

**Efeito da aplicação ao solo dos fertilizantes silicato de potássio, Eurofit Max<sup>®</sup> e do fungicida Ridomil Gold<sup>®</sup> [40% de Folpete (p/p) e 5% de metalaxil-M], no controlo da Doença da Tinta do Castanheiro**

**Jorge Nuno Rodrigues Lopes Alves do Rosário**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para  
obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia*

Orientado por

**Professora Doutora Maria Eugénia Madureira Gouveia**

**Professor Doutor Manuel Ângelo Rosa Rodrigues**

**Bragança**

**2019**

Este trabalho foi financiado pelo do projeto (NORTE-02-0246-FEDER-000026) TRANSFER+.TEC.CASTANHA / Reforço da transferência de conhecimento científico e tecnológico da fileira da castanha para o setor empresarial.



**Agradecimentos:**

A toda a minha família e principalmente aos meus queridos pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional.

Aos meus orientadores Professora Maria Eugénia Madureira Gouveia e ao Professor Manuel Ângelo Rodrigues por tudo o que me ensinaram, pelo apoio científico, incentivo e disponibilidade.

Ao Valentim Coelho e a todos os outros elementos do laboratório de Sanidade Vegetal da Escola Superior Agrária, pela amizade, conselhos e apoio à conclusão desta dissertação.

Registro meu agradecimento ao Laboratório de Solos do IPB, pelo suporte durante as análises. Agradeço a Prof. Margarida Arrobas, Sandra Afonso, Soraia Raimundo, Rita Diniz e Ana Pinto por tudo o que me ensinaram, pelo apoio científico, incentivo e disponibilidade.

Ao Amílcar Pimentel e a todos os outros elementos das estufas da Escola Superior Agrária pela ajuda na fase experimental deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas que me ajudaram na realização deste trabalho. Por fim, agradeço à todos que de uma forma ou outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado

## RESUMO

Em Portugal a área de castanheiro e a produção de castanha têm aumentado, mas continuam a existir limitações ao aumento da produtividade nesta cultura. Essas limitações devem-se essencialmente aos prejuízos associados às doenças do castanheiro (Doenças da Tinta do Castanheiro e do Cancro do Castanheiro) e também aos prejuízos provocados por pragas da castanha (Gorgulho-da-castanha e Traça-da-castanha). A Doença da Tinta do Castanheiro está associada a espécies do género *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi* Rands e *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman) que atacam as raízes. Em consequência da infeção do sistema radicular há uma redução do transporte de água, nutrientes e sais minerais, o que implica perdas na produção de madeira, redução na produção de castanha e conduz à morte das árvores afetadas. Com este trabalho pretendeu-se conhecer o efeito da aplicação ao solo dos fertilizantes silicato de potássio (40Be-SiO<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O) e fosfonato potássico (Eurofit Max<sup>®</sup>) e do fungicida Ridomil Gold<sup>®</sup> [40% de Folpete (p/p) e 5% de metalaxil-M] no controlo da Doença da Tinta do Castanheiro. Foi também monitorizado o estado nutricional das árvores com base na análise dos tecido vegetais e avaliado o efeito dos tratamentos na fertilidade do solo tendo por base a determinação de parâmetros relacionados como o teor de nutrientes, matéria orgânica, pH e complexo de troca. O estudo realizado confirmou a presença da espécie *P. cinnamomi* no substrato utilizado no ensaio (solo de castanheiros com sintomas da doença e perlite na proporção de 3:1 (v/v), espécie que foi igualmente detetada no final do ensaio em todos os tratamentos em estudo. Os resultados do ensaio evidenciam que o fungicida Ridomil Gold<sup>®</sup> conferiu o maior grau de proteção em relação ao desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro não tendo ocorrido mortalidade das plantas até ao final do ensaio (setembro de 2018). O silicato de potássico com 56% de plantas vivas e o Eurofit com 67 % de plantas vivas no final do ensaio conferiram também um grau de proteção em relação à Doença da Tinta do Castanheiro que pode ser considerado elevado. Os resultados do efeito dos tratamentos nas propriedades do solo evidenciam que o fungicida Ridomil Gold<sup>®</sup> não alterou as características do solo quando comparado com o solo testemunha, exceto o pH em água e o sódio em troca, enquanto os fertilizantes introduziram alterações significativas no valor do pH, bases, acidez e alumínio de troca e capacidade de troca catiónica efetiva (CTCe) assim como nos macro e micronutrientes extraíveis no solo no fim do ensaio. A análise dos tecidos vegetais revela que a quantidade de macro e

micronutrientes exportados pelas plantas está associado a presença do elemento no produto comercial ou a alterações na disponibilidade no solo devido à solubilização do nutriente que o tornou mais disponível para as plantas.

Os dados obtidos no ensaio realizado em estufa em substrato de terra naturalmente infetado com *P. cinnamomi* permitem obter informações relacionadas com as plantas e o solo que permitem delinear estratégias de proteção e impedir a dispersão da doença quando os castanheiros evidenciam sintomas de Doença da Tinta do Castanheiro no campo.

## ABSTRACT

In Portugal, the cultivated area of chestnut trees and the production of chestnuts are increasing. However, there are still limitations for increasing the productivity in this crop. Such limitations are essentially related to the damages caused by pests (ink disease and chestnut blight) and the chestnut nut insects (weevil and the chestnut moth). The chestnut ink disease is associated with species of the genus *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi* Rands and *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman) that infect the tree roots. The roots infection depends directly on moisture and temperature conditions of the soil, being spring, the time of the year, when conditions for infection are most favorable. The presence of free water in the soil induces the release of zoospores which are able to move by their flagella, and, therefore, are able to find the host. As a result of the radicular system rottenness, a reduction in the transport of water, nutrients, and minerals is observed. The infection causes losses in the production of wood, chestnuts nuts and leads to the death of the affected trees. With this work it is intended to study the effect of the application to the soil of potassium silicate (40Be-SiO<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O), potassium phosphonate (Eurofit MaxR), and the product Ridomil Gold Combi Pépite (40% of Folpete (w/w) and 5% of metalaxyl-M) in the control of chestnut ink disease. It is also intended to monitor the nutritional status of the trees based on the analysis of the plant tissues; evaluate the effect of the treatments applied in soil fertility through the determination of parameters related to nutrients content, organic matter, and pH. *P. cinnamomi* was detected and identified in the test substrate (soil of chestnut-trees with symptoms of the disease and perlite at a ratio of 3:1 (v/v), species also detected at the end of the test in all treatments under study. The results show that the fungicide Ridomil Gold<sup>®</sup> provided the highest degree of protection to Chestnut Ink Disease and no plant mortality occurred til the end of the assay (september 2018). Potassium silicate with 56% of live plants and Eurofit with 67% of live plants at the end of the trial also gave a degree of protection against Chestnut Ink Disease that can be considered high. The fungicide Ridomil Gold<sup>®</sup> did not change characteristics of the soil, when compared to the control soil, except the pH in water and exchangeable sodium, while the fertilizers (Potassium silicate and Eurofit) introduced significant changes in the pH value, bases, acidity, and exchangeable aluminium and effective cation exchange capacity (CTCe) as well as soil extractable macro and micronutrients at the end of the test. Plant tissue analysis shows that the amount of macro and micronutrients exported by plants is

associated with the presence of the element in the commercial fertilizers product or with changes in soil availability due to the solubilisation of the nutrient that made it more available to plants.

The results from the greenhouse trial provide information to design strategies of protection to prevent disease dispersal when chestnut trees show symptoms of the Chestnut Ink Disease in the field.

## Índice

RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
Lista de Figuras: .....	ix
Índice de Tabelas .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. Sintomas da Doença da Tinta do Castanheiro .....	2
1.2. Substâncias químicas utilizadas no combate à Doença da Tinta do Castanheiro ..	3
1.2.1. Fungicidas .....	4
1.2.1.1. Produtos homologados .....	4
1.2.2. Outras substâncias químicas .....	4
1.2.2.1. Metalaxil .....	4
1.2.2.2. Fosfonato .....	5
1.2.2.3. Silicato de potássio .....	6
1.3. Nutrição em castanheiros .....	7
<b>2. OBJECTIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1. Material biológico .....	12
3.1.1. Plantas .....	12
3.1.2. Solo .....	12
3.2. Substratos .....	12
3.2.1. Substrato dos vasos .....	12
3.3. Substâncias ativas .....	12
3.3.1. Fosfito (fosfonato potássico) .....	12
3.3.2. Metalaxil .....	13
3.3.3. Silicatos .....	13
3.4. Efeito das substâncias ativas no desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro .....	13
3.4.1. Parâmetros fisiológicos avaliados .....	15
3.4.2. Sintomatologia .....	15
3.4.2.1. Identificação das espécies .....	15
3.5. Determinações laboratoriais .....	16
3.5.1. Análise de solos .....	16
3.5.2 Análises de tecidos vegetais .....	19

3.6. Cálculo da quantidade exportada de macro e micronutrientes.....	21
3.7. Análise estatística .....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Efeito das substâncias ativas no desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro .....	24
4.1.2. Avaliação dos parâmetros fisiológicos.....	24
4.1.1. Avaliação da sintomatologia.....	27
4.2. Determinações laboratoriais .....	30
4.2.1. Análises de solos.....	30
4.2.2. Análises dos tecidos vegetais.....	32
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	40
6. CONCLUSÕES .....	46
7. Referências bibliográficas .....	48

## Lista de Figuras:

Figura 1. Castanheiro atacado pela doença da tinta .....	3
Figura 2. Disposição dos vasos de 4 l de capacidade na bancada. ....	14
Figura 3. Castanheiro (esquerda), colo e raiz de castanheiro (direita) com sintomas da doença da tinta do castanheiro.....	16
Figura 4. Método de armadilha biológica com discos de folhas de castanheiro. ....	16
Figura 5. Espectrofotómetro UV/VIS T80 PG Instrument Lda .....	18
Figura 6. Moinho Cyclotec.....	19
Figura 7. Equipamento Kjeltec TM 8400 Analyser unit FOSS.....	20
Figura 8. Equipamento PYE Unicam PU 9100X .....	21
Figura 9. Altura média dos castanheiros no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). ....	25
Figura 10. Média do diâmetro do caule dos castanheiros no final do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). ....	25
Figura 11. Matéria seca produzida nas raízes, caules e folhas e na totalidade da planta no final do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas para o mesmo componente da planta indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). Letras minúsculas indicam a separação de médias de cada componente individualmente e as maiúsculas a separação de médias da matéria seca total. ....	26
Figura 12. Mortalidade (%) dos castanheiros por tratamento no final do ensaio. ....	27
Figura 13. Percentagem de mortalidade nas diferentes modalidades ensaiadas.....	28

## Índice de Tabelas

Quadro 1. Valores normais para as concentrações foliares em castanheiro em Trás-os-Montes (Adaptado de Arrobas <i>et al.</i> , 2018).....	8
Quadro 2. Crescimento do ano e diâmetro do colo nas modalidades ensaiadas [Testemunha (Test), Eurofit, Silicato de potássio (Sil K) e Ridomil]. ....	24
Quadro 3. Número médio (média±desvio padrão) de folhas por planta ao longo do tempo de ensaio nas diferentes modalidades.....	26
Quadro 4. Detecção de <i>Phytophthora</i> nas diferentes modalidades ensaiadas e tempos de armadilhagem. ....	29
Quadro 5. Identificação das espécies e percentagem de identidade nucleótida de cada espécie identificada. ....	29
Quadro 6. Matéria orgânica, pH, bases, acidez e alumínio de troca e capacidade de troca catiónica efetiva (CTCe) no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. .	30
Quadro 7. Macro e micronutrientes extraíveis no solo no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	31
Quadro 8. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca das raízes no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	32
Quadro 9. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca dos caules no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	33
Quadro 10. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca das folhas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	35
Quadro 11. Quantidade de macro e micronutrientes exportada nas raízes no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	35
Quadro 12. Quantidade de macro e micronutrientes exportada nos caules no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	36
Quadro 13. Quantidade de macro e micronutrientes exportados nas folhas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	37
Quadro 14. Quantidade de macro e micronutrientes exportados na totalidade das plantas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. ....	38

# Capítulo I

## Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019) estima que a produção mundial de castanha em 2017 tenha sido de 2,3 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor com 1,9 milhões de toneladas. A Europa é responsável pela produção de 151903 toneladas, sendo os principais produtores a Turquia (62904 t), a Itália (52356 t), a Grécia (36000 t) e Portugal (29875 t).

De acordo com dados Instituto Nacional de Estatística (INE, 2019), a área da cultura do castanheiro em Portugal totalizava 38874 ha em 2018, a que correspondeu uma produção total de 34131 toneladas e uma produtividade média de cerca de 0,88 t/ha.

