



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Gabriela Sofia Teixeira Pereira

Incidência do Cancro do Castanheiro e estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr na região do Entre Douro e Minho

Mestrado em Agricultura Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação:

Orientadora: Professora Doutora Maria Luísa Roldão Marques Moura

Co-Orientadora: Professora Doutora Maria Eugénia Madureira Gouveia

Fevereiro de 2015

**As doutrinas expressas neste
trabalho são da exclusiva
responsabilidade do autor.**

Ao Rogério

À Martina

Aos meus pais

Aos meus amigos

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstrat.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Lista de Quadros.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
1 Introdução.....	1
1.1 O castanheiro.....	1
1.2 O castanheiro em Portugal.....	2
1.3 Distribuição geográfica.....	5
1.4 Doenças do castanheiro.....	6
1.4.1 Antracnose do castanheiro.....	7
1.4.2 Tinta do castanheiro.....	7
1.4.3 Cancro do castanheiro.....	8
1.5 Objetivos.....	17
2 Material e Métodos.....	18
2.1 Localização de soutos analisados.....	18
2.1.1 Felgueiras.....	18
2.1.2 Vila Verde.....	18
2.1.3 Cepões.....	19
2.2 Recolha de material vegetal contaminado.....	20
2.3 Isolamento, identificação e caraterização das estirpes de <i>C. parasitica</i>	24
3 Resultados.....	28
3.1 Severidade da doença.....	28
3.1.1 Souto de Felgueiras.....	28
3.1.2 Souto de Vila Verde.....	29
3.1.3 Souto de Cepões.....	31
3.2 Isolamento, identificação e caraterização das estirpes de <i>C. parasitica</i>	32

3.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (GCV)	38
4 Discussão e Conclusão	42
4.1 Recolha de material vegetal.....	42
4.2 Isolamento, identificação e caracterização das estirpes de <i>C. parasitica</i>	43
4.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (GCV)	44
5 Referências Bibliográficas	48
ANEXOS	52

Agradecimentos

A realização desta tese foi possível graças a distintas pessoas e instituições, às quais gostaria de expressar o meu agradecimento e gratidão:

À Escola Superior Agrária, pelos meios humanos e materiais que dispôs, indispensáveis à realização desta tese.

À Professora Luísa Moura, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo acompanhamento, pela paciência e ajuda constantemente prestadas em todas as etapas deste trabalho, investigação e elaboração da tese.

À Professora Eugénia Gouveia, pela orientação, pela disponibilidade demonstrada, pela ajuda, pela formação e ensinamentos prestados durante a realização do trabalho de investigação e na elaboração da tese.

Às minhas companheiras de equipa, Maria Martins e Sofia Costa, pela amizade, companheirismo, apoio, troca de experiências e agradável convívio durante o trabalho.

Ao Eric e toda a equipa de investigação do Cancro do Castanheiro da ESA- IPB pela ajuda, orientação e formação durante a fase de investigação.

Aos funcionários do laboratório da ESAPL, em especial ao Engenheiro Vergílio Peixoto, pela constante ajuda. O meu sincero agradecimento à D. Maria Gonçalves, à D. Susy Marinho e à D. Maria Helena que sempre estiveram disponíveis para me apoiar nas tarefas laboratoriais.

Aos Professores da ESAPL e colegas dos Mestrado de Agricultura Biológica, pelos ensinamentos e troca de experiências fundamentais para a minha vida profissional e académica.

Ao Engenheiro Augusto Assunção da Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, agradeço a sua colaboração na indicação do souto de castanheiros de Felgueiras. Ao Engenheiro Ayrton Cerqueira pela sua colaboração e disponibilidade no Estudo do Souto de Vila Verde. À Engenheira Lúcia Lopes pela colaboração e acompanhamento no estudo do souto de Cepões.

Ao Rogério e à Martina que durante mais de dois anos, sempre me apoiaram, auxiliaram e que tornaram possível a concretização deste mestrado. Pelo seu amor, carinho, apoio e ajuda inestimável, o meu muito obrigado. Sem vocês esta etapa não teria sido possível.

Os trabalhos de investigação apresentados foram realizados com financiamento da EU/FCT no âmbito do projeto FCT PTDC/AGR-PRO/4606/2012.

A todos os que, direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho.



Resumo

O agente causal do cancro castanheiro *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, é considerado um dos principais fatores de mortalidade de *Castanea sativa* Mill. em todo o mundo. Introduzido em Portugal e com desenvolvimento epidémico conhecido a partir da década de 90, manifestou elevada agressividade e uma dispersão muito rápida, tendo, atualmente, distribuição generalizada nas regiões de produção de castanheiro.

Neste trabalho realizou-se um estudo sobre a incidência do cancro do castanheiro e sobre a estrutura das populações de *C. parasitica* presentes em três soutos da Região do Entre Douro e Minho localizados em Felgueiras, Vila Verde e Ponte de Lima.

Para avaliar a diversidade da população de *Cryphonectria parasitica* e obter isolados hipovirulentos, foi realizada uma prospeção nos três soutos em estudo. Foi realizada uma avaliação visual da severidade da doença nas árvores amostradas e uma amostragem de tecidos de cancros ativos e de cancros curados, tendo-se obtido uma coleção de isolados do fungo que foram caracterizados em laboratório. Todos os isolados foram confrontados com isolados europeus de referência (“**European Testers**”) EU-1, EU-2, EU-11, EU-12 e EU-66 para determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa presentes nos soutos estudados.

Dos 221 castanheiros analisados nos três soutos, vinte e um não apresentavam sintomas de cancro e quatro não possuíam viabilidade biológica. Estes soutos apresentavam uma elevada incidência de cancro do castanheiro, mas também se observou a existência de muitos cancros curados.

Os isolados obtidos nos três soutos do Entre Douro e Minho pertencem a seis grupos de compatibilidade vegetativa e apenas um número reduzido de isolados não foi incluído em nenhum grupo de compatibilidade vegetativa em estudo. O GCV mais representativo é o EU-11 compreendendo 62% dos isolados, seguindo-se o EU-2 (20%), o EU-12 (7%), o EU-66 e o EU-1 (5,5%).

Os soutos de Vila Verde e de Cepões apresentam elevada variabilidade, existindo seis GCV no souto de Vila Verde e cinco GCV no souto de Cepões. A variabilidade é inferior no souto de Felgueiras, com apenas três GCV.

