boa eficiência quando utilizado em aplicações foliares. Para a Califórnia é recomendado um tratamento do solo na altura da plantação seguido de 4 tratamentos foliares com 60 dias de intervalo. Este produto é também eficiente por injeção de tronco, tendo DAVAS *et al.* (1984) verificado que pela aplicação de 20ml de uma solução com 7 a 10% de fosetil de Al se conseguia uma eficácia equivalente ou superior, à obtida pelas pulverizações foliares. Neste caso são necessárias duas aplicações por ano.

Estudos de avaliação da eficácia do metalaxil e fosetil de Al aplicados ao solo para combater *P. cinnamomi* em castanheiro, foram também iniciados pela Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes (DRATM). Os resultados preliminares indicam resultados interessantes (MANTAS & SOUSA, 1991), que, a concretizarem-se em avaliações futuras poderão levar à homologação destes produtos fitofarmacêuticos para esta situação fitossanitária.

3.6.2.2 – Meios de luta biológicos e culturais

Os agentes patogénicos que se desenvolvem no solo estão intimamente associados a um conjunto numeroso de outros organismos, com os quais estabelecem situações de equilíbrio dinâmico complexas.

As condições que promovem o desenvolvimento de antagonistas e impedem o desenvolvimento dos parasitas podem ser obtidas através de processos naturais – solos supressivos – pela adição de antagonistas ou pela modificação das condições ambientais.

3.6.2.2.1 – Solos supressivos

Os solos supressivos caracterizam-se pela ausência ou pelo não desenvolvimento de determinada doença, mesmo nas situações em que o agente patogénico e o hospedeiro susceptível se encontram presentes. A supressividade, observada desde o início do século, é, segundo HUBER & SCHNEIDER (1989), um termo geral que engloba a fungistasis, a capacidade da competição saprofítica e outras interações hospedeiro/parasita.

A existência de solos supressivos para *P. cinnamomi* é referenciada pela primeira vez por BROADBENT & BAKER (1974), na cultura do abacateiro.

A supressividade dos solos, em condições naturais, está associada a uma grande diversidade de mecanismos e os seu conhecimento resulta das diferentes perspectivas de análise.

Resultados obtidos por MALAJCZUK *et al.* (1977) levaram estes autores a concluir que as propriedades do solo actuam indirectamente na supressividade do solo ao proporcionarem o desenvolvimento de uma microflora mais antagonista para *P. cinnamomi*, sugerindo ser este o mecanismo envolvido na supressividade.

MURRAY (1987) verificou, por outro lado, que a população de fungos na rizosfera de *Banksia grandis* é significativamente superior à de *Eucalyptus marginata* e *Acacia pulchella*, existindo maior número de bactérias e actinomicetas em *A. pulchella* (espécies menos susceptíveis a *P. cinnamomi*) e também maior número de antagonistas. Os autores concluíram que a rizosfera da acácia criará condições desfavoráveis ao desenvolvimento de *P. cinnamomi*, ao contrário do que se verifica na rizosfera de *B. grandis* ou *E. marginata*.

O mecanismo pelo qual *P. cinnamomi* não se desenvolve em determinada rizosfera está associado, segundo os mesmos autores, à menor capacidade de produção de esporângios e também à supressão da libertação dos zoósporos.

A constatação da existência na região de Bragança de zonas delimitadas geograficamente onde a doença da tinta não se manifesta, observação que técnicos e agricultores da região confirmaram, sugeriu-nos um estudo, a nível regional, das condições edáficas das zonas afectadas e não afectadas pela doença da tinta.

Os resultados, apresentados no Quadro 6, evidenciaram diferenças ao nível do complexo de troca catiónica e na relação carbono/azoto (C/N).

Os solos onde a doença da tinta era evidente (local 1) apresentaram os menores valores de Ca e Mg de troca, da Soma de Bases e da percentagem de Bases na Capacidade de Troca Catiónica Efectiva. Por outro lado, apresentaram os maiores valores de alumínio de troca e da sua percentagem na CTC efectiva (FIGUEIREDO *et al.*, 1991).

Quadro 6 – Propriedades químicas dos solos afectados (local 1) e não afectados (locais 2 e 3) pela doença da tinta na região de Bragança (FIGUEIREDO *et al.*, 1991).

Camada (cm)	Local 1		Local 2		Local 3	
	0 – 5	20 – 25	0 – 5	20 – 25	0 – 5	20 – 25
...						
Razão C/N	14,3	16,0	10,9	12,7	10,0	11,4
...						
Complexo de troca (cmol (+) kg ⁻¹)						
Bases						
Ca	0,67	0,40	1,31	0,49	1,48	0,78
Mg	0,24	0,12	0,47	0,18	0,59	0,39
K	0,09	0,06	0,34	0,19	0,33	0,21
Na	0,06	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04
Soma (S)	1,06	0,62	2,16	0,90	2,46	1,35
Acidez de troca	1,79	2,30	1,29	1,98	1,38	2,39
Alumínio de troca	1,37	1,87	1,05	1,45	1,01	1,47
CTC efectiva ^(a)	2,85	2,92	3,45	2,88	3,84	3,74
S/CTC efect. (S)	37,2	21,2	62,6	31,3	64,1	36,1
Al troca(CTC efect. (%))	48,1	64,0	30,4	50,3	26,3	39,3

(a) CTC efectiva – Capacidade de troca catiónica efectiva (S + Acidez de troca)

O valor da razão C/N é também mais elevado nos soutos com doença, situando-se e ultrapassando mesmo o limiar 15 referenciado por COSTA (1985), o que sugere condições menos favoráveis para a actividade microbiana.

Posteriormente a este trabalho preliminar, novas indicações sobre possíveis fenómenos de supressividade parecem corroborar estes resultados. É, por exemplo, a situação observada em Carrzedo de Montenegro e Espinhoso que evidenciam diferenças no conteúdo em matéria orgânica, bases de troca e azoto total entre os solos permissivos e supressivos (ABREU *et al.*, 1993).

Os solos que evidenciaram supressividade a *P. cinnamomi* na Austrália, referenciados por MALAJCZUK (1987), apresentavam níveis mais elevados de argila,

maior teor em matéria orgânica, maior capacidade de troca catiónica, e elevado Ca^{++} e Mg^{++} de troca, características que em parte se verificam nos solos que não evidenciam doença por nós estudados.

Apesar de não se conhecerem os mecanismos através dos quais os solos são supressivos, a supressividade do solo é utilizada, na prática, pelos agricultores quando decidem o local da instalação dos sotos e que se evidencia nas expressões frequentemente utilizadas do castanheiro “vai bem” ou “vai mal” em determinado local.

3.6.2.2.2 – Introdução de antagonistas no solo

A introdução de antagonistas no solo com o objectivo de impedir o desenvolvimento do parasita é uma meio de luta biológico muito estudado para combater fungos do solo.

Os antagonistas são geralmente seleccionados em condições laboratoriais ou em situações onde a doença foi suprimida através de tratamentos do solo pouco drásticos, como por exemplo a solarização.

Os organismos antagonistas para *P. cinnamomi* indicados por MALAJCZUK (1987), referindo vários autores, estão indicados na Quadro 7.

Quadro 7 – Microrganismos antagonistas para *P. cinnamomi* e mecanismos envolvidos

Organismos Antagonistas espécies	Mecanismos referenciados
Bactérias e actinomicetas	
<i>Bacillus</i>	Produção de antibióticos
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	Lise do micélio
<i>Streptomyces</i>	Colapso dos esporângios
<i>S. griseoloalbus</i>	Produção de antibióticos
Fungos	
<i>Dactylella spermatophaga</i>	Parasitismo das hifas e dos oósporos
<i>Trichoderma harzianum</i>	Lise das hifas por produção de antibióticos
<i>T. viride</i>	Lise das hifas por produção de antibióticos e parasitismo das hifas

Ainda segundo o mesmo autor os actinomicetas produzem antibióticos *in vitro* contra muitas espécies de *Phytophthora*, sendo mesmo os microrganismos presentes em maior número nos solos supressivos. MALAJCZUK (1987) considera que a acção destes organismos se exercerá nas estruturas de sobrevivência, dado que são dominantes em solos com menor percentagem de humidade. Já para as bactérias antagonistas, a actuação

ocorre através da produção de antibióticos e pelo efeito de lise que provocam nas hifas e ainda pela inibição da diferenciação dos zoósporos. Os fungos antagonistas, nomeadamente *Trichoderma* spp., actuam no crescimento de *Phytophthora* devido à produção de substâncias voláteis a que segue vacuolização do conteúdo da célula que eventualmente resulta em lise das extremidades da hifas, podendo ainda ocorrer micoparasitismo das estruturas da resistência.

A utilização prática, pela adição destes antagonistas ao solo não se tem desenvolvido muito como meio de luta em *P. cinnamomi*, aparecendo como mais promissor a utilização das micorrizas.

3.6.2.2.3 – Micorrizas

MARTINS (1991), citando outros autores, refere que o castanheiro, à semelhança da maioria de espécies florestais, apresenta as raízes ectomicorrizadas em condições naturais, situando-se estas raízes na zona superficial do solo (5-20cm) e em redor do tronco das árvores adultas, num círculo de aproximadamente 1-2m de raio.

A lista dos fungos micorrízicos do castanheiro, realizada com base na ocorrência de carpóforos em soutos e castiçais, é muito extensa, como pode ser constatado no trabalho anteriormente referido e no trabalho de AZEVEDO (1989). No entanto, e ainda segundo MARTINS (1991), a especificidade e importância relativa das associações micorrízicas em castanheiro não têm sido constatadas *in vitro* senão para um grupo muito reduzido de fungos, entre os quais *Hebeloma cylindrosporum*, *Lyphllum decastes* e *Tuber melanosporum*.

Os mecanismos através dos quais as micorrizas protegem as plantas dos ataques de *P. cinnamomi* são, segundo MALAJCZUK (1987), devidos a um ou à combinação dos seguintes factores:

- Alteração dos exsudados radiculares, com a consequente redução dos fenómenos de quimiotaxis e diminuição dos estímulos que promovem a germinação dos clamidiósporos e zoósporos;
- Produção por parte dos fungos micorrízicos de antibióticos que inibem o crescimento micelial dos fungos parasitas;
- Formação de uma barreira física, na forma de manto fúngico, que impede o estabelecimento do patogénio;
- Desenvolvimento de uma população microbiana, na rizosfera, antagonista de *P. cinnamomi*.

Apesar das dificuldades em fazer crescer, *in vitro*, os fungos e em criar condições para a associação simbiótica dos fungos micorrízicos em castanheiro, os resultados obtidos nesta área, nomeadamente por MARTINS (1991), que micorrizou plantas de castanheiro micropropagadas, com *Pisolithus tinctorius*, tornam promissor a utilização prática deste meio de luta biológico no combate à doença da tinta do castanheiro. No entanto, é ainda necessário testar a adaptação das plantas às condições naturais.

3.6.2.2.4 – Alteração das condições ambientais

Muitas técnicas culturais podem ser utilizadas para alterar as condições ambientais do solo que promovem o desenvolvimento da doença. Entre estas referem-se a adição de matéria orgânica e a realização de mobilizações adequadas para promover a drenagem do solo tanto à superfície como em profundidade.

A instalação da cultura é, desta forma, uma fase crítica que deve ser ponderada tanto do ponto de vista do local de instalação como das técnicas a utilizar. BERGOUGNOUX *et al.* (1978) referem como mais aconselhável a ripagem do terreno, quando o solo está seco, para que o efeito seja duradouro, e não instalar esta cultura se aparecer uma camada impermeável a pouca profundidade, dado que mesmo a subsolagem não impedirá a asfixia radicular em anos muito húmidos.

ABREU (1992) considera como factores que mais contribuem para a predisposição do castanheiro à doença da tinta, as lavouras profundas realizadas com máquinas agrícolas pesadas que dilaceram as raízes, levam à compactação do solo e à asfixia radicular, e ainda o abandono da prática da incorporação de matéria orgânica nesta cultura.

A adição de matéria orgânica aos solos pode ser encarada como um meio de luta biológico, estando os elevados teores em matéria orgânica frequentemente associados à supressividade da doença provocada por *P. cinnamomi*. O mecanismo pelo qual a matéria orgânica contribui para a redução da doença aparece associada à supressão do agente patogénico devido à acção dos microrganismos antagonistas, que causam a lise do micélio e a produção de esporângios anormais (NESBITT *et al.* 1979). Na Austrália esta técnica é utilizada na cultura do abacateiro (MALAJCZUK, 1987). Os elevados teores de matéria orgânica são mantidos na cultura pela sideração de uma mistura de leguminosas e gramíneas a que se adiciona estrume de aves e calcário dolomítico para favorecer a decomposição da matéria orgânica.

IV – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E MELHORAMENTO DO CASTANHEIRO EM RELAÇÃO À DOENÇA DA TINTA.

4.1 – Introdução

O estudo dos mecanismos de resistência das plantas a *Phytophthora* iniciaram-se com a interacção *Phytophthora infestans*/batateira. UMAERUS *et al.* (1987), citando outros autores, referem que, além dos estudos hoje conhecidos como de Resistência Horizontal, o cruzamento de *Solanum tuberosum* com *Solanum demisum* foi também utilizado na procura de resistência em 1849 por SALAMAN e WILSON, embora nessa época não se tivessem obtido resultados práticos.

A resistência das plantas às doenças foi inicialmente explicada pela existência de substâncias tóxicas para os agentes patogénicos (ELLINGBOE, 1981). Este conceito de resistência altera-se radicalmente depois dos trabalhos de FLOR (1942) que, analisando de forma sistemática, a hereditariedade da resistência e da susceptibilidade do hospedeiro (*Linum usitatissimum*) e a hereditariedade da avirulência e virulência do fungo (*Melampsora lini*), estabeleceu que os hospedeiros e os parasitas possuem sistemas genéticos complementares.

Recentemente KEEN (1990), analisando a complementaridade gene-a-gene nas interacções hospedeiro-parasita, considera que as estratégias de defesa das plantas em relação aos agentes patogénicos são muito similares às utilizadas pelos vertebrados, na medida em que os mecanismos de defesa só são activados depois do processo infeccioso se ter iniciado. Além disso o reconhecimento dos patogénios nos dois sistemas de defesa apresenta, também, características comuns. Nos vertebrados antígenos específicos reconhecem os patogénios e nas plantas ocorre o reconhecimento de moléculas provenientes da actividade dos agentes patogénicos, que KEEN (1975) denominou como “elicitores”.

Os genes de resistência que funcionam segundo o sistema gene-a-gene são frequentemente denominados como “genes maiores” por determinarem efeitos de fácil identificação, geralmente do tipo resistente *versus* susceptível.

A facilidade em reconhecer e manipular os “genes maiores” determinou a sua utilização em muitos programas de melhoramento das plantas às doenças. A utilização desta estratégia de melhoramento vegetal, com a consequente obtenção de plantas com elevados níveis de resistência, evidenciou que era facilmente superada, se novas raças do patogénio se desenvolviam, sendo então necessário incorporar novos genes de resistência no hospedeiro para manter essas variedades viáveis.

Esta situação veio chamar a atenção para outro tipo de resistência, que embora sendo difícil de usar nos programas de melhoramento, por ser determinada por um elevado número de genes, cada um deles com um pequeno efeito difícil de identificar, possui a vantagem de não ser restrita para raças particulares do patogénio, ou seja, é efectiva para todos os indivíduos dessa espécie. Este tipo de resistência é, por vezes, designada por Resistência Horizontal.

Para além dos mecanismos activos de defesa, RODRIGUES (1980) refere que as plantas devem possuir também, mecanismos gerais de defesa que lhes permitam manterem-se sãs, em presença de elevado número de potenciais agentes patogénicos.

Ainda segundo este autor, os factores a que se tem atribuído papel relevante na resistência das plantas às doenças podem agrupar-se em barreiras morfológicas (físicas) e barreiras químicas. Neste último caso a resistência é devida a compostos inibitórios existentes na superfície ou dentro dos tecidos do hospedeiro, podendo ser considerados constitutivos ou induzidos, conforme são já operacionais antes da infecção ou resultam da interacção hospedeiro/parasita.

A não manifestação da doença quando estão presentes hospedeiros susceptíveis, agentes patogénicos virulentos e as condições são favoráveis ao desenvolvimento da doença, foi denominada por AGRIOS (1988) como Resistência Aparente e por PARLEVLIET & ZADOKS (1977) como "escape resistance".

A Resistência Aparente ocorre devido a mecanismos de fuga à doença que se relacionam directamente com as condições ambientais, mas dependem também de características intrínsecas do hospedeiro e do agente patogénico. Assim, factores que afectam a sobrevivência, o processo de infecção, a multiplicação e disseminação dos parasitas, assim como as características fisiológicas das cultivares, constituem mecanismos pelos quais as plantas não contraem doença. A fuga à doença é uma característica que pode ser implementada para evitar a sua progressão e dispersão.

Este tipo de resistência e a Resistência Horizontal têm, segundo AGRIOS (1988), uma área comum muito vasta, na medida em que uma característica fisiológica de fuga à doença pode ser encarada como resistência de tipo horizontal do hospedeiro.

A resistência das plantas às doenças é uma área de investigação interdisciplinar, que por ser tão polifacetada pode ser considerada segundo diferentes perspectivas. Por essa razão, expõem-se alguns dos mecanismos de resistência das plantas aos ataques de *P. cinnamomi* e a metodologia utilizada no melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta.

4.2 – Resistência Horizontal

Todas as plantas possuem um certo nível de resistência não específica que se manifesta, em grau variável, nos diferentes indivíduos e é efectiva para todos os indivíduos da espécie patogénica. Sem entrar na enorme e controversa discussão que se gerou à volta do verdadeiro sentido dado por VAN DER PLANK (1963) ao conceito de Resistência Horizontal (RH), e que tem na versão de NELSON (1978) o local privilegiado de discussão, podem considerar-se como sinónimos de RH a resistência designada por: Resistência Geral, Resistência Quantitativa, Resistência de Campo e Resistência não Específica.

A RH é determinada por elevado número de genes, é efectiva para todos os indivíduos da espécie patogénica, mantem-se durante prolongados períodos de tempo e manifesta-se de forma diferente nas diferentes condições ambientais.

KEEN & YOSHIKAWA (1987) incluem nos mecanismos que conferem RH, as características estruturais do hospedeiro, substâncias químicas pré-formadas, indução de barreiras estruturais, reacções de hipersensibilidade e as fitoalexinas.

A diversidade de mecanismos envolvidos neste tipo de resistência, faz com que a avaliação da expressão do RH seja complexa e se manifeste de forma diferente em diferentes fases do ciclo infeccioso. UMAERUS *et al.* (1987) consideram que os métodos utilizados para avaliar a RH têm como principal objectivo, separar a resistência em componentes efectivas nas diferentes fases do ciclo infeccioso, ou seja, na fase de pré-infecção, colonização e reprodução do agente patogénico.

Estas componentes podem ainda ser subdivididas em sub-fases, em experiências mais precisas, podendo considerar-se a RH como um processo mais ou menos efectivo de bloqueamento do processo infeccioso, que poderá ocorrer em diferentes fases e em diferentes combinações hospedeiro/parasita.

PARLEVLIET (1979) considera que, nas doenças provocadas por agentes patogénicos de tipo policíclico, a severidade da doença (área de tecido infectado) resulta do efeito cumulativo de muitos factores ou componentes.

A resistência que reduz a taxa aparente de infecção, (*r*) *sensu* VAN DER PLANK, pode ser dividida em resistência à infecção, resistência à colonização e resistência à reprodução do agente patogénico. Cada tipo de resistência pode ainda ser subdividida em diferentes componentes, permitindo uma quantificação mais precisa do desenvolvimento do patogénio no hospedeiro.

Ainda segundo este autor quando num genótipo se avaliam diferentes componentes da resistência, muitas vezes variam de forma associada umas com as outras. A RH está geralmente associada a baixas frequências de infecção, prolongados períodos

de latência, reduzida produção de esporos e a períodos favoráveis para a ocorrência de infecção de duração limitada.

A divisão do processo de resistência em diferentes componentes permite sistematizar as observações e quantificar essas componentes possibilitando, assim, uma análise mais precisa dos mecanismos envolvidos, embora por vezes seja difícil separá-los rigorosamente, porque os processos biológicos estão, frequentemente, interligados.

4.3 – Mecanismos que Conferem Resistência a *P. cinnamomi*

4.3.1 – Mecanismos de fuga à doença

Os mecanismos que contribuem para a redução da taxa de desenvolvimento epidémico integram os mecanismos de fuga à doença e os mecanismos de resistência, considerando-se resistência como a capacidade do hospedeiro em retardar o crescimento e/ou o desenvolvimento do agente patogénico.

O processo infeccioso de *P. cinnamomi* inicia-se com o contacto do inóculo com as raízes do hospedeiro, processo que é mediado por um estímulo químico.

ERB *et al.* (1987) estudaram o processo infeccioso de *P. cinnamomi* em mirtilo (*Vaccinium* spp.) e verificaram que as cultivares mais resistentes atraíam menor número de zoósporos, mecanismo que consideraram responsável pela resistência evidenciada por estas cultivares.

Os zoósporos de *P. cinnamomi* são passivamente transportados pela água de drenagem do solo, mas possuem também processos activos de movimentação, deslocando-se por meio de flagelos. A dispersão dos zoósporos será essencialmente um fenómeno de transporte passivo, desempenhando os fenómenos de quimiotaxia um papel importante junto do hospedeiro e o quimiotropismo um papel importante na penetração do hospedeiro.

A quantidade de exsudados radiculares varia com o hospedeiro considerado (MALAJCZUK & MCCOMB, 1977, ZENTMYER, 1980, MURRAY, 1987, ERB *et al.*, 1987, FRAEDRICH *et al.*, 1989), mas varia também com as condições fisiológicas do hospedeiro e com as condições ambientais. Os fenómenos de quimiotaxia e quimiotropismo foram já analisados quando se avaliou o processo de patogénese em *P. cinnamomi*, podendo ser encarados como processos de fuga à doença se se promoverem as condições que diminuem a produção de exsudados radiculares por parte das raízes.