Aumentar a produtividade da cultura significa diminuir os prejuízos provocados por pragas (gorgulho-da-castanha e traça-da-castanha) e também os prejuízos associados às doenças do castanheiro (Tinta e Cancro). O castanheiro é uma espécie de suscetibilidade bastante pronunciada a certas doenças graves, como a Doença da Tinta (*P. cinnamomi* e *P. cambivora*) e o cancro (*Cryphonectria parasitica* (Murill.) Barr.) (Gouveia *et al.*, 2016), as quais têm sido responsáveis pela redução da área de distribuição em toda a Europa (Vannini & Vettrano, 2001; Vettrano *et al.*, 2005).

A Doença da Tinta do Castanheiro está associada a espécies do género *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi* Rands e *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman) que atacam as raízes.

## 1.1. Sintomas da Doença da Tinta do Castanheiro

Os sintomas da Doença da Tinta são diversos e começam frequentemente na parte superior da copa a partir das extremidades dos ramos, com cloroses nas folhas, enrolamento e senescência foliar. Estas folhas ficam amareladas e murcham, acabando por cair prematuramente. Alguns ouriços e folhas secam rapidamente, ficam com um tamanho reduzido e mantêm-se firmemente agarrados aos ramos durante um ou dois anos (figura 1).

A doença é detetada quando se observa uma mancha em forma de cunha na zona do colo. Ao nível do colo e por baixo da casca observa-se uma podridão com manchas irregulares e de cor violácea com exsudações de cor violeta ou azul-escuro devido a oxidação dos fenóis libertados pelas células corticais, do floema ou do câmbio (Carvalho, 2014).

O conjunto de sintomas que caracteriza a Doença da Tinta é muito evidente em termos de diagnóstico quando a doença se encontra em estado muito avançado de evolução. Nesta fase todos os tratamentos têm um efeito reduzido o que contribui para aumentar a dispersão da doença nos sotos.



Figura 1. Castanheiro atacado pela Doença da Tinta (Fotografia amavelmente cedida por Valentim Coelho)

Quando a doença se manifesta no castanheiro o tratamento do solo com substâncias químicas é em muitas situações a única solução disponível para reduzir a doença nos sotos.

## **1.2. Substâncias químicas utilizadas no combate à Doença da Tinta do Castanheiro**

Os tratamentos químicos propostos para tratamento da Doença da Tinta são muito diversos tais como pulverização da copa das árvores infetadas com fungicidas e

adubações foliares, injeções no tronco das árvores doentes e aplicação de diferentes produtos fungistáticos às raízes doentes e ao solo.

## **1.2.1. Fungicidas**

### **1.2.1.1. Produtos homologados**

Em Portugal estão homologados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2019) para tratamentos da Doença da Tinta do Castanheiro os produtos com as substâncias ativas de oxiclureto cobre e hidróxido de cobre e o fosetil na forma de sal de alumínio.

O oxiclureto e hidróxido de cobre estão aconselhados para aplicar de janeiro a fim de março, se possível em período de chuva. Recomenda-se a aplicação de 1 a 4 litros de calda à volta do tronco num raio de um metro e no tronco até um metro de altura. Repetir o tratamento durante pelo menos cinco anos e repetir a série de cinco tratamentos anuais, passados 5-10 anos.

O fosetil de alumínio (fosetil-Al) é aconselhado para se iniciarem os tratamentos em viveiros, quando as plantas tenham 4 a 6 folhas definitivas, entre os meses de maio a junho. Em soutos estabelecidos deve-se aplicar o tratamento durante o período de desenvolvimento vegetativo, na Primavera até finais de junho, antes da floração, pulverizando até ao escorrimento. Se necessário repetir os tratamentos a intervalos de um mês.

## **1.2.2. Outras substâncias químicas**

### **1.2.2.1. Metalaxil**

O aparecimento do metalaxil representou um grande avanço na luta química contra a podridão radicular e outras podridões causadas por espécies do género *Phytophthora*. Do grupo das fenilamidas, o metalaxil é a substância ativa mais usada. É solúvel em água e eficaz contra todas as espécies de *Phytophthora*, não afetando porém fungos não pertencentes à classe Oomycetes. É um fungicida sistémico, com translocação apoplástica, que interfere com a síntese de RNA das espécies de *Phytophthora*, podendo ser aplicado como fungicida terapêutico (curativo) em plantas já infetadas.

A grande desvantagem do metalaxil, assim como de outros fungicidas semelhantes, está na sua ação predominantemente fungistática, ou seja, a não destruição da população de oomicetas no solo. Assim, quando o metalaxil é quimicamente transformado no solo o inóculo latente de *Phytophthora* pode reaparecer e repor concentrações de inóculo suficientes para gerar doenças letais, devido à sua capacidade de rápida regeneração. Apesar de ainda não haver evidências de desenvolvimento de resistência ao metalaxil por parte da espécie *P. cinnamomi* (e outros agentes patogênicos do solo), este fenômeno constitui um problema na medida em que ao aplicar o fungicida, as populações resistentes rapidamente vão dominar em relação às que são sensíveis.

#### **1.2.2.2. Fosfonato**

Os fosfonatos foram inicialmente estudados como fertilizantes na Alemanha e nos Estados Unidos durante as décadas de 1930 e 1940 (Guest & Grant, 1991).

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

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

Considerando que o ião fosfito tem pouco ou nenhum efeito no metabolismo do fósforo na planta, parece improvável que possa prevenir doenças por estimulação das defesas do hospedeiro. Todavia, alguns estudos revelam que quando certas espécies de *Phytophthora* infetam determinadas espécies de plantas tratadas com fungicidas fosfonatos, são produzidos inibidores químicos do fungo chamados fitoalexinas (Landschoot & Cook, 2005). Um recente estudo envolvendo *Eucalyptus* mostrou que a

concentração de ião fosfito na planta pode determinar a dimensão da ativação das defesas do hospedeiro.

Num estudo em estufa para avaliar eficácia do tratamento com fosfonato potássico, (Atlante<sup>®</sup>) com carácter preventivo e por aplicação foliar, na proteção das raízes do castanheiro em relação *P. cinnamomi*, Coelho (2009) verificou que a aplicação de fosfonato potássico protegeu o sistema radicular uma vez que passados quatro meses após a aplicação a grande maioria das raízes não apresentavam sintomas de podridão radicular relativamente às plantas em que não foi aplicado fosfonato potássico e que apresentavam todo o sistema radicular infetado por *P. cinnamomi*.

### **1.2.2.3. Silicato de potássio**

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na superfície da Terra (Bélanger *et al.*, 1995, Fawe *et al.*, 1998). O Si na solução do solo é facilmente absorvido pelas raízes das plantas, sob a forma de ácido silícico,  $H_4SiO_4$ , em concentrações normalmente entre 9,6 e 57,6 mg  $l^{-1}$ . Dentro dos tecidos de plantas o Si é depositado no lumen, paredes e espaços intercelulares das células (Epstein, 1994, Schuerger & Hammer, 2003) Como consequência, o Si está presente no tecido da planta em concentrações que variam de menos de 1% a mais de 10% da matéria seca total em algumas plantas, conhecidas como acumuladores de Si (Epstein, 1994). Apesar de ser um constituinte importante dos tecidos vegetais, o Si não é considerado um elemento essencial. No entanto, há relatos de que a omissão de Si da solução nutritiva levou a sintomas severos de deficiência, como clorose das folhas e depressão na formação de flores e frutos em pepino (Marschner *et al.*, 1990).

O efeito do Si no crescimento e desenvolvimento de doenças nas plantas está relacionado com a interação do Si com outros nutrientes das plantas. Sistani *et al.* (1998) relataram que as plantas de arroz respondem tanto ao Si quanto a aplicação de N e P.

Nas folhas de cana-de-açúcar a aplicação de fertilizantes de silicato aumenta os níveis de P, Si, Ca e Cu e reduz os níveis de N, K, Mg, Fe, Mn e Zn (Elawad *et al.*, 1982). E segundo Sistani *et al.* (1998) os silicatos aumentam também o pH, Si, P, Ca e Mg no solo. Ainda foi relatado que o conteúdo de nutrientes (incluindo Si) do abacate influencia a qualidade da fruta e o número de dias para que a fruta atinja a maturação (Hoffman *et al.*, 2002). Wutscher (1989) descreveu uma forte interdependência entre os

níveis de Si e os de S, P, Fe, Mg, Mn, Cu, Zn e Mo, especialmente na casca, folhas e raízes finas da Laranjeira “Valência late” (*Citrus sinensis* L.). Morikawa & Saigusa (2003) relataram que o teor médio de N, K, Mg, Cu e Zn é menor nas folhas velhas quando comparadas às folhas novas, enquanto os teores de P, Ca, Fe, Mn e Si são mais altos nas folhas velhas.

Santos (2015) indica a redução da fitotoxicidade de Fe e Mn, devido a criação de condições de oxidação pelo Si, devido ao importante aumento da quantidade de oxigênio molecular que é veiculado pela parte aérea da planta para a raiz. O silício pode aliviar essa toxicidade não apenas porque reduz a absorção, mas também aumenta o nível de tolerância interna da planta para excesso desses elementos no tecido.

Embora o silício não afete a disponibilidade de P para absorção das raízes na solução do solo, ele aumenta a absorção de P em solos ácidos (Clements, 1965), melhora a disponibilidade de P através da diminuição da captação de Mn e assegura um bom transporte por toda a planta (Ma & Takahashi, 2002). Ma (1990) relatou que o silício aumenta a concentração de P em partes de plantas fotossinteticamente ativas da cultura de arroz, mas que isso não ocorre quando a nutrição de P é alta. Isso pode sugerir que sob baixo stresse de P, a utilização deste pode ser melhorada pela adição de silício. Sob condições de alto P disponível, o silício reduz a absorção de P.

O silicato de potássio é um fertilizante de liberação lenta, apareceu pela primeira vez em 1978 (Ma & Takahashi, 2002). A adubação com Si em plantas de castanheiro aparece como um possível indutor de resistência contra infecção por *P. cinnamomi* (Carneiro-Carvalho *et al.*, 2017). Considerando o potencial do Si que atuam como barreira mecânica devido à silicificação das células leva ao aumento da resistência da parede celular dificultando a entrada do oomiceta, seu desenvolvimento e respectivas colonização tornando as paredes da planta mais grossas e rígidas, sendo uma das explicações para o número reduzido de hifas e oosporos observados em cortes de raízes de plantas tratadas com Si comparado ao controle, como verificado por Monteiro *et al.* (2017).

### **1.3. Nutrição em castanheiros**

No Nordeste de Portugal, as áreas com soutos apresentam valores de acidez de solo elevados, baixo teor de matéria orgânica, baixos valores de fósforo e alto teor de potássio segundo estudos realizados por Arrobas *et al.* (2018). No entanto, quando

correlacionados com o estado nutricional da planta através das análises foliares, houve pouca ou nenhuma relação entre a fertilidade do solo e o estado nutricional da planta. No quadro 1, mostram-se os valores normais de acordo com os valores propostos por Arrobas *et al.* (2018) para as concentrações foliares em castanheiro na região de Trás-os-Montes.

Quadro 1. Valores normais para as concentrações foliares em castanheiro em Trás-os-Montes (Adaptado de Arrobas *et al.*, 2018)

N	P	K	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Zn	Mn
20-28	1,1-3,0	g kg <sup>-1</sup> 7,5-18	5,0-15	1,5-6	20-100	4,0-40	mg kg <sup>-1</sup> 10-300	15-75	100-2000

Noutro trabalho de Arrobas *et al.* (2017), em que se avaliou o crescimento inicial de plantas de castanheiro durante 4 anos, foi mostrado que o castanheiro apresenta tolerância moderada a solos ácidos, pois quando realizada a calagem em um solo com pH inicial de 5,5 o crescimento das árvores não foi influenciado em comparação com a modalidade testemunha. Mas os tratamentos em que não foi aplicado potássio ou boro mostraram um crescimento inicial das plantas mais reduzido.

Azevedo (2014) avaliou a resposta do castanheiro à correção do pH e à ausência de fertilização dos elementos N, P, K e B. O estudo mostrou que o boro foi o elemento que mais limitou o crescimento das árvores, através da redução da altura e diâmetro do tronco.

Portela *et al.* (2010) avaliou a relação entre os altos teores de manganês no solo em soutos na região Norte de Portugal e as condições ácidas do solo e verificou o aparecimento de deficiência de magnésio nos castanheiros quando os níveis de manganês no solo eram elevados.

# Capítulo II

## Objetivos

## **2. OBJECTIVOS**

Com este trabalho pretende-se:

1) Conhecer o efeito da aplicação ao solo de silicato de potássio ( $40\text{Be-SiO}_2\cdot\text{K}_2\text{O}$ ), fosfonato potássico (Eurofit Max) e Ridomil Gold Combi Pélite (40% de Folpete (p/p) mais 5% de metalaxil-M (p/p)) no controlo da Doença da Tinta do Castanheiro;

2) Avaliar o efeito dos tratamentos na fertilidade do solo tendo por base a determinação de diversos parâmetros, como o teor de nutrientes, a matéria orgânica e o pH;

3) Monitorizar o estado nutricional das árvores com base na análise dos tecidos vegetais.