Foram isoladas estirpes hipovirulentas (isolados brancos de *C.parasitica*) nos soutos de Vila Verde e Felgueiras. No souto de Ponte de Lima (Cepões) apesar de também existirem muitos cancos curados, não se isolou nenhuma estirpe hipovirulenta.

A eficácia da hipovirulência como meio de luta biológica em castanheiro, depende da capacidade de transmissão dos hipovírus e dos mecanismos biológicos que a determinam, nomeadamente os relacionados com a capacidade de replicação e transmissão do vírus, e das condições ambientais em cada região concreta, e ainda das características da população de *C. sativa*, pelo que novos estudos são necessários para compreensão destas interações e aplicação da luta biológica com sucesso.

Palavras-chave: cancro do castanheiro, *Cryphonectria parasitica*, hipovirulência, grupo de compatibilidade vegetativa.

Abstract

Cryphonectria parasitica, the causal agent of chestnut blight, was considered one of the main factors of mortality of *Castanea sativa* worldwide. Introduced in Portugal since 1990, and with rapid epidemic development, the disease has manifested high aggressiveness and a very quick dispersion. Currently it has a widespread distribution in the chestnut production regions.

In This work we studied the incidence of chestnut blight and on the structure of populations of *C. parasitica* present in three chestnut areas of Entre-Douro-e-Minho region, located in Felgueiras, Vila Verde and Ponte de Lima.

To assess the incidence of the disease, the diversity of *Cryphonectria parasitica* population and to obtain native hypovirulent strains, a prospection was held in the three chestnut groves under study. A visual assessment of the severity of the disease in sampled trees, and a sampling of tissue from active and inactive cankers was done. A collection of isolates of the fungus was obtained in the laboratory. All isolates were confronted with the European Testers EU-1, EU-2, EU-11, EU-12 and EU-66 for determination of the vc types present in chestnut groves under study.

From a total of 221 chetnuts, 21 showed no signs of canker, and 4 had no biological viability. In these groves the canker showed to be very widespread but a few chestnut were found to have healed cankers.

Six vc types were found among isolates, and there was a small number of isolate that has not be classified in any vc type. The vc type EU-11 was the most representative comprising 62% of the isolates, followed by EU-2 (20%), the EU-12 (7%), the EU-66 and EU-1 (5.5%).

The groves of Vila Verde and Cepões show high VC variability.

Six vc types were found in Vila Verde and five vc types in Cepões. Variability is lower in the grove of Felgueiras, with only three vc types present.

Hypovirulents strains were isolated (white isolate of *C. parasitica*) in groves of Vila Verde and Felgueiras. In the grove of Ponte de Lima (Cepões) although there are also many cured cankers, no hypovirulent strain was isolated.

The effectiveness of hypovirulence as a means of biological control in chestnut, relies on the capacity of transmission of hypovirus and on their biological mechanisms, namely those related to the ability to replicate the virus, the environmental conditions in each specific region, and even, the characteristics of the of the *C. sativa* population. Therefore, further studies are needed to understand these interactions and application for a successful biological control.

Keywords: chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence, vc type.

Lista de Abreviaturas

CEE - Comunidade Económica Europeia

Cp – *Cryphonectria parasitica*

DMACN - Divisão Municipal de Ambiente e Conservação da Natureza

DRAPN – Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte

DRATM – Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes e Alto Douro

DRAEDM – Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho

DRABI – Direcção Regional de Agricultura da Beira Interior

DRARO – Direcção Regional de Agricultura do Ribatejo e Oeste

DRAAL – Direcção Regional de Agricultura do Alentejo

DRAALG – Direcção Regional de Agricultura do Algarve

ESAPL – Escola Superior Agrária de Ponte de Lima

GCV – Grupos de Compatibilidade Vegetativa

HIP – Isolado que evidencia características hipovirulentas

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

IFN – Inventário Florestal Nacional

INE – Instituto Nacional de Estatística

PDA – Potato Dextrose Agar

RNA – Ácido ribonucleico

SNAA – Serviço Nacional de Avisos Agrícolas

VIR – Isolado que evidencia características virulentas

Lista de Quadros

Quadro 1.3.1- Superfície Florestal do Castanheiro em Portugal (Fonte: INE, 2013).....	5
Quadro1.4.1- Lista de patogéneos e respetiva incidência em soutos de castanheiros (Fonte: Vázquez, 2009).....	6
Quadro 1.4.2 - Levantamento da dispersão do cancro do castanheiro em Portugal (Fonte: Bragança, 2007)	11
Quadro 2.2.1- Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de castanheiros na área 1 e área 2 do souto de Felgueiras.	22
Quadro 2.2.2 - Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de cada árvore na área A e B do souto de Vila Verde.....	23
Quadro 2.2.3- Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de cada árvore no souto de Cepões.	23

Lista de Figuras

Figura 1.1.1- Silhueta das treze espécies de castanheiros existentes no mundo, com a altura máxima que atingem (Bazzigher et al., 1982).....	1
Figura 1.4.1 - Folha infetada por <i>Mycosphaerella maculiformis</i> (Fonte: Nevado et al., 2004).....	7
Figura 1.4.2 - Raízes de castanheiro infetadas por <i>Phytophthora spp.</i> evidenciando uma coloração violeta ou azul escura (Fonte: http://lusosouto.webnode.pt/produtos/tratamento-de-doen%C3%A7as)	8
Figura 1.4.3- Ciclo de vida da <i>Cryphonectria parasitica</i> (Fonte: Sofia, 2010).	9
Figura 1.4.4- Castanheiros com sintomas característicos de cancro (<i>Cryphonectria parasitica</i>) A - cor avermelhada, fissuras longitudinais da casca (Felgueiras, 2013) e B - Picnídios (Cepões, 2014).....	12
Figura 1.4.5- Em cima imagem de frutificações de corpos sexuados – peritecas. Em baixo imagem de frutificações assexuadas – picnídeos (Fonte: http://ec.asm.org/content/vol8/issue3/images/medium/coverfig.gif)	13
Figura 1.4.6- Castanheiro com cancro que infetou a árvore através de lesões resultantes da poda (Felgueiras, 2013).....	14
Figura 2.1.1- Vista aérea do Souto de Felgueiras, com indicação do grau de severidade de infeção por <i>C. parasitica</i> de todos os castanheiros do souto.....	18
Figura 2.1.2- Vista aérea do Souto de Vila verde, com a delimitação das duas áreas deste souto, a linha a vermelho corresponde ao limite da área A e a linha a azul representa o limite da área B.....	19
Figura 2.1.3- Vista aérea do Souto de Cepões, com a delimitação da área deste souto a vermelho.	20
Figura 2.2.1- (a) Árvore com sintomas de <i>C. parasitica</i> (Cepões, 2014); (b) Árvore com cancros curados (Felgueiras, 2013)	21
Figura 2.3.1- Isolamento a partir da amostra de material vegetal de um cancro curado em meio de cultura PDA – placa 14 I Hip	24
Figura 2.3.2- Crescimento de <i>C. parasitica</i> da amostra 23 Vir, 7 dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante 8 dias. A seta indica uma porção do micélio utilizada para repicagem e purificação do isolado.....	25

