



ValorCast

Valorização da castanha e otimização da sua comercialização



ValorCast

Valorização da castanha e otimização da sua produção

RefCast – Associação Portuguesa da Castanha



Aguiar Floresta – Associação Florestal e Ambiental de Vila Pouca de Aguiar



Coopenela - Cooperativa Agrícola de Penela da Beira



GEOSIL Empreendimentos Agro-Silvícolas, SA



IPB - Instituto Politécnico de Bragança



IPV - Instituto Politécnico de Viseu



UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

utad

ARATM – Associação Regional dos Agricultores das Terras de Montenegro



Espaço Visual – Consultores de Engenharia Agronómica, Lda



Agromontenegro, Lda



SORTEGEL Produtos Congelados, SA



Universidade do Porto



ValorCast – Valorização da castanha e otimização da sua produção

Coordenador Científico: José Gomes Laranjo

Editores: José Gomes Laranjo, Alcino Pires, José Ângelo Pinto, Duarte Marques, Anabela Martins, Rui Carneiro

Local de publicação: Vila Real

Data de publicação: 12/2022

Edição: RefCast – Associação Portuguesa da Castanha

Nº edição: 1ª edição

Impressão e acabamento: Minerva Transmontana, Tipografia, Lda

Tiragem:

Fotografias: dos autores

Suporte: impresso e digital

ISBN: 978-989-53782-2-7

Depósito Legal: 509074/22

PREFÁCIO

A castanha foi um alimento fundamental no passado, basta lembrar que o castanheiro acompanhava as tropas Romanas durante a expansão do Império Romano devido ao seu carácter multifuncional, produzindo madeira para as construções e produzindo castanha para a alimentação das tropas. A castanha continua a ser um alimento importante no presente, despertando cada vez mais interesse pelas suas qualidades dietéticas, e continuará a sê-lo para o futuro, cada vez mais como uma mais valia nos pratos onde é incorporada, seja na “alta cozinha” seja na cozinha dos “nossos dias”. A castanha é por isso, um alimento intemporal, um alimento interclassista, passando de alimento base de pobres nos tempos da “Maria Castanha” (*in* Jorge Lage), até aos dias de hoje, onde claramente acrescenta uma mais valia na alimentação cada vez mais “gourmet” onde entra, sem, contudo, deixar de ser a castanha dos magustos e das numerosas festas populares que decorrem um pouco por todo lado.

Os tempos são também outros nas exigências de qualidade para o consumidor moderno, urbano ou rural, mais ou menos jovem. As alterações climáticas estão a criar novos desafios à preservação da qualidade e conservação da castanha, desde o momento da apanha até que chega ao consumidor. A globalização dos mercados convoca-nos igualmente para novos desafios e para uma necessidade de sermos cada vez mais competitivos. As cadeias podem ser cada vez mais longas.

Este foi o grande desafio dos promotores do ValorCast: conhecer as debilidades e apontar novas soluções para a apanha de castanha; introduzindo melhoramento nos processos pós-colheita de forma a minimizar impactos relacionados com a presença de pragas e doenças na castanha; desenvolvendo novas propostas de revestimentos e embalamentos para que a castanha chegue cada vez mais em melhores condições ao consumidor e; por fim, criando novas propostas de produtos com ou à base de castanha.

Tudo isto para que no final o setor consiga colocar à disposição do consumidor um produto cada vez mais de excelência, na linha da nova estratégia da EU para a Agricultura “do prado ao prato”.

O setor merece!

O consumidor merece!

A ver vamos!

José Gomes Laranjo

Coordenador Científico do GO ValorCast

Índice

1.	O projeto e os parceiros	11
1.1.	Identificação do problema ou oportunidade que se propõe abordar.....	11
1.2.	Descrição da situação de partida, no que respeita ao problema ou oportunidade objeto da iniciativa.....	12
1.3.	Descrição dos objetivos visados.....	15
2.	Identificação das principais perdas do valor comercial da castanha ..	17
2.1.	Introdução.....	17
2.2.	Dados dos produtores.....	18
2.3.	Dados dos soutos.....	19
2.4.	Fatores críticos na produção de castanha em Portugal.....	21
2.5.	Práticas culturais na cultura do castanheiro em Portugal.....	24
2.6.	Cultivares produzidas em cada Dop.....	25
2.6.1.	Dop Castanha dos Soutos da Lapa.....	25
2.6.2.	Dop Castanha da Padrela.....	26
2.6.3.	Dop Castanha da Terra Fria.....	26
2.7.	Colheita.....	28
2.7.1.	Seleção das castanhas.....	28
2.7.2.	Mão de obra na colheita.....	28
2.7.3.	Colheita mecânica.....	29
2.8.	Armazenamento da castanha.....	31
2.9.	Preço da castanha.....	32
2.10.	Autoconsumo.....	34
2.11.	Conclusão.....	36
3.	Melhoria dos procedimentos de colheita de castanha	39
3.1.1.	Objetivos.....	39
3.1.2.	Material e métodos.....	39
3.1.2.3	métodos de colheita.....	44
3.1.2.5	avaliação da capacidade de trabalho.....	45
3.1.3.	Resultados e discussão.....	49
3.1.4.	Conclusões.....	56
3.1.5.	Referências.....	57
3.2.	Análise do impacto da colheita mecânica na qualidade e capacidade de conservação da castanha na dop castanha da padrela e dop castanha dos soutos da lapa.....	58
3.2.1.	Ensaio colheita mecânica na Dop Castanha da Padrela.....	58
3.2.2.	Ensaio colheita mecânica Dop castanha dos Soutos da Lapa.....	61
4.	Controlo de bichado no pós-colheita. Resultados preliminares da utilização de protótipo	65
5.	Controlo das podridões da castanha	73
5.1.	Comunidade fúngica associada a castanhas portuguesas: cultivar, tipo de processamento e período de conservação como fatores de diversidade.....	74

5.1.1.	Objetivos	74
5.1.2.	Materiais e métodos	74
5.1.3.	Resultados e discussão.....	76
	inspeção exterior e interior das castanhas.....	76
	diversidade e incidência de fungos	78
5.1.4.	Conclusões	79
5.2.	Controlo das podridões por arejamento das caixas palete	81
5.2.1.	Objetivos	81
5.2.2.	Materiais e métodos	81
5.2.3.	Resultados e discussão.....	83
	parâmetros ambientais	83
	avaliação das castanhas.....	85
	perda de peso	85
	podridões externas.....	85
	podridões internas.....	85
	avaliação geral no final do ensaio	87
5.2.4.	Conclusões	88
5.3.	Avaliação da incidência e virulência de <i>gnomoniopsis smithogilvyi</i> , agente causal da podridão castanha	89
5.4.	Controlo da podridão castanha pelo processo de esterilização.	91
5.5.	Ensaio de ensaio de campo sobre a avaliação de fungicidas e uma solução nutritiva no controlo de <i>gnomoniopsis smithogilvyi</i>	94
5.6.	Referências	104
6.	Caracterização da perda de água nas principais cultivares de castanha	107
6.1.	Objetivos	107
6.2.	Trabalho experimental	107
6.3.	Tratamento de dados	109
6.4.	Resultados e discussão.....	110
6.4.1.	Raios caraterísticos	110
6.4.2.	Percentagem máxima de perda de água	111
6.4.3.	Coeficientes de difusão.....	114
6.5.	Conclusões	117
6.6.	Referências.....	117
7.	Aplicação de revestimentos na castanha	119
7.1.	Resumo.....	119
7.2.	Introdução.....	120
7.3.	Conclusões	138
7.4.	Agradecimentos	139
7.5.	Referências.....	140
8.	Utilização de embalagens como forma de reduzir a perda de água	143
8.1.	Resumo.....	143
8.2.	Introdução.....	144
8.3.	Conclusões	153

8.4.	Agradecimentos	153
8.5.	Referências	154
9.	Farinha de castanha: caracterização e utilização	155
9.1.	Introdução	155
9.2.	Farinha de castanha	156
9.2.1.	Produção	156
9.2.2.	Características da farinha de castanha	158
9.3.	Utilização da farinha de castanha	169
9.3.1.	Produção de pão hipermacio	170
9.3.2.	Produção de massa alimentícia	172
9.4.	Referências bibliográficas	174
10.	Novos produtos à base de castanha: castanhas cozidas em calda de vinho	183
10.1.	Resumo	183
10.2.	Introdução	184
10.2.1.	Descrição dos principais ingredientes usados na formulação dos produtos	184
10.3.	Materiais e métodos	189
10.3.1.	Desenvolvimento do produto	189
10.3.2.	Caracterização do perfil sensorial das amostras	190
10.4.	Resultados e discussão	192
10.4.1.	Primeira prova sensorial	192
10.5.	Referências	202
11.	Avaliação económica do impacto da utilização das medidas propostas no go mecânica	205
11.1.	Análise da viabilidade económica dos diferentes métodos de apanha	205
11.1.1.	Enquadramento	205
11.1.2.	Objetivo geral e específico	206
11.1.3.	Caracterização da exploração	206
11.1.4.	Métodos de colheita	206
11.1.5.	Segundo cenário	208
11.1.6.	Dimensões de rentabilidade	225
11.1.7.	Conclusões	226
11.2.	Análise económica da experiência do controlo da perda de peso das castanhas em conservação frigorífica	228
11.3.	Análise da viabilidade económica da estrutura de arejamento nas caixas palete	231
11.4.	Estudo económico da farinha de castanha	233

5. Controlo das podridões da castanha

Paula Rodrigues^{1,2}, Ana Gomes³, José Gomes Laranjo^{3,4} e Ana Sampaio^{3,4}

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

²Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), IPB, Campus de Santa Apolónia, 5300-253, Bragança, Portugal

³Centro de Investigação e Tecnologia de Ciências Agroambientais e Biológicas (CITAB-UTAD), Vila Real, Portugal

⁴Laboratório Associado Instituto para a Inovação, Capacitação e Sustentabilidade da Produção Agro-alimentar (Inov4Agro), UTAD, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

A maioria da castanha portuguesa tem como destino o mercado nacional e internacional do fresco. Em termos médios, a castanha chega aos operadores com cerca de 15 a 30% de castanha bichada, dependendo das condições climáticas do ano e do maneio do souto. Esta perda pode representar cerca de 10 000 t de castanha (cerca de 15 M €), no total de cerca de 30 000 t processadas, que terão de ser desviadas de imediato para refugo. Esta elevada percentagem, além de causar prejuízos significativos, levanta sérios problemas no processamento da castanha visando a sua colocação no mercado. A recente proibição da utilização na Europa do brometo de metilo para a desinfestação da castanha, veio criar novas dificuldades aos operadores, que ainda não estão completamente solucionadas. O método atualmente mais usado é a imersão de castanha em água quente (choque térmico). Este processo tem criado dificuldades de conservação da castanha nos processos de exportação de longo curso. Outras soluções foram já tentadas com algum sucesso quanto ao efetivo controlo da praga, como a irradiação e a pressurização. Contudo apresentam limitações à sua execução quanto aos custos envolvidos e à capacidade de processamento de grandes quantidades de castanha. Assim, outras possibilidades deverão ser consideradas.