# Capítulo III

## Materiais e Métodos

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Material biológico**

#### **3.1.1. Plantas**

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

#### **3.1.2. Solo**

O solo utilizado neste ensaio foi proveniente de sotos com castanheiros que apresentavam sintomatologia de Doença da Tinta do Castanheiro da região de Bragança.

### **3.2. Substratos**

#### **3.2.1. Substrato dos vasos**

Ao solo proveniente do campo foi adicionado perlite na proporção de 3:1 (v/v). O substrato de plantação foi colocado em vasos com 4 litros de capacidade.

### **3.3. Substâncias ativas**

#### **3.3.1. Fosfito (fosfonato potássico)**

Utilizou-se um fertilizante bioestimulante e ativador das defesas naturais da planta que é vendido com o nome comercial de Euro Fit Max. É constituído por 3% de azoto, 2% na forma amoniacal e 1% na forma ureica, por 35% de pentóxido de difósforo ( $P_2O_5$ ), 0,2% de ferro, 2,8% de magnésio e 1% de zinco, sendo estes nutrientes solúveis em água. O produto apresenta uma densidade de 1,53. O Euro Fit Max apresenta-se como sendo um complexo que através dos seus três efeitos de atuação (efeito elicitor, efeito sinal e efeito mineral), estimula os mecanismos naturais de defesa das plantas, ativando a produção de recetores que participam na identificação e controlo de certos agentes patogénicos. O produto apresenta os benefícios de proteger as plantas de agressões por agentes patogénicos, diminuindo o aparecimento de infeções causadas por

fungos parasitas e garantindo uma adequada nutrição em micronutrientes essenciais e aumentando a eficácia de absorção dos nutrientes. O pH é de 0,3.

O produto foi preparado numa concentração de 4 ml/l e aplicado no dia 7 e 27 de maio de 2018.

### **3.3.2. Metalaxil**

Foi utilizado o Ridomil Gold Combi Pélite que é um fungicida de superfície e sistémico à base de 40% (p/p) folpete mais 5% (p/p) metalaxil-M. No rótulo informa que tem atividade preventiva e curativa, quando aplicado próximo das contaminações. O folpete pertence à família química das fetalimidias; inibe vários processos metabólicos, atuando em diversas enzimas. O folpete possui atividade preventiva. O metalaxil-M pertence à família química das fenilamidas e inibe a síntese de ácidos nucleicos, atuando na RNA polimerase I. A atividade curativa é de 14 dias, devendo o intervalo após um tratamento com este produto e um não curativo ser de 12 dias. Devem realizar-se no máximo 2 tratamentos com este produto ou outro do grupo químico das fenilamidas.

Neste trabalho, utilizou-se uma concentração de 2 g l<sup>-1</sup>, que foi aplicado no dia 7 e 27 de maio de 2018.

### **3.3.3. Silicatos**

Silicato de potássio (40Be-SiO<sub>2</sub>.K<sub>2</sub>O) é um líquido semitransparente e inodoro, com uma constituição química de 25 a 27% de SiO<sub>2</sub> e 12 a 13% de K<sub>2</sub>O. Apresenta uma relação molar de 3,13 a 3,37. Com densidade real a temperatura de 20 °C de 39 a 40 °Be (Baumé) e uma viscosidade medida à mesma temperatura de 800 a 1000 cP.

No ensaio utilizou-se uma concentração de 4 ml l<sup>-1</sup> que foi aplicado com 20 dias de intervalo durante o mês de maio de 2018.

## **3.4. Efeito das substâncias ativas no desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro**

Para se avaliar o efeito das substâncias ativas no desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro em plantas jovens, foi instalado um ensaio nas estufas da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. As plantas de castanheiro foram plantadas nos vasos contendo o substrato (solo + perlite) e dispostas numa bancada,

com rega semanal por inundação e rega por nebulização a intervalos regulares durante o período diurno (figura 2). Cada vaso continha uma planta e os vasos mantiveram-se em estufa durante um ano.

O ensaio contou com quatro tratamentos: três substâncias ativas silicato de potássio (40Be-SiO<sub>2</sub>.K<sub>2</sub>O) (4 ml l<sup>-1</sup>), fosfonato potássico (Eurofit) (4 ml l<sup>-1</sup>) e Ridomil GoldR (40% (p/p) folpete + 5% (p/p) metalaxil-M) (2 g l<sup>-1</sup>) e um tratamento testemunha onde não foi aplicado qualquer substância ativa. As experiências em vasos foram organizadas de forma completamente causalizada. Numa fase inicial, em 36 vasos onde as plantas evidenciaram sintomas e morreram, foram replantadas, novas plantas de castanheiro.



Figura 2. Disposição dos vasos de 4 l de capacidade na bancada.

As substâncias ativas foram diluídas num copo de vidro contendo 500 ml água corrente, segundo as concentrações indicadas anteriormente, sendo o conteúdo de cada copo vertido diretamente ao solo do vaso à volta da planta. As substâncias ativas utilizadas neste ensaio foram aplicadas ao solo em duas épocas diferentes. A primeira aplicação foi realizada no dia 7 de maio de 2018. A segunda aplicação foi realizada 20 dias após a primeira aplicação.

### 3.4.1. Parâmetros fisiológicos avaliados

Foram realizadas as medições do crescimento, do crescimento total e do diâmetro ao nível do colo, em todas as plantas nos dias 21 de setembro de 2017 e nos dias 11 de abril, 29 de maio, 2 de julho, 7 de agosto e 14 de setembro de 2018.

A biomassa foi determinada, considerando as diferentes partes da planta, designadamente folhas, caules e raízes, no fim do ensaio. O material fresco foi pesado e posto a secar numa estufa regulada a 65 °C até peso constante.

### 3.4.2. Sintomatologia

Avaliou-se a sintomatologia na parte aérea da planta, de 15 em 15 dias durante todo o período do ensaio (figura 3).

O solo dos vasos foi utilizado para o isolamento de *Phytophthora*, utilizando o método de armadilha biológica com discos de folhas de castanheiro (figura 4) proposto por Gouveia *et al.* (2009). De cada vaso, foram recolhidos 20 ml de solo e colocado numa placa de Petri de 120 mm de diâmetro. Em cada placa foram adicionados 8 ml de água destilada e colocaram-se vinte discos de 0,5 cm de diâmetro de folhas de castanheiros. As placas foram deixadas à temperatura ambiente e após 24, 48 e 72 horas retiraram-se três folhas de cada placa e foram colocadas a crescer em meio de cultura seletivo PARPH (Pimaricina, 5 mg l<sup>-1</sup>; Ampicilina, 250 mg l<sup>-1</sup>; Rifampicina, 10 mg l<sup>-1</sup>; Hymexazol, 25 mg l<sup>-1</sup>). A presença de *Phytophthora* foi confirmada por observação microscópica, ao nível das hifas.

Após crescimento micelial repicou-se o micélio para meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar, Difco 39 g l<sup>-1</sup>) para posterior identificação molecular das espécies.

#### 3.4.2.1. Identificação das espécies

A identificação das diferentes espécies de *Phytophthora* baseou-se em características morfológicas e métodos moleculares por amplificação e sequenciação da região ITS, do DNA ribossomal (rDNA) com a utilização dos iniciadores universais ITS4 e ITS6 (White *et al.*, 1990) e comparadas com as sequências publicadas nas bases de dados do GenBank, BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A extração de DNA foi realizada com o kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) e o kit REDExtract-N-Amp™ PCR (Sigma-Aldrich), e a sequenciação de região amplificada foi realizado pelos laboratórios Stabvida (Caparica, Portugal). Cada espécie foi

classificada taxonomicamente de acordo com o MycoBank Database ([www.micobank.org](http://www.micobank.org)).



Figura 3. Castanheiro (esquerda), colo e raiz de castanheiro (direita) com sintomas da Doença da Tinta do Castanheiro.



Figura 4. Método de armadilha biológica com discos de folhas de castanheiro.

### **3.5. Determinações laboratoriais**

#### **3.5.1. Análise de solos**

As amostras de solos foram colhidas em todos os vasos no final das experiências. As amostras recolhidas foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e foram secas numa estufa de ventilação forçada a 65 °C, até obter peso contante. Posteriormente foram crivadas com auxílio de um crivo de malha de 2 mm, sendo as

determinações analíticas efetuadas na fração terra fina (< 2mm). As análises efetuadas são descritas a seguir.

**Matéria orgânica** - foi determinada pelo método Walkley Black, que consta numa digestão húmida da matéria orgânica da amostra de solo com a mistura de dicromato de potássio e ácido sulfúrico a uma temperatura de aproximadamente 120 °C durante 30 minutos para oxidar formas de carbono orgânico facilmente oxidáveis. Para a determinação do carbono facilmente oxidável, o dicromato residual foi titulado com sulfato de ferro e o teor de matéria orgânica foi estimado através da multiplicação da percentagem de carbono pelo fator 1,72, associando a suposição de que a matéria orgânica da amostra de solo contém cerca de 58% de carbono (Van Reeuwijk, 2002).

**pH em água** - Preparou-se uma amostra com proporção entre solo e água de 1 para 1,25 (p/v), agitou-se por 2 horas e fez-se a leitura por potenciometria.

**pH em cloreto de potássio** - Preparou-se uma amostra com proporção de 1 para 2,5 (p/v) solo e solução de 1M KCl, agitou-se por 2 horas e fez-se a leitura por potenciometria.

**Capacidade de troca** – foram pesadas 2,5 gramas de solo e adicionados a 50 ml de uma solução de acetato de amónio tamponizada a pH 7 e após 30 minutos de contacto e agitação, os catiões  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  foram determinados no extrato filtrado por espectrofotometria de absorção atómica (Van Reeuwijk, 2002) num equipamento PYE Unicam PU 9100X.

**Acidez de troca** - 10 gramas de cada amostra de solo foram colocados em contacto com 100 ml da solução de KCl 1M e agitada durante 30 minutos. Depois de filtrada a suspensão fez-se uma titulação com NaOH 0,1 M usando a fenolftaleína como indicador (Sims, 1996).

**Fósforo e potássio extraíveis** - foram determinados de acordo com o método de Egner-Riehm, que consiste numa mistura com a proporção de 1:20 (p/v), de uma amostra de solo e uma solução de lactato de amónio e ácido acético tamponizada a pH 3,5 agitando-se durante duas horas (MAP, 1977). Após filtração, o fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) foi determinado por espectrofotometria UV/VIS no comprimento de onda 882 nm, após o desenvolvimento de cor pelo método do ácido ascórbico. Este método de desenvolvimento de cor consiste na formação de um complexo ácido fosfomolibdénico

que foi reduzido a azul-fosfo-molibdénico na presença de ácido ascórbico (Van Reeuwijk, 2002). O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro UV/VIS T80 PG Instrument Lda (figura 5). A quantificação do potássio ( $K_2O$ ) realizou-se por fotometria de chama (MAP, 1977) no equipamento fotómetro de chama Jenway.



Figura 5. Espectrofotómetro UV/VIS T80 PG Instrument Lda

**Cobre, ferro, zinco e manganês** - Os elementos foram extraídos com uma solução de acetato de amónio, ácido acético, ácido etileno diaminotetracético e medidos por espectrometria de absorção atómica (Lakanen & Ervio, 1971) num equipamento PYE Unicam PU 9100X.

**Boro** – Extraído pelo método de água quente na presença de  $CaCl_2$  0,1M. A quantificação do boro extraído foi feita pelo método colorimétrico que usa a azometina-H como reagente de desenvolvimento de cor (Keven, 1996) e é depois determinada num espectrofotómetro UV/VIS a 430 nm.

### 3.5.2 Análises de tecidos vegetais

Nos castanheiros provenientes dos vasos foram medidos o diâmetro do colo e o comprimento. Cada castanheiro foi dividido em três partes raízes, caules e folhas. A biomassa foi posteriormente seca a 65 °C em estufa de ventilação forçada (Memmert). A matéria seca foi pesada e moída num moinho Cyclotec (figura 6) com um crivo de 1 mm de malha.



Figura 6. Moinho Cyclotec

De seguida foi feita a quantificação da concentração dos nutrientes.

**Azoto** - foi pesado um grama das amostras de tecido vegetal que foram transferidas para tubos de digestão para equipamentos Kjeldahl e colocado em um suporte de alumínio com capacidade para 20 frascos. Adicionaram-se duas pastilhas de um catalisador (selénio) e 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 400 °C durante 40 minutos. Terminado o período de digestão, deixou-se arrefecer e colocou-se o tubo de digestão num equipamento automático Kjelttec TM 8400 Analyser unit FOSS (figura 7), no mesmo foi adicionada uma

quantidade de hidróxido de sódio acompanhado de vapor de água. A amônia formada é arrastada na corrente de vapor e titulada com ácido clorídrico num vaso com uma solução recetora de ácido bórico e indicadores (Bremner, 1996).