Figura 2.3.3- Isolados de <i>C. parasitica</i> purificados por repicagem de uma porção de micélio, transferido para novas placas com meio de PDA. (a) Isolado virulento da amostra 4I Vir; (b) Isolado hipovirulento da amostra A5 Hip; (c) Isolado virulento da amostra 28 Hip.....	25
Figura 2.3.4- Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV): (a) Pareamento do isolado europeu EU-12 com isolados 12A Vir; 12B Vir; 12C Vir e 13A Vir do Souto de Cepões, todos os pareamentos são incompatíveis: ; (b) Pareamento do isolado europeu EU-11 com isolados A2 Vir; A2 Hip; A4 Hip e A13 Hip do Souto de Vila Verde, todos os pareamentos são compatíveis:.....	26
Figura 2.3.5- Pareamento dos isolados Europeus EU-11 e EU-66 com o isolado hipovirulento B4 HipA. Os pareamentos deste isolado com os isolados europeus são incompatíveis.	27
Figura 3.1.1- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Felgueiras. Percentagem de árvores para cada nível de infeção.....	28
Figura 3.1.2- Incidência e severidade do cancro do castanheiro nas árvores onde se recolheram amostras de material vegetal para isolamento de <i>C. parasitica</i> – Souto de Felgueiras	29
Figura 3.1.3- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Vila Verde. Percentagem de árvores para cada nível de infeção.....	30
Figura 3.1.4 - Incidência e severidade do cancro do castanheiro nas árvores onde se recolheram amostras de material vegetal para isolamento de <i>C. parasitica</i> - Souto de Vila Verde.....	31
Figura 3.1.5- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Cepões- Ponte de Lima. Percentagem de árvores para cada nível de infeção.....	32
Figura 3.2.1- Crescimento de <i>C. parasitica</i> : (a) amostra 14 I Vir, sete dias após incubação a 25°C na ausência de luz. (b) amostra 9 II Vir, sete dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias, apresentando características virulentas. (C) amostra B15 Vir, sete dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias, apresentando características hipovirulentas.....	32
Figura 3.2.2- Crescimentos dos isolados sete dias após repicagem e incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias. (a) Isolado Virulento; (b) Isolado hipovirulento	33

Figura 3.2.3- Percentagem de isolados virulentos e hipovirulentos obtidos a partir de amostras vegetais de cancos curados e cancos ativos dos Soutos de Felgueiras e Vila Verde.	34
Figura 3.2.4- Classificação morfológica dos isolados virulentos obtidos nos três soutos em estudo: (a) Forma de crescimento do micélio de isolados de <i>C. parasitica</i> em meio PDA; (b) Pigmentação do micélio de <i>C. parasitica</i> ; (c) Padrão de distribuição dos esporos no micélio de isolados de <i>C. parasitica</i> ; (d) Coloração dos picnídeos de <i>C. parasitica</i>	36
Figura 3.2.5- (a) Isolado virulento 34 Vir - micélio com crescimento laranja irregular com esporos cor de laranja distribuídos de forma concêntrica no micélio de <i>C. parasitica</i> ; (b) Isolado virulento A8 Vir - micélio amarelo uniforme com esporos castanhos distribuídos de forma dispersa no micélio de <i>C. parasitica</i> ; (c) Isolado virulento B16 Vir - micélio com crescimento laranja uniforme com esporos cor de laranja distribuídos de forma mista (concêntrica/dispersa) no micélio de <i>C. parasitica</i> ; (d) Isolado virulento B4 Hip- micélio laranja uniforme com esporos cor de laranja distribuídos de forma dispersa no micélio de <i>C. parasitica</i>	37
Figura 3.3.1- Percentagem de isolados do souto de Felgueiras em cada grupo de compatibilidade vegetativa.	38
Figura 3.3.2- Percentagem de isolados do souto de Vila Verde em cada grupo de compatibilidade vegetativa. *NI- GCV não identificado.	39
Figura 3.3.3- Grupos de compatibilidade vegetativa presentes nas duas áreas do Souto de Vila Verde: (a) GCV presentes na Área A do souto de Vila Verde e respetiva representatividade; (b) GCV presentes na Área B do souto de Vila Verde e respetiva representatividade.	40
Figura 3.3.4- Percentagem de isolados do souto de Vila Verde em cada grupo de compatibilidade vegetativa.	41

1 Introdução

1.1 O castanheiro

O castanheiro europeu, *Castanea sativa* Mill., é uma das espécies pertencentes ao género *Castanea* da família *Fagaceae*. O género *Castanea* subdivide-se em 13 espécies das quais cinco estão presentes na Ásia Oriental, sete na América do Norte e apenas uma na Europa (*Castanea sativa*), conhecido como castanheiro europeu ou castanheiro comum (Cortizo et al., 1999). Estas espécies caracterizam-se por portes de variada dimensão. Existem plantas com portes majestosos como *C. dentata*, *C. henry* e *C. sativa*, outras com portes máximos de 15 a 20 m como *C. pumila*, *C. mollissima* e *C. crenata*. Com altura até 10 m conhecem-se *C. floridiana*, *C. Seguinii* e *C. ashei*, e com porte arbustivo *C. davidii*, *C. alnifolia* e *C. paucispina* (Figura 1.1.1).