As unidades de processamento debatem-se ainda com o aparecimento muito frequente de podridões nas castanhas, provocadas por diversos fungos (*Penicillium* sp., agentes causadores da podridão verde; *Ciboria batschiana* (syn. *Sclerotinia pseudotuberosa*), agente causador da podridão negra; *Gnomoniopsis* sp. e *Phoma endogena*, agentes causadores da podridão castanha, ou mumificação) que podem levar à destruição completa do lote de castanha. Este problema é um óbice ao prolongamento no tempo da oferta de castanha de qualidade, conforme as necessidades do mercado exigem atualmente.

5.1. Comunidade fúngica associada a castanhas portuguesas: cultivar, tipo de processamento e período de conservação como fatores de diversidade

5.1.1. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: i) determinar a incidência, abundância e diversidade de fungos em castanhas de três cultivares de *Castanea sativa* do nordeste de Portugal (Longal, Judía e Martáinha); e ii) identificar as fases de processamento e o tempo de armazenamento onde os fungos e podridões são mais significativos.

5.1.2. Materiais e métodos

O estudo foi desenvolvido usando castanhas de Trás-os-Montes recebidas, processadas e armazenadas na empresa Sortegel, durante a campanha 2018/2019. As amostras (33) foram recolhidas em várias fases do processamento e armazenamento, de três cultivares, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos pontos de amostragem de castanhas para avaliação de fungos e podridões.

Código	Fase de processamento	Tempo de Armazenamento (dias)	Cultivares (Réplicas)
P2	Esterilizadas por banho térmico (45 °C, 30 min)	0	Judía (3)
			Longal (2)
P3	Esterilizadas por banho térmico (45 °C, 30 min) e armazenadas	15	Judía (1)
P6	Imediatamente após receção, sem esterilização	0	Judía (3)
			Longal (3)
			Martáinha (2)
P7	Armazenadas sem esterilização	15	Judía (3)
			Longal (1)
			Martáinha (1)
P8	Armazenadas sem esterilização	30	Judía (1)
			Longal (3)
			Martáinha (1)
P9	Armazenadas sem esterilização	45	Judía (2)
P10	Esterilizadas por banho térmico (45 °C, 30 min), rejeitadas após seleção	0	Judía (3)
			Longal (4)

De cada amostra foram avaliados e registados os seguintes parâmetros (em 50 castanhas/amostra): aspeto exterior (defeitos, infestação, fungos) (Figura 1); aspeto interior (Figura 2); número de frutos com podridão interna (incidência); área interna da castanha com podridão (severidade); e tipo de podridão (Rodrigues *et al.*, 2022).



Figura 1 - Método de avaliação externa das castanhas (Driss, 2019).



Figura 2 - Avaliação interna das podridões (Driss, 2019).

A incidência foi calculada como a razão (percentual) entre o número de castanhas infetadas e o número total de castanhas testadas. Os níveis de severidade foram definidos na seguinte escala: L0: sem infeção; L1: 1 a 25% de infeção; L2: 26 a 50% de infeção; L3: 51 a 75% de infeção; L4: 76 a 100% de infeção (Donis-González *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2022). Os níveis de severidade da infeção (obtidos por observação qualitativa) foram transformados num índice que representa a distribuição de frequências obtida em cada unidade experimental, de modo a associá-la a uma resposta quantitativa. Em escalas com três ou mais classes, como no caso deste estudo, a resposta quantitativa foi obtida pela média ponderada das classes, usando o índice proposto por McKinney (1923):

$$I = \sum_{k=1}^K \frac{F_k \cdot x_k}{n \cdot x_K}$$

Para cada amostra, foram selecionadas 10 castanhas com podridão visível. Destas castanhas foram cortados 5 explantes de dimensão semelhante (aproximadamente 0,5 cm de lado) e semeados em placa de Petri contendo 15 mL de meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Figura 3). Após incubação a 25 °C durante 7 dias, os fungos foram isolados e posteriormente identificados por métodos morfológicos e moleculares, através da sequenciação da região ITS (Rodrigues *et al.*, 2022).

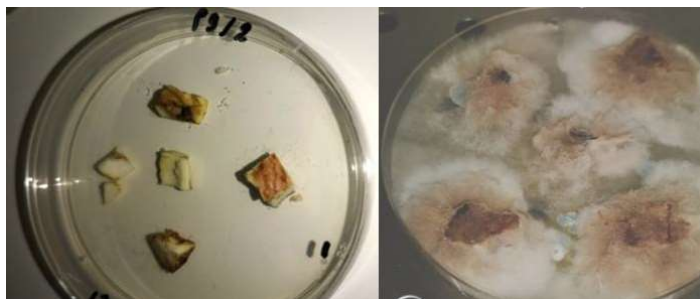


Figura 3 - Sementeira em meio de cultura de explantes de castanhas com podridão, após incubação a 25 °C durante 7 dias.

5.1.3. Resultados e discussão

Inspeção exterior e interior das castanhas

Conforme apresentado na Figura 4, a cultivar Longal foi a que apresentou a percentagem de danos exteriores mais elevada, independentemente da fase de processamento. Foram observadas diferenças significativas entre as cultivares Longal e Judia ($p < 0.05$).

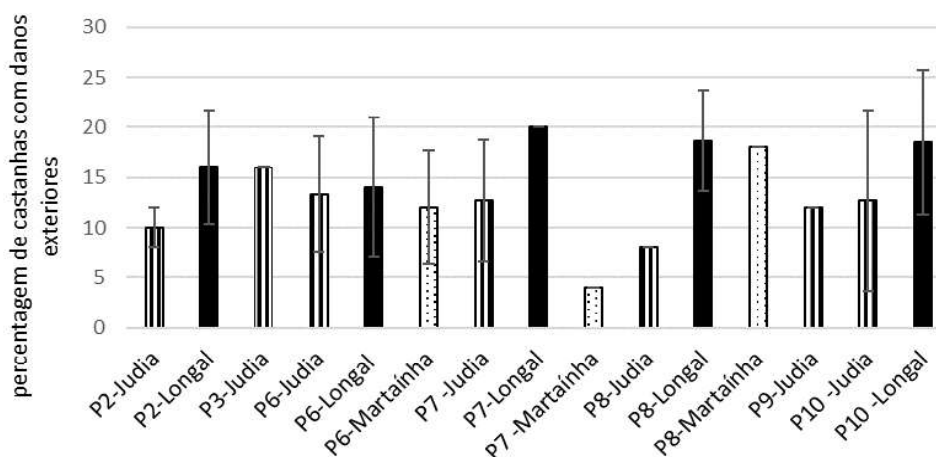


Figura 4 - Percentagem de castanhas danificadas nas diferentes fases de processamento e armazenamento, para as cultivares Longal, Judia e Martainha.

A percentagem de infestação média mais elevada foi registada na cultivar Longal, exceto na fase P10 (rejeitadas), onde a cultivar Judia mostrou maior taxa de infestação (Figura 5). Por outro lado, as amostras recolhidas nos pontos de amostragem P2 e P3 (esterilizadas, com 0 e 15 dias de armazenamento, respetivamente) apresentaram a mais baixa incidência de infestação. O tempo de armazenamento nas castanhas não esterilizadas (P6 a P9) mostrou ter um impacto negativo sobre a incidência de infestação, uma vez que se verificou um aumento ao longo do período de armazenamento.

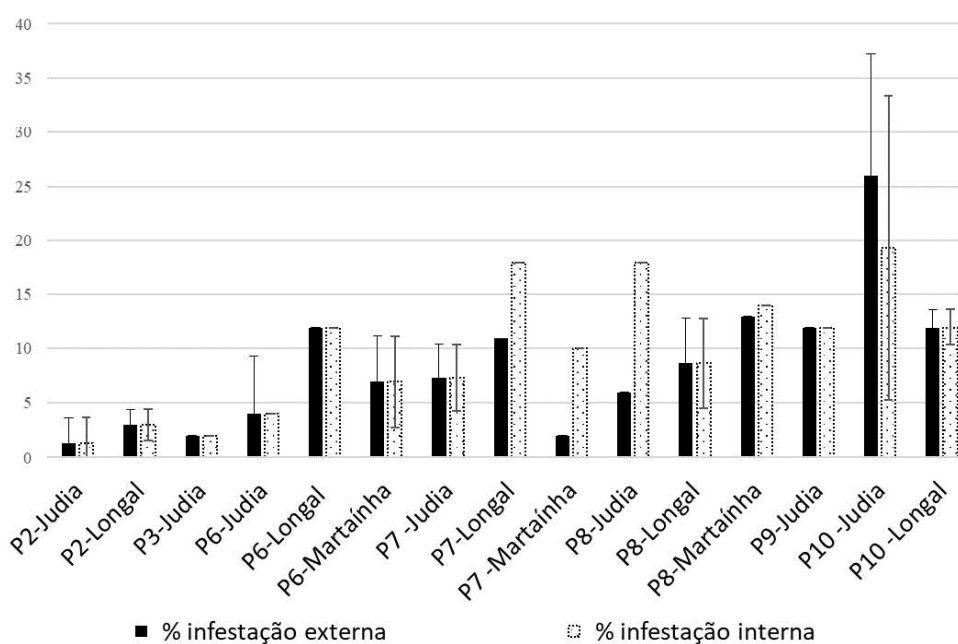


Figura 5 - Percentagem de castanhas com infestação externa e interna nas diferentes fases de processamento e armazenamento, para as cultivares Longal, Judia e Martainha.

Relativamente ao nível de podridão fúngica interna, calculado através do índice de McKinney (Figura 6), as amostras sem esterilização apresentaram genericamente níveis de infeção mais elevados. Das três cultivares, a Longal apresentou o maior índice de severidade de podridões internas (maior índice de McKinney), mostrando ser a mais sensível à infeção e desenvolvimento de fungos. Esta cultivar possui conteúdo proteico e lipídico mais elevados do que as restantes (Costa *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2009), assim como menor conteúdo em fenóis totais, ácido elágico e ácido gálico (Vasconcelos *et al.*, 2009). Os fenóis em geral, e os ácidos elágico e gálico em particular, têm um papel central na defesa das plantas contra a infeção fúngica através da ativação de respostas antioxidativas ou inibição da produção de ergosterol (El-Nagar *et al.*, 2020; El-Shahir *et al.*, 2022).

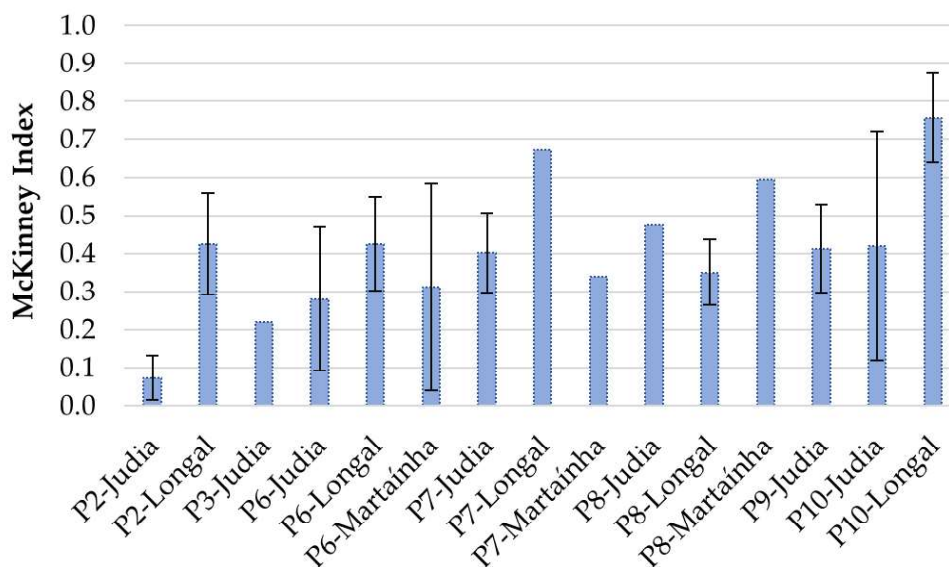


Figura 6 - Índice de severidade (índice de McKinney) das podridões internas das castanhas nas diferentes fases de processamento e armazenamento, para as cultivares Longal, Judia e Martainha.