Figura 7. Equipamento Kjeltec TM 8400 Analyser unit FOSS

**Fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês** – Foram pesados 0,25 g das amostras que foram transferidos para tubos de digestão aos quais se adicionaram 10 ml de ácido nítrico. Os tubos foram fechados e levados para digestão em micro-ondas MARSXpress. Após a digestão, o líquido foi transferido para um tubo 50 ml que se completou com água desionizada. Foram quantificados os teores de potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês em espectrofotômetro de absorção atômica num equipamento PYE Unicam PU 9100X (figura 8). Para a determinação do fósforo, após a diluição adicionou-se 4,0 ml da solução molibdato de amônio azul com ácido ascórbico. Após 35 minutos foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda 882 nm (Walinga *et al.*, 1989)



Figura 8. Equipamento PYE Unicam PU 9100X

**Boro** - Pesou-se um grama das amostras que foram transferidas para cadinhos onde se adicionou 0,10 g de óxido de cálcio e se misturou até a amostra ficar homogênea. De seguida, os cadinhos foram 90 minutos para uma mufla onde se realizou a queima das amostras a temperatura de 500 °C. Após a queima adicionaram-se 10 ml de ácido sulfúrico 0,5 M e após 30 minutos filtraram-se as amostras. Posteriormente, transferiu-se 1 ml das amostras para tubos de 10 ml de polipropileno e foram adicionados 2,0 ml de azometina-H, e 30 minutos depois do desenvolvimento de cor realizaram-se as leituras de absorbância das amostras em espectrofotômetro com comprimento de onda 420 nm (Walinga *et al.*, 1989).

### **3.6. Cálculo da quantidade exportada de macro e micronutrientes.**

O processo de cálculo consistiu em multiplicar a concentração de cada macro e micronutriente pela matéria seca da respectiva parte da planta.

### **3.7. Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise de variância (Anova) pelo teste F. Quando ocorreram diferenças significativas entre tratamentos efetuou-se a comparação múltipla de médias utilizando o teste de Tukey HSD com 5% de probabilidade de erro. As tabelas e gráficos foram elaborados no programa Excel.

# Capítulo IV

## Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito das substâncias ativas no desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro

#### 4.1.2. Avaliação dos parâmetros fisiológicos

Os dados referentes ao crescimento do ano e ao diâmetro do colo estão representados no quadro 2. A planta 1 da modalidade testemunha teve um crescimento invulgar.

Quadro 2. Crescimento do ano e diâmetro do colo nas modalidades ensaiadas [Testemunha (Test), Eurofit, Silicato de potássio (Sil K) e Ridomil].

Planta	Crescimento do ano (cm)				Diâmetro do colo (cm)			
	Test	Eurofit	Sil K	Ridomil	Test	Eurofit	Sil K	Ridomil
1	111,0	13,0	50,1	24,0	1,42	0,37	1,12	0,64
2	0,0	45,5	52,5	72,0	0,24	0,78	1,17	1,02
3	26,1	16,7	5,5	3,0	0,81	0,40	0,49	0,39
4	38,0	37,0	3,0	30,0	1,14	0,89	0,55	0,92
5	4,7	0,0	0,0	11,0	0,49	0,30	0,25	0,84
6	17,5	36,0	10,0	19,5	0,46	0,50	0,42	0,57
7	46,5	8,3	0,0	11,0	0,62	0,38	0,18	0,64
8	32,5	0,0	59,0	23,0	0,52	0,30	1,12	0,60
9	9,7	14,8	35,0	26,0	0,39	0,68	0,62	0,70

Os diferentes tratamentos fitossanitários não influenciaram de forma significativa a altura das plantas (figura 9). As plantas dos vasos testemunha apresentaram a maior altura média (48,4 cm) enquanto as plantas do tratamento Eurofit foram as mais baixas (38,6 cm).

Em relação ao diâmetro do colo dos castanheiros também não houve diferenças significativas entre tratamentos (figura 10). Contudo, o tratamento com Ridomil apresentou a maior média do diâmetro no colo da planta (0,70 cm) enquanto o tratamento com Eurofit apresentou a média mais baixa (0,47cm).

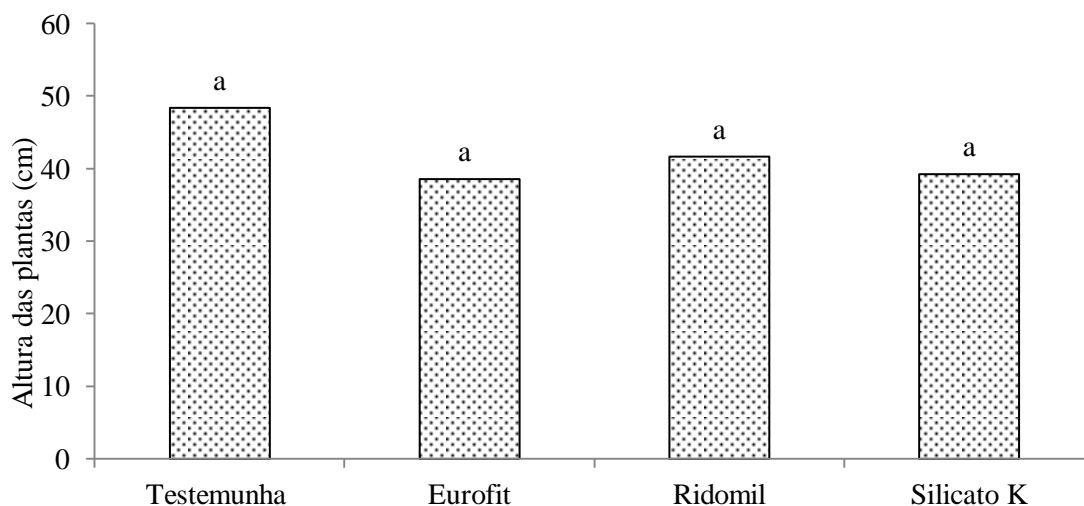


Figura 9 Altura média dos castanheiros no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

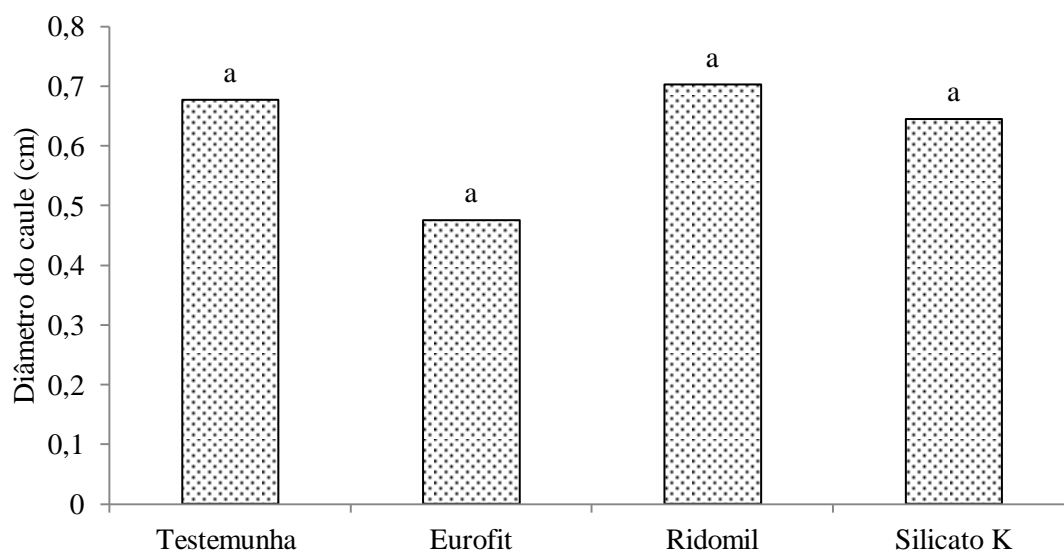


Figura 10. Média do diâmetro do caule dos castanheiros no final do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

O número médio de folhas por planta ao longo do tempo de ensaio está representado no quadro 3. No final do ensaio o tratamento com Ridomil apresentou o número médio de folhas mais elevado. Estes valores devem-se a nenhuma planta ter morrido durante o ensaio nesta modalidade. As plantas da modalidade Testemunha

(onde se verificou 78% de mortalidade das plantas) apresentaram o menor número médio de folhas.

Quadro 3. Número médio (média±desvio padrão) de folhas por planta ao longo do tempo de ensaio nas diferentes modalidades.

	Set-2017	Abr-2018	Mai-2018	Jul-2018	Ago-2018	Set-2018
Testemunha	4,8±1,7	5,0±2,9	5,0±2,1	4,7±1,1	5,2±6,2	3,4±7,8
Silicato K	4,6±1,5	3,4±2,4	3,2±2,4	3,3±2,6	5,3±4,8	5,3±4,8
Eurofit	3,7±1,7	1,7±1,6	3,8±2,7	3,4±2,6	4,2±2,6	4,1±2,3
Ridomil	4,0±1,4	4,2±2,1	4,4±1,5	6,9±4,1	5,6±3,6	5,6±3,6

A matéria seca produzida nas raízes, caules e folhas e na totalidade da planta e na totalidade da planta em função dos tratamentos fitossanitários é apresentada na figura 11.

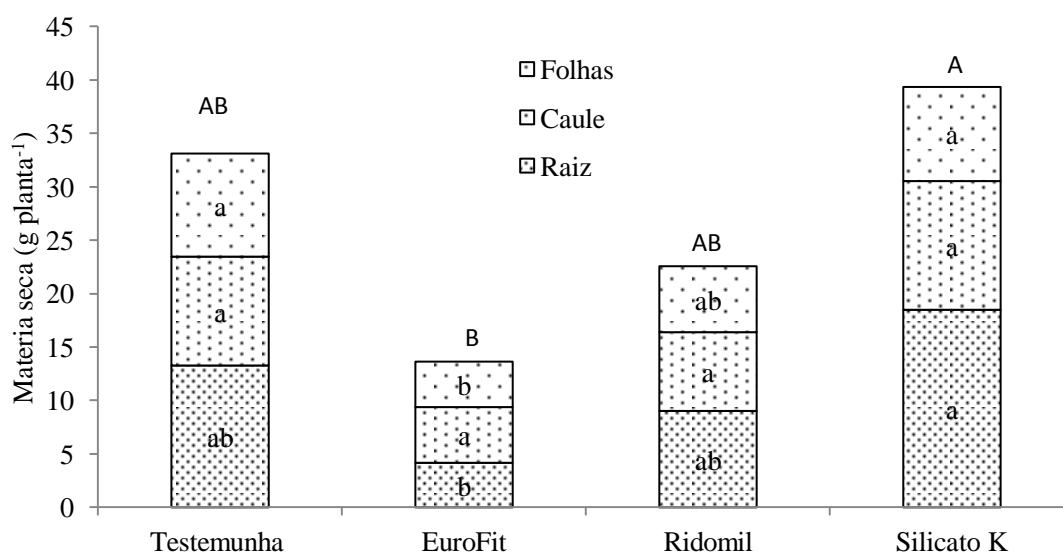


Figura 11. Matéria seca produzida nas raízes, caules e folhas e na totalidade da planta no final do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários. Médias seguidas por letras distintas para o mesmo componente da planta indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). Letras minúsculas indicam a separação de médias de cada componente individualmente e as maiúsculas a separação de médias da matéria seca total.

Apesar da variação dos valores médios registados nos caules não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos. As raízes apresentam os valores mais elevados no Silicato K. Nas folhas os valores mais elevados exibem-se na Testemunha.

O tratamento Silicato K apresentou os valores médios mais elevados de matéria seca total produzida (39,4 g planta<sup>-1</sup>) enquanto o tratamento Eurofit apresentou os valores mais baixos (13,6 g planta<sup>-1</sup>).

#### 4.1.1. Avaliação da sintomatologia

A mortalidade das plantas é apresentada na figura 12. As plantas que foram tratadas com Ridomil mantiveram-se todas vivas até ao final do ensaio. Por outro lado, 78% das plantas da modalidade testemunha morreram durante o ensaio.