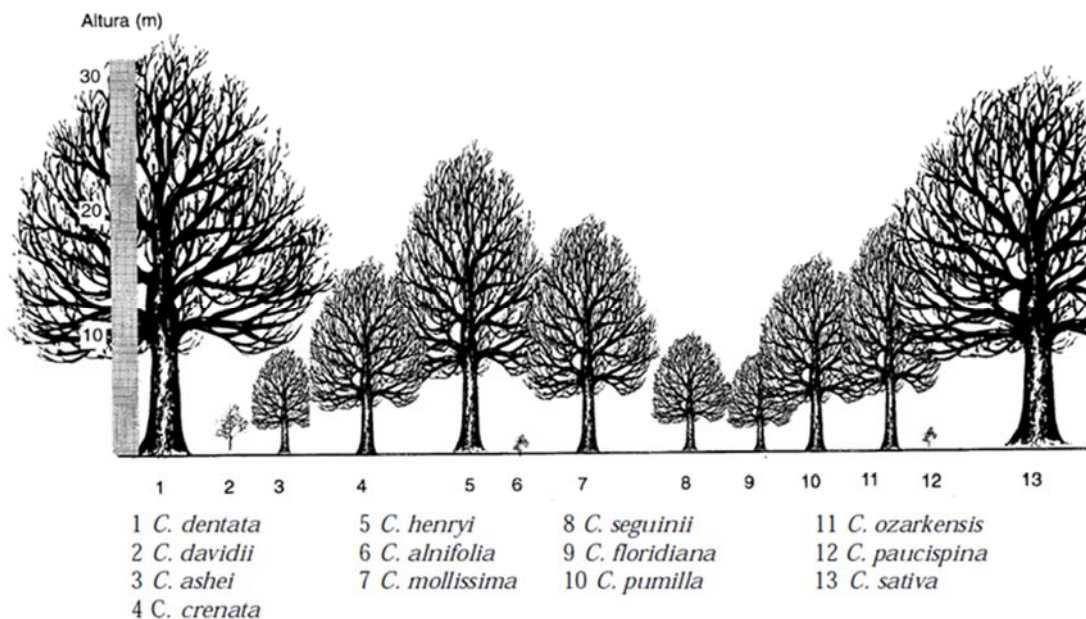


Figura 1.1.1- Silhueta das treze espécies de castanheiros existentes no mundo, com a altura máxima que atingem (Bazzigher et al., 1982).

O castanheiro é uma árvore de folha caduca que pode alcançar 20 a 25 metros de altura (Soler, 2009) e com 6-10 metros de diâmetro, podendo atingir 22 metros de diâmetro. O seu porte varia de acordo com as condições de crescimento. Apresenta um tronco apurcado quando cresce em formações fechadas, podendo surgir majestosamente, com a copa pouco ramificada, constituindo uma das maiores espécies arbóreas do país. Quando

crece isolada, o tronco é mais ou menos sinuoso, muito ramificado e forma uma copa com tendência esférica, conferindo um aspeto diferente do anterior.

As folhas dos castanheiros são simples, dispostas de forma alternada com filotaxias de 2:5 ou 1:2. A nervação é penínérvea, paralela, irregularmente alternada e muito saliente na página inferior. São caducas e pecioladas com 10 a 25 cm de comprimento e 5 a 8 cm de largura. Apresenta um sistema radicular aprumado e muito robusto, mas de limitado desenvolvimento em profundidade, prendendo-se ao solo pelas raízes laterais muito ramificadas. É uma planta monoica, dado que apresenta na mesma planta flores femininas e masculinas reunidas em amentilhos androgínicos eretos ou sub-pendentes com 15-30 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro inseridos na parte terminal dos ramos do ano (Gomes-Laranjo, 2007).

A floração decorre entre os meses de Maio e Junho, tendo início quando as temperaturas médias atingem os 15-18°C, surgindo inicialmente as flores masculinas e só um mês depois as femininas. As flores são muito odoríferas pois dependem muito da polinização por insetos (Gomes-Laranjo, 2007). A polinização do castanheiro é principalmente cruzada, embora se possa verificar polinização anemófila. O fruto surge na inflorescência feminina, é volumoso de cor castanho-avermelhada, forma ovoide subglobosa desenvolve-se dentro de um involúcro espinhoso, o ouriço. Cada ouriço pode ter até três castanhas. Os ouriços abrem a partir de Outubro, libertando as castanhas.

Segundo Gomes-Laranjo (2007), o castanheiro terá surgido na Era Cenozoica, há cerca de 60 milhões de anos. Os estudos paleobotânicos indicam que a sua origem possa ter sido na Ásia Menor, mais propriamente na China, região que é conhecida como o centro de maior diversidade genética do castanheiro. Daqui, terão surgido vias de migração, com origem na *Castanea mollissima* (castanheiro chinês), em direção quer à América do Norte, dando lugar ao castanheiro americano – *Castanea dentata*, quer ao extremo Oriente, dando lugar ao castanheiro japonês – *Castanea crenata*, quer ainda à Europa, dando lugar ao castanheiro europeu – *Castanea sativa*.

1.2 O castanheiro em Portugal

Desde o Terciário que na Península Ibérica os dados polínicos demonstram o carácter autóctone do género *Castanea* (Teroso et al., 2011). No Plistocénico a sua presença foi

detetada em distintas áreas do território galego, sendo um elemento comum na maioria dos diagramas polínicos do noroeste ibérico em todo o Holocénico. Terá sido um elemento constituinte dos bosques caducifólios, onde a sua presença foi sempre reduzida. De acordo com os dados polínicos a expansão de *Castanea sativa* ter-se-á verificado a partir da Idade Média, em função do seu cultivo para aproveitamento de frutos e madeira.

Em Portugal nas regiões rurais de montanha, a castanha foi a base da alimentação humana antes do aparecimento e expansão da cultura da batata e dos cereais (Borges et al., 2007). A introdução do milho e da batata na Europa fizeram com que a castanha perdesse a importância que tinha na alimentação humana e animal (Silva, 2007).

Nos séculos XVI e XVII aparecem variedades mais adaptadas às maiores altitudes, tendo sido selecionadas, algumas delas, pela qualidade da madeira produzida. Com efeito, uma das particularidades da economia de montanha do castanheiro foi a realização de plantações com grandes espaçamentos entre árvores com duplo objetivo de produção: fruto e madeira. Esta dupla exploração da “árvore-do-pão” surge de uma sábia precaução das populações, mais ou menos isoladas, que desta forma se tornavam autossuficientes em alimentos e madeira para a construção das habitações (Silva, 2007).