No entanto, a dificuldade em separar os efeitos devidos ao hospedeiro e devido às condições ambientais tornam este tipo de estudos difíceis de utilizar na avaliação e quantificação da resistência.

4.3.2 – Mecanismos de resistência

4.3.2.1 – Resistência à infecção

A progressão da doença será mais rápida se o parasita se desenvolver facilmente nos tecidos do hospedeiro do que se esse desenvolvimento for limitado a pequenas áreas junto do local de infecção. Neste último caso o desenvolvimento da doença depende do efeito cumulativo de elevado número de pontos de infecção que, por sua vez, dependem dos factores que influenciam a produção de inóculo na rizosfera.

A evidência de que a colonização dos tecidos pelo fungo pudesse representar um papel importante na resistência a *P. cinnamomi* surgiu inicialmente de constatações em vários dos seus hospedeiros. O desenvolvimento epidémico de *P. cinnamomi* em eucalipto e pinheiro (SHEA & BROADBENT, 1987) e ainda em castanheiro (GRETE, 1978), caracteriza-se por apresentar períodos com elevada mortalidade seguidos de outros períodos em que apenas se evidencia ligeiro declínio, com algumas mortes esporádicas. Estes autores atribuem este fenómeno ao facto destas espécies terem um sistema radicular muito desenvolvido e não dependem das raízes superficiais para a absorção de água, razão pela qual concluem que a morte das árvores estará associada à invasão dos tecidos secundários das raízes principais e do caule.

Em castanheiro a resposta individual da árvore à tinta é muito diferente podendo ocorrer a morte da árvore no mesmo ano em que a doença se manifesta ou demorar vários anos até que isso aconteça. Este facto é facilmente observado em condições naturais e por vezes no mesmo souto, facto possivelmente associado a esta componente da resistência, ou seja, resistência à colonização dos tecidos secundários.

Em eucalipto esta perspectiva da progressão de doença é relativamente recente e só se concretizou quando MARKS, em 1981, verificou que *P. cinnamomi* além das raízes mais finas também atacava os tecidos secundários da raiz e do caule (TIPPETT *et al.* 1985).

Esta componente da resistência é indicada por vários autores em diferentes interacções hospedeiro/*P. cinnamomi*: ERB *et al.*, (1987) em *Vaccinium ashei* Reade; TIPPETT *et al.*, (1985), SHEARER *et al.*, (1987) em *Eucalyptus* spp.; MCCREDIE *et al.*, (1985), SHEARER *et al.*, (1987) em *Banksia grandis*; DOLAN & COFFEY (1986) em porta- -enxertos de *Persea americana*; FERNANDES (1966) e GRETE (1978), em *Castanea sativa*.

O facto do fungo se desenvolver nos tecidos secundários do hospedeiro possibilita uma maior variedade de mecanismos de defesa do que se o desenvolvimento se processasse apenas nos tecidos primários (TIPPETT *et al.*, 1985).

Os mecanismos de defesa, referidos na bibliografia como limitadores da progressão de infecção, são os mais variados, podendo de uma forma geral ser divididos em dois grandes grupos:

- mecanismos de defesa físicos
- mecanismos de defesa bioquímicos.

4.3.2.1.1 – Mecanismos de defesa físicos

As alterações anatómicas e histológicas que ocorrem nas raízes e caules infectados, constituem uma barreira física à invasão dos tecidos por *P. cinnamomi*. PHILLIPS *et al.* (1987) verificaram este fenómeno em raízes de “Duke 7”, porta-enxerto de abacateiro (*Persea americana* Mill.), considerado moderadamente resistente a *P. cinnamomi*.

As maiores alterações localizavam-se no limite da zona colonizada, ocorrendo produção de periderme de cicatrização no cortex e isolamento dos feixes floémicos infectados através de conjuntos de células formadas pela divisão periclinal da parede celular.

A formação da periderme de cicatrização é considerada como um processo de defesa não específico em relação à morte das células vizinhas e serve para proteger os tecidos vivos dos efeitos adversos, associados à morte dessas células.

O isolamento dos feixes floémicos envolve a proliferação de células e a acumulação de substâncias amorfas, luminescentes e castanho amareladas, dentro das células da parede celular e nos espaços intercelulares. Em “Duke 7” essa substância foi identificada como sendo suberina. Adicionalmente, estes autores observaram ainda, a formação de tiloses nos vasos xilémicos que podem evitar, em certa medida, a progressão das hifas nestes tecidos. Concluem ainda, que estes mecanismos de resistência não afectam de forma definitiva a viabilidade do fungo parasita, mas podem impedir o seu avanço, sendo provável que nos fenómenos de resistência actuem em paralelo mecanismos bioquímicos.

TIPPETT *et al.* (1983) tinham já verificado estas alterações anatómicas nos tecidos do caule e das raízes de eucalipto, tendo incluído nos mecanismos de resistência não específicos a formação de periderme de cicatrização, “necrophyllactic periderm” (segundo a terminologia de MULLICK & JENSEN (1973) que estes autores adoptaram) a oclusão dos vasos com calose e formação de “Kino veins”.

Em eucalipto, além da periderme de cicatrização “necrophyllactic periderm” forma-se ainda “exophyllactic periderm” que é um tecido mais organizado situado entre as células suberizadas da “necrophyllactic periderm” e as células suberizadas do felema que ficam lenhificadas e de parede mais espessa (TIPPETT *et al.*, 1983).

As barreiras físicas induzidas pela acção do agente patogénico, são considerados como uma componente da resistência a *P. cinnamomi*. Este mecanismo seria complementado com mecanismos de tipo bioquímico, como os que são indicados como hipótese por alguns investigadores.

TIPPETT *et al.* (1985) referem que a susceptibilidade em *Eucalyptus marginata* Smith. (jarrah, segundo a designação local) estaria associada à incapacidade do hospedeiro para deter o crescimento do fungo a partir de lesões que inicialmente o tinham confinado. Poderia estar ainda associada à capacidade do fungo produzir clamidósporos nos tecidos do hospedeiro. Consideram também que os compostos fenólicos desempenham possivelmente um papel importante na manifestação de resistência em algumas espécies de eucalipto.

SHEARER *et al.* (1987), por outro lado, atribuem a variação de crescimento micelial nos tecidos do hospedeiro, às diferentes condições nutritivas que os fungos encontrariam nas espécies vegetais ou clones.

4.3.2.1.2 – Mecanismos de defesa bioquímicos

Muitos produtos do metabolismo secundário das plantas possuem propriedades antibióticas e são considerados mecanismos de defesa contra os agentes patogénicos (GOTTSTEIN & GROSS, 1992).

Este tipo de metabolitos pode dividir-se em dois grandes grupos:

- compostos pré-formados, ou seja, constituintes endógenos das plantas;
- compostos de produção induzida pela acção dos agentes patogénicos, por ferida, ou por condições ambientais desfavoráveis – as fitoalexinas.

Dentro dos compostos induzidos, de baixo peso molecular, incluem-se os fenóis que aparecem de forma generalizada nas plantas lenhosas.

Os fenóis induzem a lenhificação da parede celular e apresentam características anti-microbianas, desempenhando por isso um papel importante na manifestação dos fenómenos de resistência.

As feridas, as condições de “stress” e os ataques dos agentes patogénicos, causam alterações muito acentuadas no conteúdo dos compostos fenólicos junto das zonas agredidas das plantas. Em muitos casos é, no entanto, difícil determinar com precisão quando um destes compostos é um composto constitutivo que se acumulou no local de agressão ou quando é um composto produzido *de novo*, ou seja, uma fitoalexina (GOTTSTEIN & GROSS, 1992).

PETRI em 1924 atribuiu a resistência do *C. crenata* a *P. cinnamomi* a uma reactividade particular do citoplasma do tecido embrional e também à elaboração de

substâncias tânicas em abundância que se acumulavam nos tecidos e exerciam uma acção nefasta nos parasitas. DEFRENOY, em 1932, atribuiu a resistência desta espécie à formação de compostos fenólicos nas células corticais (FERNANDES, 1966).

Outro tipo de substância pré-formada com características anti-microbianas foi identificado por ZAKI *et al.* (1980) em espécies de *Persea* que denominaram por “borbonol”, por ter sido isolada, pela primeira vez de *Persea borbonia*.

Este composto foi detectado em raízes, caules e folhas como um constituinte pré-formado, aparecendo em concentrações superiores a 100µg/g, não existindo ou existindo em muito pequenas concentrações, nas variedades susceptíveis. Este metabolito inibe o crescimento de *P. cinnamomi*, *in vitro*, a concentrações de 1µg/ml em meios líquidos e a 50µg/ml em meios gelosados, impedindo a formação de esporângios a uma concentração de 10µg/ml.

4.4 – Melhoramento do Castanheiro em Relação à Doença da Tinta

O castanheiro, por possuir um período juvenil (período de tempo em que a planta não tem capacidade de produzir frutos) muito longo, as suas sementes darem origem a indivíduos geneticamente muito diferentes e ainda por ter um ciclo de vida com várias dezenas de anos é uma espécie onde os estudos genéticos e os programas de melhoramento se prolongam por períodos de tempo muito alargados.

No caso concreto do melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta, os requisitos básicos para obter resistência são, no entanto, semelhantes aos utilizados nas plantas anuais, sendo necessário:

- identificar as fontes de resistência;
- desenvolver metodologia para incorporar a resistência nas variedades pretendidas;
- avaliar a resistência ao longo do tempo e em diferentes condições ambientais;
- identificar os mecanismos de resistência e a sua base genética.

Os primeiros estudos para detectar fontes de resistência à doença da tinta indicavam como espécies resistentes o castanheiro japonês (*C. crenata* Zieb & Zuc.) e o castanheiro chinês (*C. mollissima* Blume). Estudos posteriores demonstraram que estas espécies não eram totalmente resistentes à doença (FERNANDES, 1966). Este mesmo autor refere que a utilização do *C. crenata* teve algum significado em Portugal, mas os resultados foram desanimadores porque esta espécie tem exigências ecológicas diferentes do *C. sativa* e também porque a qualidade do fruto e madeira são muito inferiores à do castanheiro nacional.

Desanimador foi também, segundo o mesmo autor, a sua utilização como porta-enxerto devido à falta de afinidade com *C. sativa*.

Os estudos de resistência em híbridos intra-específicos foi iniciada em Portugal em 1947 por GOMES GUERREIRO em híbridos naturais ou obtidos por fecundação controlada de *C. crenata* × *C. sativa*, tendo como objectivo, obter formas resistentes à doença e ao mesmo tempo com características de qualidade e de adaptação às nossas condições ecológicas (FERNANDES, 1953).

Como não é possível prever antecipadamente o comportamento dos híbridos, FERNANDES (1953), além desta linha de melhoramento, introduziu nos estudos de resistência do castanheiro a procura de formas resistentes de *C. sativa*.

Com esta linha de melhoramento estariam resolvidas as questões relacionadas com a adaptação e com as características culturais que era necessário avaliar nos híbridos. O método consistia na selecção dos indivíduos que manifestavam resistência de campo dos quais se colhia a semente e se obtinham plantas que inoculava num ano com *P. cinnamomi* e no ano seguinte com *P. cambivora*, ou vice-versa. Considerava positivas as inoculações que resultavam na morte de planta e negativas as que apresentavam comportamento igual ao das plantas testemunha, mantendo em observação as que apresentam necroses localizadas. As plantas com inoculações negativas aos dois fungos eram consideradas resistentes. Nestes estudos, FERNANDES (1953) verificou que 36% do material testado apresentava resistência e concluiu que era possível existirem indivíduos de *C. sativa* com acentuadas características de resistência à doença.

A partir de 1960 este método foi ligeiramente alterado sendo a inoculação feita por incisão na zona cambial, com uma mistura de estirpes das duas espécies (FERNANDES, 1966) e repetidas em 3 anos consecutivos. Com este método o autor refere que é possível realizar maior número de inoculações e testar populações maiores, proporcionando por isso maiores êxitos, porque os castanheiros ao serem sujeitos ao parasitismo de várias estirpes têm maior probabilidade de resistirem à doença em condições naturais. A esta fase seguia-se a plantação dos clones em solos naturalmente infectados e realizava nova avaliação da resistência seleccionando as plantas que confirmavam a característica de resistência.

Na linha de melhoramento de material resultante das hibridações de *C. crenata* × *C. sativa* e de *C. mollissima* × *C. sativa* ou vice versa, a metodologia de selecção foi semelhante, realizando-se complementarmente retrocruzamentos de material F1 resistente com os progenitores (selecção recorrente). Os híbridos considerados resistentes eram instalados no campo onde se avaliava, além do carácter resistente, a adaptação às condições ecológicas e a afinidade de enxertia.

Os mecanismos genéticos envolvidos na resistência do castanheiro a *P. cinnamomi* são processos difíceis de avaliar porque os estudos da heritabilidade da

resistência, parâmetro que avalia a transmissão das características dos progenitores para a sua descendência, demoram vários anos devido ao prolongado período juvenil desta espécie. FERNANDES (1966) refere que só obtiveram flores femininas, nos híbridos, passados 10 anos da plantação, o que atesta bem a dificuldade destes estudos genéticos.

A metodologia de selecção da resistência em relação à doença da tinta foi muito semelhante em toda a Europa tendo-se obtido em França, Portugal, Espanha e Itália colecções de clones com características de resistência à doença. Merece justo realce o trabalho iniciado por CRUZ GALLASTEGNI, da então Missão Biológica da Galiza, e depois continuado por ERNESTO VIEITEZ, da Universidade de Santiago de Compostela, que conduziu à obtenção de uma importante colecção de clones resistentes à tinta (HERNANDEZ & MAGÁN, 1979)

No ANEXO I, apresenta-se a lista de clones resistentes, obtidos por TAVEIRA FERNANDES, utilizando o método da inoculação por ferida ou por hibridação e vegetativamente propagados pelo Centro Regional de Investigação e Desenvolvimento Agrário de Bragança (L. Maia, com. pessoal, 1991).

Os trabalhos de melhoramento do castanheiro prosseguiram em Portugal, realizando-se estudos de avaliação da resistência à doença da tinta em diferentes condições ecológicas, avaliação da afinidade da enxertia, capacidade de enraizamento por estaca, assim como do seu potencial produtivo e de qualidade para fruto e madeira.

O melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta foi recentemente impulsionado pela UTAD, constando essencialmente de três fases (C. ABREU, com. pessoal, 1991), que podem ser observadas na Fig. 7.

O material vegetal de partida é constituído por populações de castanheiro seleccionadas com base em características favoráveis do ponto de vista da silvicultura. Na primeira fase recolhe-se a semente, que é disposta num viveiro "mortório", área devidamente isolada e inoculada artificialmente com micélio/clamidósporos de todos os isolamentos identificados como *P. cinnamomi*. No ano seguinte as plantas sobreviventes, provavelmente com alguma resistência, são transferidas para outro local (2ª fase do programa) e inoculadas com micélio do fungo com manifesta patogenicidade, através de uma incisão em T, feita na zona cambial do colo da planta. Na terceira fase avalia-se a resistência em ramo destacado e seleccionam-se os clones a propagar vegetativamente.

Este programa, conduzido nos últimos 6 anos pelos Departamentos de Protecção de Plantas e Florestal, permitiu seleccionar alguns clones com manifesta resistência e elegeo mesmo clones com resistência e boa adaptação, segundo os primeiros resultados dos ensaios multilocais de adaptação.

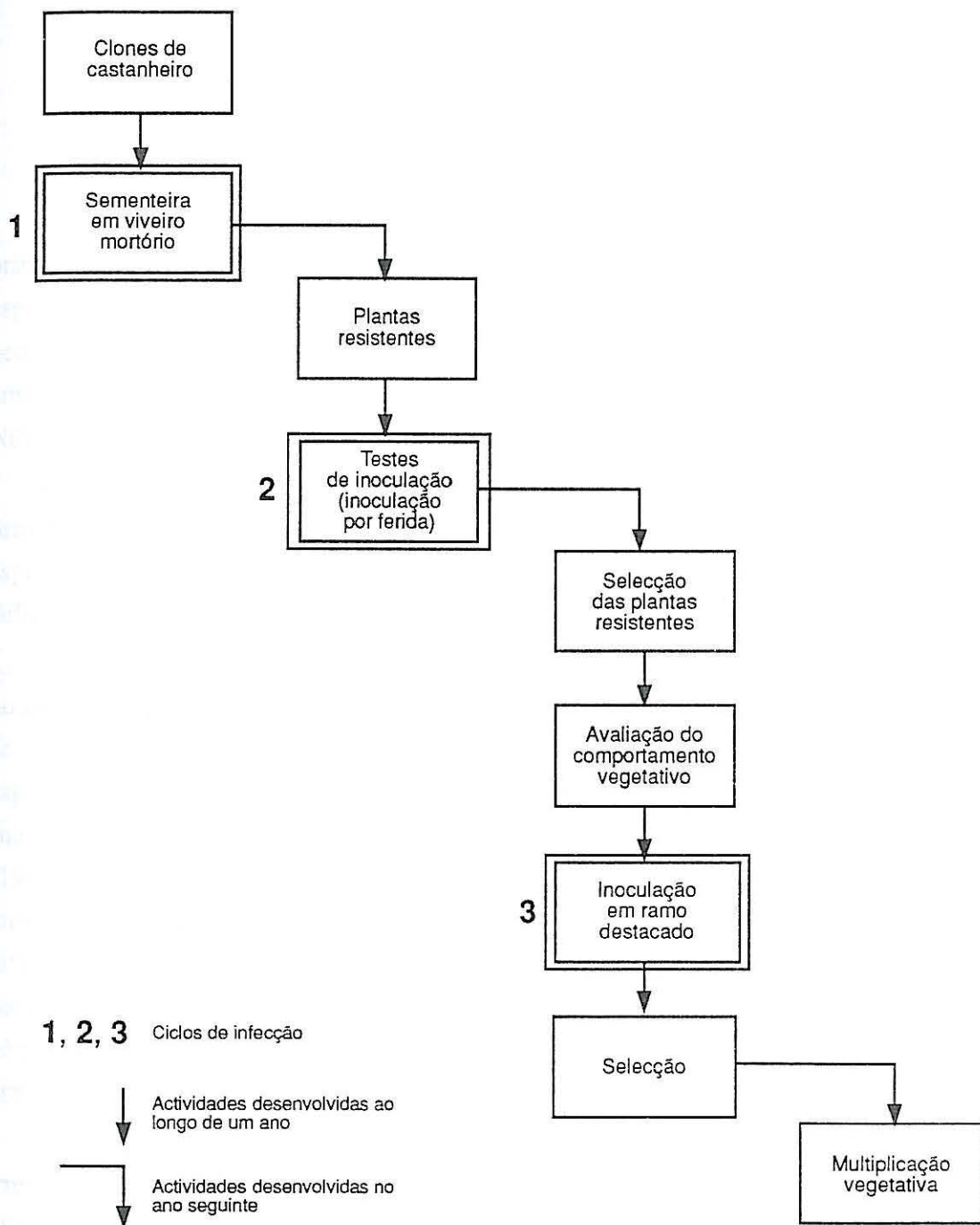


Fig. 7 – Diagrama representativo do programa de melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta.

V - IDENTIFICAÇÃO DE ISOLAMENTOS DE *PHYTOPHTHORA* OBTIDOS DE PLANTAS COM SINTOMAS CARACTERÍSTICOS DA DOENÇA DA TINTA

5.1 Introdução

A identificação e classificação das espécies de *Phytophthora* assenta primariamente nas características morfológicas dos esporângios, nomeadamente no espessamento, presença e tipo de papila apical, na caducidade e no comprimento do pedicelo. Estes caracteres, conjugados com o tipo de anterídio (anfigíneo, paragíneo ou ambos), dão origem aos seis grupos (I-VI) das chaves de WATERHOUSE (1963), NEWHOOK *et al.* (1978) e STAMPS *et al.* (1990).

P. cinnamomi e *P. cambivora*, espécies que isoladamente, ou em conjunto, provocam no castanheiro sintomatologia semelhante, são espécies que possuem esporângios não papilados e não caducos e anterídios sempre anfigíneos, caracteres que definem o grupo VI das chaves anteriormente referidas.

A produção de esporângios proporciona um rápido aumento do inóculo potencial no solo, uma vez que cada esporângio pode produzir de dez a trinta zoósporos em menos de uma hora se as condições lhe são favoráveis (ZENTMYER, 1981). A obtenção de esporângios em condições axénicas exige condições e meios especiais e mesmo assim a sua formação é irregular e aleatória. LEONIAN (1934), GREENTE (1961b) e FERNANDES (1966), obtiveram esporângios de *P. cambivora* transferindo micélio com 7-8 dias de crescimento para água destilada. LEONIAN (1934), considera esta característica na diferenciação de *P. cambivora* de *P. cinnamomi*, uma vez que esta última espécie, nessas condições, permanece estéril. GREENTE (1961b), contudo, concluiu que esta característica não deve ser considerada diferenciadora devido à irregularidade na obtenção de esporângios por este processo.

A obtenção de esporângios de *P. cinnamomi* apresenta ainda maior irregularidade e complexidade, tendo-se baseado nos últimos quarenta anos (ZENTMYER, 1980) na utilização de extractos de terra não estéreis. Este método foi utilizado pela primeira vez por MERHLICH em 1935 (ZENTMYER, 1980), consistindo na transferência de micélio com 4 dias de crescimento em meio líquido de malte para extracto de terra não estéril. A transferência do micélio é precedida de lavagens repetidas com água destilada e esterilizada. O facto de extractos de solo não estéreis estimularem a esporulação de *P. cinnamomi* e dos extractos esterilizados perderem essa capacidade, foi atribuído à presença de metabolitos produzidos por bactérias (ZENTMYER, 1980).