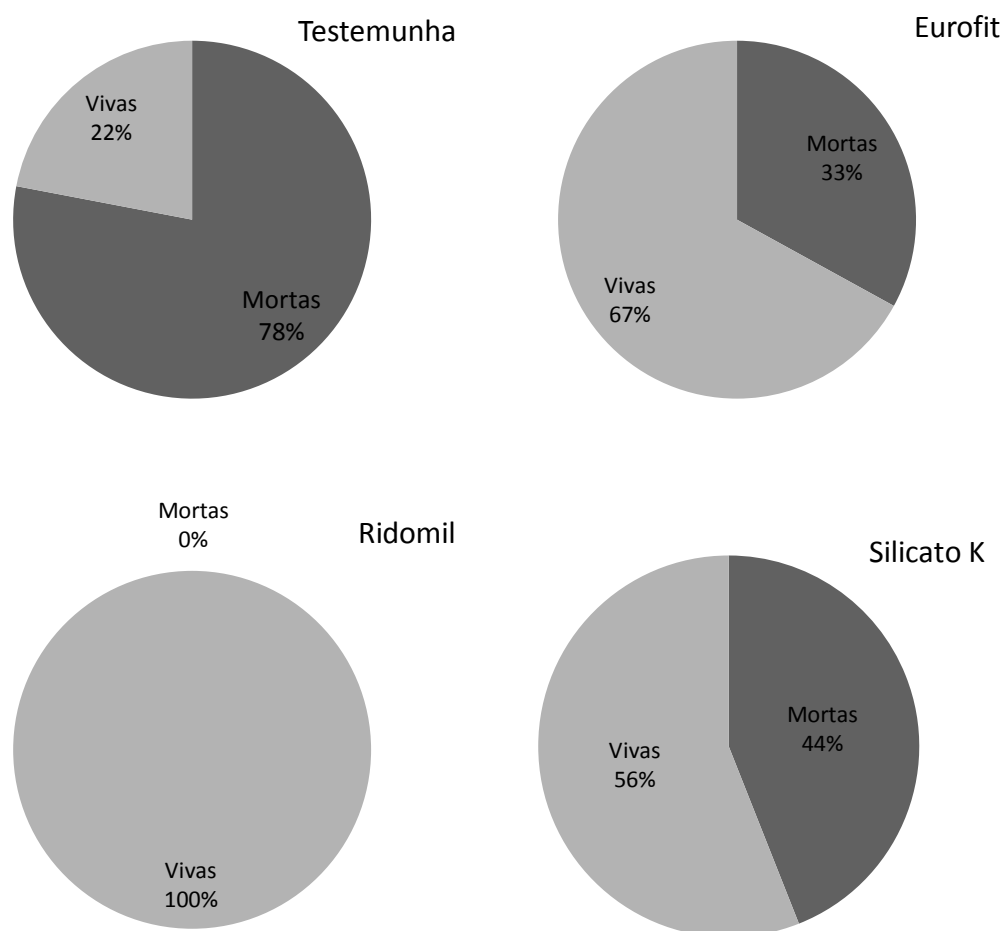


Figura 12. Mortalidade (%) dos castanheiros por tratamento no final do ensaio.

Acompanhando a evolução da mortalidade nas diferentes modalidades (com exceção da modalidade Eurofit) verifica-se um gradual aumento da percentagem de mortalidade até à primeira aplicação das substâncias ativas (figura 13).

A primeira aplicação das substâncias ativas ocorre quando se começam a revelar os primeiros sintomas da Doença da Tinta, e a segunda aplicação ocorre 20 dias depois. Assim que ocorre a primeira aplicação dos produtos, a mortalidade nas modalidades Silicato K e Eurofit praticamente estabiliza, enquanto na modalidade que não levou qualquer substância ativa continuou a aumentar. Pela análise da figura 13 fica evidente que as plantas tiveram uma resposta à aplicação das diferentes substâncias ativas em estudo.

Embora *Phytophthora* estivesse presente no solo de todos os tratamentos estudados, como se pode confirmar pelo teste de armadilha biológica, apresentado mais a frente, não foram detetados sintomas nas plantas do tratamento com Ridomil, pois nenhuma planta morreu ao longo do ensaio.

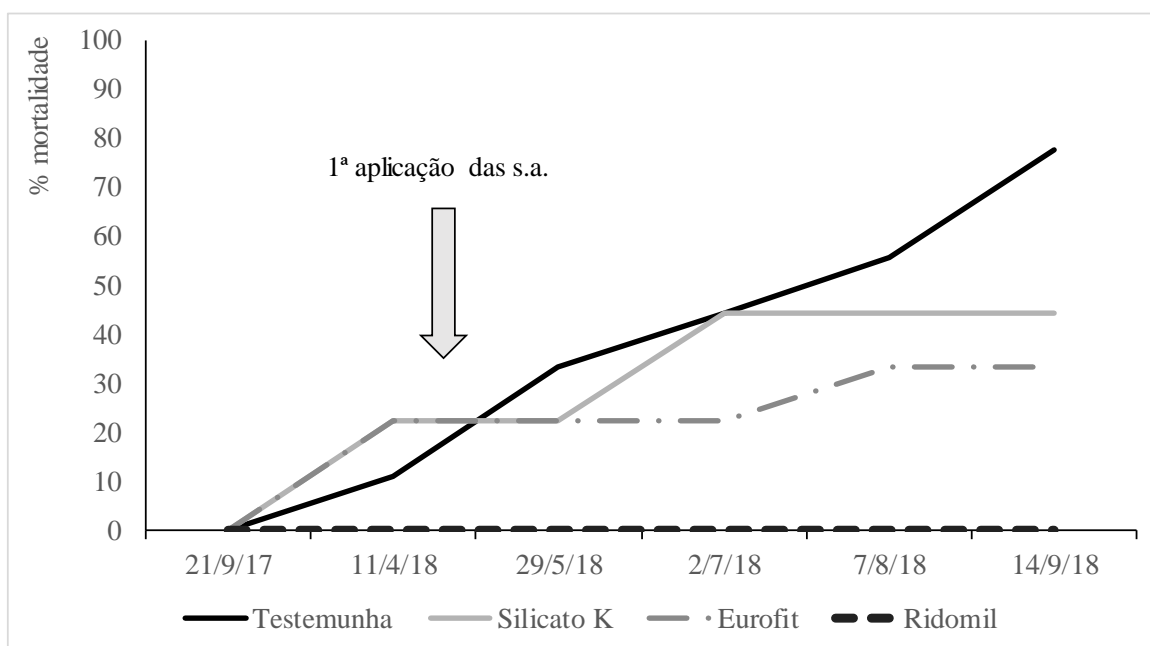


Figura 13. Percentagem de mortalidade nas diferentes modalidades ensaiadas.

No ensaio de tecido armadilha, obtiveram-se isolamentos positivos de *Phytophthora* na modalidade Testemunha nos diferentes tempos de armadilhagem (24h, 48h e 72 horas), embora a percentagem de deteção tenha variado entre as modalidades (quadro 4). Nas modalidades onde foram aplicadas substâncias ativas a deteção de *Phytophthora* só foi observada às 48 e 72 horas.

Quadro 4. Detecção de *Phytophthora* nas diferentes modalidades ensaiadas e tempos de armadilhagem.

Tempos de armadilhagem	24 horas	48 horas	72 horas
Testemunha	+	+	+
Eurofit	-	+	+
Silicato K	-	+	+
Ridomil	-	+	+

+ Detecção de *Phytophthora* em pelo menos um disco de folha de castanheiro; - sem detecção de *Phytophthora*.

Dos isolados obtidos a partir dos discos de folhas de castanheiros infetados com *Phytophthora*, foram selecionados 13 isolados para identificação molecular da espécie. A identificação molecular mostrou que 11 isolados pertenciam à espécie *Phytophthora cinnamomi*, tendo a identidade nucleotídica da região ITS dos isolados variado entre 98 a 100% (quadro 5). Dois isolados, que morfologicamente foram identificados como *Phytophthora*, revelaram pertencer a duas espécies diferentes, *Clonostachys rosea* e *Helgardia anguioides*.

Quadro 5. Identificação das espécies e percentagem de identidade nucleotídica de cada espécie identificada.

Origem da deteção	Espécie	Identidade (%)
Testemunha vaso 1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Testemunha vaso 2	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	98
Testemunha vaso 6	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Eurofit vaso 2	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Eurofit vaso 9	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100
Ridomil vaso 6	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100
Ridomil vaso 9	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Silicato K vaso 1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Silicato K vaso 2	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Silicato K vaso 6	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Silicato K vaso 9	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99
Silicato K vaso 4	<i>Clonostachys rosea</i>	99
Silicato K vaso 6	<i>Helgardia anguioides</i>	99

## 4.2. Determinações laboratoriais

### 4.2.1. Análises de solos

Os resultados do efeito dos tratamentos nas propriedades do solo, matéria orgânica, pH e complexo de troca são apresentados no quadro 6. Os resultados mostram que os teores de matéria orgânica no solo não variaram de forma significativa com os tratamentos. Os valores médios situaram-se entre 4,1 e 4,8 %. O pH, pelo contrário, mostrou-se bastante sensível aos tratamentos, quer quando determinado em água quer em KCl. Os valores foram particularmente mais elevados com a aplicação de Silicato K, enquanto o uso de Eurofit acidificou o solo registando-se valores inferiores aos da testemunha. As bases de troca cálcio e magnésio seguiram uma tendência semelhante ao pH, com valores mais elevados no tratamento Silicato K e os valores mais baixos no tratamento Eurofit. O potássio de troca atingiu valores particularmente elevados no tratamento Silicato K (3,8  $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ ) e significativamente diferentes dos restantes tratamentos cujos valores médios foram de 0,6  $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ . O sódio de troca oscilou entre 0,4 (Eurofit) e 0,6 (Testemunha) com diferenças significativas entre tratamentos. A acidez de troca e o alumínio de troca foram significativamente mais elevados no tratamento Eurofit enquanto a capacidade de troca catiónica efetiva foi significativamente mais elevada no tratamento Silicato K e mais baixa no tratamento Eurofit.

Quadro 6. Matéria orgânica, pH, bases, acidez e alumínio de troca e capacidade de troca catiónica efetiva (CTCe) no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Propriedades do solo	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K	
Matéria orgânica (%)	4,8 a	4,1 a	4,4 a	4,1 a	
pH	H <sub>2</sub> O	5,6 b	4,3 d	4,9 c	6,3 a
	KCl	4,6 b	3,8 c	4,3 b	5,5 a
Cálcio de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	2,8 b	2,0 c	2,6 b	3,2 a	
Magnésio de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	1,4 ab	0,9 c	1,1 bc	1,6 a	
Potássio de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	0,6 b	0,6 b	0,6 b	3,8 a	
Sódio de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	0,6 a	0,4 c	0,5 bc	0,5 ab	
Acidez de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	0,1 b	0,8 a	0,2 b	0,0 b	
Alumínio de troca ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	0,0 bc	0,5 a	0,1 b	0,0 c	
CTCe ( $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ )	5,6 b	4,7 c	5,0 bc	9,2 a	

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

Resultados de fósforo, potássio, boro, cobre, ferro, zinco e manganês extraíveis no solo são apresentados no quadro 7. Os tratamentos originaram diferenças significativas no fósforo extraível. Os valores mais elevados foram registados nos vasos onde se aplicou Eurofit (174,1 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos nos vasos testemunha (105,7 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kg<sup>-1</sup>). Contudo, os valores médios no tratamento Ridomil não diferiram de forma significativa dos valores encontrados na testemunha. O potássio extraível, por seu lado, aumentou de forma significativa no tratamento Silicato K relativamente a todos os restantes tratamentos, não havendo diferenças significativas entre estes. Os valores médios em Silicato K foram particularmente elevados tendo-se atingido 1953,3 mg K<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>, enquanto nos restantes tratamentos os valores médios oscilaram entre 304,7 e 314,0 mg K<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup>. Os valores de boro no solo variam também de forma significativa entre tratamentos tendo os valores médios mais elevados sido registados no tratamento Silicato K (2,1 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos nos vasos que receberam Eurofit (1,2 mg kg<sup>-1</sup>). Os teores de cobre não diferiram de forma significativa entre tratamentos, tendo os valores médios variado entre 1,7 e 2,2 mg kg<sup>-1</sup>. O ferro registou os valores médios mais baixos na testemunha (108,3 mg kg<sup>-1</sup>) e os valores mais elevados e com diferenças significativas no tratamento com Silicato K (163,0 mg kg<sup>-1</sup>). O zinco registou valores médios muito altos e com diferença significativa para os restantes tratamentos nos vasos tratados com Eurofit (21,4 mg kg<sup>-1</sup>), enquanto nos restantes vasos os valores médios variaram entre 1,3 e 1,6 mg kg<sup>-1</sup>. O teor de manganês no solo também registou diferenças significativas entre tratamentos, estando os valores mais elevados associados aos vasos que receberam Eurofit (235,6 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos à modalidade testemunha (137,3 mg kg<sup>-1</sup>).

Quadro 7. Macro e micronutrientes extraíveis no solo no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes extraíveis	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Fósforo (mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> kg <sup>-1</sup> )	105,7 c	174,1 a	107,2 c	135,8 b
Potássio (mg K <sub>2</sub> O kg <sup>-1</sup> )	308,3 b	304,7 b	314,0 b	1953,3 a
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	1,5 ab	1,2 b	1,4 b	2,1 a
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	2,2 a	1,7 a	1,7 a	2,0 a
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	108,3 b	121,3 ab	115,6 b	163,0 a
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	1,3 b	21,4 a	1,6 b	1,3 b
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	137,3 b	235,6 a	151,3 b	202,6 a

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.2.2. Análises dos tecidos vegetais

Os resultados da concentração dos nutrientes na matéria seca das raízes são apresentados no quadro 8. Os tratamentos originaram diferenças significativas no azoto presente na matéria seca. Os valores médios mais elevados foram registados no tratamento com Eurofit (22,9 g kg<sup>-1</sup>) e os valores mais baixos foram observados nas raízes que foram tratadas com Silicato K (5,6 g kg<sup>-1</sup>), embora estes não tenham diferido de forma significativa dos valores encontrados na testemunha (6,1 g kg<sup>-1</sup>). No caso do fósforo nas raízes, foram observados valores particularmente elevados no tratamento Eurofit em comparação com os restantes tratamentos. A concentração de potássio nas raízes tratadas com silicato K (7,3 g kg<sup>-1</sup>) apresentou valores significativamente mais elevados que os registados nos restantes tratamentos, não havendo diferenças significativas entre estes. As concentrações dos nutrientes cálcio, cobre e ferro não diferiram significativamente entre os tratamentos. Relativamente aos nutrientes magnésio, boro, zinco e manganês as concentrações mais elevadas foram sempre registadas no tratamento com Eurofit.