Segundo (Monteiro, 2010), historicamente o castanheiro foi a “árvore-do-pão” pois sempre que houve fome e escassez de alimentos, as populações usaram as castanhas como base da sua alimentação, até que com a revolução industrial os castanheiros são dizimados para fazer face às exigências das novas indústrias.

Em Portugal, o castanheiro predomina na região Centro e Norte, existindo em 1908, em 13 distritos, concentrando-se a Noroeste de Portugal. Segundo as estatísticas de 1936, a área ocupada por soutos em Portugal, oscilava entre 80 000 e 85 000 hectares (Costa et al., 2011). O declínio da espécie ocorreu apenas no séc. XX em resultado do êxodo rural e do abandono do artesanato e da concorrência de novos produtos que substituíram o castanheiro como produto de manufatura, o que implicou o abandono de extensas áreas de castanheiro (Monteiro, 2010).

A grave situação fitossanitária do castanheiro em Portugal, causada pela doença da tinta (*Phytophthora cinnamomi* Rands) e pelo cancro (*Cryphonectria parasitica*) também contribuíram para o declínio do castanheiro. No nosso país, a doença da tinta foi noticiada

pela primeira vez nas margens do rio Lima no séc. XIX. Segundo Abreu (1992), a doença da tinta teve em 1875 um evento epidémico desastroso para os castanheiros, na parte mais ocidental da Galiza, supostamente este evento iniciou-se nas margens do Rio Lima e em virtude deste surto existem ainda hoje poucos castanheiros na região litoral atlântica. Os tratamentos químicos, a micorrização das plantas e a obtenção de cultivares resistentes têm permitido controlar a doença (Lopes, 2007). Já no que respeita ao cancro do castanheiro, de introdução recente em Portugal e com desenvolvimento epidémico conhecido a partir dos finais da década de 90, manifestou-se com elevada agressividade e uma dispersão muito rápida, tendo, atualmente, distribuição generalizada nas regiões de produção de castanheiro. Não existindo castanheiros resistentes à doença nem substâncias químicas com capacidade de controlar o avanço da doença, o único meio disponível para diminuir os efeitos da doença baseia-se na eliminação dos cancros por remoção dos tecidos doentes. A remoção dos cancros é uma atividade muito laboriosa e de eficácia reduzida, apresentando dificuldades de concretização prática, pela impossibilidade de eliminar todas as fontes de doença, e de aplicar numa escala geográfica alargada (Gouveia et al, 2005). A luta biológica baseada na hipovirulência mostrou ser eficaz levando à cicatrização dos cancros e recuperação dos castanheiros. A hipovirulência como meio de luta biológica contra o cancro do castanheiro, implica um conjunto de colaborações de diferentes entidades para que possa ser adotada. Neste método é absolutamente necessário produzir estirpes hipovirulentas e implementar um plano de ação que garanta a aplicação da estirpe adequada. A coordenação de entidades ligadas à investigação, serviços oficiais, entidades reguladoras e produtores de castanheiros são essenciais para se conseguir cumprir um plano de controlo do cancro do castanheiro e proporcionar uma sólida base científica para a sua posterior aplicação em todas as regiões de castanheiro em Portugal. Esta estratégia terá um impacto positivo na produtividade do castanheiro assim como no valor paisagístico e cultural do ecossistema castanheiro (Gouveia, 2013).

O Plano de Desenvolvimento Sustentável da Floresta Portuguesa, apresentado em 1998 e a Estratégia Nacional para as Florestas, aprovada em 2006 consideram o castanheiro como uma espécie a promover. As metas para 2030 preveem 90 000 ha ocupados por castanheiros em sistema multifuncional preconizando-se uma lógica de diferentes usos nomeadamente de produção de castanha, pastagem, caça, cogumelos, recreio e

agroturismo, garantindo-se desta forma os valores paisagísticos e a biodiversidade deste sistema de exploração da terra (Monteiro, 2010).

1.3 Distribuição geográfica

Segundo as Estatísticas Agrícolas de 2013, o Norte é a região de Portugal onde a superfície florestal do castanheiro é maior (Quadro 1.3.1). Entre os anos de 2005 e 2010 verificou-se um aumento de 9,6% da superfície florestal ocupada por castanheiros.

Quadro 1.3.1- Superfície Florestal do Castanheiro em Portugal (Fonte: INE, 2013)

NUTS II \ Espécie	Castanheiro	
	Unidade: 1 000 ha	
	2005	2010
Portugal	37,5	41,1
Continente¹	36,9	40,5
Norte	32,5	36,0
Centro	4,0	4,2
Lisboa	0,0	0,0
Alentejo	0,6	0,6
Algarve	0,0	0,0
Açores²	0,0	0,0
Madeira³	0,6	0,6

Segundo o INE venderam-se em Portugal na campanha de 2012/2013, 79 907 pés de castanheiros, dos quais, 60 318 se destinaram a plantações no norte do país.

Em 2013 a produção de castanha, segundo os dados do INE, registou uma produção global de 24,7 mil toneladas, o que corresponde a um aumento de 29,3% face ao ano anterior e um aumento de 13,7% face à média do último quinquénio. A ocorrência de precipitação nos meses de verão (agosto e setembro) nas principais zonas produtoras em Trás-os-Montes foi essencial para o desenvolvimento normal da castanha, situação que não ocorreu nos anos anteriores, nomeadamente entre os anos de 2010 a 2012.

¹ Origem: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) - 6.º Inventário Florestal Nacional (IFN6).

² Origem: Direção Regional dos Recursos Florestais - Inventário Florestal da Região Autónoma dos Açores (2007).

³ Origem: Direção Regional de Florestas - 1.º Inventário Florestal da Região Autónoma da Madeira (2008).

1.4 Doenças do castanheiro

O castanheiro é afetado por dois grandes grupos de patógenos causadores de doenças: os fungos e os nemátodes. A lista destes patógenos e a respetiva incidência nos soutos encontram-se descritas na Quadro 1.4.1.