Mais recentemente, CHEN & ZENTMYER (1970) obtiveram esporângios de *P. cinnamomi* em condições axénicas, transferindo micélio jovem para uma solução salina pobre em nutrientes (nitrato de cálcio 0,01M; nitrato de potássio 0,005M; sulfato de magnésio 0,004 M , num litro de água destilada a que adicionaram 1ml de Fe EDTA esterilizado por filtração Millipore). O micélio é lavado com a solução salina no momento da transferência, operação que é repetida, posteriormente, a intervalos regulares. Esta técnica baseia-se na alteração das condições nutritivas e no efeito que determinados cátions, em proporções específicas, exercem na esporulação de *P. cinnamomi*.

P. cambivora e *P. cinnamomi* são espécies morfológicamente muito próximas, facto que se pode confirmar pelo elevado número de caracteres comuns nas chaves de identificação. Na chave sinóptica de HO (1981), que avalia trinta caracteres, os que permitem distinguir estas duas espécies são: forma do esporângio, morfologia da superfície do oogónio, capacidade para produzir clamidósporos em cultura axénica, morfologia das hifas em meios gelosados, aparecimento de dilatações nas hifas, tamanho forma e disposição das dilatações das hifas, morfologia da colónia em meio gelosado de milho ("corn meal agar"), sensibilidade ao verde malaquita, produção de pigmentos em meio de caseína-tirosina hidrolisada.

A grande maioria dos caracteres diferenciadores está relacionada com a morfologia das hifas, devendo a observação ser realizada em determinadas condições. GREUTE (1961b) verificou que o micélio aéreo é igual nas duas espécies. Verificou ainda que se apresentava liso e uniforme e que só o micélio submerso permitiria diferenciar as espécies, uma vez que *P. cambivora* apresenta hifas lisas e uniformes e *P. cinnamomi* apresenta vesículas de forma e volume muito variáveis. Esta característica aparece unicamente em *P. cinnamomi* , sendo referido por WATERHOUSE *et al.* (1987) como "hifas com dilatações grandes, esféricas e botrióide". Estas dilatações diferenciam-se dos clamidósporos por não possuírem septo basal e parede celular interna contínua à volta da dilatação, mas por vezes é difícil separar estas duas estruturas. Estes caracteres morfológicos, facilmente observáveis na extremidade das colónias em crescimento activo, são indicadores de *P. cinnamomi*, dada a estabilidade desta característica nos diferentes meios de cultura.

Os critérios de separação destas duas espécies, não serão tão facilmente objectiváveis noutras características, como por exemplo na produção de pigmentos em meio de caseína-tirosina hidrolisada onde a diferenciação é feita com base na produção moderada ou ligeira de pigmentos por *P. cambivora* e *P. cinnamomi*, respectivamente. A mesma situação ocorre quanto à forma dos esporângios que em média são esféricos, ovóides ou obpiriformes com razão comprimento largura (c/l) 1,0-1,6 em *P. cambivora* e ovóides, elipsóides ou obpiriformes com razão c/l 1,6-1,9 em *P. cinnamomi*.

As dificuldades colocadas à obtenção de alguns caracteres morfológicos, a variabilidade desses mesmos caracteres e a diferenciação das espécies nem sempre se basear em critérios objectivos ou facilmente objectiváveis, fizeram com que a identificação das espécies do género *Phytophthora*, fosse, desde sempre, um processo demorado e realizado apenas por especialistas. Esta situação motivou e promoveu, em certa medida, o aparecimento de estudos no domínio da bioquímica, da genética e da serologia aplicados à taxonomia deste género, utilizando as novas técnicas que entretanto iam surgindo nestas áreas do conhecimento.

GALLEGLY (1987a) considera o estudo das proteínas por electroforese como um dos métodos mais promissores na classificação e identificação das espécies do género *Phytophthora*. Esta técnica, utilizada mais frequentemente na delimitação e confirmação da identificação das espécies, foi pela primeira vez usada por CLARE & ZENTMYER (1966). Estes investigadores verificaram que os padrões proteicos em gel de amido de *P. cinnamomi* Rands, *P. citrophthora* (Sm. & Sm) Leonian e *P. palmivora* (Butler) Butler, eram diferentes, tendo concluído que esta técnica poderia ser útil na delimitação específica das espécies do género *Phytophthora*. HALL *et al* (1969) confirmaram a validade desta técnica na delimitação das espécies deste género, baseados na uniformidade dos padrões proteicos obtidos no estudo de quarenta e três isolamentos, identificados por critérios morfológicos como *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, e *P. palmivora*. Os perfis proteicos obtidos em gel de acrilamida permitiam, com base nas bandas dominantes, diferenciar padrões proteicos de quatro tipos; *P. cinnamomi* e *P. cactorum* apresentaram, em cada espécie, um único padrão proteico, enquanto *P. palmivora* apresentou dois tipos quantitativamente diferentes mas qualitativamente semelhantes. Esta espécie, deixou de estar separada em tipos ou formas morfológicas, sendo considerada actualmente, com base em critérios morfológicos, como espécies diferentes – *P. megakarya*, e *P. capsici*. Neste mesmo estudo os padrões proteicos apresentaram ligeiras variações nas diferentes repetições, dado que nem todas as bandas ficavam igualmente bem reveladas nas diferentes corridas electroforéticas. Estes mesmos autores, baseados no facto de não terem obtido bandas comuns nas diferentes espécies estudadas, concluíram que o género *Phytophthora*, como unidade taxonómica, não se poderia identificar por electroforese, assim como não se poderiam relacionar bandas ou conjuntos de bandas com determinadas característica morfológicas. KAOSIRI & ZENTMYER (1980) utilizando electroforese em gel de acrilamida, obtiveram uma banda proteica de igual mobilidade electroforética (Rf 60) nas espécies *P. cinnamomi*, *P. capsici* e nas formas morfológicas - MF1, MF2, MF3, MF4 de *P. palmivora*. NWAGA *et al.* (1990) obtiveram também uma banda comum de reduzida mobilidade electroforética nas espécies *P. cryptogea*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma*, *P. nicotianae*, *P. capsici*, *P. megakarya*, *P. palmivora* e *P. citrophthora*.

A utilidade da electroforese de proteínas na delimitação específica do género *Phytophthora* foi confirmada por outros autores, como GIL & POWELL (1967), GIL & ZENTMYER (1978), CACCIOLA *et al.* (1990), ÇINAR *et al.* (1990), NWAGA *et al.* (1990), RICCI *et al.* (1990).

Os sistemas isoenzimáticos são também frequentemente estudados, tanto considerados isoladamente como em conjunto com os perfis proteicos, com o objectivo de caracterizar mais pormenorizadamente as espécies. HALL *et al.* (1969) obtiveram 3 tipos de padrões esterásicos em *P. cinnamomi*, um único padrão em *P. cactorum* e nove tipos em *P. palmivora*. Verificaram, ainda, que os isolamentos com perfis de esterases idênticos apresentavam perfis proteicos idênticos, não acontecendo o mesmo na situação inversa. CACCIOLA *et al.* (1990) concluíram que os zimogramas esterásicos revelavam diferenciação intraespecífica, permitindo identificar três tipos esterásicos em *P. cryptogea*. Este mesmo autor obteve padrões proteicos e enzimáticos (arilesterase e malato-desidrogenase) que permitem diferenciar *P. cryptogea* de *P. drechsleri*, espécies morfológicamente muito próximas.

NWAGA *et al.* (1990), concluíram que alguns sistemas enzimáticos são mais adequados do que outros para a caracterização das espécies em estudo, sendo necessário realizar um estudo prévio para os identificar.

O facto já anteriormente referido, das espécies *P. cinnamomi* e *P. cambivora* serem morfológicamente muito semelhantes e provocarem sintomatologia idêntica no castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.), torna premente a identificação precisa e rápida das espécies em causa, nomeadamente quando se pretende avaliar o inóculo potencial no solo, a agressividade do parasita, as interações hospedeiro parasita no processo infeccioso e a avaliação da resistência do hospedeiro.

Para a identificação dos isolamentos de *Phytophthora* o estudo conduzido baseou-se em critérios morfológicos e critérios bioquímicos. Avaliaram-se caracteres morfológicos diferenciadores relacionados com morfologia da colónia, das hifas e dos esporângios referidos na chave sinóptica de HO (1981) e STAMPS *et al.* (1990). Como critério bioquímico, compararam-se os perfis proteicos e enzimáticos (esterases) dos isolamentos em estudo usando como padrão, isolamentos classificados como *P. cinnamomi*, pelo Commonwealth Mycological Institute.

5.2 – Material e Métodos

5.2.1 – Isolamentos de *Phytophthora*

Os isolamentos em estudo, provêm quase todos de castanheiros jovens da região de Trás-os-Montes. A sua caracterização encontra-se descrita no Quadro 8. Os

isolamentos UTAD 79 e UTAD 80 foram identificados como *P. cinnamomi* pelo Commonwealth Mycological Institute, recebendo os códigos IMI 335 488 e IMI 335 492, respectivamente. Estes isolamentos serão utilizados como padrão de comparação nos estudos de eletroforese e como fonte de inóculo nos estudos de avaliação de resistência dos vários clones de castanheiro.

Quadro 8 – Caracterização sumária dos isolamentos de *Phytophthora*.

Código do isolamento	Local de origem das plantas	Ano de isolamento	Hospedeiro de que se isolou
UTAD 66/Col.	Alcobaça	1986	<i>C. sativa</i>
UTAD 79/Col.	Vila Real	1989	Marsol* (jovem)
UTAD 80/Col.	Vila Real	1989	<i>C. sativa</i>
UTAD 100/Col.	Mira	1991	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>
UTAD 180/Isol.	Bornes	1990	<i>C. sativa</i> (jovem)
UTAD 183/Isol.	Lamachã	1990	<i>C. sativa</i> (jovem)
UTAD 187/Isol.	Lamachã	1990	<i>C. sativa</i> (jovem)

* Híbrido *C. crenata* × *C. sativa*

5.2.2 – Caracteres morfológicos

5.2.2.1 – Morfologia da colónia em meio gelosado de milho (CMA)

Para se avaliar a morfologia e a taxa de crescimento da colónia transferiu-se, da extremidade de colónias em crescimento activo, um inóculo com 4 mm de diâmetro, para o centro de placas de Petri com 10 ml de meio gelosado de milho (Difco CMA, 19g/l) que se incubou a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. A taxa de crescimento foi determinada pela medição diária do crescimento radial da colónia durante dez dias, medições que foram realizadas segundo duas direcções ortogonais, previamente marcadas nas placas.

5.2.2.2 – Morfologia das hifas

Da extremidade de colónias com 3-4 dias de crescimento e de micélio submerso no meio gelosado de batata dextrosada (Difco PDA, 39g/l), efectuaram-se preparações microscópicas com lactofenol azul (cristais de fenol, 20g; ácido láctico, 20g; glicerina, 40g; solução azul algodão, 20 ml) ou lactofenol (a mesma solução sem a solução de azul algodão) quando se pretendeu observar a coloração natural das hifas e dilatações.

5.2.2.3 – Morfologia dos esporângios

Para a produção de esporângios seguiram-se os princípios gerais que CHEN & ZENTMYER (1970) estabeleceram: micélio em activo crescimento, redução nas condições nutricionais do meio e estímulo dos catiões Ca^{++} e Mg^{++} . O método utilizado assentou no indicado por TUIITE (1962) para a produção de esporângios no género *Phytophthora*, acrescido das condições que satisfizessem as permissas anteriormente referidas.

Da extremidade de colónias com 3 dias de crescimento em CMA (Corn Meal Agar, Difco 19 g/l) e incubadas a 25°C, retiraram-se inóculos de forma e tamanhos irregulares mas de pequena dimensão que seguidamente se transferiam para placas de Petri com 15 ml de meio líquido, constituído por:

- a) água destilada e esterilizada;
- b) solução de Petri esterilizada (0,4 g de nitrato de cálcio, 0,15 g de sulfato de magnésio, 0,15g de fosfato de potássio, 0,05 g de cloreto de potássio, 1 litro de água destilada);
- c) solução de solo autoclavado (100g de solo dissolvido num litro de água que se deixou decantar durante 24h e se filtrou por papel de filtro).

Quando da transferência do micélio, o inóculo foi abundantemente lavado com a solução para a qual ia ser transferido. Incubou-se a 25°C numa estufa que permitia condições de luminosidade durante o dia. Observou-se ao microscópio passados 3 e 8 dias.

5.2.3 – Observações microscópicas e medições micrométricas

As observações microscópicas foram realizadas num microscópio Leitz, Laborlux 12. As medições micrométricas efectuaram-se com ocular micrométrica contrastada com $\times 18$ e com objectiva $\times 40$. Nesta combinação, um espaço do micrómetro equivale a 2,65 μm .

O número de medições para avaliar cada carácter variou de 10-20, que segundo DE VRIES (1952) é suficiente quando o objectivo é identificar as espécies e não determinar a variabilidade desse carácter.

As fotomicrografias foram realizadas num microscópio Leitz, Laborlux 12 equipado com material fotográfico Wild Leitz (MPS 46, Photoautomat).

5.2.4 – Caracteres bioquímicos – electroforese de proteínas miceliais e sistemas enzimáticos

5.2.4.1 – Condições culturais dos fungos em estudo

Os isolamentos constantes do Quadro 8, foram transferidos da micoteca da UTAD, para placas de Petri com 10 ml de meio gelosado de batata dextrosada (PDA) (Difco PDA - 39g/l). Este inóculo foi colocado numa estufa a 25°C durante 3 dias. Retirou-se então, da extremidade da colónia, 3 discos com 3mm de diâmetro que foram transferidos assepticamente para balões de Erlenmyer com 150ml de meio líquido de extracto de malte (Extract Malt Broth, Difco 15g/l), incubou-se a 22°C às escuras e durante 15 dias.

5.2.4.2 – Extracção de proteínas miceliais totais

Para a extracção das proteínas miceliais adoptou-se a metodologia de GUEDES & RODRIGUES (1974) com algumas alterações.

O micélio foi separado do meio de cultura por filtração em funil de Buckner e papel Whatman nº 3, lavado com água destilada 2 a 3 vezes, seguido de uma lavagem com tampão acetato 0,05 M, pH 4,5.

Adicionou-se 10ml do tampão a cerca de 1g de micélio e triturou-se com ultraturax IKA, durante cerca de 1 minuto. O homogeneizado foi centrifugado a 12 500 rpm por uma hora. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante a noite, em câmara fria ($\pm 5^\circ$). A concentração foi realizada com carbowax (polietilenoglicol 6 000) até cerca de 1ml, seguida de nova centrifugação a 12 500 rpm, por 15 min.

O sobrenadante foi colocado e guardado em tubos Ependorf a 5°C.

5.2.4.3 – Electroforese de proteínas miceliais

A separação de proteínas foi realizada com 1 μ l do extracto micelial num aparelho PhastSystem da Pharmacia, por focagem isoeléctrica (IEF) em gel de acrilamida de gradiente pH 4,0 – 6,5. A coloração das proteínas foi feita com nitrato de prata no PhastSystem Development Apparatus Pharmacia.

5.2.4.4 – Sistemas enzimáticos

Para o estudo dos sistemas enzimáticos, as condições culturais do micélio e o processo de extracção das proteínas tiveram de ser modificadas, pois nas condições

anteriormente referidas não se detectou qualquer tipo de actividade enzimática das esterases, peroxidases, malato desidrogenase e fosfatases.

As condições culturais dos fungos mantiveram-se no essencial idênticas às descritas anteriormente. As diferenças situam-se no pH do meio, que foi ajustado inicialmente a pH 8 com NaOH, e no período de crescimento, que foi reduzido para 8 dias, dado que a actividade enzimática é mais acentuada em micélio jovem (HALL *et al.*, 1969). No processo de extracção das proteínas miceliais, a metodologia foi a anteriormente indicada, mas realizada com tampão Tris – HCl, 0,01M, pH 7, com 0,1% de mercapto – ethanol e 0,1g de polyclar/g de micélio, seguindo-se depois o mesmo processo.

O sistema enzimático estudado foi o das esterases. Foram separadas em gel de poliacrilamida por focagem isoeléctrica num aparelho PhastSystem, em gel de gradiente de pH 3-9 e revelado como o descrito por NAVE (1986), utilizando como substrato 1,5ml de acetato α -naftil a 1% e 0,5ml de acetato de β -naftil a 1% e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora.

A análise dos zimogramas, baseou-se na observação e comparação visual dos perfis dos diferentes isolamentos, obtidos no mesmo gel. Os perfis proteicos foram analisados com base no número e posição das bandas e comparados entre si pelo Índice de Similaridade (IS), que KAOSIRI & ZENTMYER (1980), usaram pela primeira vez para comparar espécies do género *Phytophthora* e o definiram como:

$$IS = \frac{\text{Número de bandas similares}}{\text{Número de bandas similares} + n^2 \text{ de bandas diferentes}}$$

Como é óbvio, valores próximos da unidade indicam maior grau de similaridade e permitem concluir da validade das comparações estabelecidas.

5.3 – Resultados

5.3.1 – Caracteres morfológicos

5.3.1.1 – Morfologia e crescimento radial da colónia

Todos os isolamentos em estudo apresentaram em meio gelosado de batata dextrosada e em meio gelosado de milho (PDA Difco, 39g/l; CMA Difco, 17g/l), crescimento submerso e aéreo com colónias de aspecto petaloide com excepção do isolamento UTAD 80 que apresentou colónia tipo estrela. A aparência da colónia nos meios anteriormente referidos diferencia *P. cinnamomi* de *P. cambivora*, uma vez que nesta última as colónias não têm aquele tipo específico de crescimento. Esta característica

apresentou-se mais evidente quando a temperatura de incubação se situou na gama dos 22°C. A temperaturas mais elevadas as colónias têm um crescimento mais rápido, praticamente sem micélio aéreo e com morfologia de crescimento menos evidente.

O crescimento radial de colónia, não sendo um carácter taxonómico diferenciador, foi avaliado com o objectivo de melhor se caracterizarem os diferentes isolamentos. O resultado da análise de variância referente ao crescimento radial da colónia ao fim de 10 dias de incubação, tendo-se utilizado 4 repetições por isolamento, revela diferenças altamente significativas no crescimento dos diferentes isolamentos (Quadro 9).

Quadro 9 – Análise da variância dos valores referentes ao crescimento radial da colónia ao fim de 10 dias de incubação dos diferentes isolamentos de *Phytophthora* (4 repetições).

Origem da variação	GL	SQ	QM	F	p
Isolamentos	6	92,316	15,386	30,331	0,000
Erro	20	10,247	0,512		

Os valores médios do crescimento dos 8 isolamentos de *Phytophthora* ficam separados, com base nos critérios de TUKEY, como o indicado no Quadro 10.

Quadro 10 – Crescimento radial médio das colónias dos diferentes isolamentos de *Phytophthora* após 10 dias de incubação a 22–23°C.

Isolamento	UTAD 66	UTAD 79	UTAD 100	UTAD 187	UTAD 183	UTAD 80	UTAD 180
Crescimento radial da colónia (cm)	10,688A*	9,288 A	9,850 A	6,788 B	6,667 B	6,375 B	5,688 B

TUKEY, nível de significância ($\alpha = 5\%$)

* Valores médios com letras em comum não são significativamente diferentes.

5.3.1.2 – Morfologia das hifas

Todos os isolamentos evidenciaram hifas com dilatações típicas de *P. cinnamomi*, Fig. 8 (A, B e C) como o indicado por GREUTE (1961b), FERNANDES (1966), NEWHOOK *et al.* (1978) e WATERHOUSE *et al.* (1987), que consideram estas dilatações como uma característica estável a avaliar nesta espécie. Alguns isolamentos em estudo apresentaram dilatações em menor número, como no caso do UTAD 66 e UTAD 180. Estas dilatações aparecem como protuberâncias esféricas e sésseis nas hifas jovens, podendo ser terminais ou laterais e surgirem isoladas ou em grupo (Fig. 8, B e C).