Quadro 8. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca das raízes no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (g kg <sup>-1</sup> )	6,1 c	22,9 a	14,4 b	5,6 c
Fósforo (g kg <sup>-1</sup> )	0,8 b	3,9 a	1,1 b	1,0 b
Potássio (g kg <sup>-1</sup> )	3,5 b	5,1 b	5,1 b	7,3 a
Cálcio (g kg <sup>-1</sup> )	2,5 a	2,5 a	3,0 a	2,6 a
Magnésio (g kg <sup>-1</sup> )	1,6 ab	2,1 a	2,1 a	1,4 b
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	19,6 b	29,6 a	25,5 ab	23,2 b
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	9,4 a	11,3 a	10,8 a	11,1 a
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	2141,3 a	2195,4 a	1909,7 a	1875,4 a
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	23,3 c	250,3 a	37,5 b	27,6 bc
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	241,9 c	1233,9 a	706,6 b	261,4 c

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

No quadro 9 apresentam-se as concentrações dos nutrientes na matéria seca dos caules. Os tratamentos originaram diferenças significativas no azoto presente na matéria seca. Os valores mais elevados foram registados nos tratamentos com Eurofit (12,4 g kg<sup>-1</sup>) e os valores mais baixos foram observados nas raízes que foram tratadas com Silicato K (4,3 g kg<sup>-1</sup>). Porém, os valores médios no tratamento Silicato K não diferiram de forma significativa dos valores encontrados na testemunha. Os valores de fósforo nos

caules mostraram que as plantas tratadas com Eurofit apresentaram valores significativamente mais elevados que os restantes tratamentos. O potássio apresenta uma elevada concentração nos caules nas plantas tratadas com silicato K (10,9 g kg<sup>-1</sup>), enquanto o cálcio apresentou valores significativamente mais baixos neste tratamento (1,9 g kg<sup>-1</sup>). Entre os restantes tratamentos não ocorreram diferenças significativas quer para o potássio quer para o cálcio. Para o magnésio a maior concentração aparece com Eurofit (2,4 g kg<sup>-1</sup>) e a menor aparece no tratamento Silicato K (1,1 g kg<sup>-1</sup>). As concentrações de boro nos caules variam também de forma significativa entre tratamentos, tendo os valores médios mais elevados sido registados no tratamento Eurofit (38,1 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos nas plantas que receberam Silicato K e na testemunha (25,9 mg kg<sup>-1</sup>). O cobre registou os valores médios mais baixos no Silicato K (5,5 mg kg<sup>-1</sup>) e os valores mais elevados e com diferenças significativas no tratamento com Ridomil (10,1 mg kg<sup>-1</sup>). O nutriente ferro não apresentou diferenças entre tratamentos e distribuiu-se entre as concentrações de 64,1 mg kg<sup>-1</sup> no tratamento com Silicato K e 79,8 mg kg<sup>-1</sup> na testemunha. O zinco apresentou diferenças significativas entre as plantas tratadas com Eurofit, com um valor elevado 132,1 mg kg<sup>-1</sup>, e os restantes tratamentos que variaram entre 14,9 e 28,8 mg kg<sup>-1</sup> no tratamento com Silicato K e a testemunha, respetivamente. O teor de manganês no solo também registou diferenças significativas entre tratamentos, estando os valores mais elevados associados aos vasos que receberam Eurofit (2551,0 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos à modalidade Silicato K (450,8 mg kg<sup>-1</sup>), sendo que este último não mostrou diferenças significativas com a testemunha.

Quadro 9. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca dos caules no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (g kg <sup>-1</sup> )	5,4 c	12,4 a	8,4 b	4,3 c
Fosforo (g kg <sup>-1</sup> )	0,7 b	1,9 a	0,8 b	0,8 b
Potássio (g kg <sup>-1</sup> )	4,0 b	2,5 b	2,6 b	10,9 a
Cálcio (g kg <sup>-1</sup> )	3,2 a	3,9 a	3,7 a	1,9 b
Magnésio (g kg <sup>-1</sup> )	1,8 b	2,4 a	2,2 ab	1,1 c
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	25,9 b	38,1 a	32,0 ab	25,9 b
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	8,9 a	8,1 ab	10,1 a	5,5 b
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	79,8 a	67,9 a	73,0 a	64,1 a
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	28,8 b	132,1 a	27,1 b	14,9 b
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	536,5 c	2551,0 a	1296,2 b	450,8 c

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

No quadro 10 apresentam-se as concentrações de nutrientes na matéria seca das folhas. Em relação ao azoto ocorreram diferenças significativas entre tratamentos, com os valores mais elevados a serem registados nas plantas onde se aplicou Ridomil (20,7 g kg<sup>-1</sup>) e Eurofit (19,2 g kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos nas plantas tratadas com Silicato K (13,6 g kg<sup>-1</sup>) e na testemunha (13,7 g kg<sup>-1</sup>). O fósforo apresentou valores mais elevados nas plantas tratadas com Eurofit (6,3 g kg<sup>-1</sup>) e os restantes valores variaram entre os 1,1 g kg<sup>-1</sup> na testemunha e os 1,8 g kg<sup>-1</sup> do Silicato K. O potássio, por seu lado, aumentou de forma significativa no tratamento Silicato K (31,8 g kg<sup>-1</sup>) relativamente a todos os restantes tratamentos, que variam entre 6,5 e 5,8 g kg<sup>-1</sup>, não havendo diferenças significativas entre estes. Os valores mais elevados de cálcio, nas folhas, foram registados nos tratamentos com Ridomil (8,2 g kg<sup>-1</sup>) e os valores mais baixos foram assinalados nas plantas tratadas com Silicato K (2,0 g kg<sup>-1</sup>). O magnésio também foi no Ridomil que se registou a concentração mais elevada (6,1 g kg<sup>-1</sup>) e nas plantas tratadas com Silicato K ocorreu a menor concentração nas folhas (1,4 g kg<sup>-1</sup>). Os valores de concentração de boro nas folhas variaram significativamente entre dois grupos. O grupo com os valores mais elevados é constituído pelos tratamentos Eurofit (186,1 mg kg<sup>-1</sup>) e Ridomil (179,4 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos constituído pelo Silicato K (72,6 mg kg<sup>-1</sup>) e testemunha (64,8 mg kg<sup>-1</sup>). O cobre registou os valores médios mais baixos no Silicato K (7,8 mg kg<sup>-1</sup>) e os valores mais elevados e com diferenças significativas no tratamento com Ridomil (10,5 mg kg<sup>-1</sup>). O ferro apresentou diferenças entre a testemunha (232,2 mg kg<sup>-1</sup>) e os restantes tratamentos, que se distribuí entre as concentrações 84,7 mg kg<sup>-1</sup> do Eurofit e 103,5 mg kg<sup>-1</sup> do Silicato K. O zinco apresentou diferenças significativas entre as plantas tratadas com Eurofit com um valor elevado (380,8 mg kg<sup>-1</sup>) e os restantes tratamentos que variaram entre as 24,1 mg kg<sup>-1</sup> do Silicato K e as 40,4 mg kg<sup>-1</sup> do Ridomil. O teor de manganês nas folhas também registou diferenças significativas entre tratamentos, estando os valores mais elevados associados às plantas que receberam Eurofit (15343,2 mg kg<sup>-1</sup>) e os mais baixos à modalidade Silicato K (1115,8 mg kg<sup>-1</sup>), embora este sem diferenças significativas para a testemunha.

Quadro 10. Concentração de macro e micronutrientes na matéria seca das folhas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (g kg <sup>-1</sup> )	13,7 b	19,2 a	20,7 a	13,6 b
Fosforo (g kg <sup>-1</sup> )	1,1 b	6,3 a	1,4 b	1,8 b
Potássio (g kg <sup>-1</sup> )	6,4 b	6,5 b	5,8 b	31,8 a
Cálcio (g kg <sup>-1</sup> )	4,9 b	7,1 ab	8,2 a	2,0 c
Magnésio (g kg <sup>-1</sup> )	3,7 b	4,9 ab	6,1 a	1,4 c
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	64,8 b	186,1 a	179,4 a	72,6 b
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	8,1 ab	9,4 ab	10,5 a	7,8 b
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	232,2 a	84,7 b	92,4 b	103,5 b
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	36,4 b	380,8 a	40,4 b	24,1 b
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	1806,3 c	15343,2 a	8754,9 b	1115,8 c

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

A quantidade de cada nutriente exportada nas raízes é apresentada no quadro 11. Os resultados obtidos referentes à concentração de nutrientes nas raízes diferiram entre tratamentos mas demonstraram tendências na concentração dos nutrientes. Os nutrientes cálcio, magnésio, boro, e ferro apresentaram os valores mais elevados no tratamento Silicato K e os mais baixos no Eurofit. O potássio e o cobre foram exportados em maior quantidade no tratamento com Silicato K, sendo a quantidade mais baixa registada no tratamento com Eurofit e sem diferenças significativas para Ridomil. No azoto, fósforo e manganês não apareceram diferenças significativas entre tratamentos. O zinco registou o valor mais alto no tratamento Eurofit (1,0 g planta<sup>-1</sup>) e o mais baixo na testemunha (0,3 g planta<sup>-1</sup>).

Quadro 11. Quantidade de macro e micronutrientes exportada nas raízes no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (mg planta <sup>-1</sup> )	77,7 a	96,0 a	130,0 a	105,0 a
Fosforo (mg planta <sup>-1</sup> )	10,7 a	16,4 a	10,0 a	18,7 a
Potássio (mg planta <sup>-1</sup> )	47,6 b	21,3 b	46,0 b	141,0 a
Cálcio (mg planta <sup>-1</sup> )	32,9 ab	10,2 b	27,0 ab	48,3 a
Magnésio (mg planta <sup>-1</sup> )	19,3 ab	8,7 b	18,8 ab	26,3 a
Boro (mg planta <sup>-1</sup> )	0,2 ab	0,1 b	0,2 ab	0,4 a
Cobre (mg planta <sup>-1</sup> )	0,1 ab	0,0 b	0,1 b	0,2 a
Ferro (mg planta <sup>-1</sup> )	28,0ab	9,2 b	17,2 ab	34,5 a
Zinco (mg planta <sup>-1</sup> )	0,3 b	1,0 a	0,3 b	0,5 b
Manganês (mg planta <sup>-1</sup> )	3,2 a	5,2 a	6,4 a	4,9 a

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

A quantidade de cada nutriente exportada nos caules é apresentada no quadro 12. Só os nutrientes potássio, zinco e manganês registaram diferença significativas entre tratamentos. O potássio apresentou o valor médio mais elevado no Silicato K com 130,2 g planta<sup>-1</sup>. A quantidade de potássio exportada nos caules nos outros tratamentos variou entre 12,5 e as 37,2 g planta<sup>-1</sup>. No zinco o tratamento com Eurofit foi o que teve o valor mais elevado com 0,7 g planta<sup>-1</sup> tendo apresentado diferenças significativas com os outros tratamentos. A quantidade variou entre 0,3 e 0,2 g planta<sup>-1</sup>. No manganês o valor mais alto apareceu no Eurofit (13,3 g planta<sup>-1</sup>) e o mais baixo no Silicato K (5,3 g planta<sup>-1</sup>).