O nível de podridão teve uma correlação positiva e significativa com os restantes parâmetros avaliados, nomeadamente nível de danos externos ($r = 0.579$, $p = 0.000$), sinais externos e internos de infestação ($r = 0.647$, $p = 0.000$ e $r = 0.593$, $p = 0.000$, respetivamente) e com o nível externo de contaminação fúngica ($r = 0.585$, $p = 0.000$).

A infeção fúngica interna e a podridão do endosperma não são dependentes apenas da existência de danos na casca ou de feridas de oviposição, uma vez que alguns fungos responsáveis pelo apodrecimento do endosperma são considerados endófitos. No entanto, as feridas e danos aumentam essa podridão, uma vez que servem de porta de entrada para fungos externos (Overy *et al.*, 2003).

Diversidade e incidência de fungos

No total das amostras, foram isolados 557 fungos filamentosos, dos quais foram identificados 78 por métodos morfológicos e moleculares. Foram identificadas 37 espécies diferentes, pertencentes aos seguintes géneros: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botryotinia*, *Botrytis*, *Ciboria*, *Cladosporium*, *Coleophoma*, *Coniella*, *Curvibasidium*, *Cytospora*, *Didymella*, *Fusarium*, *Gnomoniopsis*, *Lanzia*, *Mollisia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Phacidium*, *Pilidium*, *Sporothrix*, *Stromatina* e *Trichoderma*. A Figura 7 mostra a incidência das espécies identificadas, por fase de processamento. Destacamos *Mucor racemosus* pela sua elevada incidência, e os fungos *Penicillium* spp. (agentes causais das podridões verdes/azuis), *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) e *Ciboria*

batschiana (podridão negra), pelo seu papel relevante como agentes causais de podridões que conduzem a elevadas perdas durante o armazenamento. De especial relevância é a espécie *Gnomoniopsis smithogilvyi*, detetado neste estudo pela primeira vez em Portugal em castanhas armazenadas, com incidência média de 10%. Este fungo é o agente causal da podridão castanha, que se revelou na última década um dos principais fatores de perdas e castanha por podridão em toda a Europa, nomeadamente em Itália (Visentin *et al.*, 2012; Maresi *et al.*, 2013) e na Suíça (Dennert *et al.*, 2015), mas também na Austrália (Smith e Ogilvy, 2008; Gentile *et al.*, 2010; Shuttleworth *et al.*, 2013).

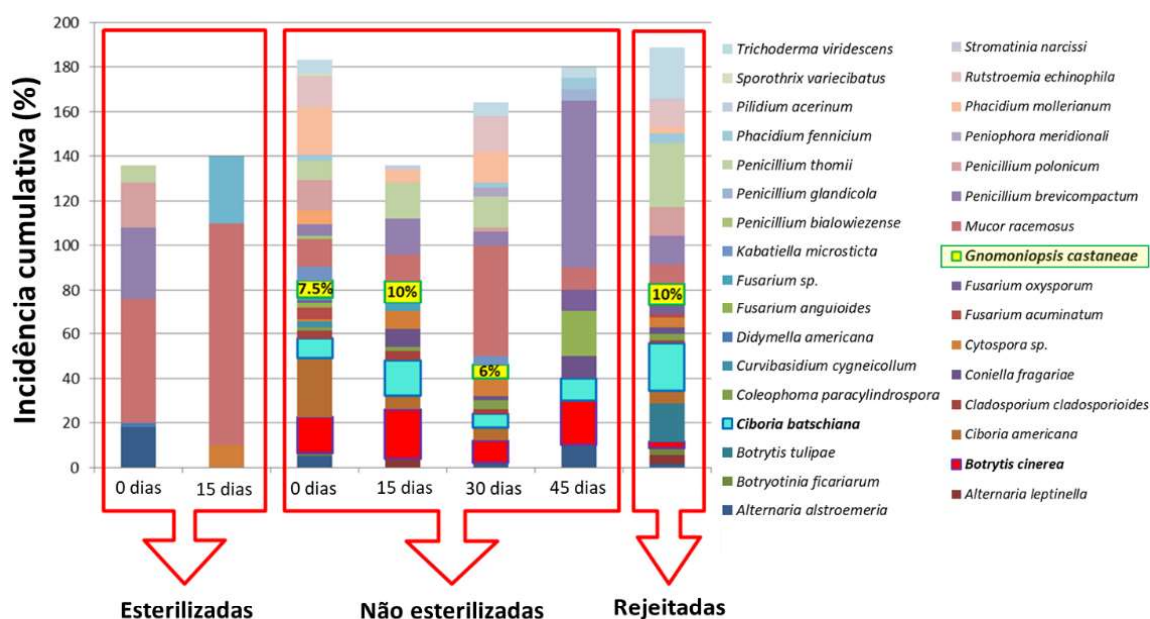


Figura 7 - Incidência média de fungos isolados de castanhas, por fase de processamento.

5.1.4. Conclusões

Na indústria, o armazenamento das castanhas representa um problema significativo devido ao desenvolvimento de uma elevada variedade de fungos de deterioração, que levam ao apodrecimento dos frutos. Entre as espécies de fungos dominantes, foram encontrados importantes agentes de podridão, como *B. cinerea*, agente causal da podridão cinzenta; *G. smithogilvyi*, causador da podridão castanha; *C. batschiana*, podridão negra; e várias espécies de *Penicillium*, responsáveis pelas podridões verdes e azuis, e potenciais produtoras de micotoxinas.

Os resultados obtidos sugerem que a diversidade de fungos, assim como a severidade das podridões, dependem da cultivar, fase de processamento e tempo de

armazenamento. A cultivar Martaínha parece ser menos sensível ao desenvolvimento fúngico, enquanto a Longal mostrou-se mais sensível à infeção e apodrecimento.

A esterilização hidrotérmica industrial parece ser eficaz na eliminação ou redução de alguns fungos, nomeadamente *G. smithogilvyi*, *C. batschiana* e *B. cinerea*, embora não mostre eficácia contra outros (*Mucor*, *Penicillium* e *Alternaria*).

O conhecimento das interações castanha-fungo nas diferentes cultivares e fases de processamento pode servir como base de avaliação e monitorização do apodrecimento das castanhas na indústria, assim como apoiar o desenvolvimento de estratégias e tratamento de controlo eficazes na fase pós-colheita da cadeia de valor da castanha.

Por outro lado, estudos subseqüentes são necessários no sentido de desenvolver metodologias rápidas, precisas e não destrutivas capazes de detetar e quantificar em tempo real o desenvolvimento de podridões, assim como de diferenciar os seus agentes causais. O desenvolvimento de tais metodologias é essencial para o controlo eficaz das podridões em tempo útil, uma vez que se sabe que os fungos por elas responsáveis são frequentemente de origem endófito, não apresentando sinais exteriores visíveis.

5.2. Controlo das podridões por arejamento das caixas palete

5.2.1. Objetivos

Após a receção da castanha nas unidades de processamento, esta é colocada em caixas palete até ser processada. Devido à humidade e aos fungos presentes nas castanhas, facilmente ocorre um aumento de temperatura levando à fermentação e podridão da castanha. Pretendeu-se com este ensaio quantificar e reduzir este problema, através da testagem de um sistema de arejamento das castanhas nas caixas palete.

5.2.2. Materiais e métodos

Em novembro/dezembro de 2021 foi preparado o ensaio de arejamento, através da montagem de um sistema de arejamento do centro de massa das caixas palete de castanha usando tubos de 50 mm de diâmetro com perfurações, conforme se verifica na Figura 8A. O sistema foi ajustado às características das caixas palete e de conservação da empresa Sortegel para tentar responder aos principais problemas de podridões detetados pela empresa neste tipo de armazenamento, tendo sido adaptado do sistema descrito por Jenkins (2014). O sistema de tubos foi preparado nos serviços técnicos do IPB.

Foram seleccionadas quatro caixas palete de castanhas (1 ton de castanha cada) da cultivar Longal, calibre 28, duas com castanhas esterilizadas por banho quente, e duas com castanhas calibradas não esterilizadas. Para cada tipo, numa das caixas palete foi colocado o sistema de arejamento (condição teste, Figura 8B), e a outra foi mantida como controlo (sem sistema de arejamento).

No centro das caixas palete foram colocados sacos de rede com aproximadamente 1 kg de castanhas (Figura 8C), representando a zona de maior apodrecimento. No centro de massa da caixa palete (em local próximo dos sacos de amostras), assim como no exterior das caixas palete, foram colocados *data loggers* para registo contínuo de temperatura e humidade nas caixas palete arejadas e não arejadas (Figura 8D).

Depois de preparadas, as caixas palete foram colocadas na câmara de frio (Figura 8E). O ensaio teve início no dia 13/01/2022, e foram feitas colheitas de amostras (3 sacos de cada palote) com intervalos de duas semanas durante dois meses, num total de 5 tempos de análise.



Figura 8. Sistema de arejamento montado nas caixas palete de castanhas: A) sistema de tubos perfurados; B) colocação de sacos de amostras e *data loggers* no centro de massa da caixa palete; C) aspeto do saco de amostra (1 kg de castanhas); D) detalhe do *data logger*; E) armazenamento das caixas palete na câmara refrigerada.

De cada amostra foram avaliados e registados os seguintes parâmetros (em 50 castanhas/amostra): peso de 50 frutos; aspeto exterior (defeitos, infestação, fungos); aspeto interior (Figura 9A); número de frutos com podridão interna (incidência); área interna da castanha com podridão (severidade); tipo de podridão; contaminação fúngica interna (Figura 9B) (apenas em 10 castanhas) (Rodrigues *et al.*, 2022).

A incidência foi calculada como a razão (percentual) entre o número de castanhas infetadas e o número total de castanhas testadas. Os níveis de severidade foram definidos na seguinte escala: L0: sem infeção; L1: 1 a 25% de infeção; L2: 26 a 50% de infeção; L3: 51 a 75% de infeção; L4: 76 a 100% de infeção (Donis-González *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2022). Os níveis de severidade da infeção (obtidos por observação qualitativa) foram transformados num índice que representa a distribuição de frequências obtida em cada unidade experimental, de modo a associá-la a uma resposta quantitativa. Em escalas com três ou mais classes, como no caso deste estudo, a resposta quantitativa foi obtida pela média ponderada das classes, usando o índice proposto por McKinney (1923):

$$I = \sum_{k=1}^K \frac{F_k \cdot x_k}{n \cdot x_K}$$

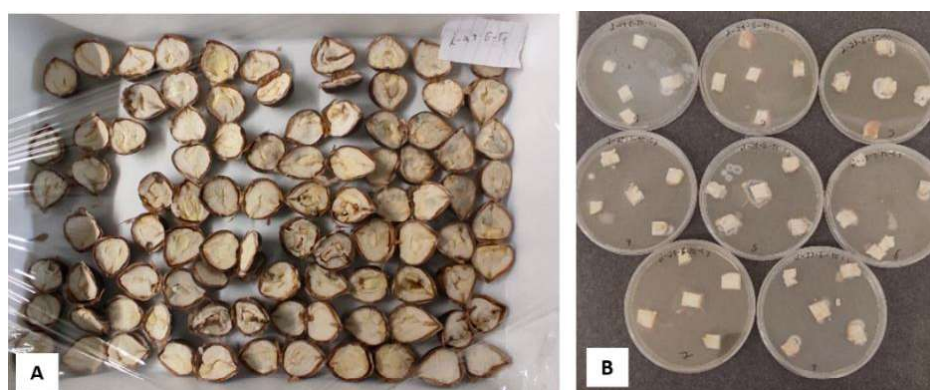


Figura 9 - Método de avaliação de podridões no interior das castanhas (A) e do tipo de fungos presentes em castanhas aparentemente saudáveis (B).