Quadro 1.4.1- Lista de patógenos e respetiva incidência em soutos de castanheiros (Fonte: Vázquez, 2009)

	Patógeno	Incidência
Fungos	<i>Armillaria gallica</i>	Presente, distribuição restringida
	<i>Armillaria mellea</i>	Presente, distribuição restringida
	<i>Botrytis cinerea</i>	Presente
	<i>Coryneum modonium</i>	Presente
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Amplamente distribuída
	<i>Fusarium roseum</i>	Presente
	<i>Hypoxyton mediterraneum</i>	Presente
	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Presente
	<i>Mycosphaerella maculiformis</i>	Amplamente distribuída
	<i>Penicillium expansum</i>	Presente
	<i>Phoma endogena</i>	Presente
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Amplamente distribuída
	<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	Presente, distribuição restringida
	<i>Sclerotinia pseudotuberosa</i>	Presente
Nemátodes	<i>Longidorus attenuatus</i>	Presente
	<i>Rotylenchus</i> sp.	Presente
	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	Presente
	<i>Xiphinema pachtaicum</i>	Presente

De todas as doenças mencionadas em epígrafe apenas três se encontram amplamente distribuídas sendo todas elas causadas por fungos: *Cryphonectria parasitica*, *Mycosphaerella maculiformis* e *Phytophthora cinnamomi*. Provocam respetivamente cancro do castanheiro, antracnose do castanheiro e a tinta do castanheiro. Os danos provocados pela tinta do castanheiro e pelo cancro do castanheiro podem resultar na morte das árvores infectas. Estas duas doenças e as alterações socio-económicas são responsáveis pela redução da área de castanheiros em Portugal.

1.4.1 Antracnose do castanheiro

No que diz à antracnose do castanheiro (*Mycosphaerella maculiformis*) os danos causados por esta doença são pouco significativos. As folhas são o principal órgão afetado pela doença, surgindo manchas circulares castanhas com o bordo amarelado que se estendem por todo o limbo (Figura 1.4.1). Se as folhas sofrerem infeções fortes enrolam-se e caem. Se esta desfolha for extensa e prematura, os ouriços não chegam a amadurecer (Nevado et al, 2004). Recomenda-se a apanha e queima das folhas caídas, medida de controlo suficiente, uma vez que se interrompe assim o ciclo evolutivo do fungo, reduzindo ou praticamente eliminando as infeções no ano seguinte (SNAA, 2014).



Figura 1.4.1 - Folha infetada por *Mycosphaerella maculiformis* (Fonte: Nevado et al., 2004).

1.4.2 Tinta do castanheiro

Phytophthora spp. infeta primeiro as raízes absorventes provocando-lhes uma rápida destruição, seguindo-se as raízes grossas e o colo da planta (Vázquez, 2009). Em consequência da podridão do sistema radicular há uma redução do transporte de água, nutrientes e sais minerais, o que implica perdas na produção de madeira, na produção de castanha e pode mesmo levar à morte das árvores afetadas (Vázquez, 2009).

O líquido viscoso violeta ou azul-escuro que as raízes afetadas exsudam deu o nome à doença (Figura 1.4.2). Segundo Abreu (1992) a escolha do nome é um facto pouco feliz pois castanheiros saudáveis também podem exsudar um líquido da mesma cor quando sofrem lesões corticais ou profundas da raiz que em contacto com o solo apresentam exsudações de cor violeta. Por outro lado podem existir árvores afetadas que não exsudam líquidos com esta coloração.



Figura 1.4.2 - Raízes de castanheiro infetadas por *Phytophthora* spp. evidenciando uma coloração violeta ou azul escura (Fonte: <http://lusosouto.webnode.pt/produtos/tratamento-de-doen%C3%A7as>)

1.4.3 Cancro do castanheiro

1.4.3.1 *Cryphonectria parasitica*

Cryphonectria parasitica [Syn. *Endothia parasitica* (Murril) P. J. Anderson & H. W. Anderson] (anamorph: *Endothiella*), fungo responsável pelo cancro do castanheiro, é um *Ascomyceta* da ordem *Diaporthales*. É um fungo da micoflora natural em castanheiros asiáticos (*C. crenata*, *C. mollissima*). *C. parasitica* é um fungo muito agressivo em *Castanea sativa*. O fungo tem ainda capacidade de causar infeção em diferentes espécies de *Quercus* e outras espécies florestais de folha larga, embora com menor agressividade (Gouveia, 2005).

Cryphonectria parasitica foi incluído por Kirk et al. (2001) no filo *Ascomycota*, Classe *Ascomycetes*, Subclasse *Sordariomycetidae*, ordem *Diaporthales*, família *Valsaceae* e género *Cryphonectria*. Recentemente (Gryzenhout et al., 2006) propôs a inclusão de uma nova família na ordem *Diaporthales* a *Cryphonectriaceae* que inclui o género *Cryphonectria*. Este género foi considerado sinónimo de *Endothia* (Barr 1978; Roane 1986) até que Barr em 1978 modificou profundamente a taxonomia do género *Endothia*. Os géneros *Cryphonectria* e *Endothia* foram separados com base nas discrepâncias encontradas na configuração estromática, na forma dos ascósporos e na septação (Micales & Stipes, 1987).

Segundo (Gryzenhout et al., 2006) a nova família *Cryphonectriaceae* foi criada para acomodar os géneros do complexo *Cryphonectria-Endothia*. A natureza única destes

gêneros reside na formação de uma coloração laranja do tecido estromático na mesma fase dos seus ciclos de vida, que pode ser testado com reações de cores púrpuras em KOH e ácido láctico.

A população de *C. parasitica* apresenta grande uniformidade nas características morfológicas relacionadas com a cor e crescimento dos isolados em PDA e maior variabilidade na produção de esporos.

O micélio em forma de leque com cor esbranquiçada ou amarelada é bastante característico. O fungo produz dois tipos de frutificações que se diferenciam num estroma de cor amarelo-alaranjado (Suarez, 1989) e picnídeos – frutificações assexuadas assemelham-se a cabeças de alfinetes de cor alaranjada ou castanho-avermelhada e estão espalhados à superfície dos cancrios (Fernandes, 1949).

O ciclo da doença (Figura 1.4.3) culmina com a produção de órgãos de reprodução, que são de dois tipos: os ascósporos e os picnidiósporos (Carvalho et al., 2000).