Quadro 12. Quantidade de macro e micronutrientes exportada nos caules no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (mg planta <sup>-1</sup> )	51,5 a	64,3 a	61,3 a	49,5 a
Fosforo (mg planta <sup>-1</sup> )	8,1 a	9,8 a	5,6 a	9,3 a
Potássio (mg planta <sup>-1</sup> )	37,2 b	12,5 b	18,9 b	130,2 a
Cálcio (mg planta <sup>-1</sup> )	31,4 a	20,1 a	27,4 a	22,7 a
Magnésio (mg planta <sup>-1</sup> )	17,5 a	12,3 a	16,1 a	13,6 a
Boro (mg planta <sup>-1</sup> )	0,3 a	0,2 a	0,2 a	0,3 a
Cobre (mg planta <sup>-1</sup> )	0,1 a	0,0 a	0,1 a	0,1 a
Ferro (mg planta <sup>-1</sup> )	0,8 a	0,4 a	0,5 a	0,8 a
Zinco (mg planta <sup>-1</sup> )	0,3 b	0,7 a	0,2 b	0,2 b
Manganês (mg planta <sup>-1</sup> )	5,4 b	13,3 a	9,5 ab	5,3 b

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

As quantidades de nutrientes exportados pelas plantas nas folhas são apresentadas no quadro 13. Nos nutrientes azoto, cálcio, magnésio, boro e cobre não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos. Os nutrientes fósforo e zinco apresentam no tratamento Eurofit a quantidade mais elevada e diferenças significativas para os outros tratamentos. No potássio houve um aumento significativo no tratamento Silicato K (350,5 g planta<sup>-1</sup>) relativamente a todos os restantes tratamentos, que variaram entre as médias de 27,6 e 69,1 g planta<sup>-1</sup>, não havendo diferenças significativas entre eles. O manganês acumulado nas folhas não apresentou diferenças significativas entre o Eurofit (64,4 g planta<sup>-1</sup>) e o Ridomil (53,5 g planta<sup>-1</sup>) e entre a testemunha (20,3 g planta<sup>-1</sup>) e o Silicato K (11,2 g planta<sup>-1</sup>), existindo diferenças significativas entre os dois grupos.

Quadro 13. Quantidade de macro e micronutrientes exportados nas folhas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (mg planta <sup>-1</sup> )	145,3 a	81,3 a	127,4 a	145,0 a
Fosforo (mg planta <sup>-1</sup> )	11,3 b	26,9 a	8,4 b	19,9 b
Potássio (mg planta <sup>-1</sup> )	69,1 b	27,6 b	35,8 b	350,5 a
Cálcio (mg planta <sup>-1</sup> )	56,4 a	30,1 a	50,5 a	22,4 a
Magnésio (mg planta <sup>-1</sup> )	41,1 a	21,8 a	37,1 a	16,7 a
Boro (mg planta <sup>-1</sup> )	0,7 a	0,8 a	1,1 a	0,8 a
Cobre (mg planta <sup>-1</sup> )	0,1 a	0,0 a	0,1 a	0,1 a
Ferro (mg planta <sup>-1</sup> )	2,5 a	0,4 b	0,6 b	1,1 b
Zinco (mg planta <sup>-1</sup> )	0,4 b	1,6 a	0,2 b	0,2 b
Manganês (mg planta <sup>-1</sup> )	20,3 b	64,4 a	53,5 a	11,2 b

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

No quadro 14 apresentam-se as concentrações dos nutrientes exportados na totalidade da planta (raízes + caules + folhas). Surgiram diferenças significativas entre tratamentos nos nutrientes fósforo, potássio, cobre, ferro, zinco e manganês. O nutriente fósforo apresenta os maiores valores no tratamento Eurofit 53,1 mg planta<sup>-1</sup> e os menores no Ridomil 24,0 mg planta<sup>-1</sup>. O potássio apresentou o valor mais elevado no tratamento Silicato K (550,3 g planta<sup>-1</sup>), e os restantes valores variam, sem diferenças significativas entre eles, entre 61,4 e 146,0 g planta<sup>-1</sup>. O cobre apresenta o menor valor de 0,1 g planta<sup>-1</sup> no tratamento Eurofit e os restantes valores médios variaram entre 0,2 e 0,3 g planta<sup>-1</sup>. No nutriente ferro o maior valor médio aparece no Silicato K (36,2 g planta<sup>-1</sup>) e o menor valor de 10,0 g planta<sup>-1</sup> no tratamento com Eurofit. O nutriente zinco exibiu diferenças significativas entre tratamentos. O valor mais elevado de 3,3 g planta<sup>-1</sup> foi registado no tratamento Eurofit. Relativamente ao manganês acumulado na planta, não houve diferenças significativas entre a testemunha (26,4 g planta<sup>-1</sup>) e o Silicato K (19,4 g planta<sup>-1</sup>) nem entre o Eurofit (82,8 g planta<sup>-1</sup>) e o Ridomil (69,4 g planta<sup>-1</sup>), existindo, contudo, diferenças significativas entre estes dois grupos.

Quadro 14. Quantidade de macro e micronutrientes exportados na totalidade das plantas no fim do ensaio em função dos tratamentos fitossanitários.

Nutrientes	Testemunha	Eurofit	Ridomil	Silicato K
Azoto (mg planta <sup>-1</sup> )	258,4 a	241,6 a	318,7 a	271,5 a
Fósforo (mg planta <sup>-1</sup> )	27,5 ab	53,1 a	24,0 b	43,9 ab
Potássio (mg planta <sup>-1</sup> )	146,0 b	61,4 b	100,5 b	550,3 a
Cálcio (mg planta <sup>-1</sup> )	113,1 a	60,5 a	105,0 a	88,9 a
Magnésio (mg planta <sup>-1</sup> )	72,5 a	41,8 a	72,0 a	52,8 a
Boro (mg planta <sup>-1</sup> )	1,1 a	1,1 a	1,6 a	1,4 a
Cobre (mg planta <sup>-1</sup> )	0,3 ab	0,1 b	0,2 ab	0,3 a
Ferro (mg planta <sup>-1</sup> )	31,0 a	10,0 b	18,3 ab	36,2 a
Zinco (mg planta <sup>-1</sup> )	1,0 b	3,3 a	0,8 b	0,9 b
Manganês (mg planta <sup>-1</sup> )	26,4 b	82,8 a	69,4 a	19,4 b

Médias seguidas por letras distintas na linha indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

# Capítulo V

## Discussão dos Resultados

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de três substâncias ativas (Silicato K, Eurofit, Ridomil) por aplicação ao solo, na proteção de plantas jovens de castanheiro contra a Doença da Tinta do Castanheiro. A resposta ao tratamento foi estudada com base nos sintomas evidenciados pela planta (mortalidade) e em parâmetros fisiológicos relacionados com o crescimento da planta.

Nos ensaios em estufa verificou-se que o Ridomil conferiu o maior grau de proteção das plantas em relação ao desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro não tendo ocorrido mortalidade das plantas até ao final do ensaio (setembro de 2018). O silicato de potássico (44% de mortalidade) e o Eurofit (33% de mortalidade) conferiram algum grau de proteção à Doença da Tinta do Castanheiro, relativamente às plantas que não levaram qualquer tratamento, mas menor percentagem que o tratamento com Ridomil.

Os fosfitos caracterizam-se pela sua eficiência no controle de míldios e diversas doenças causadas pelo género *Phytophthora*. A ação direta ou fungicida dos fosfitos está bastante documentada. Quanto à ação direta dos fosfitos sobre *Phytophthora*, sabe-se que o ácido fosforoso e seus derivados atuam na inibição do processo da fosforilação oxidativa em Oomicetas (McGrath, 2004). Entre os fosfitos, o de potássio destaca-se por afetar mais o crescimento micelial de diferentes espécies de *Phytophthora* e apresentar maior solubilidade, quando comparado a outros produtos do grupo (Ouimette & Coffey, 1989). No entanto, segundo os mesmos autores, os fosfitos nunca apresentam controlo total da doença, sejam estes aplicados de carácter preventivo ou curativo.

O Si, embora não seja considerado nutriente essencial para as plantas, destaca-se pelo seu potencial para diminuir a intensidade de doenças em várias culturas. O efeito do silício no controle de doenças de plantas, seu modo de ação e sua função em vários patossistemas ainda não estão totalmente esclarecidos. Existe a hipótese de uma possível formação de barreira física, que se baseia na acumulação de Si nas plantas, principalmente na parede celular. Em seu movimento ascendente (movimento apoplasto), das raízes às folhas, ocorre polimerização de Si nos espaços extracelulares, acumulando-se nas paredes das células epidérmicas das folhas e vasos do xilema (Samuels *et al.*, 1991; Fawe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* realizados por Kaiser *et al.* (2005) verificaram que concentrações de 5 ml silício solúvel por litro de ágar inibiam o crescimento de *P. cinnamomi* em 100%. Os mesmos autores,

recomendam, com base nos resultados apresentados, uma dosagem mínima de 20 ml por litro de solução de silício solúvel por litro de água para garantir o controle adequado de *P. cinnamomi* nos ensaios de campo e vaso.

O metalaxil foi introduzido na década de 1970 como fungicida sistêmico contra Oomicetas e tem sido largamente usado contra *Phytophthora*, *Pythium*, e míldios. O metalaxil movimenta-se apoplásticamente a partir de sementes, raízes e folhas para os novos crescimentos (Staub *et al.*, 1978; Zaki *et al.*, 1981; Gupta *et al.*, 1985); por isso o efeito sistêmico e curativo que o metalaxil exerce nas plantas faz com que seja mais vantajoso que os fungicidas curativos (protetores) especialmente quando a infecção ocorreu antes da aplicação. Sendo o metalaxil solúvel em água, ele pode ser aplicado ao solo onde é prontamente transportado pelas raízes e translocado apoplásticamente nos tecidos das plantas (Schwinn, 1983; Bruck *et al.*, 1980, Schwinn & Staub, 1987). O metalaxil é um exemplo de um fungicida com ação no interior da planta, sendo tóxico contra *Phytophthora* quando esta infecta e cresce em plantas (Schwinn & Staub, 1987, 1995). Estudos conduzidos por Swart & Dennam (2000) mostraram que a aplicação de metalaxil-M ao solo de vasos contendo plantas do gênero *Leucospermum*, reduziu a população de *P. cinnamomi* nesse mesmo solo e teve um efeito supressor no desenvolvimento dos sintomas na planta.

Neste estudo, o efeito da aplicação das substâncias ativas é visível logo após a primeira aplicação destas mesmas substâncias (maio de 2018, no aparecimento dos primeiros sintomas da doença). Assim que ocorre a primeira aplicação dos fungicidas em estudo a mortalidade nas modalidades Silicato K e Eurofit praticamente estabiliza, enquanto na modalidade que não levou qualquer substância ativa continuou a aumentar. Embora *Phytophthora* estivesse presente no solo de todos os tratamentos estudados, não foram detetados sintomas nas plantas do tratamento com Ridomil, pois nenhuma planta morreu ao longo do ensaio.

A aplicação das substâncias ativas ao solo, embora tenham protegido as plantas em grau variável, dependendo do tipo de substância em estudo, não eliminou *Phytophthora* do solo uma vez que os inóculos se mantêm no solo, como se veio a confirmar pelo método de tecido armadilha. Conhecer o período de tempo em que as plantas ficam protegidas assim como as épocas e doses de aplicação são aspetos sobre os quais é necessário obter informações para tornar eficiente e permitir a inclusão destas substâncias na proteção do castanheiro em programas de proteção integrada. Deste modo serão necessários outros estudos para comparar a persistência de ação destas

substâncias em plantas em estufa e confirmar o potencial de uso destas substâncias no campo.

Relativamente aos parâmetros fisiológicos, as plantas testemunha apresentaram um crescimento em altura média ligeiramente superior às plantas em que houve tratamentos, sem, no entanto, apresentarem diferenças significativas. O diâmetro médio ao nível do colo das plantas com aplicação de Ridomil foi superior ao das plantas testemunhas e com os outros tratamentos, mas os valores obtidos não mostraram diferenças significativas entre as modalidades. Nos dois parâmetros fisiológicos estudados, foi no tratamento com Eurofit que ocorreram os valores médios mais baixos.

Em relação a matéria seca determinada nas raízes e nos caules, foi nas plantas tratadas com silicato K que apresenta maiores valores médios, não apresenta diferenças significativas entre as plantas de castanheiros tratadas com fungicida Ridomil e a testemunha. Embora a testemunha apresente o segundo valor medio mais alto na raiz e no caule, expõe o valor medio mais alto na matéria seca das folhas, apresentaram diferenças significativas com o EuroFit. As plantas que acumularam mais massa total foram as plantas com tratamento com silicato K. Este tratamento foi o que apresentou maior quantidade de matéria seca nas raízes. Diferentes autores têm reconhecido o peso de matéria seca das raízes como um dos mais importantes e melhores parâmetros para se estimar a sobrevivência e o desenvolvimento de novas plantas (Gomes, 2001).

O Eurofit acidificou o solo e em consequência aumentou a acidez de troca e o alumínio de troca. O silicato K teve efeito contrário registando valores de pH no solo mais elevados que a testemunha. O produto comercial Eurofit apresenta um valor de pH extremamente ácido (0,3) e o Silicato K apresenta um pH alcalino (10,96). Assim, o efeito no pH registado nos diferentes tratamentos e, por consequência, na acidez e alumínio de troca terão sido devidos às características dos produtos comerciais. A subida da acidez de troca e da solubilização de alumínio à medida que desce o pH são fenómenos bem conhecidos (Santos, 2015).

O fósforo no solo subiu no tratamento Eurofit provavelmente devido à composição do produto (35 %  $P_2O_5$ ). O potássio extraível subiu no Silicato K pelas mesmas razões, isto é, o produto comercial contém 12 a 13 % de K expresso em  $K_2O$  na sua composição. O zinco no solo subiu no tratamento Eurofit também devido à composição do produto. Relativamente ao manganês, os valores deste nutriente no solo terão subido no Eurofit devido a descida de pH que solubilizou o nutriente. A elevada concentração

de manganês em solos ácidos é conhecida em solos de Trás-os-Montes (Arrobas *et al.*, 2007).