5.2.3. Resultados e Discussão

Parâmetros ambientais

Os resultados de temperatura (T) e humidade relativa (HR) registados pelos *data loggers* nas quatro caixas palete, assim como no ambiente da câmara estão apresentados nas Figuras 10A e 10B, respetivamente (média dos valores registados ao longo do tempo). Não se verificaram variações significativas da T e HR ao longo dos 60 dias do ensaio. No entanto, a descida de temperatura desde o momento de colocação das caixas palete na câmara até à estabilização da T foi mais rápida nas caixas palete arejadas.

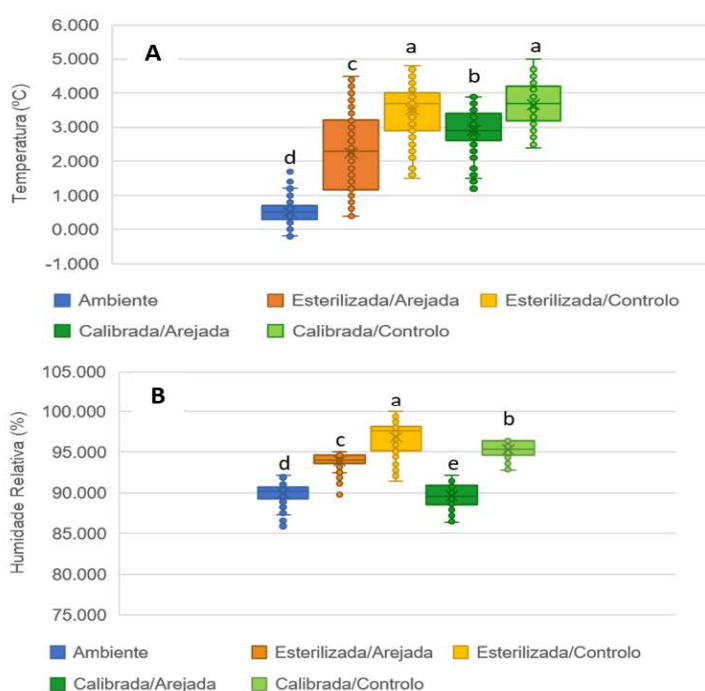


Figura 10 - Registo de temperatura (A) e humidade relativa (B) no ambiente da câmara e nas caixas palete.

Pode verificar-se que a T atingida no centro de massa das caixas palete é significativamente mais elevada do que a T ambiente, o que resulta da natural continuidade do processo de respiração das castanhas, assim como de um possível início de processos de fermentação. Por sua vez, o sistema de arejamento permitiu manter a T significativamente mais baixa nas caixas palete arejadas relativamente às caixas palete controlo. Estes resultados podem indiciar uma redução dos processos fermentação através do arejamento.

Relativamente à HR, verificou-se menor HR nas caixas palete arejadas do que nas caixas palete controlo, e no final do ensaio, no momento em que os sistemas de arejamento foram removidos das caixas palete, era possível observar acumulação de água (condensação) no interior dos tubos de arejamento, em particular na caixa palete das castanhas calibradas (Figura 11).

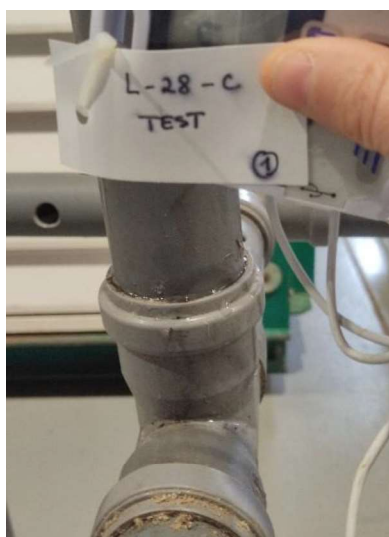


Figura 11 - Sistema de arejamento da caixa palete de castanha calibrada, no momento da retirada, onde se observa forte condensação.

As caixas palete de castanhas esterilizadas apresentaram valores significativamente mais elevados de HR que as castanhas calibradas. Este resultado deveu-se ao facto de, após a esterilização, as castanhas não terem sido devidamente secadas por problemas técnicos no equipamento de esterilização. Em face disto, podemos considerar que os dados de HR das castanhas esterilizadas não corresponderão aos valores normalmente registados.

Avaliação das castanhas

Perda de peso

A Figura 12 apresenta a evolução do peso de 50 castanhas ao longo dos 60 dias do ensaio para os quatro tratamentos. Verificou-se uma ligeira redução do peso das castanhas esterilizadas nos primeiros 15 dias do ensaio, provavelmente devido ao excesso de humidade registado, mas essa diferença não foi significativa. Não se verificou variação significativa de peso em nenhum lote de castanhas ao longo do tempo.

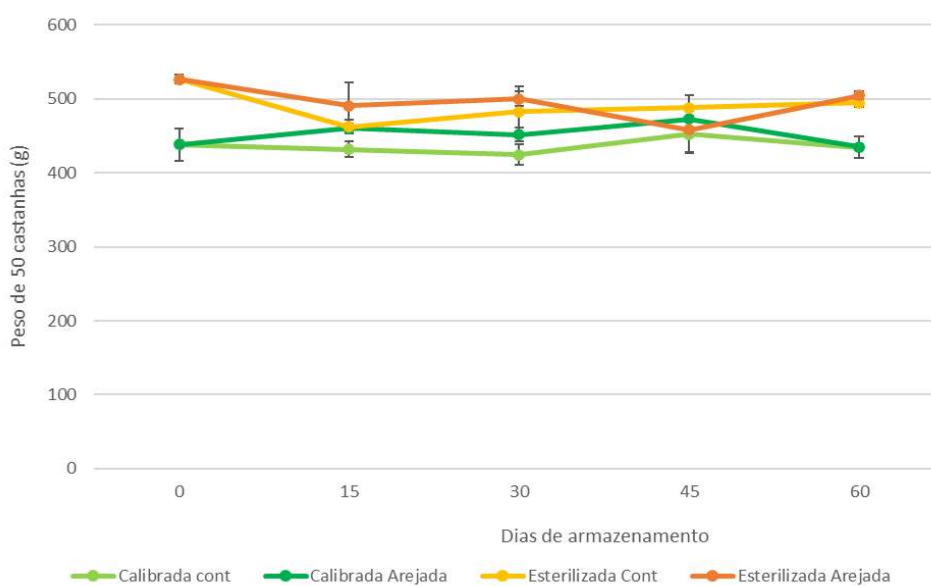


Figura 12 - Variação de peso de 50 castanhas ao longo do tempo (dias), relativamente ao peso inicial (média \pm DP, n=3).

Podridões externas

Das 50 castanhas analisadas para cada tratamento, apenas 4 apresentavam sinal de bolores à superfície. Não se verificaram variações significativas de podridões externas ao longo do tempo, nem diferenças significativas entre tratamentos.

Podridões internas

Os diferentes tratamentos apresentaram diferentes níveis de podridão interna, tanto em termos de incidência (Figura 13A) como de área interna da castanha com podridão. O nível de podridão interna é representado pelo Índice de McKinney (I; Figura 13B), que conjuga incidência (percentagem de castanhas com podridão) com

severidade (área interna da castanha com desenvolvimento de fungo). Em geral, as castanhas apresentaram incidência de podridão interna entre 10 e 17%. As castanhas arejadas apresentaram genericamente maior I. No entanto, a variância entre réplicas foi muito elevada (elevado desvio padrão), tanto para incidência como para severidade (I), pelo que nenhuma diferença entre amostras foi considerada significativa.

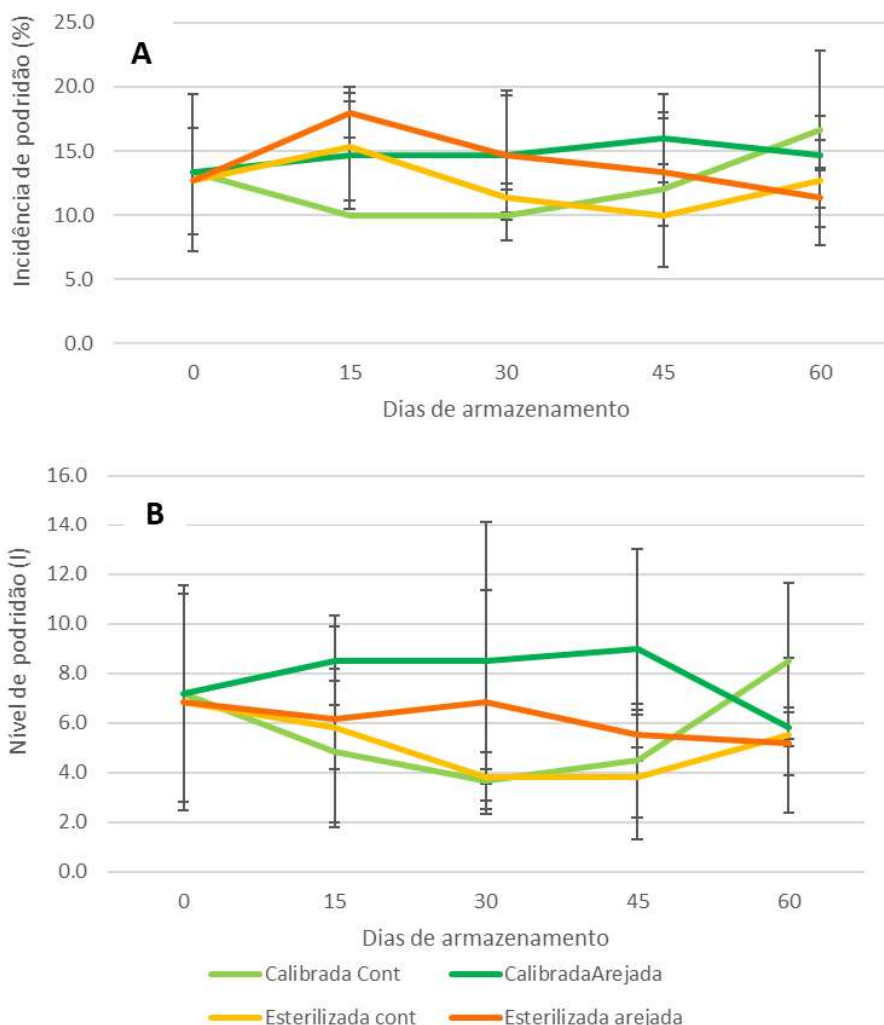


Figura 13 - Incidência (A) e nível de podridão (Índice de McKinney) (B), para os diferentes tratamentos (média \pm DP, n=3)

Além da avaliação da podridão interna visível, foi também avaliada a infecção interna (em 10 castanhas aparentemente saudáveis) de fungos potencialmente presentes mas não visíveis, através da sementeira de porções de castanha em placa de Petri. A Figura 14 apresenta alguns exemplos dos resultados obtidos.