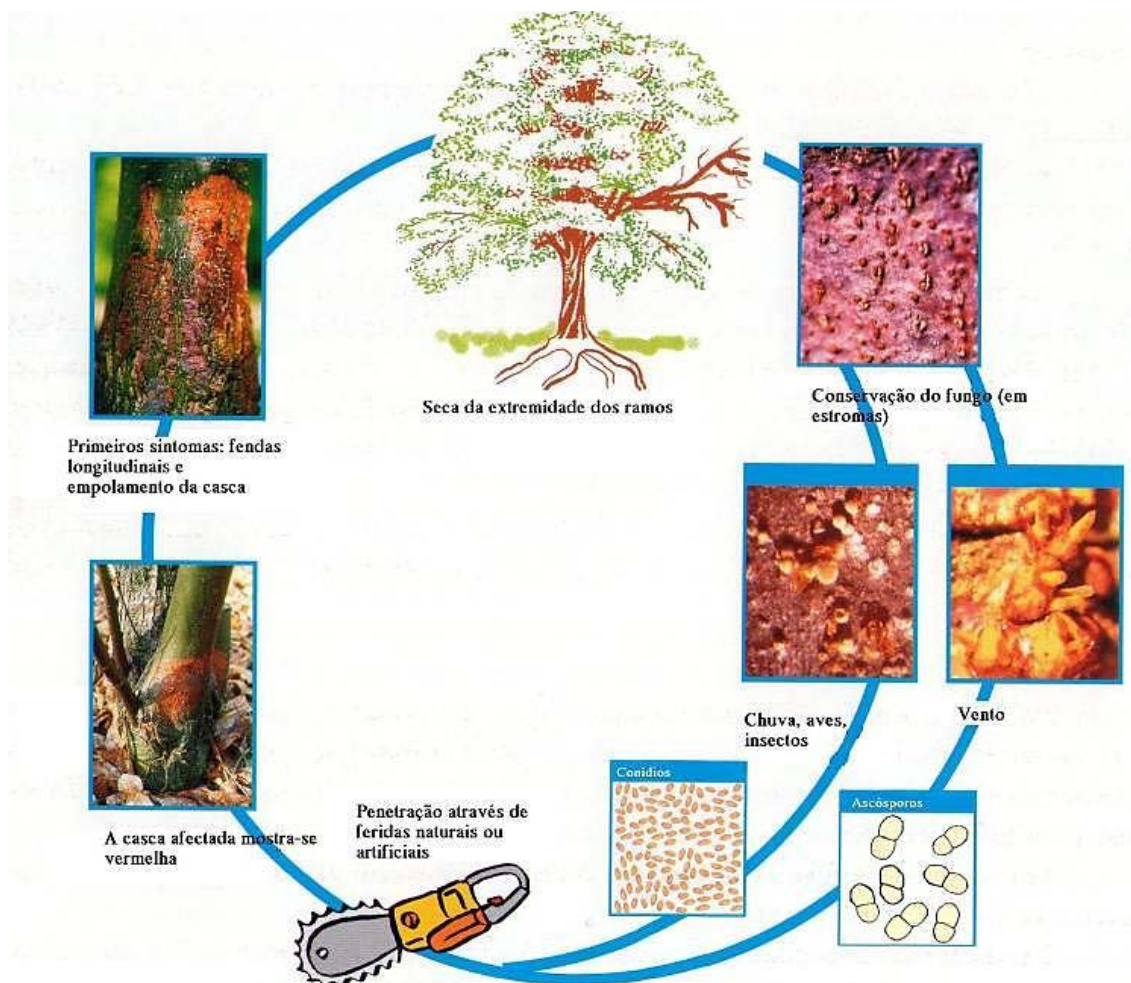


Figura 1.4.3- Ciclo de vida da *Cryphonectria parasitica* (Fonte: Sofia, 2010).

1.4.3.2 Distribuição da doença em Portugal

Cryphonectria parasitica foi detetado pela primeira vez em 1904 nos Estados Unidos, quando se observaram necroses e lesões no tronco e ramos de *Castanea dentata* (Marsh, Borkh), levando ao desaparecimento quase total do castanheiro neste país (Gouveia et al., 2001).

A doença foi descoberta na Europa em 1938 no norte da Itália. Apesar de o cancro do castanheiro ter provocado grandes estragos na Europa não foi tão grave como nos Estados Unidos. Este foi descrito pela primeira vez em Portugal em 1929 em amostras da casca de *Castanea crenata*, provenientes da Beira Interior. Depois da deteção inicial, apenas em 1989, dois focos da doença foram encontrados em castanheiro Europeu, *C. sativa*, na província de Trás-os-Montes e Alto Douro (Bragança et al., 2008).

Atualmente o cancro do castanheiro está instalado nas zonas de produção de castanheiro, incluindo soutos do Entre Douro e Minho. A doença está presente em diversas populações de castanheiros nos vários concelhos constituintes desta região.

Estudos realizados por Bragança et al. (2005b) sobre a dispersão do cancro do castanheiro em Portugal mostraram que a doença estava presente em regiões das áreas da Direção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes e Alto Douro (DRATM), Direção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho (DRAEDM), Direção Regional de Agricultura da Beira Interior (DRABI), Direção Regional de Agricultura do Ribatejo e Oeste (DRARO), Direção Regional de Agricultura do Alentejo (DRAAL), Direção Regional de Agricultura do Algarve (DRAALG), Região Autónoma dos Açores e da Madeira (Quadro 1.4.2).

Segundo este estudo (Bragança et al., 2005b) foram observados sintomas da doença em todas as regiões prospetadas embora nalguns casos não fosse possível observar sinais da doença, como é o caso de Monchique, no Algarve. No entanto os Serviços de agricultura já tinham, no entanto, referenciado o aparecimento de cancro na Serra de Monchique. Na zona afeta à DRARO observou-se a presença de cancro apenas em Colares - Sintra e em Mafra.

Quadro 1.4.2 - Levantamento da dispersão do cancro do castanheiro em Portugal (Fonte: Bragança, 2007)

	Direção regional de agricultura	Concelhos	Nº de Parcelas infetadas	Nº de Parcelas com isolados de <i>C. parasitica</i>
Portugal Continental	DRAEDM	Vila Verde Amares Barcelos Guimarães	4 (áreas florestais)	4
	DRATM	Chaves Valpaços Vinhais Bragança Tarouca Penedono	73	58
	DRABI	Trancoso Guarda Manteigas Belmonte Sabugal Fundão Penamacor Castelo- Branco Idanha-a-Nova Vila Velha de Rodão	23 (14 áreas florestais)	6
	DRABI	Castanheira de Pêra Lousã Vila Nova de Paiva S. Pedro do Sul Viseu	6 (2 áreas florestais)	0
	DRARO	Alcanena Ferreira do Zêzere Cadaval Mafra Sintra ⁵	10 (8 áreas florestais)	0
	DRAAL	Portalegre Castelo de Vide Marvão	25 (2 áreas florestais)	7
	DRAALG	Monchique ¹	2	0
	Região Autónoma da Açores	PICO	Madalena S. Roque do Pico	6
TERCEIRA		Angra do Heroísmo Vila Praia da Vitória	14	12
S. MIGUEL		Ponta Delgada Ribeira Grande Lagoa Vila Franca do Campo Nordeste Povoação	18	16
Região Autónoma da Madeira	MADEIRA	Ribeira Brava Câmara de Lobos Funchal	11	3

¹ Inclui locais com sinais e sintomas da doença

1.4.3.3 Sintomatologia da doença

Esta doença manifesta-se no tronco e nos ramos das árvores e como consequência ocorre o estrangulamento dos mesmos impedindo a circulação da seiva que pode em casos graves pode provocar a morte das árvores (Vasquez, 2009; DRATM, 2011).