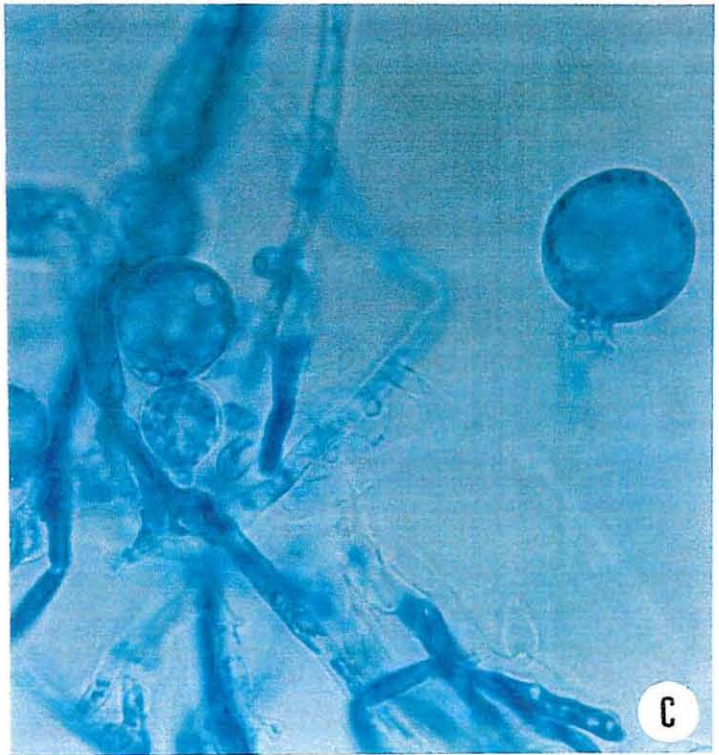
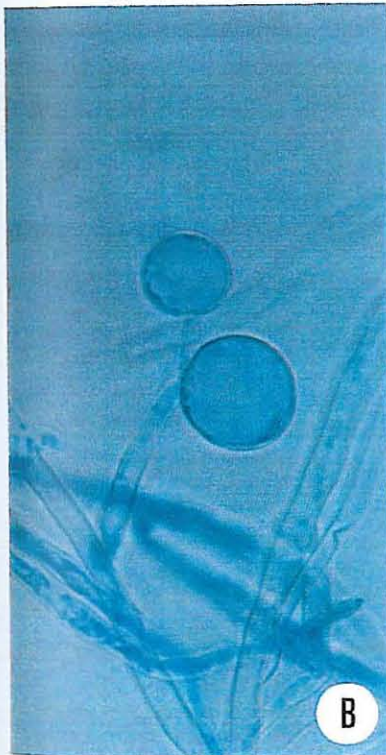
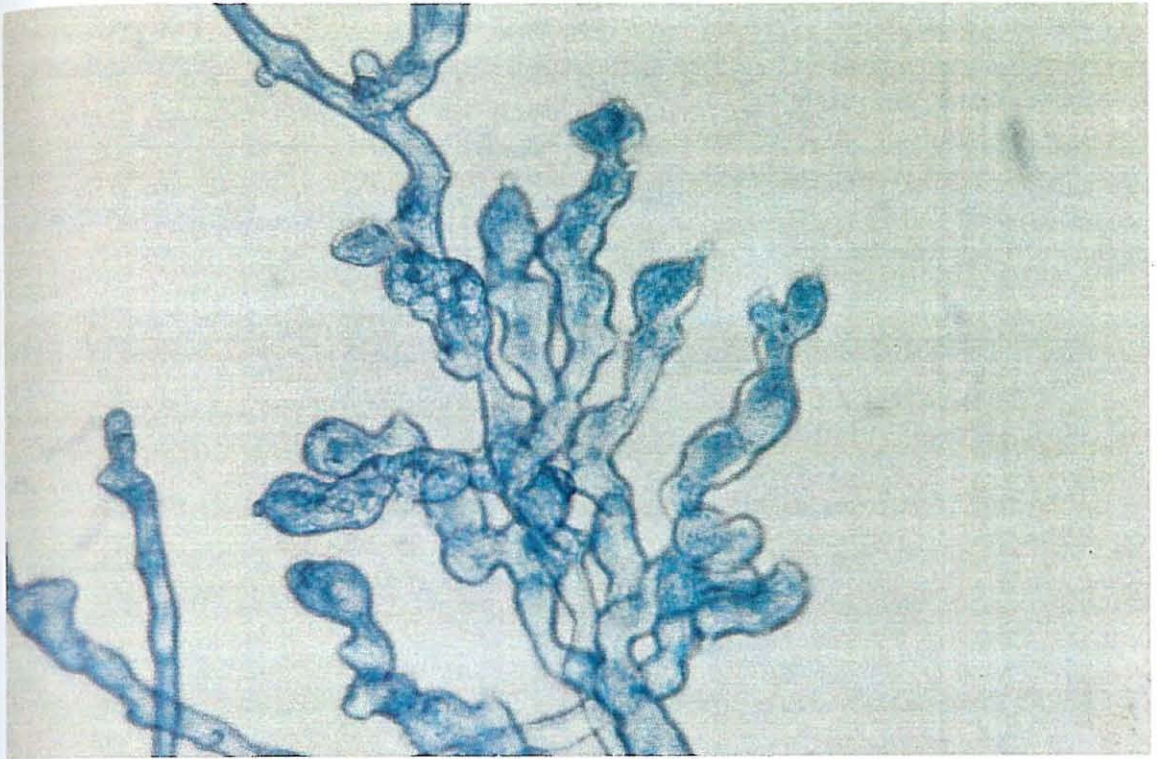


Fig. 8 – Aspecto característico das hifas de *Phytothphora cinnamomi*. A – Hifas de aspecto irregular e verrucosas ($\times 400$). B – Dilatações terminais isoladas em hifas lisas e uniformes da parte aérea da colónia ($\times 400$). C – Dilatações terminais das hifas dispostas em grupo ($\times 400$). As dilatações das hifas são semelhantes aos clamidósporos, diferenciando-se destes por não apresentarem septos que os separam das hifas e parede interna contínua.

As dilatações das hifas adquirem um aspecto botrióide quando o micélio atinge a maturidade.

As hifas que se desenvolvem na parte aérea da colónia são lisas e uniformes quando jovens, podendo desenvolver dilatações esféricas isoladas semelhantes à do micélio submerso, quando atingem maior maturidade.

A separação entre micélio de *P. cinnamomi* e de *P. cambivora* só pode ser determinado em micélio jovem e submerso, uma vez que colónias mais velhas de *P. cambivora* podem apresentar também dilatações nas hifas de forma esférica ou ovóide dispostas em grupo ou isoladamente, tornando mais subjectiva a avaliação deste carácter (GRENTE, 1961b).

As dilatações das hifas em determinadas condições são muito semelhantes aos clamidósporos, diferenciando-se destes por não apresentarem parede interna contínua e septos que os separam das hifas (Fig. 8 C).

A forma, dimensão e disposição das dilatações nas hifas é considerado carácter taxonómico a avaliar na chave sinóptica de HO (1981). Este autor não especifica a etapa de desenvolvimento para realizar as observações, mas atribuiu-lhe um factor de ponderação 2, o que significa que é um carácter com estabilidade acentuada.

5.3.1.3 - Esporângios

Todos os isolamentos, com excepção do UTAD 187, produziram esporângios (Fig. 9, A, B e C) em solução de Petri esterilizada, sendo todos não caducos e não papilados com as seguintes características biométricas.

Quadro 11 - Características biométricas médias dos esporângios.

Isolamento	Comp (c) \pm sd (μ m)	Larg (l) \pm sd (μ m)	c/l
UTAD 79/Col.	54,75 \pm 7,99	35,77 \pm 2,93	1.5
UTAD 80/Col.	38,42 \pm 3,33	22,08 \pm 3,30	1.7
UTAD 66/Col.	40,41 \pm 7,92	28,40 \pm 5,08	1.4
UTAD187/Isol.	-	-	-
UTAD183/Isol.	43,51 \pm 7,06	31,80 \pm 2,83	1.4
UTAD180/Isol.	35,51 \pm 7,42	24,38 \pm 5,13	1.5
UTAD100/Col.	42,4 \pm 2,16	31,13 \pm 1,14	1.4

- sem produção de esporângios

sd desvio padrão da média

No Isolamento UTAD80 (IMI 335 492) observaram-se inicialmente clamidósporos, mas na observação realizada aos 8 dias estavam presentes esporângios, embora todos de reduzidas dimensões. Nos outros isolamentos observou-se

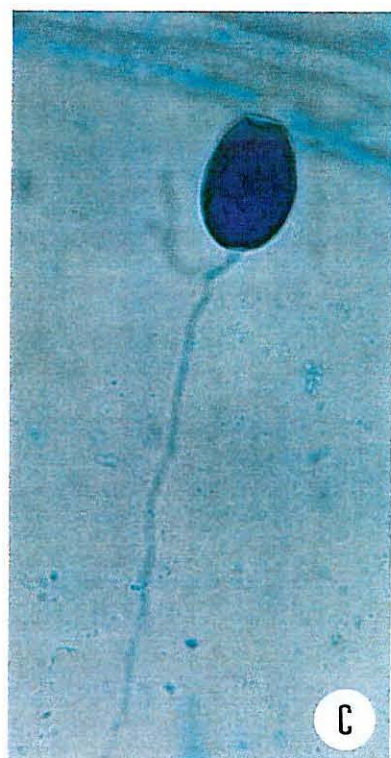
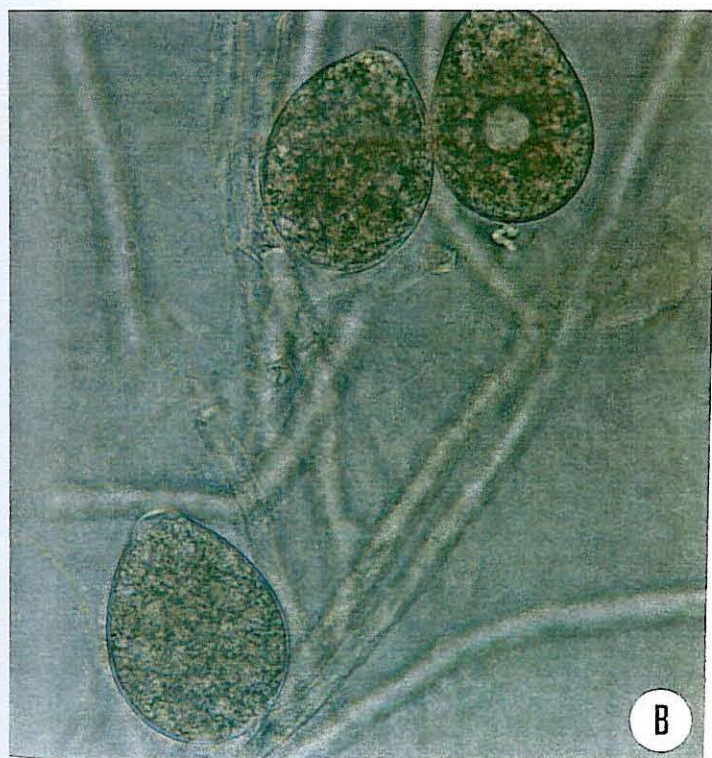
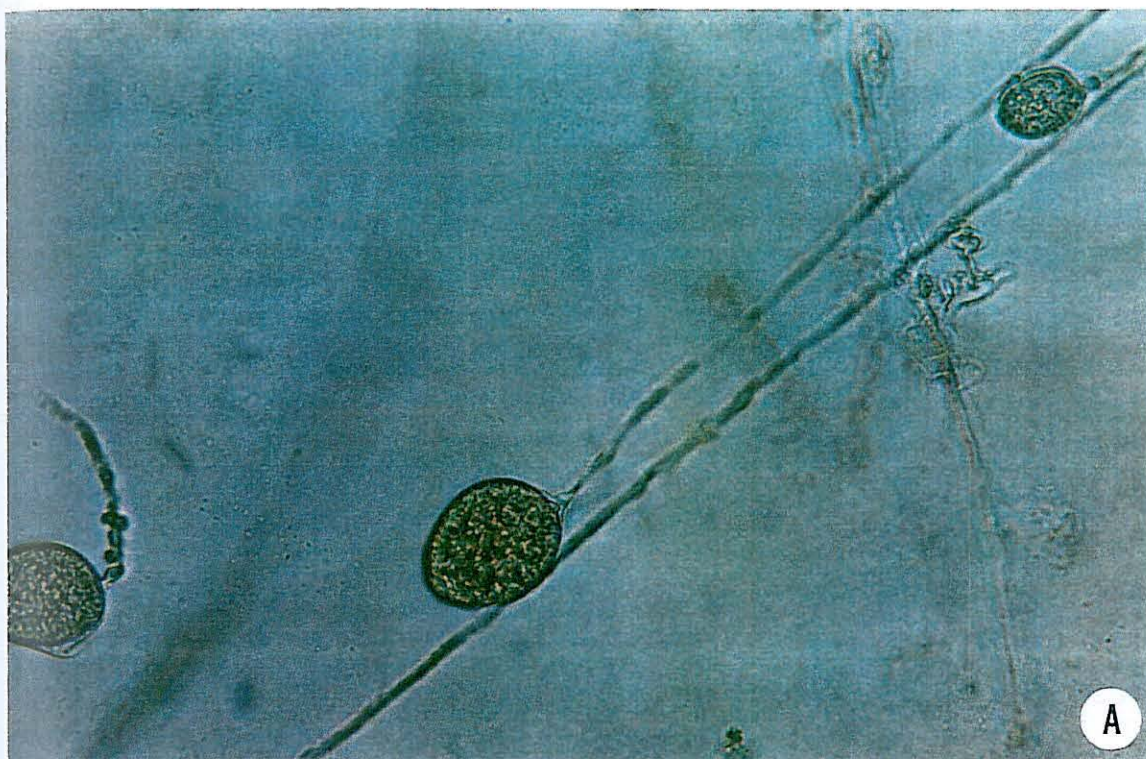


Fig. 9 – Esporângios de *Phytothphora cinnamomi* obtidos em solução de Petri. A e B – Esporângios ovóides, não papilados e não caducos de *Phytothphora cinnamomi* ($\times 400$). B – Esporângio de *Phytothphora cinnamomi* corado com lactofenol azul ($\times 400$).

frequentemente a germinação directa dos esporângios, germinação por hifas germinativas, e por vezes o fenómeno da proliferação interna. HO (1981) atribui grande importância taxonómica a esta característica, tendo-lhe atribuído factor de ponderação 3.

Em água destilada e estéril não se obteve qualquer tipo de estrutura de resistência ou de propagação e em solução de solo estéril verificou-se a formação de clamidósporos que posteriormente germinaram por elevado número de hifas germinativas (Fig. 3 C).

Como foi já repetidamente referido, a morfologia dos esporângios, nomeadamente o espessamento da papila apical, o tipo de caducidade e o comprimento do pedicelo, são os caracteres primariamente avaliados para identificar o grupo a que pertence o isolamento de *Phytophthora* em estudo. Na chave sinóptica de HO (1981) todos os caracteres relacionados com os esporângios têm um factor de ponderação 3, factor atribuído apenas aos caracteres de grande estabilidade, com excepção dos que se relacionam com a forma e dimensão desta estrutura assexual de reprodução que são ponderados com factor 1 (carácter variável e pouco estável).

Constata-se ainda que nenhuma das características relacionadas com os esporângios é diferenciadora destas duas espécies, com excepção, e só em determinada medida, da que se relaciona com a forma do esporângio, que pode ser esférico, ovóide, ou obpiriforme, com razão comprimento/largura 1,0-1,6 em *P. cambivora* e ser ovóide, ou obpiriforme com razão comprimento/largura 1,6-1,9 em *P. cinnamomi*. O facto de apresentarem formas e razão c/l sobreponíveis, atesta bem a variabilidade deste carácter e o seu reduzido valor na diferenciação destas espécies do grupo VI da classificação de WATERHOUSE (1963), NEWHOOK *et al.* (1978) e STAMPS *et al.* (1990).

Pode-se, então, referir que todos os isolamentos de *Phytophthora* estão de acordo com a descrição de WATERHOUSE & WATERTSON (1966) para *P. cinnamomi*.

5.3.2 – Caracteres bioquímicos

5.3.2.1 – Perfis proteicos e enzimáticos

Os resultados, da separação das proteínas miceliais em gel de acrilamida de gradiente pH 4,0 – 6,5 por focagem isoeléctrica (IEF) dos seis isolamentos de *Phytophthora*, encontram-se representados diagramaticamente na Fig. 10. A representação diagramática baseou-se na ampliação fotográfica do gel, Anexo II, e na sua observação visual.

A uniformidade dos perfis é elevada, aparecendo, no entanto, algumas diferenças que se relacionam com a ausência de algumas bandas e o aparecimento de bandas menos nítidas devido à sua pequena dimensão e densidade óptica. As bandas que apresentam diferenças estão assinaladas no diagrama com letras minúsculas: a) bandas de

menor dimensão e densidade óptica, b) bandas não comuns a todos os isolamentos. O perfil do isolamento UTAD 100 não foi considerado nesta análise porque as bandas proteicas ficaram mal reveladas na maior parte do perfil o que tornou inviável a sua observação e identificação.

O número de bandas principais, bandas com dimensão e intensidade óptica facilmente observáveis, variou de 22 a 24 e o de bandas menores, bandas de reduzida dimensão e fraca intensidade óptica, variou de 4 a 6. A análise dos perfis baseou-se no cálculo do Índice de Similaridade (IS) de KAOSIRI & ZENTMYER (1980), que avalia a posição das bandas proteicas sem incluir a dimensão e densidade óptica das bandas.

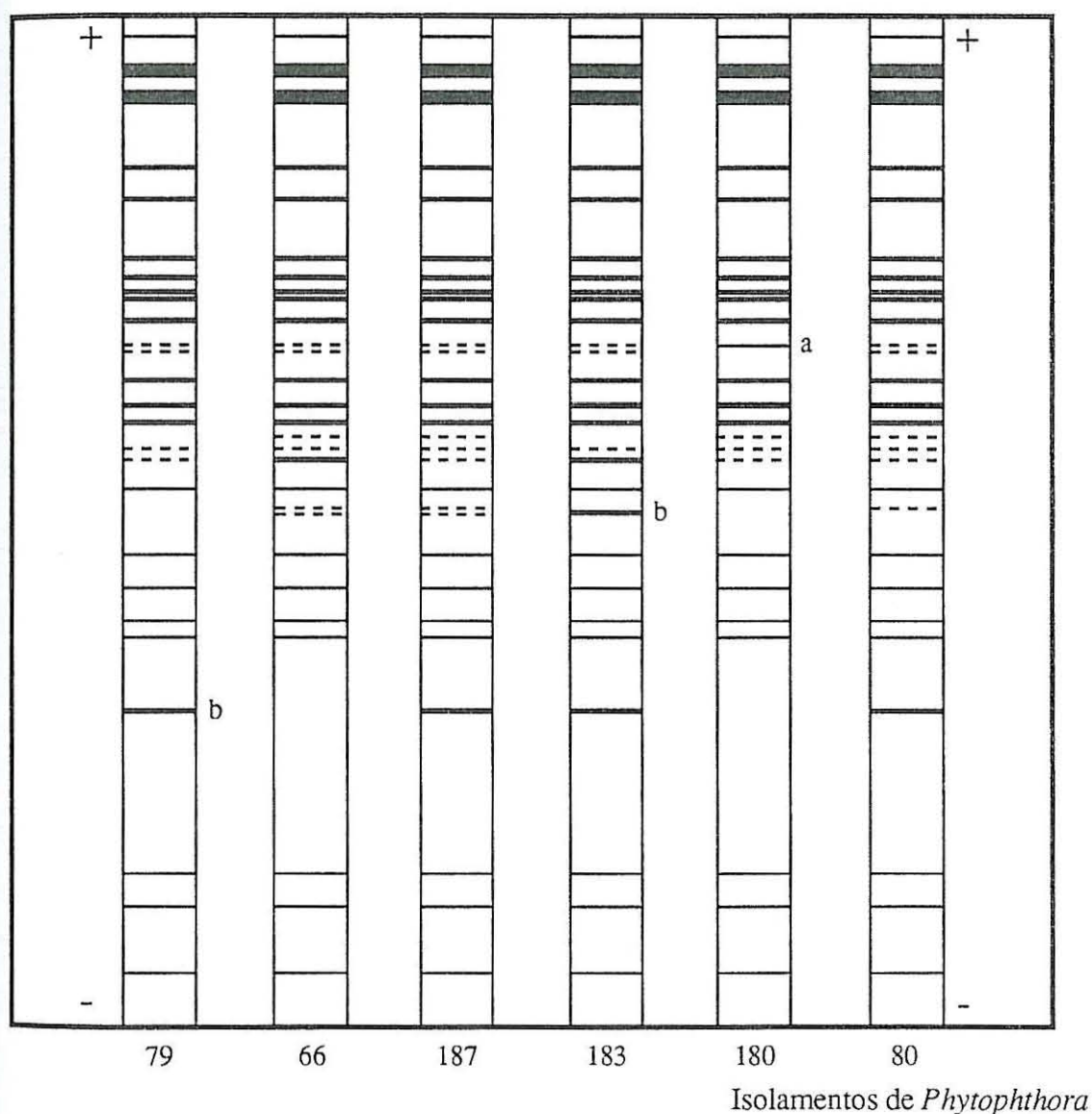


Fig. 10 – Espectro de proteínas totais obtidas em gel de acrilamida com gradiente de Focagem Isoelétrica 4,0-6,5.

a – bandas de menor dimensão e densidade óptica.

b – bandas não comuns a todos os isolamentos de *Phytophthora*.

Os valores do Índice de Similaridade dos isolamentos em estudo estão indicados no Quadro 12, para as bandas principais e no Quadro 13 para a totalidade das bandas.

Da análise dos Quadros 12 e 13 verifica-se que o Índice de Similaridade variou entre 0,84 e 1,00, quando se consideraram apenas as bandas principais e entre 0,81 e 0,97 quando se consideraram todas as bandas. Aplicando-se a estes valores o critério de KAOSIRI & ZENTMYER (1980), NWAGA *et al.*, (1990), RICCI *et al.*, 1990), que consideram valores superiores a 0,60 como similaridade elevada, verifica-se que a uniformidade dos perfis proteicos dos isolamentos em estudo é elevada e pode-se concluir que todos os isolamentos pertencerão à mesma espécie, *P. cinnamomi*.

Quadro 12 – Valores do Índice de Similaridade (bandas principais).

Isolamento nº	Índice de Similaridade					
	UTAD 79	UTAD 80	UTAD 66	UTAD 187	UTAD 183	UTAD 180
UTAD 79	-	1,00	0,96	1,00	0,91	0,91
UTAD 80		-	0,91	1,00	0,92	0,91
UTAD 66			-	0,91	0,92	0,91
UTAD 187				-	0,93	0,91
UTAD 183					-	0,84
UTAD 180						-

Quadro 13 – Valores do Índice de Similaridade (totalidade das bandas).

Isolamento nº	Índice de Similaridade					
	UTAD 79	UTAD 80	UTAD 66	UTAD 187	UTAD 183	UTAD 180
UTAD 79	-	0,87	0,81	0,84	0,90	0,83
UTAD 80		-	0,93	0,97	0,96	0,89
UTAD 66			-	0,97	0,90	0,89
UTAD 187				-	0,93	0,86
UTAD 183					-	0,86
UTAD 180						-

Os zimogramas das esterases, diagramaticamente representados na Fig. 11, iguais em todos os isolamentos em estudo, apresentaram 4 enzimas; uma banda mais intensa com ponto isoeléctrico (pI) 5,3 e três bandas de reduzida dimensão e intensidade óptica com pI, 8,35, 8,5, e 8,6, respectivamente.