Apesar de não se verificar diferença significativa entre tratamentos em termos de incidência de podridões (100% das castanhas analisadas apresentaram algum tipo de contaminação fúngica), verificou-se que o tipo de fungos detetado nas castanhas esterilizadas foi diferente dos detetados nas castanhas calibradas. Nas castanhas

calibradas foram detetados maioritariamente fungos da espécie *Gnomoniopsis smithogilvyi* (identificação morfológica ao microscópio), agente causal da podridão castanha, enquanto nas castanhas esterilizadas os principais contaminantes foram *Penicillium* spp., agentes de podridões verdes. Este resultado indicia a elevada capacidade de eliminação do fungo *G. smithogilvyi* através do banho quente de esterilização mas a sua ineficiência na eliminação dos *Penicillium*. Estes resultados confirmam os resultados relatados em Rodrigues *et al.* (2022).

Quanto ao efeito do arejamento, não se verificou diferença significativa entre castanhas arejadas e controlo relativamente à incidência e tipo de fungos.

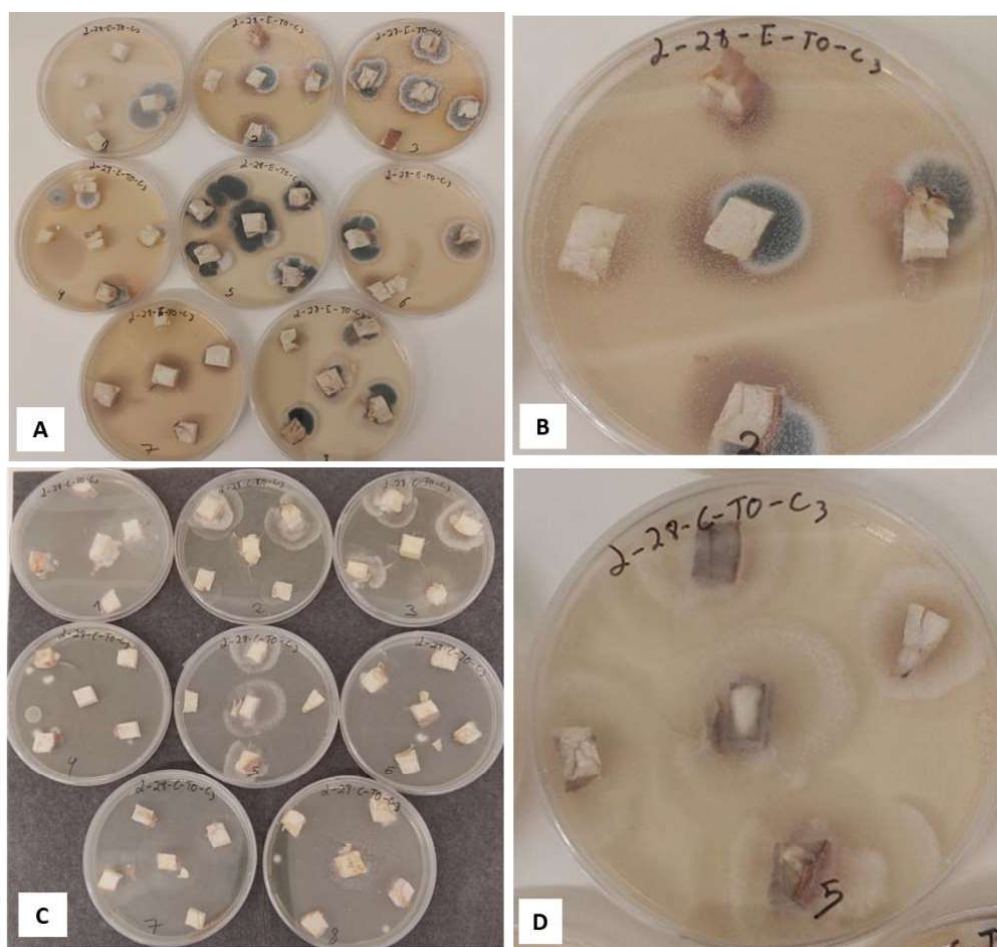


Figura 14 - Exemplo de observação in vitro de infecção interna de castanhas aparentemente saudáveis: A e B) Castanha esterilizada, com elevada contaminação por *Penicillium* spp.; C e D) Castanha calibrada, com elevada contaminação por *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

Avaliação geral no final do ensaio

No final do ensaio, as castanhas esterilizadas aparentavam maior carga de podridões exteriores e maior humidade superficial do que as castanhas calibradas arejadas (Figura

15), provavelmente devido à maior humidade inicial das primeiras. No entanto, as castanhas arejadas (calibradas e esterilizadas) aparentavam menor carga de podridões e menor humidade superficial do que as respetivas castanhas controlo.



Figura 15 - Aspeto geral das castanhas esterilizadas (A) e calibradas (B) no final do ensaio.

5.2.4. Conclusões

Em resultado do presente ensaio sobre o efeito do arejamento das caixas palete no controlo de perdas por podridão, podemos concluir que os resultados obtidos para as condições testadas não foram suficientemente esclarecedores na demonstração dos benefícios do arejamento no controlo de podridões.

Por forma a esclarecer alguns resultados, seria necessário:

- repetir o ensaio usando um sistema de arejamento com tubos mais largos para maximizar o fluxo de ar no centro de massa da caixa palete;
- usar castanhas esterilizadas contendo a humidade adequada;
- comparar os resultados do sistema de arejamento com o sistema de viragem das castanhas habitualmente usado.

5.3. Avaliação da incidência e virulência de *Gnomoniopsis smithogilvyi*, agente causal da podridão castanha

A emergente incidência do fungo causador da podridão castanha em castanhas, recentemente identificado como *G. smithogilvyi*, tem vindo a preocupar produtores e indústrias do setor deste fruto, em diferentes países do mundo. O trabalho desenvolvido durante o ano 2020 teve como foco caracterizar morfológica, ecofisiológica e molecularmente este agente isolado de castanhas de Portugal, e determinar a sua patogenicidade e virulência em cultivares de castanhas portuguesas. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo na identificação e caracterização deste agente causador da podridão da castanha em Portugal. O objetivo geral deste estudo foi obter informações sobre o principal agente causal da podridão castanha em Trás-os-Montes, para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e redução de incidência desta doença, assim como as consequentes perdas de qualidade das castanhas associadas em armazenamento.

Como conclusões do presente estudo verificou-se que:

– *G. smithogilvyi* é o agente causal da podridão castanha em castanhas de Trás-os-Montes, Portugal, o que se confirmou através dos postulados de Koch (Figuras 16 e 17);



Figura 16 - Sinal característico da podridão castanha causada por *G. smithogilvyi* em castanha.

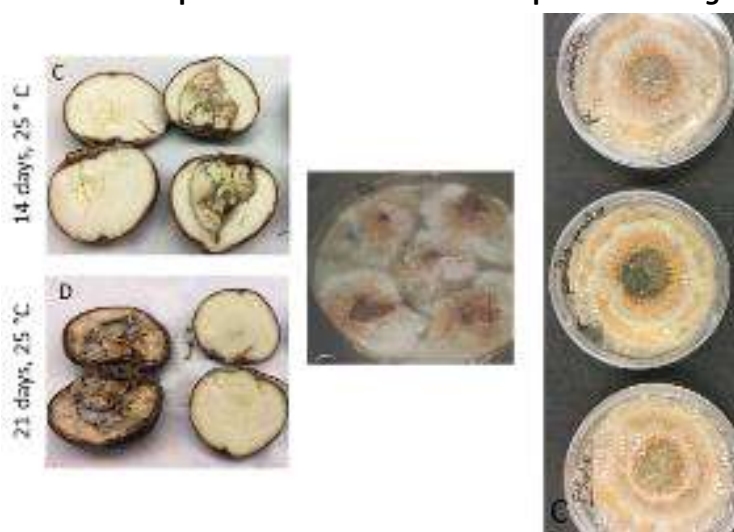


Figura 17 - Isolamento do agente causal da podridão castanha e confirmação da identidade.

A patogenicidade de *G. smithogilvyi* em castanhas depende principalmente de uma porta de entrada no fruto ou da pré-existência do fungo no interior da castanha. O fungo mostrou-se incapaz de penetrar a casca de castanhas intactas. Porém, quando danificadas, o fungo foi invariavelmente capaz de reproduzir a doença em todas as castanhas inoculadas artificialmente. Esta característica salienta a importância das boas práticas no manejo dos sotos, assim como os cuidados de pré, durante e pós colheita, no intuito de prevenir a ocorrência de pragas que possam vir a danificar os frutos e evitar danos físicos na casca, os quais favorecem o desenvolvimento da podridão castanha, entre outras doenças fúngicas.

A virulência de *G. smithogilvyi* mostrou-se muito elevada em castanhas previamente feridas, quando inoculadas artificialmente, sendo capaz de deteriorar completamente o interior dos frutos em apenas 15 dias de incubação;

G. smithogilvyi é um fungo endofítico e encontra-se presente nas castanhas de Trás-os-Montes, de maneira semelhante entre as três cultivares de castanha estudadas (Judia, Longal e Martaínha). Não foi observada resistência ou tolerância a infecção por *G. smithogilvyi* para nenhuma das três cultivares de castanhas estudadas;

A desinfecção superficial das castanhas com hipoclorito de sódio e a exposição a luz UV não se mostrou eficiente na eliminação do fungo interno.

Através de análises filogenéticas, identificou-se que os isolados portugueses de *G. smithogilvyi* sequenciados são geneticamente muito semelhantes aos isolados provenientes de outras regiões do mundo, mesmo fora da Europa, como aos isolados da Austrália, Chile e EUA, todos agrupados num mesmo clado;

As características morfológicas e ecofisiológicas dos isolados portugueses estudados estão em concordância com as mesmas características descritas para isolados de outros países, como Índia, Itália e Nova Zelândia;

G. smithogilvyi é um fungo altamente adaptado ao desenvolvimento em castanhas. Este estudo incluiu nos testes de ecofisiologia e de biocontrolo um meio de cultura à base de castanhas, para averiguar a interação do patógeno com o substrato, e de facto observou-se que o desenvolvimento do fungo neste meio apresentou melhores resultados, comparativamente com os mesmos testes conduzidos nos meios PDA e MEA.

Perspetiva-se, para trabalhos futuros, o estudo da patogenicidade e virulência de *G. smithogilvyi* em castanhas incubadas em diferentes temperaturas, tendo em vista que este estudo averiguou apenas estas características a 25 °C. Sendo assim, seria possível identificar a temperatura à qual a virulência de *G. smithogilvyi* declinaria satisfatoriamente, para que as indústrias apliquem apenas a refrigeração necessária durante o armazenamento, sem que haja demasiado gasto económico neste sentido. Também se pretende efetuar o estudo de outros patógenos causadores de podridão de

castanhas, e que apresentam relativa importância em Trás-os-Montes, como *Mucor racemosus*, *Penicillium spp.*, *Ciboria batschiana*, *Botrytis cinerea*, entre outros.