A concentração de azoto e fósforo nas raízes aumentou de forma marcada no tratamento Eurofit. A principal razão terá sido um fenómeno de concentração dos nutrientes devido à reduzida produção de biomassa. O fenómeno de concentração deve-se ao facto de a absorção radicular ser mantida em níveis elevados quando outras variáveis estão a restringir o crescimento das plantas (Rodrigues, 1997). No caso do fósforo terá contribuído também o aumento de fósforo no solo dada a presença de fósforo no produto comercial. Os teores de potássio nas raízes foram elevadas no tratamento Silicato K, devido à presença do elemento no produto comercial tal como se referiu para o solo. É também de notar que os teores de zinco nas raízes aumentaram no tratamento Eurofit tal como tinha acontecido com os teores de zinco no solo e a principal razão será a presença do elemento no produto comercial. No caso do manganês o aumento da concentração do elemento na raiz terá sido devido à descida de pH que solubilizou o nutriente e o tornou mais disponível para as plantas (Santos, 2015; Arrobas *et al.*, 2017).

Nos caules e nas folhas, os nutrientes mostraram as mesmas tendências registadas nas raízes e as justificações para os resultados terão sido as mesmas. Os valores da concentração dos nutrientes nas folhas podem ser comparados com os intervalos de suficiência de cada um dos nutrientes para o castanheiro, embora a comparação deva ser feita com reservas uma vez que os intervalos de suficiências foram estabelecidos para folhas jovens com o limbo completamente expandido de árvores adultas em produção e em data específica do ano e não para a totalidade das folhas de árvores jovens como acontece neste trabalho. Assim, o intervalo de suficiência para o azoto está compreendido entre 20 a 28 g kg<sup>-1</sup> (Arrobas *et al.*, 2018), tendo apenas as plantas tratadas com Ridomil se aproximado destes valores (20,7 g kg<sup>-1</sup>). Todas as plantas dos restantes tratamentos apresentaram resultados mais baixos, o que pode mostrar carência do nutriente uma vez que as plantas foram cultivadas em vasos com reduzida disponibilidade do elemento. No caso do fósforo as plantas tenderam a mostrar valores dentro do intervalo de suficiência (1,1 a 3,0 g kg<sup>-1</sup>), embora no tratamento Eurofit se tenham registado valores médios muito elevados com 6,3 g kg<sup>-1</sup>. Para o potássio surgem valores superiores ao intervalo de suficiência (7,5 a 18 g kg<sup>-1</sup>) nos tratamentos Ridomil (31,8 g kg<sup>-1</sup>) e Silicato K (31,8 g kg<sup>-1</sup>) e mais baixos nos tratamentos Eurofit (6,5 g kg<sup>-1</sup>) e Testemunha (6,4 g kg<sup>-1</sup>).

Para os restantes macro e micronutrientes foram registados resultados algo semelhantes aos macronutrientes azoto, fósforo e potássio, com valores a saírem frequentemente fora dos intervalos de suficiência. Repita-se que estes resultados não devem ser apreciados em absoluto, mas apenas em termos relativos, comparando entre os diferentes tratamentos, uma vez que o tipo de tecidos, a idade das plantas e a data de amostragem fogem ao padrão para o qual estão estabelecidos os intervalos de suficiência.

# Capítulo VI

## Conclusões

## 6. CONCLUSÕES

No final do ensaio foi confirmada a presença da espécie *P. cinnamomi* em todos os tratamentos mesmo com a utilização do fungicida Ridomil. Os resultados do ensaio evidenciaram que o fungicida Ridomil conferiu o maior grau de proteção em relação ao desenvolvimento da Doença da Tinta do Castanheiro não tendo ocorrido mortalidade das plantas até ao final do ensaio. Os resultados do efeito dos tratamentos na alteração da concentração de macro e micronutrientes tanto no solo como na matéria seca foi devido em grande parte às características dos produtos comerciais. Assim, o Eurofit acidificou o solo, em consequência aumentou a acidez de troca e o alumínio de troca. O silicato K proporcionou efeito contrário registando valores de pH no solo mais elevados que a testemunha. No tratamento com Eurofit a concentração de azoto e fósforo nas raízes aumentou, sendo que a principal razão terá sido um fenómeno de concentração dos nutrientes devido à reduzida produção de biomassa. O fenómeno ter-se-á devido ao facto da absorção radicular se ter mantido em níveis altos quando outras variáveis limitavam o crescimento das plantas.

Os dados obtidos neste ensaio permitiram obter informações relacionadas com plantas que se desenvolvem em solos infetados com *P. cinnamomi*, o que auxilia a delinear estratégias de proteção e dificultar a dispersão da doença quando os castanheiros evidenciam sintomas de Doença da Tinta do Castanheiro.

Os ensaios deveriam ser mantidos para avaliar o efeito a longo prazo dos tratamentos e deveriam ser realizados novos ensaios que permitissem a avaliação de outras concentrações dos produtos utilizados e diferentes substâncias em variadas combinações.

Os fungicidas sintéticos podem ter efeitos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, aplicações repetidas podem levar à resistência a fungicidas por patógenos Oomicetas. Estas preocupações criaram a necessidade de investigar outras opções, incluindo o controle biológico. Além disso, o uso combinado de agentes de biocontrolo e fungicidas químicos atraiu muita atenção, pois pode resultar em um controle mais integrado e sustentável das doenças do solo.

# Capítulo VII

## Referências Bibliográficas

## 7. Referências bibliográficas

- Arrobas M, Afonso S, Rodrigues M A, 2018. Diagnosing the nutritional condition of chestnut groves by soil and leaf analyses. *Scientia Horticulturae*, 228: 113-121.
- Arrobas M, Afonso S, Ferreira I Q, Moutinho-Pereira J, Carlos M, Correia C M, Rodrigues M A; 2017. Liming and application of nitrogen, phosphorus, potassium, and boron on a young plantation of chestnut. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41: 441-451.
- Azevedo E J V, 2014. Resposta do castanheiro à aplicação de fertilizantes ao solo. Dissertação de Mestrado em Agroecologia. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico Bragança, p 56.
- Bélangier R R, Bowen P A, Ehret D L, Menzies J G, 1995. Soluble Silicon Its Role in Crop and Disease Management of Greenhouse Crops. *Plant Disease*, 79(4): 329 - 336.
- Bremner J M, 1996. Nitrogen-Total. In: *Methods of soil analysis. Part 3, Chemical methods- SSSA. Soil Science Society of America Book Series. Book Series nº 5*, 1085-1122.
- Carneiro-Carvalho A, Pereira C, Marques T, Martins L, Anjos R, Teresa Pinto, Lousada J, Gomes-Laranjo J, 2017 .Potential of silicon fertilization in the resistance of chestnut plants to ink disease (*Phytophthora cinnamomi*). *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*, 2(5), 2740-2753.
- Carvalho J, 2014. Métodos de luta alternativos contra a Doença da Tinta do Castanheiro. Instituto Superior de Agronomia. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais. Universidade de Lisboa, p 82.
- Clements H F, 1965. The roles of calcium silicate slags in sugarcane growth. *Hawaiian Sugar Technol*, 103-126.
- Coelho V, 2009. Efeito do fosfonato de potássio na protecção das raízes do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) contra *Phytophthora cinnamomi*. Dissertação de Mestrado em Agroecologia. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico Bragança. p 97.
- DGAV, 2019. Direção Geral de Alimentação e Veterinária Disponível em: [http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/guia/finalidades\\_guia/Insec&Fung/Culturas/castanheiro.htm](http://www.dgav.pt/fitofarmaceuticos/guia/finalidades_guia/Insec&Fung/Culturas/castanheiro.htm) (atualizado a 16/04/2019) Acedido em 26 junho. 2019.

- Elawad S H, Gascho G J, Street J J, 1982. Response of Sugarcane to Silicate Source and Rate. I. Growth and Yield 1. *Agronomy Journal*, 74: 481-484.
- Epstein E, 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1):11-17.
- FAO, 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acedido em 17 mar 2019.
- Fawe A, Abou-Zaid M, Menzies J G, Bélanger R R, 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*, 88(5): 396-401.
- Gouveia E, Coelho V, Sousa N, Coutinho S, Nunes L, Monteiro M L, 2009. Um método eficiente para a detecção de *Phytophthora cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro na rizosfera de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.). *Revista de Ciências Agrárias*, 32 (1) 130-138.
- Gouveia E, Pereira E, Araújo A, Coelho V, Castro J, Bragança H, Martins L, 2016. Cancro do castanheiro em Trás-os-Montes (Portugal): incidência atual e estudo da estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica* para a introdução da luta biológica por hipovirulência. *Gaia Scientia*, 10 (2), 75-83.
- Gouveia E, 1993. Doença da Tinta do Castanheiro. Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. Dissertação do Curso de Mestrado em Proteção Integrada. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 135.
- Grünwald N J, Sturbaum A K, Montes G R, Serrano E G, Lozoya-Saldaña H, Fry W E, 2006. Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. *Phytopathology*, 96(12): 1397-1403.
- Guest D I, Grant B R, 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews*, 66: 159-187.
- Hoffman P J, Vuthapanich S, Whiley A W, Klieber A, Simons D H, 2002. Tree yield and fruit minerals concentrations influence ‘Hass’ avocado fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 92: 113-123.

- INE, 2019. Instituto Nacional de Estatística, *Estatísticas Agrícolas - 2018*, Disponível em: <https://www.ine.pt/> Acedido em 20 agosto de 2019.
- Keren R, 1996. Boron. In *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. Book Series n° 5*: 603-626.
- Lakanen E, Ervio R, 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Acta Agralia Fennica*, 123: 223-232.
- Landschoot P, Cook J, 2005. Sorting out the phosphonate products. *GCM*. 73-77.
- Ma J F, 1990. *Studies on Beneficial Effects of Silicon on Rice Plants*. Doctoral dissertation, Kyoto University, Japan.
- Ma J F, Takahashi E, 2002. *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Elsevier, Amsterdam, 4-105.
- MAP, 1977. Ministério da Agricultura e Pescas, Laboratório Químico-Agrícola Rebelo da Silva. Sector Fertilidade do Solo. Documentação 2. D.G.S.A.
- Marschner H, Oberle H, Cakmak I, Römheld V, 1990. Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. *Plant and Soil*, 124(2): 211-219.
- McGrath M T, 2004. What are fungicides? The plant health instructor. <https://www.apsnet.org/> Acedido em 2 setembro de 2019.
- Monteiro S, Carvalho A M C, Anjos R, Gomes-Laranjo J, Pinto T, 2017. The use of silicon as a protector against the ink disease in *Castanea sativa*: A microscopy approach. In the use of silicon as a protector against the ink disease in *Castanea sativa*: A microscopy approach. Espanha. Formatex Research Center, 359 - 366.
- Morikawa C K, Saigusa M, 2003. Mineral composition and accumulation of silicon in tissues of blueberry (*Vaccinium corymbus* cv. Bluecrop) cuttings. *Plant Soil*, 258: 1-8.
- Quimette D G, Coffey M D, 1989. Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species. *Phytopathology*, 79: 761-767.
- Portela E, Pires C C, Louzada J, 2010. Magnesium deficiency in chestnut groves: the influence of soil manganese. *Journal of Plant Nutrition*, 33: 452-460.

- Rodrigues M A, 1997. Análise de plantas: potencialidades e limitações. *Série Seminários*. Instituto Politécnico de Bragança, p 20.
- Santos J Q, 2015. Fertilização: Fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos. Publindústria, edições técnicas, Porto, p 553.
- Schuerger A C, Hammer W, 2003. Suppression of powdery mildew on greenhouse-grown cucumber by addition of silicon to hydroponic nutrient solution is inhibited at high temperature. *Plant Disease*, 87: 177-185.
- Sims J, 1996. Lime requirement. In: *Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods*. SSSA Book Series, 5: 491-515.
- Sistani K R, Reddy K C, Kanyika W, Savant N K, 1998. Integration of rice crop residue into sustainable rice production systems. *Journal of plant nutrition*, 21(9): 1855-1866.
- Stehmann C, Grant B R, 2000. Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 67: 13-24.
- Vannin A, Vettraino A M, 2001. Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3): 345–350.
- Van Reeuwijk, 2002. *Procedures for soil analysis*. Sixth edition. ISRIC. FAO
- Vettraino A M, Morel O, Prelerou C, Robin C, Diamandis S, Vannini A, 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with ink disease and crown decline. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 169–180.
- Walinga I, Van vark W, Houba V J G, Van Der Lee J J, 1989. *Soil and Plant analysis. Part 7, Plant Analysis Procedures*. Department of soil science and plant nutrition, p 263.
- Wutscher H K, 1989. Growth and mineral nutrition of young orange trees grown with high levels of silicon. *HortScience*, 24(2): 275-277.