HALL *et al.*, (1969) obtiveram três tipos de perfis de esterases em *P. cinnamomi* num total de quinze isolamentos, o que segundo ÇINAR (1990) significa que existem diferenças genéticas entre os isolamentos, o que tornaria os zimogramas destas enzimas mais indicados na identificação ao nível da subespécie.

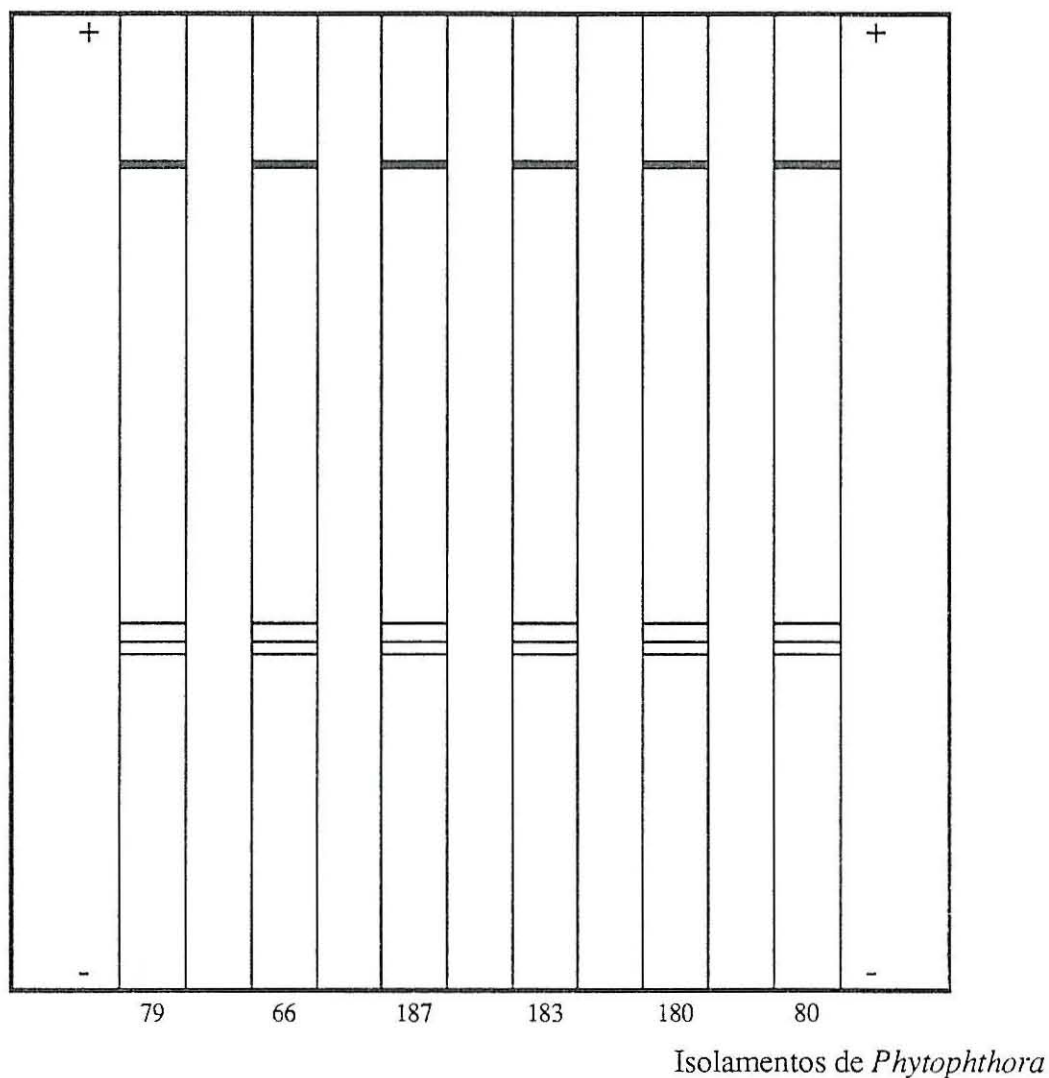


Fig. 11 – Espectro de esterase em gel de acrilamida com gradiente de Focagem Isoelétrica 3,0-9,0.

No presente estudo, os zimogramas esterásicos iguais em todos os isolamentos confirmam a grande uniformidade dos perfis das proteínas miceliais e apoiam a conclusão de que todos os isolamentos pertencerão à mesma espécie, *P. cinnamomi*.

5.4 – Discussão

A identificação das espécies de *Phytophthora* deve assentar, segundo WATERHOUSE *et al.* (1987), em caracteres facilmente reconhecidos e observáveis, mesmo que esses caracteres tenham um significado biológico menos evidente que outros,

de obtenção mais complexa, mas nem sempre possíveis de executar, como por exemplo, a determinação do número de cromossomas e de estudos bioquímicos. ZENTMYER (1980), considera *P. cinnamomi* uma espécie com características morfológicas estáveis e por isso facilmente identificada, mas como já se referiu é também morfológicamente muito próxima de *P. cambivora* baseando-se a diferenciação destas espécies em critérios não facilmente objectiváveis o que torna por vezes subjectiva a separação destas duas espécies do Grupo VI das chaves de WATERHOUSE (1963), NEWHOOK *et al.* (1978) e STAMPS *et al.* (1990).

A avaliação dos caracteres morfológicos relacionados com as hifas, que na chave de HO (1981) contribuem com quase 50% dos caracteres diferenciadores destas duas espécies, faz-se em colónias plenamente desenvolvidas, estabelecendo-se a diferenciação das duas espécies com base na disposição das dilatações, que serão botrióides ou simples em *P. cinnamomi* e serão catenuladas ou simples em *P. cambivora*. Este critério parece mais subjectivo do que o estabelecido por GREENTE (1961b) que limitando a observação ao micélio jovem, baseou a diferenciação destas duas espécies na presença ou não das dilatações das hifas.

Os esporângios, estrutura morfológica essencial na identificação dos isolamentos ao nível de grupo, não apresenta diferenças significativas e estáveis que permitam separar estas duas espécies, uma vez que todas as características são iguais, com excepção das que se relacionam com a forma e dimensão, embora aparecendo nas chaves valores que se sobrepõem e ponderados por HO (1981) com factor 1, que atesta bem a reduzida estabilidade deste carácter. As dimensões dos esporângios dos isolamentos em estudo situaram-se abaixo dos indicados pela maioria dos autores, mas incluídos na gama de variação apresentada por FERNANDES (1966), que obteve esporângios que variaram entre $38-84 \times 26-48 \mu\text{m}$. A razão comprimento/largura (c/l) dos esporângios, dos isolamentos em estudo, que em certa medida reflecte a forma desta estrutura de reprodução assexuada, apresentou valores que pela chave de HO (1981) corresponderiam a *P. cambivora* (1,0-1,6). Da bibliografia consultada verificou-se ser muito variável esta relação (c/l) em *P. cinnamomi*; HO & ZENTMYER (1977a), por exemplo, encontraram valores que variaram de 1,3 a 2,6 em esporângios produzidos por apenas dois isolamentos de *P. cinnamomi*. WATERHOUSE *et al.* (1987), considera mesmo o conhecimento da gama de variação de determinado carácter mais importante do que o seu valor médio, o que evidencia a falta de robustez dos caracteres taxonómicos que avaliam a dimensão e forma das estruturas morfológicas no género *Phytophthora*. Outro factor importante, a considerar na avaliação da forma e dimensão das estruturas morfológicas, é a uniformização dos meios e condições culturais para obtenção das diferentes estruturas. Este objectivo foi formulado pela primeira vez por ROSENBAUM em 1917 (WATERHOUSE *et al.*, 1987), considerando este último autor que, este objectivo continua actual, sendo

necessário fazer um esforço no sentido da uniformização, apesar das dificuldades que advém das espécies apresentarem exigências diferentes de umas para as outras.

A variabilidade fenotípica fortemente influenciada pelas condições ambientais e culturais dos isolamentos, fez com que muito cedo se estudassem caracteres taxonómicos menos dependentes das condições ambientais, como por exemplo a electroforese das proteínas miceliais e de enzimas. HALL *et al.* (1969) consideraram que este método reflectia relações genotípicas, embora não directamente relacionadas com os caracteres morfológicos usados na classificação do género *Phytophthora*. Os resultados de electroforese de proteínas miceliais por focagem isoeléctrica (IEF) em gel de gradiente 4,0-6,5 anteriormente apresentados, permitem-nos concluir que a uniformidade dos perfis proteicos em *P. cinnamomi* é elevada e que esta técnica permite identificar esta espécie do género *Phytophthora*, resultados que CLARE & ZENTMYER (1966), GILL & POWELL (1967), HALL *et al.* (1969), KAOSIRI & ZENTMYER (1980), ÇINAR *et al.* (1990), NWAGA *et al.* (1990), também obtiveram e apoiam teoricamente esta nossa conclusão.

A comparação dos resultados dos diferentes estudos de electroforese, que muito contribuíram para o conhecimento de variabilidade proteica das espécies de *Phytophthora*, não é possível, dado serem diferentes as condições de extracção de proteínas e de electroforese, o que limita o alcance do método na taxonomia deste género. GALLEGLY (1987a) considera como estudo ideal a realizar nesta área do conhecimento, aquele que incluísse todas espécies e fosse realizado num único laboratório e nas mesmas condições experimentais.

Até agora, e na falta de um estudo como o proposto por GALLEGLY (1987a), a electroforese de proteínas e isoenzimas tem sido mais frequentemente utilizadas na delimitação específica e como um critério bioquímico estável na identificação de espécies do género *Phytophthora*, dada a uniformidade dos perfis proteicos das espécies, obtidos por todos os investigadores que aplicaram esta técnica. Existem no entanto algumas excepções a esta uniformidade de resultados, nomeadamente em *P. citricola* onde os perfis proteicos apresentaram alguma variabilidade (BIELENIN *et al.*, 1988) e em *P. megasperma*, onde essa variabilidade é também referenciada. NWAGA *et al.* (1990) e KAOSIRI & ZENTMYER (1980) questionam mesmo as comparações por eles realizadas com base no Índice de Similaridade (IS), uma vez que este método apenas avalia a posição das bandas e não a sua densidade, concluindo que os resultados obtidos poderiam ser diferentes se esse factor entrasse em consideração. Outra questão que estes autores levantam é a de que apenas uma parte das proteínas totais é analisada, o que poderá limitar também a sensibilidade das comparações com base na electroforese.

Neste estudo os zimogramas das esterases, iguais em todos os isolamentos, evidenciaram 4 isoenzimas, valor que é inferior ao encontrado por HALL *et al.* (1969) que

encontrou 5 isoenzimas e inferior às 9 isoenzimas obtidas por NWAGA *et al.* (1990), mas superior ao encontrado por KAOSIRI & ZENTMYER (1980) que obtiveram 3 isoenzimas. Estes valores não têm por si só, qualquer significado, a não ser, o de evidenciar a necessidade da uniformização dos métodos para avaliação de caracteres bioquímicos com carácter taxonómico. Verifica-se ainda que nas nossas condições de estudo os zimogramas surgiram mais intensos nos isolamentos que revelaram menor crescimento radial, possivelmente devido à maior quantidade de micélio jovem, condição considerada indispensável para a detecção e resolução de actividade enzimática em *Phytophthora*.

Os perfis proteicos revelaram uniformidade acentuada, surgindo, no entanto, algumas diferenças, nomeadamente no aparecimento de bandas muito próximas mas de menor dimensão e intensidade ou mesmo na existência de bandas “menores” não comuns a todos os isolamentos. O facto de se ter utilizado um método electroforético, Focagem Isoeléctrica (IEF), em aparelho PhastSystem, que possibilita a separação de proteínas que diferem apenas ligeiramente na composição dos aminoácidos e a técnica de coloração com nitrato de prata, detectar bandas proteicas com menos de 50ng/μl, torna este método muito preciso. Possui ainda a vantagem de se obterem valores que podem ser comparados com outros laboratórios devido a automatização de grande parte dos procedimentos. Por estas razões poderá ser um dos métodos electroforéticos de eleição em estudos taxonómicos do género *Phytophthora*, permitindo, futuramente, por comparação dos perfis proteicos, uma rápida e fácil identificação das espécies em estudo.

VI – AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CASTANHEIRO À *Phytophthora cinnamomi*

6.1 – Introdução

As técnicas de melhoramento, utilizadas para obter plantas resistentes às doenças, são, no essencial, idênticas às utilizadas para as características hereditariamente transmitidas. No entanto, para avaliar a resistência é necessário desenvolver metodologias específicas que evidenciem a interacção que se estabelece entre o parasita e o hospedeiro.

A metodologia da avaliação da resistência nas espécies de *Phytophthora* que atacam as raízes e todo o seu ciclo de vida se processa no solo, assim como nos outros agentes patogénicos, assenta no conhecimento do processo de patogénese e nas características biológicas dos seus hospedeiros. Têm, como principal objectivo, obter infecções em condições ambientais que possam ser facilmente reproduzidas noutros estudos e permitam diferenciar a reacção dos diferentes genótipos.

Resultados válidos podem ser obtidos por vários processos. A inoculação do solo ou de substratos, onde se desenvolve o hospedeiro, é uma metodologia frequentemente utilizada nestas situações. Este processo apresenta como principal vantagem, o facto de avaliar as infecções nos órgãos que em condições naturais são infectados pelo fungo. Como desvantagens, aparecem frequentemente referidas, a necessidade da disponibilidade de grandes espaços por períodos de tempo longos e de exigir condições precisas dos factores ambientais que influenciam o processo de infecção. A humidade do solo, por exemplo, tem que ser mantida a um nível adequado para que o processo de infecção ocorra de maneira uniforme, podendo ser dificilmente mantida a níveis idênticos nos diferentes ensaios e variar ainda com os substratos utilizados (IRWIN *et al.*, 1980).

A avaliação da infecção será mais rigorosa se a inoculação das raízes for realizada com quantidades definidas de inóculo. Este objectivo é atingido em algumas interacções hospedeiro/parasita pelo método designado “tank test” de ZENTMYER & MIRCETICH (1965). Consiste sumariamente, em mergulhar as raízes do hospedeiro, durante um determinado período de tempo, numa suspensão de zoósporos.

Esta metodologia é utilizada frequentemente nas interacções em que as espécies de *Phytophthora* facilmente produzem zoósporos em condições laboratoriais e a infecção ocorre, em condições naturais, nas raízes jovens.

Para que a inoculação das raízes ocorra de forma uniforme e permita diferenciar os genótipos é necessário que a concentração de zoósporos na suspensão seja ajustada a

níveis adequados, previamente determinados por ensaios preliminares e as plantas sejam transferidas para substratos esterilizados que não interfiram com o desenvolvimento do inóculo. Este processo de inoculação é de utilização relativamente recente nas interações hospedeiro/*P. cinnamomi*, facto directamente associado com a dificuldade em obter zoósporos em quantidade e de forma sistemática, processo que apenas foi estabelecido por BYRT & GRANT (1979).

FRAEDRICH *et al.* (1989), avaliaram por este processo a resistência de *Pinus taeda* L. e *P. echinata* Mill. a *P. cinnamomi*, tendo determinado como concentrações adequadas de zoósporos, as que situavam entre $2,4 \times 10$ a $2,4 \times 10^3$. Para concentrações inferiores de zoósporos, as raízes não ficavam infectadas e para concentrações superiores ficavam todas uniformemente infectadas.

A relação entre quantidade de inóculo e infecção, foi verificada noutras interações, nomeadamente *P. megasperma* var. *soja/soja*, tendo EYE *et al.* (1978) verificado que para elevadas concentrações, todas as cultivares de soja ficavam infectadas e a resistência não se evidenciava.

Este processo é frequentemente utilizado para testar plantas jovens, exigindo condições de obtenção de plantas que evitem as infecções das raízes, para se ter a garantia que o hospedeiro se encontra são.

Em castanheiro esta metodologia não aparece referida na bibliografia, sendo no entanto frequente a utilização do método da infecção das raízes por processos naturais, ou seja pela utilização de solo de souto naturalmente infectado ou mesmo pela inoculação com micélio/clamidósporos de solo condutivo para a doença. Esta metodologia conduz a resultados muito variáveis, sendo necessário confirmar os resultados utilizando outros processos de inoculação (GRAHAM, 1990).

Em castanheiro, *P. cinnamomi* provoca sintomatologia evidente nas raízes e no colo da planta, facto que determinou a utilização mais frequente de outro tipo de inoculação e avaliação da resistência. FERNANDES (1953), avaliava a resistência de *Castanea sativa* Mill. inoculando micélio dos parasitas responsáveis pela doença na zona cambial do colo da planta, fazendo para isso uma incisão em T, na qual colocava o inóculo. As plantas eram inoculadas com *P. cinnamomi* quando tinham um ano de idade e no ano seguinte com *P. cambivora*, ou vice versa. Eram consideradas plantas resistentes as que não manifestavam sintomas de infecção, depois de terem sido sujeitas às duas inoculações sucessivas.

Para obter resultados adequados, FERNANDES (1953) entendia ser necessário um período de 3 anos (e por vezes 4 anos) e trabalhar com elevado número de plantas envasadas para conseguir obter plantas resistentes. O mesmo autor para tornar o processo mais eficiente, introduziu algumas modificações na sua metodologia a partir de 1960, passando a inocular as plantas com uma mistura de estirpes das duas espécies

identificadas no país, processo que era repetido durante três anos (FERNANDES, 1966). Com esta metodologia e porque as plantas eram produzidas em viveiro, era possível testar maior número de plantas e obter resistência mais estável em condições naturais. Esta metodologia de avaliação da resistência, inoculação por ferida em tecidos de crescimento secundário, só recentemente foi utilizada em eucalipto, espécie onde *P. cinnamomi* provoca doença com carácter epidémico, mas até há pouco tempo considerava-se que os ataques do fungo se limitavam às raízes mais finas. TIPPETT *et al.* (1985) referem que esta perspectiva se modificou, quando em 1981 vários autores verificaram que *P. cinnamomi*, além de invadir as raízes jovens também invadia os tecidos do floema das raízes mais grossas, e podia mesmo progredir nesses tecidos até à zona do colo da planta. Estes mesmos autores consideram ainda que os ensaios em vaso reflectem a susceptibilidade das plantas jovens à infecção provocada por *P. cinnamomi* e que as inoculações nos tecidos de crescimento secundário são metodologias adequadas para avaliar a resistência de plantas adultas de eucalipto. Concluíram que a inoculação dos ramos, em planta intacta, é uma metodologia a utilizar nos estudos de resistência, uma vez que este método evidencia claramente as diferenças entre os vários níveis de resistência.

IRWIN *et al.* (1980) compararam as metodologias de inoculação do substrato com micélio com a inoculação por ferida no caule, na interacção luzerna/*P. megasperma* Drechs. f sp. *medicaginis*. Verificaram que o método da inoculação por ferida no caule, evidenciava o mesmo comportamento manifestado pelas raízes quando se inoculava o substrato. Concluíram que as reacções no caule seriam controladas pelo mesmo sistema genético, razão pela qual o método de inoculação do caule conduzia aos mesmos resultados.

O método da inoculação por ferida, inicialmente realizado em plantas intactas, foi posteriormente testado em órgãos vegetais destacados, nomeadamente em raízes e ramos. JEFFERS *et al.* (1982) utilizaram este método para avaliar a patogenicidade dos diferentes isolamentos de *Phytophthora* obtidos de macieiras doentes.

A constatação da existência de elevada correlação entre os resultados obtidos por inoculação de ramos destacados e os obtidos com a inoculação por zoósporos, inoculação do solo com micélio ou ainda com a inoculação de ramos em planta intacta, determinou a sua utilização em muitas interacções hospedeiro/*Phytophthora*: nomeadamente, *Banksia grandis* /*P. cinnamomi* (DIXON *et al.*, 1984), *Eucalyptus* ssp./*P. cinnamomi* (TIPPETT *et al.* 1985, SHEARER *et al.* 1987), abacateiro/*P. cinnamomi* (DOLAN & COFFEY, 1986), *Chamaecyparis lawsoniana*/*P. lateralis* (HANSEN *et al.* 1989), macieira/*P. cactorum* (LEMOINE & GAUDIN, 1991).

TIPPETT *et al.* (1985), consideram que por este processo não se poderá avaliar a resistência que se expressa algum tempo depois da inoculação. Avalia, no entanto, a

resistência constitutiva, razão pela qual permite avaliar a agressividade dos isolamentos e a resistência dos hospedeiros.

O método da inoculação em ramo destacado, em algumas interações anteriormente referidas, mostrou estar mais correlacionada com os resultados obtidos por outros processos de inoculação, do que a utilização de raízes destacadas, porque estes órgãos retirados de árvores adultas, apresentam idades, diâmetros e espessura de floema secundário, muito diferentes, sendo mais difícil obter uniformidade do material a testar.

Apesar do artificialismo do método de inoculação em ramo destacado, os resultados obtidos por este processo são idênticos aos obtidos por processos mais naturais de inoculação, apresentando a grande vantagem de permitir testar grande quantidade de material num período de tempo relativamente curto em condições facilmente reproduzíveis e uniformizadas. A estas características acrescenta-se ainda o facto de se quantificar a resistência pelo desenvolvimento da lesão, obtendo-se assim valores de natureza quantitativa que possibilitam a análise estatística dos resultados.

A inoculação em folhas destacadas, apesar de raramente aparecer referida como método de avaliação da resistência nas interações hospedeiro/*Phytophthora*, foi utilizada por TELHADA (1988) para avaliar a agressividade de diferentes espécies de *Phytophthora* que atacam os citrinos em vários hospedeiros, tendo obtido com este método resultados semelhantes aos de outros métodos de inoculação.

A avaliação da resistência das plantas a *P. cinnamomi* foi também estudada em tecidos cultivados *in vitro*. GRENTE & SAURET (1961) inocularam com micélio de *P. cinnamomi*, *callus* obtidos de clones de castanheiro. Os resultados preliminares destes estudos, indicavam que a resistência se manifestava nestes tecidos, mas só era possível fazer a sua avaliação se obtidos em obscuridade e depois colocados em condições de luz contínua e com idade compreendida entre os 50 e 70 dias.