Pretende-se também desenvolver um estudo mais abrangente dos soutos da região produtora de Trás-os-Montes, e o levantamento da quantidade de castanheiros contaminados principalmente por *G. smithogilvyi* além de outros agentes endofíticos, para que medidas preventivas e de controlo possam ser tomadas com maior ênfase pelos produtores cujos soutos estejam mais comprometidos, e que as indústrias possam priorizar a aquisição de castanhas por aqueles soutos cuja sanidade das árvores é maior.

5.4. Controlo da podridão castanha pelo processo de esterilização.

O método por radiação UV apresenta limitações práticas, pois a sua ação está limitada às superfícies, tendo baixo poder de penetração. Assim, decidiu-se testar o processo de desinfeção pelo calor, de forma a testar a sua eficiência no controlo da podridão castanha e, perante os resultados obtidos, verificar se os a radiação UV será necessária. Assim sendo procedeu-se ao ensaio laboratorial do processo de desinfeção das castanhas na indústria. Começou-se por avaliar diferentes tempos de desinfeção mantendo a temperatura já usada pelas indústrias e, num outro ensaio, avaliámos temperaturas diferentes, mantendo o tempo padronizado pela indústria (Tabela 2). Foram também avaliadas castanhas desinfectadas, armazenadas 7 dias à temperatura ambiente, com o objetivo de estimar a sua sanidade em armazém em condições não controladas.

Tabela 2 – Esquema de intervalo de temperaturas e tempos avaliados no processo de esterilização.

Processo de Esterilização da castanha	
Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
48,0	45 - Controlo
	43
	40
	38
48,0 – Controlo	45
45,0	
40,0	
38,0	

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados obtidos referentes aos ensaios do processo de esterilização.

Tabela 3 – Resultados obtidos (n=10, por tratamento) para os tempos diferentes a uma temperatura de desinfeção de 48 °C, após 0 e 7 dias (à temperatura ambiente) da esterilização.

Processo de Desinfeção da castanha		Resultados			
Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Placas sem crescimento	Diversidade fungos (nº)	Presença de <i>Gnomoniopsis</i>	Estado do embrião
No dia da esterilização					
48	45 - Controlo	3	3	0	vivo
	43	2	4	1	vivo
	40	6	3	0	vivo
	38	5	8	0	vivo
Após uma semana da esterilização					
48	45 - Controlo	0	2	0	vivo
	43	1	2	1	vivo
	40	0	3	0	vivo
	38	0	4	1	vivo

A partir destes dados da tabela 3 podemos verificar que os valores utilizados pela indústria confirmam ser os mais eficazes no controlo das podridões e, em especial de *Gnomoniopsis* (T=48 °C e t=45 minutos), quer a 0 e a 7 dias após a esterilização. Foi detetado *Gnomoniopsis* aos 43 minutos o que nos leva a concluir que a diminuição do tempo de esterilização à mesma temperatura deixa de ser eficaz.

Os resultados presentes na Tabela 4, em que foi avaliado o efeito da temperatura na esterilização das castanhas, mantendo o tempo (45 minutos) indicado pela indústria e confirmado em laboratório. Em geral e comparativamente com os resultados da tabela 4, verificou-se um aumento da diversidade de fungos abaixo dos 48 °C.

Assim sendo, continua a verificar-se a ausência de *Gnomoniopsis* para 48°C durante 45 minutos, confirmando os resultados anteriores. Não se verificaram diferenças nos resultados obtidos nas castanhas esterilizadas e inoculadas no próprio dia das castanhas inoculadas após 7 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Tabela 4 – Resultados obtidos (n=10, por tratamento) as temperaturas diferentes de esterilização durante 45 minutos, após 0 e 7 dias (à temperatura ambiente) da esterilização.

Processo de Esterilização da castanha		Resultados			
Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Placas sem crescimento	Diversidade fungos (nº)	Presença de <i>Gnomoniopsis</i>	Estado do embrião
No dia da esterilização					
45	48 - Controlo	1	8	0	vivo
	45	0	8	2	vivo
	40	0	9	2	vivo
Após uma semana da esterilização					
45	8 - Controlo	0	6	0	vivo
	45	0	8	0	vivo
	40	0	5	2	vivo

5.5. Ensaio de ensaio de campo sobre a avaliação de fungicidas e uma solução nutritiva no controlo de *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

Este ensaio de campo foi realizado no ano de 2021 num souto com castanheiros *Castanea sativa* x *Castanea crenata*, da cultivar Bouche de Bétizac com 8 anos de idade. As árvores estavam dispostas em linhas distantes 3 metros entre si.

Os produtos comerciais aplicados foram o Serenade® ASO (S) um fungicida com ação bacteriostática, suspensão concentrada (SC) com 1.34% de *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 (1 x 10⁹ ufc/g), Horizon® (H) um fungicida utilizado no controlo ao oídio da videira, emulsão óleo-em-água (EW) com 250 g / L de tebuconazol e o Codasil (Co) uma solução nutritiva de silício altamente concentrada, em sinergia com aminoácidos livres e peptídeos, que melhora a tolerância das culturas ao stresse: SiO₂ (26,10 p / v) + K₂O (14,62 p / v) + aminoácidos livres (5,22 p / v). Estes produtos foram aplicados em 4 linhas distintas e intercaladas, totalizando 12 linhas do mesmo patamar incluindo as 4 linhas do controlo (sem tratamento). No caso da solução nutritiva foi aplicada em 4 linhas seguidas de outro patamar do souto (Figura 18).

A aplicação foi feita dia 23 e 30 de junho e 7 de julho, na fase da floração e no caso da solução nutritiva foram realizadas aplicações em 30 junho, 30 julho e 30 agosto, sendo monitorizada a presença de fungos na altura da colheita das castanhas em setembro, onde foi realizada uma recolha de amostras dia 22 de setembro de 2021.

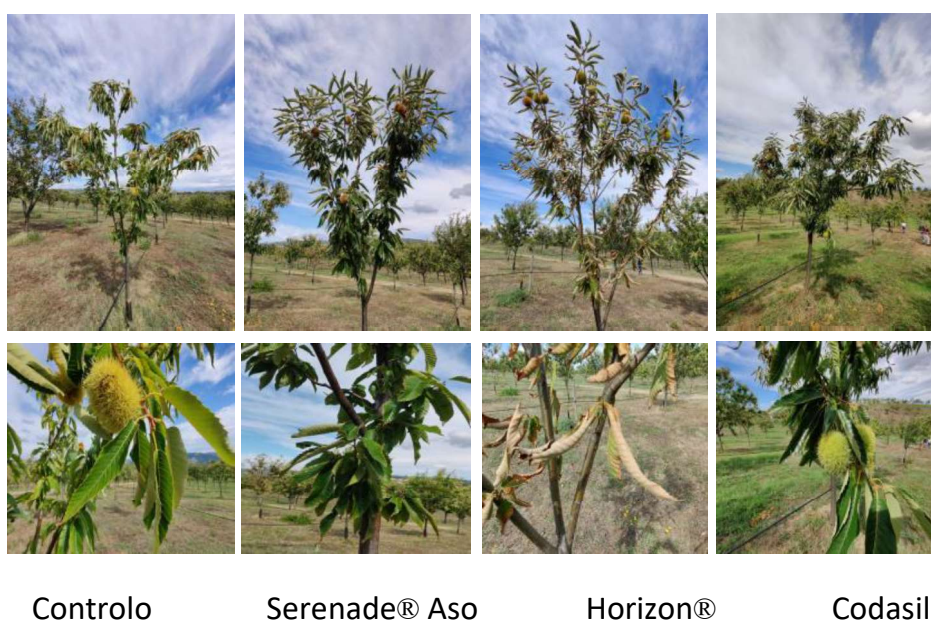


Figura 18 – Aspeto dos castanheiros com os respetivos tratamentos na altura da apanha da castanha

Foram colhidos 120 (30 x 4 filas) ouriços por tratamento. Após a colheita, foi efetuada uma análise biométrica dos ouriços e das respetivas castanhas, seguidamente foi efetuada a avaliação externa e interna de 200 (200 x 4) castanhas por tratamento. As castanhas sem sinais de podridão, 10 por tratamento (10x4), e todas as castanhas que apresentavam podridão no interior, foram inoculadas em placas de ágar batata dextrose, incubadas a 25 °C e observadas após 7 e 14 dias.

A pesagem dos ouriços e das castanhas mostrou que a produtividade foi influenciada pelos tratamentos (tabela 5): Co com os maiores pesos, seguido de perto pelo controlo (C) e S. Os valores médios dos parâmetros biométricos foram menores nas amostras tratadas com o Horizon, em média, cerca de 50% a menos em relação aos outros tratamentos, tanto no peso médio dos ouriços + castanhas como no peso por castanha (Figura 19 e 20).

Tabela 5 - Avaliação da produtividade geral das amostras recolhidas

Parâmetros	Teste H	Valor p ^a	Valor Z ^b
Peso ouriço + castanhas (g)	136,70	0,00	H≠(S=C=Co)
Peso dos ouriços (g)	49,15	0,00	H≠(S=C=Co)
Castanhas bem formadas (n)	22,68	0,00	C≠H; Co≠H
Castanhas enrugadas (n)	6,01	0,11	n.s.
Castanhas chochas (n)	6,15	0,10	n.s.
Castanhas bichadas (n)	3,69	0,29	n.s.
Castanhas sãs (n)	62,57	0,00	S≠H; S≠Co
Peso das castanhas bem formadas (g)	30,29	0,00	H≠(S=C=Co)
Peso por castanha bem formada (g)	119,71	0,00	H≠(S=C=Co)
Peso das castanhas chochas (g)	191,21	0,00	H≠(S=C=Co); S≠Co

n- Número de castanhas; ^a Kruskal-Wallis test; ^b multiple comparisons test

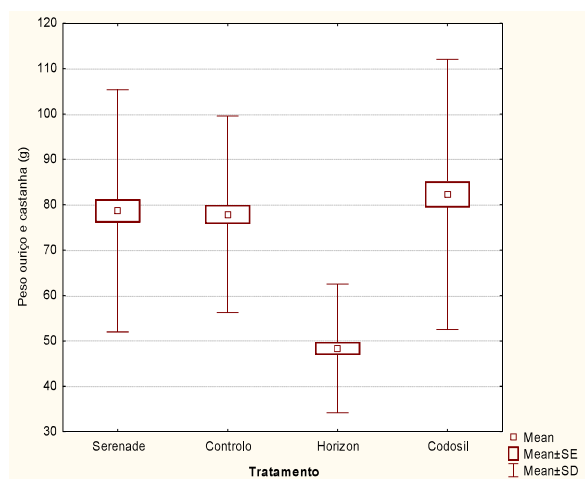


Figura 19 - Peso dos ouriços + castanhas

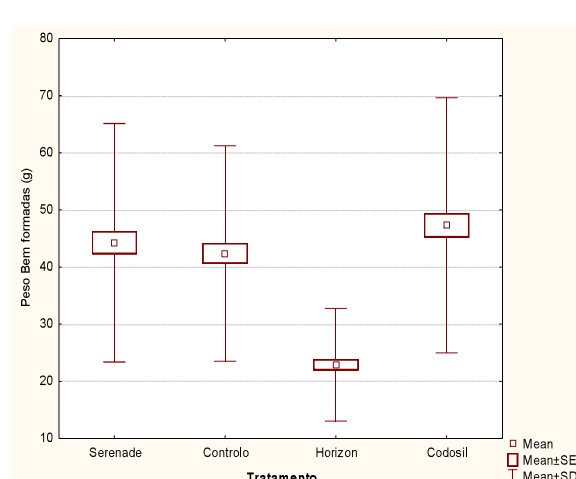


Figura 20 - Peso das castanhas bem formadas

Tabela 6 – Resultados da avaliação externa

Avaliação Externa (n=200/Tratamento)				
Tratamento	Danos (n)	Sinais de infestação (n)	Podridões (n)	Cor das castanhas
Controlo	3	0	0	1% imatura
Serenade	7	2	2	2.5% imatura
Horizon	9	1	2	14,5% imatura ; 3,5% verde
Codasil	2	2	1	1,5% imatura; 1% verde

n- Número de castanhas

A partir da análise dos resultados apresentados na tabela 6 verificamos que o Horizon foi o que mais danos externos apresentou, mas ainda que em valores baixos. Salienta-se um atraso na maturação das castanhas no tratamento Horizon.