Esta metodologia de avaliação de resistência foi retomada por McCOMB *et al.* (1987), que por este processo estudaram a resistência de espécies florestais e hortícolas da flora australiana. Concluíram que o crescimento das hifas de *P. cinnamomi* nas células de *callus* estava correlacionado com a susceptibilidade das plantas que tinham dado origem a esse tecido. A resistência manifestava-se pelo crescimento limitado do micélio nos tecidos do *callus* enquanto a susceptibilidade se evidenciava pelo rápido crescimento do fungo. Para que a resistência possa ser avaliada estes autores consideram que os *calli* devem ter uma textura semelhante e que as condições de obtenção dos tecidos influem também na manifestação da resistência.

Esta metodologia, segundo os autores anteriormente referidos, pode proporcionar um meio privilegiado para o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência, porque a resposta das células do *callus*, será mais uniforme do que a obtida

em tecidos intactos, onde cada tipo de célula vegetal reagirá de forma diferente ao agente patogénico.

Neste trabalho avalia-se a resistência do castanheiro a *P. cinnamomi* pelo método de inoculação em ramo destacado, utilizando-se como material vegetal clones de castanheiro de reacção conhecida a este agente fitopatogénico.

A utilização desta metodologia possibilita testar elevadas quantidades de material vegetal nas primeiras fases do melhoramento, ou seja aumentar a intensidade de selecção e obter resultados num período de tempo relativamente curto. Permite, por outro lado, avaliar o grau de resistência dos clones comercializados como resistentes a este fungo e constitui ainda um critério de selecção valioso, na escolha do material resistente a propagar vegetativamente.

Avaliou-se ainda a resistência por inoculação em disco destacado de folha e utilizou-se o índice de ELSTON (1963) como critério de ordenação e selecção dos clones em estudo.

6.2 – Material

6.2.1 – Isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*

Como inóculo, utilizaram-se subculturas dos isolamentos UTAD 79 e UTAD 80, com origem em Trás-os-Montes e que o International Mycological Institute, confirmou tratar-se de *P. cinnamomi* e lhe atribuiu o código IMI 335 488 e IMI 335 492, respectivamente.

As características morfológicas e bioquímicas destes isolamentos de *P. cinnamomi* estão indicadas no Capítulo V deste trabalho.

6.2.2 – Material vegetal

Os clones de castanheiro, utilizados neste estudo, são clones cujo comportamento em relação à doença da tinta é conhecido. São clones resultantes de programas de melhoramento em relação a esta doença e foram anteriormente testados por inoculação por ferida em planta intacta.

Algum deste material foi legado por TAVEIRA FERNANDES e propagado vegetativamente pelo Centro de Estudos do Castanheiro em Alcobça, no Centro Regional de Investigação e Desenvolvimento Agrário de Bragança e na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, de onde provém o material aqui denominado UTAD 7, UTAD 9, UTAD 11, SATIVA 22 e VIMEIRO. Este último clone presume-se ser um híbrido de *C. crenata* × *C. sativa* (C. ABREU, com. pessoal, 1991).

Como referência utilizou-se o clone considerado susceptível, UTAD 14 e o clone considerado resistente, o híbrido francês de *C. crenata* × *C. sativa* (CA 15) denominado MARIGOULE.

Quadro 14 – Características e origem dos clones de castanheiro.

Clones de Castanheiro	Reacção à doença da tinta		Origem dos clones	Material vegetal
	Resistente(R)	Susceptível(S)		
UTAD 9	R	-	Programa de Melhoramento de TAVEIRA FERNANDES (PMTF)	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 7	R	-	PMTF	<i>Castanea sativa</i>
VIMEIRO	R	-	PMTF	<i>C.crenata</i> × <i>C.sativa</i> (?)
UTAD 1	?	?	Seleção da UTAD	<i>Castanea sativa</i>
SATIVA 22	?	?	PMTF	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 11	?	?	PMTF	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 14	-	S	Colecção de clones de castanheiro da UTAD	<i>Castanea sativa</i>
MARIGOULE	R	-	Híbrido francês em propagação comercial	<i>C. crenata</i> × <i>C. sativa</i>

6.3 – Metodologia

6.3.1 – Inoculação em ramo destacado

Dos clones referidos em Material Vegetal (6.2.2) e quando os ramos do ano apresentavam 30-40cm de crescimento, seleccionaram-se 12 (doze) ramos de cada clone de diâmetro aproximadamente igual.

O material vegetal seleccionado foi cortado e transportado para o local da realização do ensaio com os cuidados necessários para evitar a dessecação dos ramos.

A inoculação foi realizada com micélio, obtido por crescimento em PDA (PDA Difco, 39g/l) das culturas referidas em 6.2.1–Isolamentos de *P. cinnamomi* e dividido em quantidades iguais (Fig. 12 A), imediatamente antes de se iniciar o processo de inoculação.

Para realizar a inoculação seccionou-se o ápice do ramo (Fig. 12 B), transferiu-se um disco de micélio e meio de cultura e foi posto em contacto com a secção transversal praticada (Fig. 12 C). Para evitar a dessecação dos tecidos e criar um ambiente húmido, cobriu-se a zona próxima da inoculação com papel de alumínio (Fig. 12, C e D).

A inoculação foi realizada com cada um dos isolamentos de *P. cinnamomi* já mencionados e em 5 ramos por clone de castanheiro em ensaio.

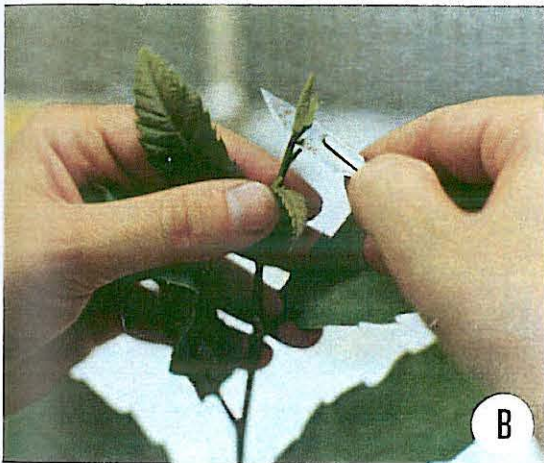


Fig. 12 - Inoculação em ramo destacado de castanheiro. A - Micélio de *Phytophthora cinnamomi* em meio gelosado de batata dextrosada. B - Ramo destacado de castanheiro, seccionamento do ápice. C - Inoculação com disco de micélio e meio de cultura. D - "Câmara húmida" obtida com a utilização de papel de alumínio.

Para avaliar o avanço da infecção mediu-se o comprimento da lesão provocada pelo desenvolvimento do fungo nesses tecidos, manifestada pela necrose dos tecidos do ramo inoculado.

Realizaram-se medições da dimensão da lesão (DL), expressas em milímetros, ao 3º, 6º e 10º dias após a inoculação, altura em que os ramos destacados começaram a evidenciar amarelecimento e queda das folhas da base.

A extremidade basal dos ramos destacados foi mantida imersa em água durante todo o período do ensaio.

O ensaio decorreu numa estufa com cobertura de fibra de vidro, temperatura regulada e com sistema de nebulização programável.

Durante o período da realização do ensaio a temperatura e a humidade relativa do ar (HR) foram registadas num termohigrógrafo. A temperatura oscilou dos 12° aos 25°C e a HR dos 60% aos 100%.

O ensaio deliniado corresponde a um ensaio factorial com três factores fixos: Clones de castanheiro (C), Isolamentos de *P. cinnamomi* (P) e Tempo (T), que parametricamente se representa:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + P_j + CP_{ij} + T_k + CT_{ik} + PT_{ik} + e_{ijkl}$$

com:

$$i = 1 \text{ a } 8; j = 1 \text{ a } 2; k = 1 \text{ a } 3 \text{ e } l = 1 \text{ a } 5$$

Para ordenar os clones de castanheiro quanto ao grau de resistência, procedeu-se à comparação das médias pelo teste de comparação múltipla de TUKEY.

A análise estatística dos dados e o traçado dos gráficos foi realizado num computador SE/30 da Macintosh, programa Systat de WILKINSON (1989).

6.3.2. – Inoculação de ramo destacado em meio de cultura

Com a mesma metodologia de selecção de material vegetal, e na mesma época do ano recolheu-se o material vegetal que foi transportado para o laboratório.

Retiraram-se as folhas dos ramos e desinfectaram-se com hipoclorito de sódio a 5%. De cada ramo retirou-se ainda, da parte central, um troço de ramo com aproximadamente 10cm de comprimento. Na extremidade basal de cada troço de ramo, realizaram-se dois cortes longitudinais com aproximadamente 1cm, para que a extremidade ficasse em forma de cunha e facilitasse a penetração do parasita.

Estes tecidos vegetais foram colocados em frascos com meio de cultura (PDA Difco, 39g/l) e *P. cinnamomi* que aí se inoculou quatro dias antes de colocar o material vegetal.

Os frascos foram hermeticamente fechados e colocados sem luz numa estufa a 22-24°C.

A dimensão da lesão foi avaliada 4 dias depois da inoculação, nas quatro repetições realizadas por clone e por isolamento de *Phytophthora*.

6.3.3 – Inoculação em disco destacado de folha

Dos mesmos clones de castanheiro e no mesmo dia da realização do ensaio da inoculação em ramo destacado, retiraram-se discos de folhas com um anel cortante, que se inocularam, por deposição de micélio de *P. cinnamomi* e meio e cultura, com 4mm de diâmetro. Para que a humidade fosse mantida a níveis adequados para o desenvolvimento do parasita, os discos de folha foram colocados sobre papel de filtro humedecido com água destilada.

Avaliou-se o período de tempo, em horas, entre a inoculação e os primeiros sintomas claramente visíveis, período de incubação, utilizando-se para isso um dispositivo constituído por uma fonte de luz, mesa translúcida e lente monocular 10x. A incubação decorreu a temperatura e humidade constantes.

O ensaio estatístico delineado corresponde a um ensaio factorial com dois factores fixos: Clones de castanheiro (C) e Isolamentos de *Phytophthora* (P).

Ordenaram-se os clones pela comparação múltipla das médias com base nos critérios de TUKEY e compararam-se com os resultados obtidos pelo método de inoculação de ramo destacado.

6.4 – Resultados e Discussão

6.4.1 – Inoculação em ramo destacado

A dimensão da lesão obtida por este processo de inoculação, nas condições e com o material vegetal e com os isolamentos de *P. cinnamomi* anteriormente referidos, encontra-se expresso no Quadro 15 e nas Figuras 13,14 e 15.

Neste estudo o termo resistência é utilizado como sinónimo funcional, ou seja, da maior ou menor capacidade dos clones limitarem o desenvolvimento do fungo nos seus tecidos depois de artificialmente inoculados.

Os resultados das inoculações revelaram que os clones se comportaram de forma diferente em relação a *P. cinnamomi*, tendo todos os clones evidenciado um grau de resistência igual ou superior ao clone UTAD14, que por outros processos de inoculação foi classificado como susceptível. Nenhum dos clones evidenciou um nível de resistência total, uma vez que o fungo infectou e colonizou em maior ou menor extensão todos os clones em estudo.

Quadro 15 – Dimensão média da lesão, nos ramos destacados de castanheiro, ao 3º, 6º e 10º dia depois da inoculação com os isolamentos IMI 335 488 e IMI 335 492.

CLONES	Isolamento IMI 335 488 (UTAD79)			Isolamento IMI 335 492 (UTAD80)		
	3º dia	6º dia	10º dia	3º dia	6º dia	10º dia
	DL±sd *	DL±sd	DL±sd	DL±sd	DL±sd	DL±sd
VIMEIRO	6,2±1,78	18,6±2,70	24,2±5,45	8,4±4,98	24,4±4,72	33,8±4,92
MARIGOULE	12,0±2,74	25,5±7,46	32,2±5,45	9,4±4,98	26,5±10,40	37,3±7,63
UTAD1	5,8±3,03	19,2±2,38	26,0±3,39	11,2±2,38	28,4±2,70	47,4±6,30
UTAD9	5,6±2,30	16,8±3,34	20,2±3,70	4,7±2,06	16,4±5,21	24,2±2,86
UTAD11	5,6±4,16	22,0±4,74	35,0±10,86	11,2±4,60	30,0±2,00	50,8±10,62
SATIVA22	4,0±1,73	14,4±2,07	34,8±8,22	5,4±1,34	20,4±5,50	58,2±10,54
UTAD14	6,8±1,64	27,0±4,58	46,4±11,52	12,0±3,74	39,0±10,22	57,6±7,23
UTAD7	5,8±1,48	17,0±3,00	21,6±2,51	9,6±1,52	18,0±3,08	24,2±1,92

* DL - Dimensão da Lesão (mm)
sd- desvio padrão da média

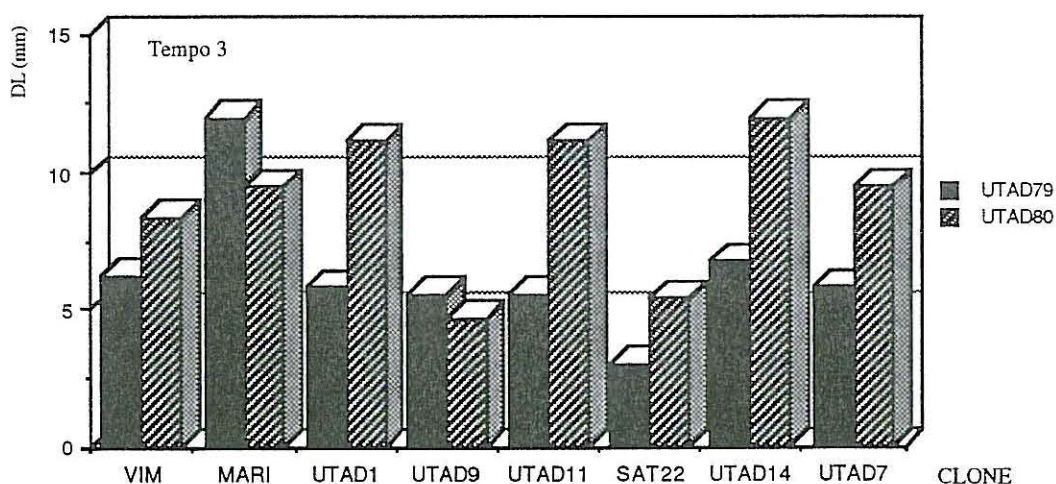


Fig.13 – Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 3 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).

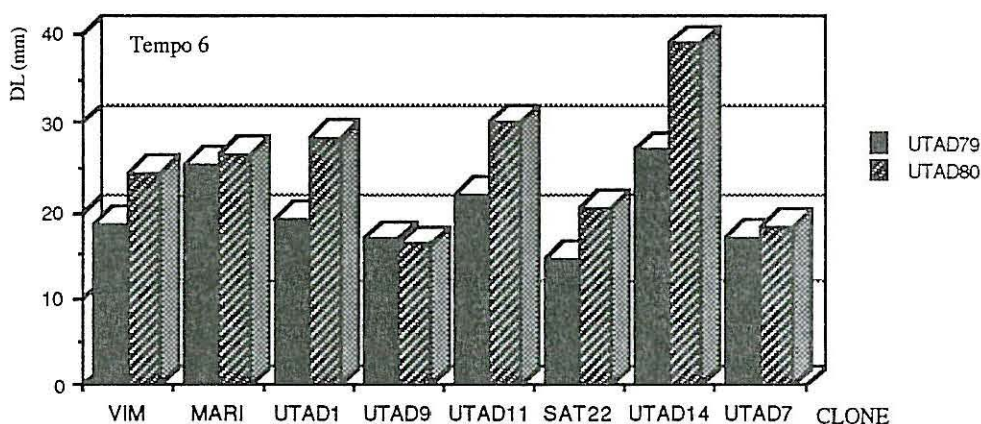


Fig. 14.— Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 6 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).

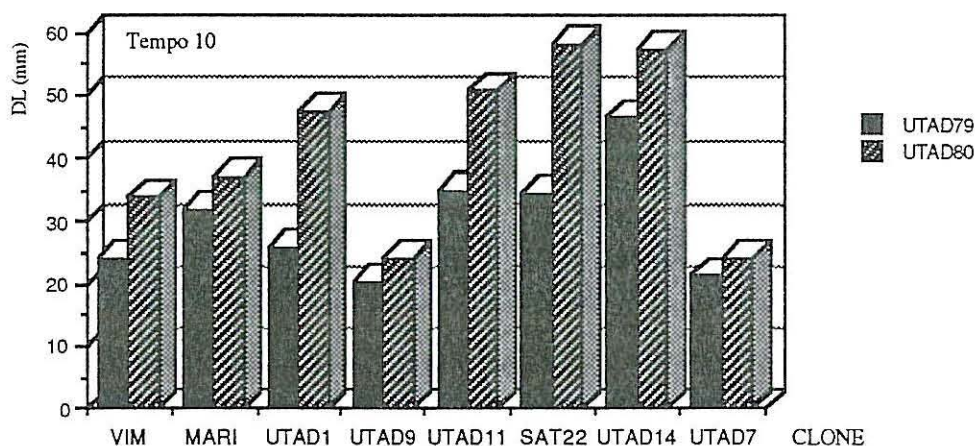


Fig 15 – Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 10 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).

Pode observar-se pelo Quadro 15 e Figuras 13, 14 e 15 que o desenvolvimento da lesão é diferente conforme o isolamento de *Phytophthora* considerado, sendo também diferente o comportamento dos clones quanto ao avanço da lesão ao longo do tempo.

Estas diferenças podem ser avaliadas pela análise estatística do ensaio a que corresponde um ensaio factorial com três factores fixos: Clones de castanheiro (C), Isolamentos de *Phytophthora* (P) e Tempo (T).

No Quadro 16 indicam-se os resultados dessa análise.

Os resultados da análise da variância evidenciam uma influência acentuada do factor tempo no desenvolvimento da lesão. Também é possível inferir que os isolamentos

de *Phytophthora* têm diferente agressividade e que os clones em estudo possuem graus diferentes de resistência.

Quadro 16 – Análise da variância dos valores referentes à dimensão da lesão (DL) apresentada ao 3º, 6º e 10º dias de incubação (T) pelos clones de castanheiro (C) quando inoculados com 2 isolamentos diferentes de *P. cinnamomi* (P). (5 repetições / clone)

Origem da Variação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	6268,520	895,509	30,653	0,000
TEMPO (T)	2	31930,460	15965,230	546,482	0,000
PHYTOPHTHORA (P)	1	2516,843	2516,843	86,150	0,000
TEMPO × PHY (T×P)	2	845,373	422,688	14,468	0,000
CLONE × TEMPO (C×T)	14	4581,062	327,219	11,201	0,000
CLONE × PHY (C×P)	7	1138,430	162,602	5,566	0,000
P × C × T	14	488,302	34,879	1,194	0,283
ERRO	189	5521,550	29,215		

Detectam-se, ainda, diferenças altamente significativas na interação Tempo × *Phytophthora*, Clone × Tempo, Clone × *Phytophthora*.

A primeira das interações significativas revela que o avanço médio da lesão produzida por cada um dos isolamentos de *P. cinnamomi* não é idêntico, avançando um dos isolamentos mais rapidamente que o outro, considerando a globalidade dos clones.

Nos tecidos destacados do hospedeiro, o isolamento IMI 335 492 (UTAD 80) manifestou maior capacidade de colonização (maior dimensão da lesão) do que o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79), diferença que pode ser interpretada como maior agressividade desse isolamento.

Em meio de cultura, estes isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*, manifestaram também comportamento diferente quanto ao crescimento radial, mas em sentido inverso. O isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) evidenciou crescimento radial significativamente superior ($\alpha = 0,05$) ao do isolamento IMI 335 492 (UTAD 80) (Quadro 9) e com uma morfologia de colônia (tipo estrela) menos nítida. Esta constatação não permite, no entanto, relacionar de forma conclusiva as características morfológicas e o crescimento radial em meio de cultura com a agressividade dos isolamentos.

A interação significativa Clone × Tempo, revela que o avanço médio da lesão não é igual nos diferentes clones, avançando mais rapidamente nuns clones que noutros, tendo em conta os dois isolamentos de *Phytophthora*.

Finalmente a interação significativa Clones × *Phytophthora* evidencia que os clones de castanheiro manifestam comportamento diferente em relação aos isolamentos de *Phytophthora*, ou seja, possuem graus de resistência diferente.

Para ordenar os clones de castanheiro quanto ao grau de resistência considerou-se a dimensão média da lesão ao 10º dia de inoculação e aplicaram-se os testes de comparação múltipla das médias com base nos critérios de TUKEY.

Quadro 17 – Análise da variância dos valores referentes á dimensão da lesão (DL) ao 10º dia após a inoculação dos 8 clones de castanheiro (C) quando inoculados com os 2 isolamentos de *P.cinnamomi* (P) (5 repetições/clone).

Origem daVariação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	8667,346	1181,049	23,103	0,000
PHYTOPHTHORA (P)	1	2664,093	2664,093	52,111	0,000
CLONE x PHY (C x P)	7	1084,636	154,948	3,031	0,008
ERRO	63	3220,750	51,123		

Como os isolamentos de *P. cinnamomi* manifestaram graus de agressividade diferente compararam-se os valores médios da dimensão da lesão, 10 dias depois da inoculação, quando inoculados com cada um dos isolamentos de *P. cinnamomi*.

Quadro 18 – Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 488.

CLONE	DL (média) (mm)			
UTAD9	20,2	A*		
UTAD7	21,6	A	B	
VIMEIRO	24,2	A	B	
UTAD1	26,0	A	B	
MARIGOULE	32,2	A	B	C
SATIVA22	34,8	A	B	C
UTAD11	35,0		B	C
UTAD14	46,4			C

TUKEY, nível de significância ($\alpha = 5\%$)

* Valores médios com letras em comum não são significativamente diferentes.