Quanto à contaminação fúngica (tabela 7), nas castanhas sem sinais visuais de infeção, apenas *G. smithogilvyi* foi detetado (uma castanha em C e 4 castanhas em Co). Nas castanhas que apresentavam sinais visuais de podridão, 3 eram provenientes de C, 2 de S e 2 de Co, e estavam contaminadas com *G. smithogilvyi*.

Tabela 7 – Resultados da avaliação interna

Avaliação Interna (n=200/Tratamento)			
Tratamento	Larvas (n)	Infeção fúngica n(L1-4)	Tipos de Podridões (n)
Controlo	0	1 (1)	castanha (1)
Serenade	0	2(1) 1(2)	castanha (2) negra (1)
Horizon	0	0	0
Codasil	0	4(1)	castanha (4)

n- Número de castanhas

Relativamente à avaliação microbiológica, no Serenade não foi detetada nenhuma podridão nas castanhas visualmente saudáveis (Figura 21a). No caso do tratamento com Horizon foram detetadas castanhas com podridões, estando no entanto ausente a podridão castanha, sendo o mais eficaz no combate a *Gnomoniopsis*.

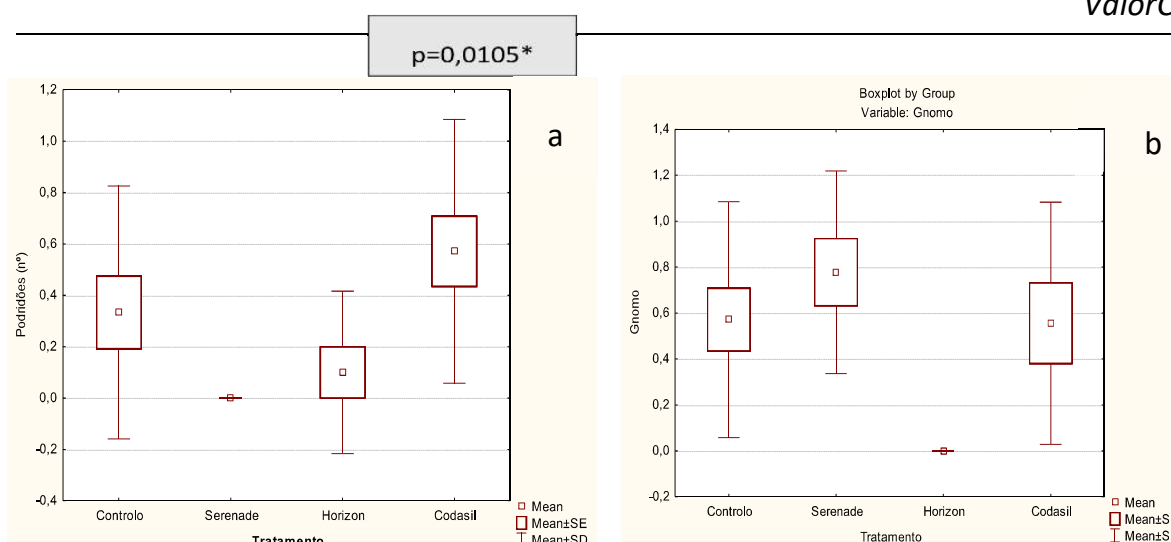


Figura 21 – Avaliação microbiológica a) castanhas sem podridão visível (n=10); b) todas as castanhas que apresentavam sinais de podridão visível

Por forma a completar este estudo e a consolidar os dados realizou-se o acompanhamento dessas mesmas castanhas que foram armazenadas á 4°C após um mês (novembro) e após 2 meses (dezembro) a apanha, procedendo-se à realização de avaliações externas, internas e microbiológicas. Com o objetivo de avaliar o potencial efeito dos produtos aplicados ao longo do armazenamento em refrigeração no combate a podridão castanha. Este acompanhamento foi realizado nas mesmas condições que as primeiras avaliações.

Tabela 8 – Avaliação externa das castanhas após um mês a apanha (novembro de 2021).

Avaliação Externa (n=10/Tratamento)			
Tratamento	Danos (n)	Sinais de infestação (n)	Podridões (n)
Controlo	0	0	0
Serenade	0	0	0
Horizon	0	0	0
Codasil	0	0	0

n- Número de castanhas

Tabela 9 – Avaliação externa das castanhas após dois meses a apanha (dezembro de 2021).

Avaliação Externa (n=10/Tratamento)			
Tratamento	Danos (n)	Sinais de infestação (n)	Podridões (n)
Controlo	0	0	0
Serenade	0	0	0
Horizon	0	0	0
Codasil	0	0	0

n- Número de castanhas

A partir da análise dos resultados apresentados na tabela 8 e 9 não se verificaram danos nem podridões externas.

Tabela 10– Avaliação interna das castanhas após um mês a apanha (novembro de 2021).

Avaliação Interna (n=10/Tratamento)			
Tratamento	Larvas (n)	Infeção fúngica n(L1-4)	Tipos de Podridões (n)
Controlo	0	4 (1)	castanha (4)
Serenade	0	2(1)	castanha (2)
Horizon	0	0	0
Codasil	0	4(1)	castanha (4)

n- Número de castanhas

Tabela 11– Avaliação interna das castanhas após dois meses a apanha (dezembro de 2021).

Avaliação Interna (n=10/Tratamento)			
Tratamento	Larvas (n)	Infeção fúngica n(L1-4)	Tipos de Podridões (n)
Controlo	0	4(5) e 1(1)	castanha (5)
Serenade	0	3(5) e 5(2)	castanha (8)
Horizon	0	2(1) e 1(4)	castanha (3) e verde (1)
Codasil	0	4(5) e 2(2)	castanha (5) e cinza com linha vermelha em círculo (1)

n- Número de castanhas

Quanto à contaminação fúngica (Tabela 10 e 11) visível verificou se um aumento das podridões ao longo do tempo de armazenamento assim como o nível de infeção fúngica.

Após um mês de armazenamento, e para o nível de infeção L1, as percentagens de infeção variaram entre os 0 - 40%. O nível máximo foi atingido, após dois meses de armazenamento, nas castanhas de todos os tratamentos (L4), com percentagens entre os 10 - 40%. As amostras do tratamento com tebuconazol foram as que apresentaram menores níveis de infeção fúngica, quer no momento da colheita, quer após um mês de armazenamento não apresentando sinais visuais de infeção fúngica (0%). Só ao fim de dois meses é que apresentaram sinais de infeção, cerca de 20% (L1) e 10% (L4). No estudo de Driss (2019) também reportou níveis de infeção de nível L4 em castanhas armazenadas não esterilizadas das cultivares ‘Martáinha’ e ‘Longal’.

Tabela 12 – Resultados microbiológicos ao longo do tempo com os tratamentos para o controlo da *Gnomoniopsis*.

Avaliação microbiológica						
Tratamento	Na apanha (n=10)		Após 1 mês (n=10)		Após 2 meses (n=10)	
	<i>Gnomo.</i>	Outros	<i>Gnomo.</i>	Outros	<i>Gnomo.</i>	Outros
Controlo	1	3	3	6	3	10
Serenade	0	4	4	6	2	7
Horizon	0	2	0	9	0	10
Codasil	4	2	5	6	4	9

n- Número de castanhas

Na figura 22 podemos observar os resultados em placas de cada um dos tratamentos no mês de novembro e dezembro.

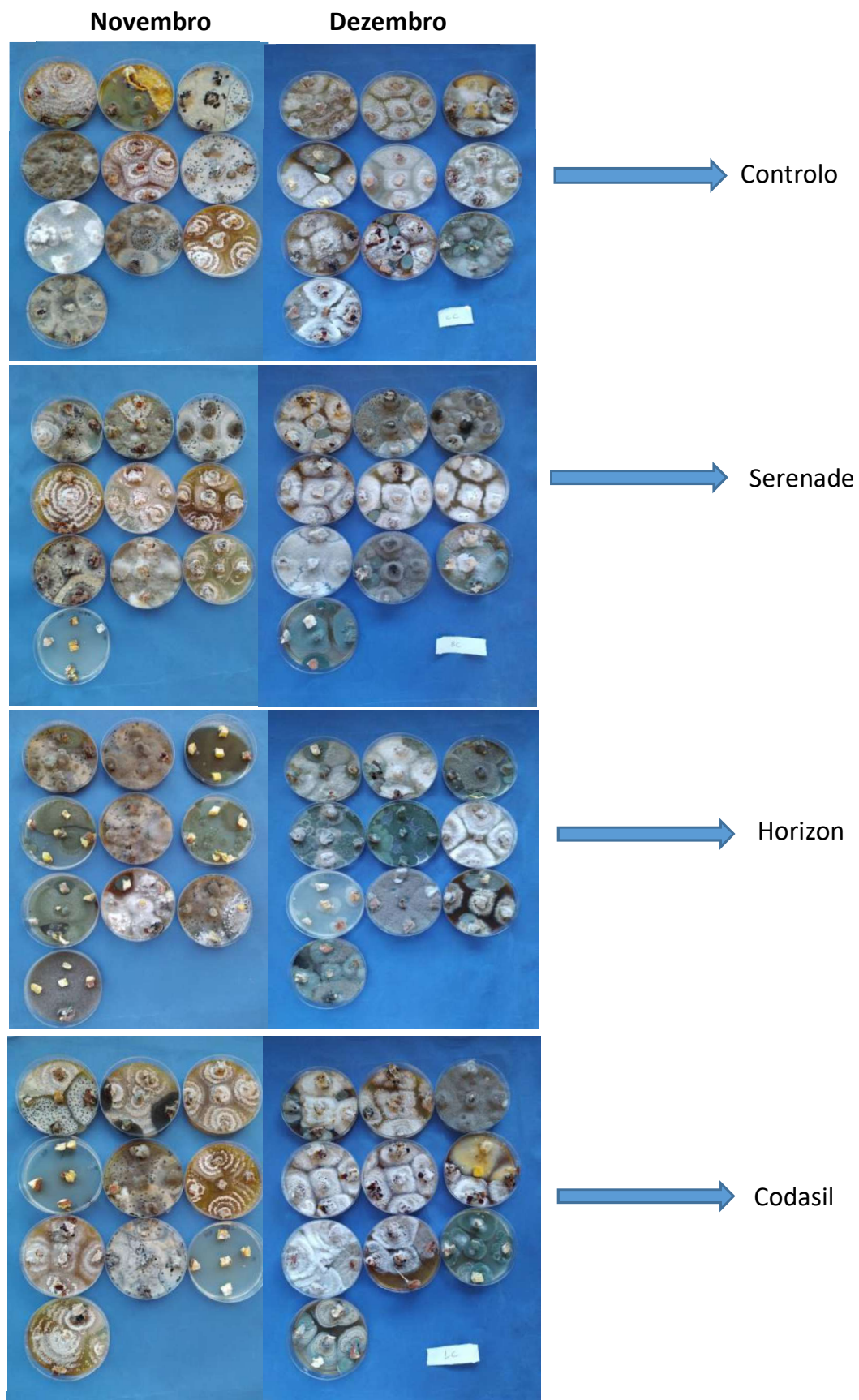


Figura 22 – Resultados microbiológicos ao longo do armazenamento

Perante os resultados obtidos nas análises microbiológicas para a pesquisa de *Gnomoniopsis* (Tabela 12), verificou-se que o tratamento Horizon mantém a sua eficácia ao longo do armazenamento, não tendo sido detetada nenhuma castanha com *Gnomoniopsis*. No estudo de Mohsin *et al.* (2021) onde infetou discos de batata-doce com *Ceratocystis fimbriata*, o agente da podridão negra na batata-doce, seguindo-se a aplicação da mistura tebuconazol + trifloxistrobina, e detetaram a inibição do crescimento de micélio de *C. fimbriata*. Num outro estudo recentemente publicado foi avaliada a atividade *in vitro* e *in situ* de vários fungicidas contra *G. smithogilvyi*, e verificaram que os fungicidas mais eficazes *in vitro* foram os que tinham como princípios ativos o difenoconazol ou a piraclostrobina. Assim como nos ensaios de campo, a combinação destas duas substâncias também mostrou ter grande eficiência, diminuindo os níveis de infeção nas castanhas (Silva-Campos *et al.*, 2022).