Quadro 19 – Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 492.

CLONE	DL (média) (mm)			
UTAD9	24,2	A*		
UTAD7	24,2	A		
VIMEIRO	33,8	A	B	
MARIGOULE	37,3	A	B	
UTAD1	47,4		B	C
UTAD11	50,8		B	C
UTAD14	57,6			C
SATIVA22	58,2			C

TUKEY, nível de significância ($\alpha = 5\%$)

* Valores médios com letras em comum não são significativamente diferentes.

Os resultados expressos nos Quadros 18 e 19 permitem separar os clones resistentes dos clones susceptíveis. A separação das médias não permite individualizar classes de resistência definidas e alguns clones ocupam posições diferentes na ordenação. Apesar disso as classes de resistência extremas, considerando-se as três maiores ou menores dimensões de lesão, incluem os mesmos clones. Como clones mais resistente (menor dimensão da lesão) aparecem o UTAD 9, UTAD7 e VIMEIRO e como clones susceptíveis (maior dimensão de lesão) o UTAD14, UTAD 11 e o SATIVA22.

Os resultados obtidos pelo método de inoculação em ramo destacado estão de acordo com o conhecimento que se tinha dos clones em estudo e com os obtidos por inoculação em ramo de planta intacta, permitindo mesmo uma maior separação dos clones quanto ao grau de resistência.

No método de inoculação em ramo de planta intacta classificam-se como resistentes, os clones onde a inoculação provoca lesões confinadas e a ferida cicatriza como nas plantas testemunha e como clones susceptíveis os que desenvolvem lesões que evoluem de forma sistemática até à morte da árvore. Por este processo de inoculação alguns clones, como o SATIVA22, apresentam lesões que no ano de inoculação aparecem confinadas, mas no ano seguinte o fungo retoma a sua actividade, originando lesões que progressivamente vão aumentando e conduzem à morte da árvore num período de tempo mais ou menos longo.

Por este processo os clones foram classificados como o indicado no Quadro 20.

Quadro 20 – Classificação dos clones de castanheiro quanto ao nível de resistência a *P. cinnamomi* avaliados pelo método de inoculação em ramo de planta intacta.

CLONES	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA	
	ANO DA INOCULAÇÃO	ANO SEGUINTE
UTAD9	R	R
UTAD7	R	R
VIMEIRO	R	R
MARIGOULE	–	–
UTAD1	R	R
UTAD11	R	R
SATIVA22	R (?)	S
UTAD14	S	S

R – resistente

S – susceptível

– não foi avaliado

6.4.2 – Inoculação de ramo destacado em meio de cultura

Os resultados obtidos com este método não permitiram avaliar a resistência dos clones em estudo, porque a quantificação da dimensão da lesão foi realizada quando os tecidos estavam já muito colonizados pelo fungo, não permitindo diferenciar os diferentes genótipos.

Este método apresenta além desta desvantagem, ou seja a necessidade de se determinar previamente o período de tempo para realizar a avaliação da resistência, o de exigir condições estritas de assepsia para que o meio de cultura não fique infectado.

Poderá, no entanto, ser um método vantajoso quando se pretende avaliar o comportamento da resistência dos clones ao longo do seu ciclo vegetativo, não só pela facilidade da realização da inoculação mas também pela fácil normalização das condições ambientais de incubação dos tecidos.

6.4.2 – Inoculação em discos destacados de folha

O número médio de horas entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas claramente visíveis, em cada clone e para cada isolamento de *Phytophthora*, estão indicados no Quadro 21.

Quadro 21 – Tempo, em horas, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas claramente visíveis.

CLONE	TEMPO (horas)	
	Isolamento IMI 335 488	Isolamento IMI 335 492
VIMEIRO	106,8 ± 13,01*	69,6 ± 15,06*
MARIGOULE	67,2 ± 26,97	38,4 ± 13,14
UTAD1	54,0 ± 18,49	58,8 ± 9,86
UTAD9	108,0 ± 14,07	115,2 ± 2,68
UTAD11	92,4 ± 22,69	49,2 ± 19,63
SATIVA22	97,2 ± 21,38	60,0 ± 18,49
UTAD14	52,8 ± 10,73	24,0 ± 0,00
UTAD7	103,2 ± 15,53	87,6 ± 17,28

* Número de horas ± desvio padrão da média

A análise de variância evidencia que os clones possuem graus diferentes de resistência e que os isolamentos de *P. cinnamomi* têm graus de agressividade diferente (Quadro 22).

de *Phytophthora* como a capacidade do fungo colonizar rapidamente os tecidos do hospedeiro, o isolamento – IMI 335 492 (UTAD80), manifestou na generalidade dos clones maior agressividade, como aliás era também evidente quando se aplicou o método de inoculação em ramo destacado.

Quadro 22 – Análise da variância dos valores referentes ao número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro (C) quando inoculados com 2 isolamentos diferentes de *P. cinnamomi* (P) (5 repetições/clone).

Origem da Variação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	42034,00	6004,91	22,267	0,000
PHYTOPHTHORA (P)	1	10215,00	10215,20	37,880	0,000
CLONE x PHY (C x P)	7	6610,40	944,34	3,502	0,003
ERRO	64	17259,20	269,67		

Os resultados obtidos por inoculação em disco destacados de folha, que avalia o número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas, dá origem a uma separação de clones, com base na comparação múltipla de médias pelo método de TUKEY (Quadros 23 e 24), idêntica à obtida por inoculação em ramo destacado. Classifica como clones mais resistentes o UTAD9, UTAD7 e o VIMEIRO introduzindo, no entanto, alguma variação nos clones mais susceptíveis, uma vez que inclui nesta classe o UTAD1 e o MARIGOULE que pelo método de inoculação em ramo destacado seriam classificados como moderadamente resistentes.

A resistência do castanheiro a *P. cinnamomi* sendo de tipo Horizontal, *sensu* VAN DER PLANK (1963), pode ser considerada como um processo de bloqueamento mais

Quadro 23 – Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculadas com o isolamento IMI 335 488 (5 repetições/clone)

CLONE	PI (médio) (horas)		
UTAD 9	108,0	A*	
VIMEIRO	106,8	A	
UTAD 7	103,2	A	
SATIVA 22	97,2	A	
UTAD 11	92,4	A	
MARIGOULE	67,2	A	B
UTAD 1	54,0		B
UTAD 14	52,8		B

TUKEY, nível de significância ($\alpha = 5\%$)

* médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes.

Quadro 24 – Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculadas com o isolamento IMI 335 492 (5 repetições/clone)

CLONE	PI (médio) (horas)					
UTAD 9	115,2	A*				
UTAD 7	87,6	A	B			
VIMEIRO	69,6		B	C		
SATIVA 22	60,0		B	C		
UTAD 1	58,8			C	D	
UTAD 11	49,2			C	D	E
MARIGOULE	38,2				D	E
UTAD 14	24,0					E

TUKEY, nível de significância ($\alpha = 5\%$)

* médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes.

ou menos eficiente do ciclo infeccioso do fungo parasita. A dimensão da lesão (DL) e o período de incubação (PI), avaliados neste estudo pelo método de inoculação em ramo destacado e por inoculação em disco destacados de folha, constituem mecanismos pelos quais o processo infeccioso pode em certa medida ser bloqueado, sendo incluídos como componentes da resistência por PARLEVLIET (1979).

Para seleccionar simultaneamente para duas ou mais características utilizam-se com frequência em melhoramento vegetal, os Índices de selecção.

ABREU *et al.* (1991) utilizaram o Índice de ELSTON (1963) para ordenar os clones de castanheiro quanto ao nível de resistência, uma vez que este índice de selecção não entra em consideração com parâmetros genéticos e de parentesco, baseando-se apenas no valor fenotípico observado. Assume-se ainda que, cada característica tem o mesmo valor na selecção e ordenação dos indivíduos.

Porque a análise estatística revelou diferença de agressividade dos isolamentos de *P. cinnamomi*, aplicou-se o índice de ELSTON aos valores fenotípicos obtidos com o isolamento mais agressivo, o IMI 335 492 (UTAD 80).

O Índice de ELSTON para p características toma a forma:

$$I_E = \prod_{i=1}^p (Y_i - C_i)$$

onde, para efeitos de ordenação, Y_i é o valor da i -ésima característica e

$$C_i = \frac{[n (\text{mínimo } Y_i) - \text{máximo } Y_i]}{(n-1)}$$

sendo n o número de genótipos considerados.

Se numa determinada característica os valores mais baixos correspondem aos objectivos do melhorador, multiplicam-se todos os valores por -1, ou então considera-se o recíproco de cada um dos valores. Neste caso concreto considerou-se o recíproco do

valor da dimensão da lesão que se multiplicou por 1000, antes da transformação logarítmica. Nesta característica interessam os valores mais baixos dado que corresponde a uma maior resistência à colonização dos tecidos.

Quadro 25 – Cálculo do Índice de ELSTON e ordenação dos clones.

CLONES	VALOR FENOTÍPICO (Yi)			ln (Yi - Ci) ^{b)}		ÍNDICE	ORDEM
	DL(mm)	PI (h)	1/DL	1/DL ^{a)}	PI		
UTAD9	24,2	115,2	0,0413	3,32	4,64	15,40	1º
UTAD7	24,2	87,6	0,0413	3,32	4,33	14,38	2º
VIMEIRO	33,8	69,6	0,0295	2,76	4,07	11,23	3º
MARIGOULE	37,3	38,4	0,0268	2,58	3,31	8,54	4º
UTAD1	47,4	58,8	0,0210	1,99	3,86	7,68	5º
UTAD11	50,8	49,2	0,0196	1,78	3,64	6,48	6º
SATIVA22	58,2	60,0	0,0171	1,24	3,89	4,82	7º
UTAD14	57,6	24,0	0,0173	1,29	2,56	3,30	8º

a) Os valores da característica 1/DL foram multiplicadas por 1000 antes da transformação logarítmica.

b) $Ci = [n (\text{mínimo}Yi) - \text{máximo}Yi]/(n-1)$

A ordenação obtida pela aplicação do Índice de ELSTON classifica como clones mais resistentes o UTAD9, UTAD7 e o VIMEIRO e como clones mais susceptíveis o UTAD11, SATIVA22 e UTAD14, que coincide com a classificação obtida através do método de inoculação em ramo destacado.

6.5 – Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo, pelo método de inoculação em ramo destacado e por inoculação de discos destacados de folha, permitem separar os clones de castanheiro quanto ao nível de resistência que manifestam em relação a *P. cinnamomi*.

A metodologia de inoculação em ramo destacado utilizada inicialmente para avaliar a agressividade dos isolamentos de *Phytophthora*, foi posteriormente testada para avaliar a resistência dos diferentes genótipos. DIXON *et al.* (1984), TIPPETT *et al.* (1985), DOLAN & COFFEY (1989) e ABREU *et al.* (1991), concluíram que esta metodologia permitia separar os diferentes genótipos quanto ao grau de resistência a *P. cinnamomi*.

Resultados semelhantes foram obtidos em relação a outras espécies de *Phytophthora* que atacam o sistema radicular de plantas lenhosas, nomeadamente em *P. cactorum* (LEMOINE & GAUDIN, 1991) e *P. lateralis* (HANSEN *et al.*, 1989).

A inoculação em discos destacados de folha evidenciou resultados similares aos obtidos pelo método de inoculação em ramo destacado. Observou-se, no entanto, maior dispersão nos resultados e introduziu algumas alterações na ordenação dos clones. SALESSES *et al.* (1993), que também usaram metodologia semelhante, verificaram que existia comportamento diferencial das folhas em função da sua posição no ramo, quando analisaram este método de avaliação de resistência do castanheiro à *P. cinnamomi*. Concluíram, no entanto, que este método permitia separar os clones de castanheiro desde que as folhas fossem retiradas de ramos em activo crescimento e situadas entre a 6ª e 10ª folha a contar do ápice do ramo.

O método de inoculação em ramo destacado, pela facilidade de execução, permite avaliar a resistência de plantas adultas, tornando-o especialmente indicado para avaliar a resistência de grande quantidade de árvores, aumentando assim a pressão de selecção nas primeiras fases dos programas de melhoramento.

O período de tempo necessário para avaliar a resistência, situa-se pelos processos tradicionais nos 3 ou 4 anos (FERNANDES, 1953), e em 2 anos, pelo método de inoculação em ramo de planta intacta. Com o método de inoculação em ramo destacado o período de tempo para avaliar a resistência fica substancialmente reduzido, obtendo-se resultados válidos apenas numa época de crescimento anual do hospedeiro.

Este método, porque avalia a resistência pela dimensão da lesão e são possíveis varias repetições de material geneticamente igual, permite a análise estatística dos resultados que evidenciam, de forma mais clara, as interacções que se estabelecem entre o hospedeiro e o parasita.

A utilização do índice de selecção de ELSTON (1963) que neste estudo conduziu a uma ordenação de clones igual à obtida pelo método de inoculação em ramo destacado, poderá ser um critério de selecção valioso, nas situações em que se avaliam diferentes mecanismos de resistência, nomeadamente a resistência constitutiva devido, por exemplo, à presença de compostos fenólicos e a resistência à colonização dos tecidos.

Os resultados dos testes de inoculação avaliados neste trabalho, foram obtidos quando os crescimentos do ano apresentavam um crescimento aproximado de 30-40cm (fins de Maio) e apenas se poderão reportar a esta época do ano, podendo conduzir a resultados diferentes se realizados no período de repouso ou noutra altura do desenvolvimento vegetativo do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. A., GOUVEIA, E. M., COLAÇO, J. A., GOMES, A. L. & CARDOSO, A. O. (1991). Clones autóctones de castanheiro resistentes à tinta ?. *Congreso Galego de Proteccion Vexetal*. Santiago de Compostela, 28-29 Nov. 1991.
- ABREU, C. (1992). Chestnut ink disease: Management practices and resistance. *World Chestnut Conference*, Morgantown, WV, 10-14 July 1992.
- ABREU, C., COUTINHO, J. F., CARDOSO, A. O. & GOUVEIA, E.M. (1993). Solos supressivos e doença da tinta do castanheiro. In: *II Encontro Nacional de Protecção Integrada*, UTAD, Vila Real, 4-5 de Março 1993.
- AGRIOS, G. N. (1988). *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, 803 pp.
- ANDERSON, E. J. (1951). A simple method for detecting the presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil. *Phytopathology*, **44**: 187-189. (Cit: TSAO, 1987).
- AZEVEDO, J. (1989). *Inventário de macrofungos em povoamentos de Castanea sativa em Trás-os-Montes*. Relatório final de Estágio da licenciatura em Engenharia Florestal. Universidade de Trás- os Montes e Alto Douro, Vila Real, 92pp.
- BAKER, F. K. (1970). Selective killing of soil microorganisms by aerated steam. In: TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). *Root Diseases and Soil- Borne Pathogens*. Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 234-239.
- BARBERCHECK, M. E. & BROEMBSSEN, V. S. L. (1986). Effects of soil solarization on plant-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Plant Dis.*, **70** (10): 945-950.
- BARRACHINA, J. J. T. (1977). Contribucion al conocimiento del genero *Phytophthora* de Barry en España. *Anales INIA/ Series Prot Veg*, **7**: 11-106.
- BENSON, D. (1991). Detection of *Phytophthora cinnamomi* in azalea with commercial serological assay kits. *Plant Dis.*, **75**: 478-482.
- BERGOUGNOUX, F., VERLHAC, A., BREISCH, H. & CHAPA, J. (1978). *Le chataignier Production et culture*. INVUFLEC, Paris, 188 pp.
- BIELININ, A., JEFFERS, S. N., WILCOX, W. F. & JONES, A. L. (1988). Separation by electrophoresis of six species of *Phytophthora* associated with deciduous fruit crops. *Phytopathology*, **78**: 1402-8.
- BLACKWELL, E. M. (1949). *Terminology in Phytophthora*. Comm. Mycol. Inst. Papers, **30**, 23pp. (cit: BARRACHINA, 1977).
- BOLAY, A. (1992). Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse romande et au Tessin. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **24** (5): 281-292.

- BROADBENT, P. & BAKER, F. K. (1974). Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Aust. J. Agric. Res.*, **25**: 121-137. (cit: TSAO, 1987).
- BYRT, P. & GRANT, B. R. (1979). Some conditions governing zoospore production in axenic cultures of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.*, **27**: 103-105.
- CACCIOLA, O. S., MAGNANO DI SANLIO, G., GRECO, G. & PANE, A. (1990). Electrophoretic study of three related *Phytophthora* species. *Bull. OEPP/EPPO*, **20**: 47-58.
- CAMPBELL, W. A. (1949). A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant Dis. Rep.*, **33**: 134-135. (Cit: TSAO, 1987).
- CARLILE, J. M. (1987). Motility, taxis and tropism in *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 95-107.
- CHANG-HO, Y. & HICHMAN, C. J. (1970). Some factors involved in the accumulation of Phycomycete zoospores on plant roots. In: *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens*. TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 103-108.
- CHEE, K.L. & NEWHOOK, F. J. (1965). Improved methods for use in studies on *Phytophthora cinnamomi* Rands and other *Phytophthora* species. *N. Z. J. Agric. Res.*, **8**: 88-95. (Cit: TSAO, 1987)
- CHEN, DAH-WU & ZENTMYER, G. A. (1970). Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia*, **62**: 397-402.
- ÇINAR, A., GUNGU, M. & BIÇICI, M. (1990). Identification of *Phytophthora* species on fruit crop in Turkey by polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. OEPP/EPPO*, **20**: 29-34.
- CLARE, B. G. (1963). Starch-gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature*, **23**: 803-804.
- CLARE, B. G. & ZENTMYER, G. A. (1966). Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **56**: 1334-1335.
- COFFEY, D. M. (1987). *Phytophthora* root rot of avocado. An integrated approach to control in California. *Plant Dis.*, **71**(11): 1046-1052.
- COSTA, J. B. (1985). *Caracterização e constituição do solo*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 527 pp.
- 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.

- DANCE, M. H., NEWHOOK, F. J. & COLE, J. S. (1975). Bioassay of *Phytophthora* spp. in soil. *Plant Dis. Rep.*, **59**: 523-527. (Cit: TSAO, 1987).
- DAVAS, J. M., TOERIEN, J. C. & MILNE, D. L. (1984). Control of avocado root rot by trunk injection with phosethyl Al. *Plant Dis.*, **68**: 691-693.
- DEVAY, J. E. & KATAN, J. (1991). Mechanisms of pathogens control in solarized soils. In: *Soil Solarization*. DEVAY, J.E. & KATAN J. (Eds.). CRC Press, pp. 87-101.
- DE VRIES, G. A. (1952). Contribution to the knowledge of genus *Cladosporium* Link ex FR., Reeditado por Verlag Von J, Cramer, New York. (cit: BARRACHINA, 1977).
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS (1989). *Distribuição da Floresta em Portugal Continental. Áreas Florestais por Distrito*. Estudos e Informação, **289**, 29 pp.
- DIXON, W. K. & THINLAY, SIVASITHAMPARAM, K. (1984). Technique for rapid assessment of tolerance of *Banksia* spp. to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis.*, **68**: 1077-1080.
- DOLAN, T. E. & COFFEY, M. D. (1986). Laboratory screening technique for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis.*, **70** (2): 115-118.
- ECKERT, J. W. & TSAO, P. (1962). A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. *Phytopathology*, **52**: 771-777.
- ELLINGBOE, A. H. (1981). Changing concepts in host-pathogens genetics. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **19** : 124-43.
- ELSTON, R., C. (1963). A weight-free index for the purpose of ranking or selection with respect to several traits at a time. *Biometrics*, **19**: 85-87.
- ERB, W. A., MOORE, J. N. & STERNE, R. E. (1987). Response of blueberry cultivars to inoculation with *Phytophthora cinnamomi* Rands zoospores. *HortScience*, **22** (2): 298-300.
- EYE, L. L., SNEH, B. & LOCKWOOD, J. L. (1978). Inoculation of soybean seedlings with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* for pathogenicity and race determination. *Phytopathology*, **68**: 1769-1773.
- FENAROLI, L. (1945). *Il castagno*. Stabilimento Tipografico del Editoriale degli Agricoltoti, Roma. (cit: GOMES, 1982).
- FERNANDES, C. TAVEIRA (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 : 87-104.

- FERNANDES, C. TAVEIRA (1953). A luta contra a "doença da tinta" dos castanheiros em Portugal. *Separata das publicações da Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*. Vol XX, Tomo II: 153-158.
- FERNANDES, C. TAVEIRA (1955a). O papel e a importância do castanheiro na "Terra Fria" do Nordeste de Portugal. *Separata das publicações da Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*. Vol XXII, Tomo I: 41-51.
- FERNANDES, C. TAVEIRA (1955b). A luta contra a "doença da tinta" dos castanheiros nos soutos do norte de Portugal e ensaios diversos para a sua maior eficácia e economia. *Separata das publicações da Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*. Vol XXII, Tomo I: 53-59.
- FERNANDES, C. TAVEIRA (1966). A "Doença da Tinta" dos castanheiros. *Parasitas do género Phytophthora* de Bary. Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça, 95pp.
- FERRAZ, J. F. P. (1990). Importância e dinâmica do inóculo potencial dos fungos fitopatogénicos do solo. *Summa Phytopathologica*, **16**: 197-213.
- FIGUEIREDO, T., GOUVEIA, M. E. & ABREU, C. (1991). Condições edáficas e incidência da tinta do castanheiro: um estudo preliminar em Bragança (Portugal). *Congresso Galego de Proteccion Vexetal*. Santiago de Compostela, 28-29 Nov. 1991.
- FLOR, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, **32**: 653-669. (cit: ELLINGBOE, 1981).
- FRAEDRICH, S. W., TAINTER, F. H. & MILLER, A. E. (1989). Zoospore inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* and infection of lateral root tips of shortleaf and loblolly pine. *Phytopathology*, **79** (10): 1109-1113.
- FRY, E. W. (1982). *Principles of Plant Disease Management*. Academic Press, 378 pp.
- FULTON, W. C. (1979). On comparing values of Vanderplank's *r*. *Phytopathology*, **69**:1162-1164.
- GALINDO, J. A. & ZENTMYER, G. A. (1964). Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **54**: 283-289.
- GALLEGLY, M. E. (1987a). New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 167-172.
- GALLEGLY, M. E. (1987b). Summary of the open discussion session on taxonomy of *Phytophthora*. In *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 173-174.

- GARRET, S. D. (1970). *Pathogenic Root-Infecting Fungi*. Cambridge Univ. Press, London, Cambridge.
- GILL, H. S. & POWELL, D. (1967). Differentiation of three species of *Phytophthora* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathology*, **57**: 812 (abstr).
- GILL, H. S. & ZENTMYER, G. A. (1978). Identification of *Phytophthora* by disc electrophoresis. *Phytopathology*, **68**: 163-167.
- GOMES, A. L. (1982). *Revisão Crítica Sobre a Cultura do Castanheiro em Portugal*. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- GOTTSTEIN, D. & GROSS, D. (1992). Phytoalexins of wood plants. *Trees*, **66**: 55-68.
- GRAHAM, J. M. (1990). Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chamydospore- infested soil. *Plant Dis.*, **74**: 743-746.
- GRENTE, J. (1961a). La maladies de l'encre du chataignier. I-Étiologie et biologie. *Ann. Epiphyties*, **12** (1): 6-24.
- GRENTE, J. (1961b). La maladies de l'encre du chataignier. II- Les agents pathogènes: *Phytophthora cambivora* et *Phytophthora cinnamomi*. *Ann. Epiphyties*, **12**(1): 25-59.
- GRENTE, J. & SAURET, S. (1961). Épreuve de la résistance a l'encre et a l'endothia sur des cultures de tissus de clones de châtaignier. *Ann. Epiphyties*, **12** (1): 61-63.
- GRENTE, J. (1978). Les maladies du châtaignier. In *Le chataignier Production et culture*. BERGOUGNOUX, F., VERLHAC, A., BREISCH, H. & CHAPA, J. (Eds.). INVUFLEC, Paris, pp. 146-155.
- GUEDES, M. E. M. & RODRIGUES, C. (1974). Disc electrophoretic patterns of phenoloxidase from leaves of coffee cultivares. *Acta Biol.*, **13** (1-2): 169-177.
- GREENHALGH, F. C. (1978). Evaluation of techniques for quatitative detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Soil Biol. Biochem.*, **10**: 257-259. (cit: TSAO, 1987).
- HALL, R., ZENTEMYER, G. A. & ERWIN, D. C. (1969). Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gel-electrophoresis of proteins. *Phytopathology*, **59**: 770-774.
- HANSEN, E. M., HAMM, P. B. & ROTH, L. F. (1989). Testing Port-orford-cedar for resistance to *Phytophthora*. *Plant Dis.*, **73**: 791-794.
- HENDRIX, F. F. & KUHLMAN, E. G. (1965). Factors affecting direct recovery of *Phytophthora cinnamomi* from soil. *Phytopathology*, **55**: 1183-1187.
- HERNANDEZ, G. & MAGÁN, F. (1979). Castaños resistentes a la tinta. *Agricultura*, **571**: 879-881.

- HO, H. H. & ZENTMYER, G. A. (1977a). Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, **69**: 701-703.
- HO, H. H. & ZENTMYER, G. A. (1977b). Infection of avocado and other species of *Persea* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **67**: 1085-1089.
- HO, H. H. (1981). Synoptic key to the species of *Phytophthora*. *Mycologia*, **73**: 705-14.
- HUBER, M. D. & SCHNEIDER, W. R. (1989). The description and occurrence of suppressive soils. In: *Suppressive Soils and Plant Diseases*. SCHNEIDER, R. (Ed.). Symp. Ser., Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN, pp. 1-7.
- HWANG, S. C. & KO, W. H. (1978). Biology of clamydospores sporangia and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology*, **68**: 726-731.
- IRWIN, J. A., MAXWELL, D. P. & SMITH, R. R. (1980). Correlation between root and stem reactions of alfalfa to *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology*, **70**: 987-990.
- JEFFERS, S. N., ALDWINCKLE, H. S., BURR, T. J. & ARNESON, P. A. (1982). *Phytophthora* and *Pythium* species associated with crown rot in New York apple orchards. *Phytopathology*, **72**: 533-8.
- KAOSIRI, T. & ZENTMYER, G. A. (1980). Proteins, esterase and peroxidase patterns in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. *Mycologia*, **72**: 989-1000.
- KANNAWISCHER, M. E. & MITCHELL, D. J. (1978). The influence of a fungicide on the epidemiology of blank shank of tobacco. *Phytopathology*, **68**: 1760-1765.
- KATAN, J. (1981). Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19**: 211-36.
- KEEN, N. T. (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production determinants of race specificity in pathogens ?. *Science*, **187**: 74-75.
- KEEN, N. T. & YOSHIKAWA, M. (1987). Physiology of disease and nature of resistance to *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 279-287.
- KEEN, N. T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Genetics*, **24**: 447-463.
- KHEW, K. L. & ZENTMYER, G. A. (1973). Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **63**: 1511-1517.
- KLEMNER, H. W. & NAKANO, R. Y. (1962). Techniques in isolation pythiaceous fungi from soil and diseased pineapple tissue. *Phytopathology*, **52**: 955-956. (cit: TSAO, 1987)

- KLIEJUNAS, J. T. & KO, H. W. (1976). Dispersal of *Phytophthora cinnamomi* on the island of Hawaii. *Phytopathology*, **66**: 457-460.
- KO, W. H. & CHANG, H. S., SU, H. J. (1978). Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **71**: 496-499. (cit: TSAO, 1987).
- LEMOINE, J. & GAUDIN, J. (1991). Porte-greffe du pommier et sensibilité au *Phytophthora cactorum*. *L'Arboriculture Fruitière*, **445** : 19-23.
- LEONIAN, L.H. (1934). Identification of *Phytophthora* species. Agric. Exp. Col. Agr. West Virginia Univ. *Bull.* , **262**. (Cit: GREUTE, 1961b).
- LINDERMAN, R. G. & ZEITOUN, F. (1977). *Phytophthora cinnamomi* causing root rot and wilt of nursery-grown native western azalea and salal. *Plant Dis. Rep.*, **6**: 1045-1048. (cit: TSAO, 1987).
- MAIA, M. L. R. M. M. (1988). *A silvicultura do castanheiro na região de Trás-os-Montes. Resultados preliminares*. Trabalho para efeitos de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Florestal Nacional - Bragança.
- MACKENZIE, D. R., ELLIOTT, V.J., KIDNEY, B.A., KING, E. D., ROYER, M. H. & THEBERGE, R. L. (1987). Application of modern approaches to the study of the epidemiology of diseases caused by *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 303-313.
- MALAJCZUK, N., McCOMB, A. J. & PARKER, C.A. (1977). Infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands of roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm.. *Aust. J. Bot.*, **25**: 483-500.
- MALAJCZUK, N. & McCOMB, A. J. (1977). Root exudates from *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm. seedlings and their effect on *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.*, **25**: 501-514.
- MALAJCZUK, N. (1987). Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 303-313.
- MANTAS, A. & SOUSA, A. T. (1991). Primeiras observações no controlo químico da "tinta do castanheiro" num souto. *Agricultura Transmontana*, **1**: 13-15.
- MARKS, G. A., KASSABY, F. Y. & REYNOLDS, S. T. (1972). Die-back in mixed hardwood forests of eastern victoria : A preliminary report. *Aust. J. Bot.*, **20**: 141-154.
- MARKS, G. A. & KASSABY, F. Y. (1974). Detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Aust. For.*, **36**: 198-203. (Cit: TSAO, 1987).

- MARKS, G. A., KASSABY, F. Y. & FAGG, P. C. (1975). Variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* in eucalyptus forest soils of easter Victoria. *Aust. J. Bot.*, **23**: 435-449.
- MARQUES, C. P. (1988). *Inventarição das Áreas e Produções dos Soutos em Trás-os-Montes*. Universidade de Trás- os Montes e Alto Douro, Vila Real, 21pp.
- MARTINS, ANABELA (1991). *Micorrização "in vitro" de plantas micropropagadas de castanea sativa Mill.*. Dissertação de mestrado em Secreção Vegetal e em Recursos Naturais Renováveis, Ramo de Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências, Lisboa.
- MARX, H. D. & BRYAN, W. C. (1970). The influence of soil bacteria on the mode of infection of pine roots by *Phytophthora cinnamomi*. In: *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens*. TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 171-172.
- MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M. & NAKANISHI, N. (1977). Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, **67**: 425-428.
- MCCAIN, J. W. (1988). Introduction to identification keys. In *Laboratory Exercises in Plant Pathology : An Instructional kit*. Teacher's Manual. BAUDOIN, A. B. A. M. (Ed.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 18-19.
- MCCOMB, J. A., HINCH, J. M. & CLARKE, A. E. (1987). Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **77**: 346-351.
- MCCREDIE, T. A., DIXON, K. W. & SIVASITHAMPARAM, K. (1985). Variability in the resistance of *Banksia* L. F. species to *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.*, **33**: 629-37.
- MIRCETICH, S. M. & ZENTMYER, G. A. (1970). Germination of chlamydospores of *Phytophthora*. In: *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens*. TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 112-115.
- MIRCETICH, S. M. & MATHERON, M. E. (1976). *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology*, **66**: 549-558.
- MULLICK, B. D. & JENSEN, G. D. (1973). New concepts in the terminology of coniferous periderms: necrophylactic and exophylactic periderms. *Can. J. Bot.*, **51**: 1459-70. (cit: TIPPETT *et al.*, 1985).
- MURRAY, D. I. L. (1987). Rhizosphere microorganisms from the jarrah forest of Western Australia and their effects on vegetative growth and sporulation in *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.*, **35**: 567-80.

- NATIVIDADE, J. VIEIRA (1944). *Bases para um Plano de Valorização e Reconstituição dos Soutos Portugueses*. Dact., Alcobaça, 9 pp.
- NAVE, B. E. & SAWHNEY, K. V. (1986). Enzymatic changes in post-meiotic anther development in *Petunia hybrida*. I- Anther ontogeny and isozyme analysis. *J. Plant Physiol.*, **125**: 451-464.
- NEHER, D. & DUNIWAY, J. M. (1991). Relationship between amount of *Phytophthora parasitica* added to field soil and the development of root rot in processing tomatoes. *Phytopathology*, **81** (10): 1124-1129.
- NELSON, R. (1978). Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **16**: 359-378.
- NESBITT, H. J., MALAJCZUK, N. & GLENN, A. R. (1979). Effects of organic matter on the survival of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil. *Soil Biol. Biochem*, **11**: 133-136.
- NEWHOOK, F. J., WATERHOUSE, G. M. & STAMPS, D. J. (1978). Tabular key to the species of *Phytophthora de Barry*. Micol. pap. **143**. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.
- NWAGA, D., LE NORMAND, M. & CITHAREL, J. (1990). Identification and differentiation of *Phytophthora* by electrophoresis of mycelial proteins and isoenzymes. *Bull. OEPP/EPPO*, **20**: 5-45.
- PARLEVLIET, J. E. & ZADOKS, J. C. (1977). The integrated concept of disease resistance; A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, **26**: 5-21.
- PARLEVLIET, J. E. (1979). Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **17**: 203-22.
- PEGG, K. G. (1977). Soil application of elemental sulphur as a control of *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot of pineapple. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, **17**: 859-865. (cit: TSAO, 1987).
- PETRI, L. (1917). Ricerche sulla morfologia e biologia della *Blepharospora cambivora* parasita del castagno. *Atti. Accad. Naz. Lincei, Rc.*, **26** : 287-299. (cit: BARRACHINA, 1977).
- PHILLIPS, D., GRANT, B. R. & WESTE, G. (1987). Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **77** (5): 691-697.
- PIMENTEL, A. A. LOPES (1947). A *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente, extremamente virulento, da "doença da tinta" do castanheiro. *Separata da Agronomia Lusitana*, Vol IX, Tomo III: 181-191.

- PRATT, R. G. & HEATHER, W. A. (1972). Method for rapid differentiation of *Phytophthora cinnamomi* from other *Phytophthora* species isolated from soil by lupin baiting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **59**: 87-96. (cit: TSAO, 1987).
- PULLMAN, G. S., DEVAY, J.E. & GARBER, R. H. (1981). Soil solarization and thermal death: A logarithmic relationship between time and temperature for soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, **71**: 959-964.
- RICCI, P., POPE-DE-VALLAVIEILLE, C., PANABIÈRES, F., MARAIS, A. & AUGÉ, G. (1990). Caractères comparés des espèces de *Phytophthora* pathogènes des agrumes. *Bull. OEPP/EPPO*, **20**: 19-28.
- RISTAINO, J. B. (1991). Influence of rainfall, drip irrigation, and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. *Phytopathology*, **81**: 922-929.
- RODRIGUES Jr, C. J. (1980). *Mecanismos de Resistência das Plantas aos Agentes Patogénicos*. Junta de Investigações Científicas do Ultramar. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, 67 pp.
- ROSENBAUM, J. (1917). Studies of the genus *Phytophthora*. *Jour. Agric. Res.*, **8**: 233-276. (cit: BARRACHINA, 1977).
- SALLESES, G., RONCO, L., CHAUVIN, J.-E. & CHAPA, J. (1993). Amélioration génétique du châtaignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. *L'Arboriculture Fruitière*, **458**: 23-31.
- SCHMITTHENNER, A. F. (1970). Significance of populations of *Pythium* and *Phytophthora* in soil. In: *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens*. TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 25-27.
- SHEA, S. R. & MALAJCZUK, N. (1977). Potencial for control of eucalypt dieback in Western Australia. In *Seminar Papers Annu. Conf. Aust. Nurserymen's Assoc. Ltd*, Hobart, Tas, pp. 13-19. (cit: MURRAY, D. I. L., DARLING, D. D., MCGANN, L. R. (1985). Indirect effect of floristic composition on production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in jarrah forest soils. *Aust. J. Bot.*, **33**: 109-13).
- SHEA, S. R., GILLEN, K. L. & LEPPARD, W. I. (1980). Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. sites in the northern jarrah forests of south-western Australia. *Prot. Ecol.*, **2**: 135-156. (cit: WESTE, 1987).
- SHEA, S. R. & BROADBENT, P. (1987). Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 335-350.

- SHEARER, B. L., MICHAELSEN, B. J. & WARREN, H. J. (1987). Comparative behaviour of *Phytophthora* species in the secondary phloem of stems and excised roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. *Aust. J. Bot.*, **35**: 103-10.
- SHEW, H. D., BENSON, D. M. & GRAND, L. F. (1979a). A comparison of baits for isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil. *Phytopathology*, **69**: 532 (Abstr.). (cit: TSAO, 1987).
- SHEW, H. D., BENSON, D. M. & GRAND, L. F. (1979b). A quantitative soil assay for *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **69** : 1045 (Abstr.). (cit: TSAO, 1987).
- SILVA, TELES (1908). *Portugal; Introdução Geográfica. Notas Sobre Portugal*. Lisboa. (cit: FERNANDES, 1955a).
- SNEATH, P.H. A. & SOKAL, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman Co., San Francisco, 132 pp. (cit: HO, 1981).
- STAMPS, D. J., WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J. & HALL, G.S. (1990). *Revised Tabular Key to the species of Phytophthora*. *Mycological papers*, **162**. C.A.B. International, Mycological Institute, 28 pp.
- STERN, E. R., ZENTMYER, G. A. & KANFMAN, M. R. (1977). The influence of matric potencial, soil texture, and soil amendment on root disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **67**: 1496-1500.
- TELHADA, J. A. (1988). *Micoses dos Citrinos Causadas por Espécies de Phytophthora. Contribuição Para o Seu Estudo em Portugal*. Dissertação para obtenção do grau de doutor em Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- TIPPETT, J. T., SHEA, R. S., HILL, T. C. & SHEARER, B. L. (1983). Development of lesions caused by *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of *Eucalyptus marginata*. *Aust. J. Bot.*, **31**: 197-210.
- TIPPETT, J. T., HILL, T. C. & SHEARER, B. L. (1985). Resistance of *Eucalyptus* spp. to invasion by *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, **33** : 409-18.
- TSAO, H. P. (1960). A serial dilution end point method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthoras* in soil. *Phytopathology*, **50**: 717-724.
- TSAO, H. P. & OCANA, G. (1969). Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature*, **233**: 636-638.
- TSAO, H. P. & GUY, O. S. (1977). Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* - isolation medium containig hymexazol. *Phytopathology*, **50**: 717-801.

- TSAO, H. P. (1987). Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp.219-236.
- TSAO, H. P. (1990). Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *Bull. OEPP/EPPO*, **20**: 11-17.
- TUCKER, C. M. (1931). Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Barry. *Missouri Agri. Exp. Sta. Res. Bull.*, **153**. (Cit: GREENTE, 1961b e BARRACHINA, 1977).
- TUITE, J. (1962). *Plant Pathological Methods : fungi and bacteria*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- UMAERUS, V., UMAERUS, M., ERGEFALT, L. & NILSSON, B. A. (1987). Control of *Phytophthora* by host resistance : Problems and Progress. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 315-326.
- URQUIJO, P. L. (1947). Revisión taxonómica de los hongos productores de la enfermedad del castaño llamada de la "tinta". *Estacion de Fitopatología Agrícola de la Coruña.Trabajos (serie Fitopatogía)*, **188**. Madrid.
- VAN DER PLANK, J. E. (1963). *Plant Diseases : Epidemics and Control*. Academic Press, New York, 349 pp.
- WATERHOUSE, G. M. (1963). *Key to the species of Phytophthora de Barry*. Mycol. pap., **92**. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England.
- WATERHOUSE, G. M. & WATERTSON, J. M. (1966). *Phytophthora cinnamomi*. Commonw. Mycol. Inst. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, n^o **113**. (cit: ZENTMYER, 1980).
- WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J. & STAMPS, D. J. (1987). Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 139-147.
- WESTE, GRETNA (1987). Population dynamics and survival of *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 237-257.
- WILKINSON, L. (1989). *Systat: the system for statistics*. Evanston, IL: Systat, Inc.
- WOODWARD, R. J., KEANE, P. J. & STONE, B. A. (1980). Structures and properties of wilt inducing polysaccharides from *Phytophthora* species. *Physiol.Plant Pathol.*, **64**: 439-454.

- ZADOKS, J. C. & SCHEIN, R. D. (1979). *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford Univ. Press, London and New York. (cit: FRY, 1982).
- ZAKI, A. I., ZENTMYER, G. A., PETTUS, J. J., SIMS, J. J. KEEN, N.T. & SING, O. V. (1980). Borbonol from *Persea* spp.- chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Plant Pathol.*, **16**: 205-212.
- ZENTMYER, G. A., GILPATRICK, J. D. & THORN, W. A. (1960). Methods of isolation *Phytophthora cinnamomi* from soil and from host tissue. *Phytopathology*, **50** : 87 (Abstr.). (cit: TSAO, 1987).
- ZENTMYER, G. A. & MIRCETHICH, S. M. (1965). Testing for resistance of avocado to *Phytophthora* in nutrient solution. *Phytopathology*, **55**: 487-489.
- ZENTMYER, G. A. (1970). Tactic responses of zoospores of *Phytophthora*. In: *Root Diseases and Soil- Borne Pathogens*. TOUSSON, T. A., BEGA, R. V. & NELSON, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, London, pp. 109-111.
- ZENTMYER, G. A. & OHR, H. D. (1978). Avocado root rot. Leaf. 2440. Univ. Calif.Div. Agric. Sci., Berkeley, 15 pp. (cit: TSAO, 1987).
- ZENTMYER, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. Monograph n° 10. Am. Phytopathol. Soc. St Paul, MN, 96 pp.
- ZENTMYER, G. A. (1981). The effects of temperature on growth and pathogenesis of *Phytophthora cinnamomi* and growth of its avocado host. *Phytopathology*, **71** (9): 925-928.
- ZENTMYER, G. A. (1987). The World of *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S. & TSAO, P. H. (Eds.). APS Press, St. Paul, MN, pp. 1-7.

ANEXO I

Clones de castanheiro resistentes à doença da tinta e vegetativamente propagados no ex. Centro Regional de Investigação e Desenvolvimento Agrário de Bragança

- Amôntoa – 9
- Amôntoa – 11
- Amôntoa – 12-B
- Amôntoa – 13
- Amôntoa – 17-B
- Amôntoa – 20-B
- Amôntoa – 21-B
- Amôntoa – 22
- Amôntoa – 41-B
- Amôntoa – 68-A
- Amôntoa – 89-A
- Amôntoa – 90
- Amôntoa – 110
- Amôntoa – 111
- Amôntoa – 116
- Amôntoa – 117-A
- Côta-sativa
- Crenata
- Cast. nº - 1104
- Cast. J. Sampaio
- Colarinha-sativa
- Crenata \times S \times C
- C \times S
- Enxertia japonês
- Enxertia-Tamagnini
- Enxertia nº 4
- Híbrido
- Híbrido Alcobaça
- Híbrido nº 4
- Híbrido nº 5
- Híbrido J-1-1160
- Híbrido Guedes
- Híbrido Sativa
- Híbrido crenata
- Híbrido nº 4 \times Sativa
- Japonês
- Longal \times Tamba-Gouri
- Molíssima
- M \times S \times C
- Moreira da Silva
- Resistente
- Sativa-Vimeiro
- S \times C
- (S \times C) \times S
- (S \times CC) \times (S \times C)
- S \times Tamagnini
- Sativa nº 1
- Sativa nº 2
- Sativa nº 12
- Tamagnini
- Tamba-Gouri

ANEXO II

Perfil das proteínas miceliais dos 8 isolamentos de *Phytophthora*
em PhastGel IEF 4-6,5 e sua ampliação fotográfica