Pode ser consultada mais informação sobre este ensaio de campo no artigo científico aceite para publicação na Revista das Ciências Agrárias, intitulado por “Tratamentos em campo com fungicidas e solução nutritiva em castanheiros: incidência de podridões e de *Gnomoniopsis smithogilvyi* na castanha pós-colheita” com o DOI: <https://doi.org/10.19084/rca.27620>.

Também foi realizado outro de ensaio em campo num outro souto com fungicidas e inseticida (Priam Top, Curenox 50 e Calypso). A aplicação dos fungicidas foi feita na primeira semana de setembro, na fase do crescimento da castanha, sendo monitorizada a presença de fungos na altura da colheita das castanhas em outubro, onde foi realizada uma recolha de amostras no dia 25 de outubro de 2021.

Os produtos comerciais aplicados foram o Priam Top 250 g/L (25,94%) de tebuconazol um fungicida utilizado contra o oídio da videira, trata-se de uma emulsão óleo-em-água (EW) tendo-se aplicado 1 L/200 L H₂O do produto, Curenox 50 constituído por cobre 50% (p/p) (na forma de oxiclreto de cobre) é um fungicida preventivo de cobre, para o controlo do míldio da vinha e dos citrinos, pedrado, cancro da castanha, entre outros, sendo a dose aplicada de 500 g/100 L H₂O e Calypso (SC) 480 g/L (48%) de tiacloprida, é um inseticida foliar do grupo químico do cloronicotinil ou neonicotinóides (CNI), com baixa toxicidade aguda para mamíferos e inócuo para insetos polinizadores a dose aplicada foi 20 mL/100 L H₂O.

Foram testados em árvores da cultivar Judia, dispostas em linhas distantes 3 metros entre si. Foi efetuada uma recolha de 30 ouriços de árvores com o tratamento e 30 ouriços de arvores sem tratamento (Controlo). Após a colheita, os ouriços e suas castanhas foram pesados, seguidamente foi efetuada a avaliação externa e interna de 50 castanhas de cada tratamento/controlo. As castanhas sem sinais de podridão, 10 por tratamento, e todas as castanhas que apresentavam podridão no interior, foram inoculadas em placas de ágar batata dextrose, incubadas a 25 °C e observadas após 7 e 14 dias.

Este acompanhamento foi realizado nas mesmas condições do primeiro ensaio. Assim sendo, para a avaliação da produtividade obtivemos os seguintes resultados:

Tabela 13 – Resultados da avaliação da produtividade

Avaliação da Produtividade (n= 30/tratamento)			
Tratamento	Peso ouriço+castanhas (g)	Peso do ouriço (g)	Peso das castanhas bem formadas (g)
Controlo	34,08±14,8	15,16±5,8	8,01±5,6
Priam Top + Curenox 50 + Calypso	41,83±12,1	20,02±4,3	11,16±5,9

n- Número de castanhas

Perante os resultados da Tabela 13, verifica-se que os ouriços com tratamento obtiveram melhores resultados comparativamente ao controlo, tanto para o peso do ouriço completo como o peso das castanhas bem formadas, sendo um resultado satisfatório.

Em relação à avaliação externa, não foram detetados danos nas amostras do tratamento; só uma castanha com danos na casca nas amostras controlo e a percentagem de castanhas imaturas neste ensaio foi muito maior do que no anterior, tanto no controlo como no tratamento (42% e 58%), respetivamente (Tabela 14). Realça-se o facto de que os 30 ouriços colhidos produziram menos castanhas que os do ensaio anterior, o que limitou a avaliação de 50 castanhas para a avaliação externa e interna, número estipulado no início do estudo.

Tabela 14 – Resultados da avaliação externa

Avaliação Externa				
Tratamento	Danos (n)	Sinais de infestação (n)	Podridões (n)	Cor da castanha (%)
Controlo (n=40)	1	2	0	42,2% imaturas; 7% Verdes
Priam Top + Curenox 50 + Calypso (n= 43)	0	1	0	58,1% imaturas

n- Número de castanhas

Na avaliação interna, continua-se a não se encontrar nenhum tipo de podridão nas amostras tratadas, sendo que foram encontradas uma larva em duas castanhas e uma castanha com um baixo nível de infecção fúngica (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados da avaliação interna

Avaliação Interna			
Tratamento	Larvas (n)	Infeção fúngica (n) (L1-4)	Tipos de Podridões (n)
Controlo (n=40)	0	1(1)	Castanha (1)
Priam Top + Curenox 50 + Calypso (n= 43)	2	1(1)	0

n- Número de castanhas

A Tabela 16 apresenta os resultados microbiológicos de ambos os ensaios, por forma a comparar a eficácia dos tratamentos com tebuconazol no controlo de *G. smithogilvyi*. Conclui-se assim que os tratamentos com tebuconazol são eficazes no combate a esta problemática.

Tabela 16 – Resumo dos resultados da avaliação microbiológica com os tratamentos com tebuconazol em ambos os ensaios.

Tratamentos com tebuconazol		
Aplicação	1º Ensaio	2º Ensaio
		3 aplicações (junho, julho e agosto)
Dose	1L/100L (8,3L/fila; 1,66L/árvore)	Priam top (1 L/100 L); Curenox 50 (500 g/100 L); Calypso (20 mL/100 L).
Resultados microbiológicos		
<i>Gnomoniopsis</i>	0	0
Outros fungos	2	0

Assim sendo, os tratamentos com o princípio ativo tebuconazol e *B. amyloliquefaciens* foram os mais eficazes, respetivamente, contra a podridão castanha e as outras podridões. Além disso, o tebuconazol foi o mais eficaz no controlo pré-colheita e pós-colheita (até 2 meses) de *G. smithogilvyi*. É urgente encontrar tratamentos alternativos, pois este composto será banido a partir de setembro de 2023. Os agentes de controlo biológico como *B. amyloliquefaciens* poderão ser um substituto contra algumas podridões, sendo necessário mais investigação na sua capacidade em controlar *G. smithogilvyi*.

5.6. Referências

Costa, R.; Ribeiro, C.; Valdiviesso, T.; Afonso, S.; Costa, R.; Borges, O.; Carvalho, J.S.; Costa, H.A.; Assunção, A.; Fonseca, L.; et al, 2008. Variedades de Castanha Das Regiões Centro e Norte de Portugal; Instituto Nacional dos Recursos Biológicos: Oeiras, Portugal.

Dennert, F.G.; Brogini, G.A.L.; Gessler, C.; Storari, M., 2015. *Gnomoniopsis castanea* is the main agent of chestnut nut rot in Switzerland. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 41–53.

Donis-González, I.R.; Guyer, D.E.; Fulbright, D.W., 2016. Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan. *Journal of Sciences of Food and Agriculture* 96: 4514–4522.

Driss, J.O., 2019. Chestnut rots: disease incidence and molecular identification of causal agents. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biotecnológica, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.

Ekman, J. 2014. Improved postharvest management of chestnuts. Applied Horticultural Research Pty Ltd, Project Number: CH13005. Ed. Horticulture Innovation Australia Ltd. ISBN 0 7341 3461 4

El-Nagar, A.; Elzaawely, A.A.; Taha, N.A.; Nehela, Y., 2020. The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy* 10: 1402. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091402>.

El-Shahir, A.A.; El-Wakil, D.A.; Abdel Latef, A.A.H.; Youssef, N.H., 2022. Bioactive compounds and antifungal activity of leaves and fruits methanolic extracts of *Ziziphus spina-christi* L. *Plants* 11: 746. <https://doi.org/10.3390/plants11060746>.

Gentile, S.; Valentino, D.; Visentin, I.; Tamietti, G., 2010. An epidemic of *Gnomonia pascoe* on nuts of *Castanea sativa* in the Cuneo area. In Proceedings of the 1st European Congress on Chestnut—Castanea 2009. Eds. G. Bounous and G.L. Beccaro. *Acta Horticulturae*: 866: 363–368.

Maresi, G.; Oliveira Longa, C.M.; Turchetti, T., 2013. Brown rot on nuts of *Castanea sativa* Mill: An emerging disease and its causal agent. *iForest* 6: 294–301.

McKinney, H.H., 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195–217.

Mohsin, S.; Hasanuzzaman, M.; Parvin, K.; Masahiro Morokuma, M.; Fujita, M., 2021. Effect of tebuconazole and trifloxystrobin on *Ceratocystis fimbriata* to control black rot of sweet potato: processes of reactive oxygen species generation and antioxidant defense responses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(9): 148. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03111-5>

Overy, D.P.; Seifert, K.A.; Savard, M.E.; Frisvad, J.C., 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology* 88: 69–77.

Rodrigues, P.; Driss, J.O.; Gomes-Laranjo, J.; Sampaio, A., 2022. Impact of cultivar, processing and storage on the mycobiota of European chestnut fruits. *Agriculture* 12: 1930. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111930>.

Silva-Campos, M.; Islam, Md T. e Cahill, D.M., 2022. Fungicide control of *Gnomoniopsis smithogilvyi*, causal agent of chestnut rot in Australia. *Australasian Plant Pathology* 51: 483–494. <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00879-4>

Shuttleworth, L.A.; Liew, E.C.Y.; Guest, D.I., 2013. Survey of the incidence of chestnut rot in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 42: 63–72.

Smith, H.C.; Ogilvy, D., 2008. Nut rot in chestnuts. *Australasian Nutgrower* 2: 10–15.

Vasconcelos, M.C.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A.S.; Ferreira-Cardoso, J.V., 2009. Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 2. Crude protein, free amino acids and phenolic phytochemicals. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2613–2619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02092.x>.

Visentin, I.; Gentile, S.; Valentino, D.; Gonthier, P.; Tamietti, G.; Cardinale, F., 2012. *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaperthales) as a causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology* 94: 411–419.