Os sinais da doença causada por *C. parasitica* são o aparecimento de um micélio branco, facilmente visível debaixo da casca, e a formação de estromas alaranjados nos quais se formam os picnidíos (Grente y Berthelay- Sauret, 1978).

O sintoma mais evidente da doença são a formação de cancrios sobre o tronco, ramos e rebentos (Figura 1.4.4) o fendilhamento longitudinal da casca, coloração avermelhada da casca, picnídeos e aparecimento de micélio de *Cryphonectria parasitica* debaixo da casca. Com o tempo, estes sintomas desenvolvem-se podendo provocar a morte da árvore. A existência de ramos secos na copa com permanência de folhas e ouriços mesmo durante o Inverno, o amarelecimento das folhas do ramo logo acima do cancro, são outros os sintomas desta doença.

Em meio de cultura em laboratório, os isolados virulentos de *C. parasitica* caracterizam-se por ter um índice elevado de crescimento, micélio aéreo, morfologia alaranjada e uma abundante formação de picnidíos (Kuhlman, 1983; Elliston, 1985).

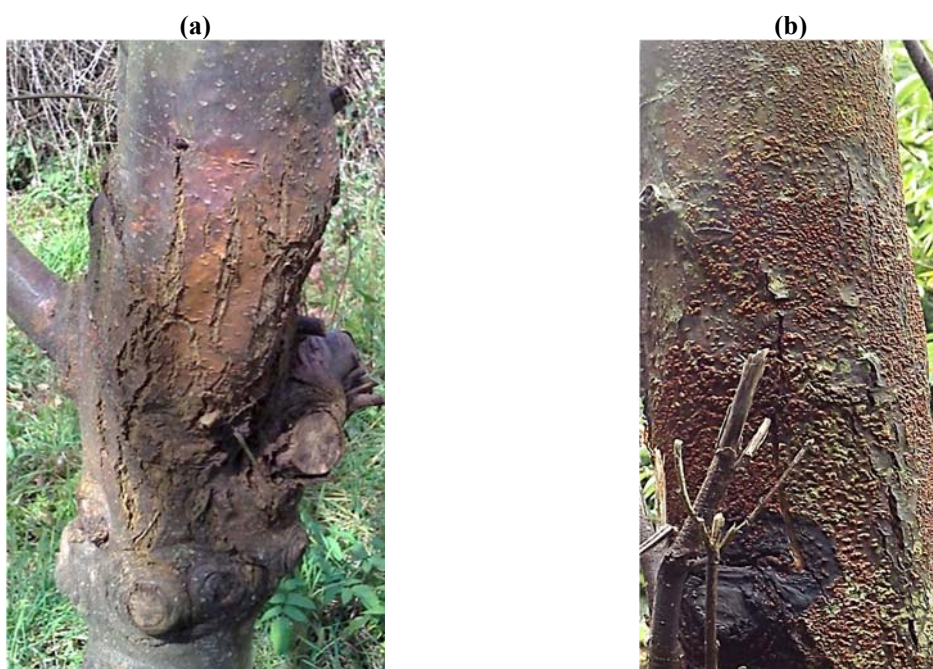


Figura 1.4.4- Castanheiros com sintomas característicos de cancro (*Cryphonectria parasitica*) A - cor avermelhada, fissuras longitudinais da casca (Felgueiras, 2013) e B - Picnidíos (Cepões, 2014).

1.4.3.4 Fatores de predisposição e indução da doença

C. parasitica penetra no hospedeiro através de feridas naturais ou provocadas por podas e enxertias invadindo a casca e posteriormente o lenho. Na superfície da casca da árvore aparece o estroma do fungo formando pústulas de cor amarela-alaranja, onde posteriormente poderão aparecer picnídeos (frutificações assexuadas) e peritecas (frutificações sexuadas) (Vázquez, 2009) (Figura 1.4.5). Com o tempo húmido (outono e primavera) os picnídeos formam cordões mucilaginosos em forma de cirros que se disseminam pela ação das aves, insetos ou da chuva. As peritecas menos frequentes têm a forma de pera, dentro das quais se encontram os ascos, sacos delgados de forma elíptica, que encerram grupos de oito ascósporos em disposição bisseriada (Fernandes, 1949; Suarez, 1989).

Os ascos projetam os ascósporos hialinos para a atmosfera (Fernandes, 1949). O fungo desenvolve-se melhor com temperaturas entre os 18°C e os 38°C.



Figura 1.4.5- Em cima imagem de frutificações de corpos sexuados – peritecas. Em baixo imagem de frutificações assexuadas – picnídeos (Fonte: <http://ec.asm.org/content/vol8/issue3/images/medium/coverfig.gif>)

A intervenção humana dissemina a doença pela utilização de instrumentos não desinfetados nas enxertias e podas, pela enxertia de varas doentes em plantas sãs, pelo

comércio de materiais de propagação (plantas, garfos) e madeiras infetadas. Este último fator é o principal responsável pelo aparecimento de novos focos da doença, nomeadamente em zonas distantes dos focos iniciais (Figura 1.4.6).

A dispersão natural do parasita, a permanência dos focos de infeção nos sotos e as práticas culturais associadas à enxertia e à poda constituem fatores que potenciam e agravam a situação.

De acordo com trabalhos realizados em Portugal por Bragança et al. (2005a), a ocorrência da doença em plantações muito jovens, onde praticamente não houve condições para a contaminação local, quer por se tratar de árvores com pouca ou nenhuma intervenção humana, quer pelo facto de se verificar a inexistência de casos de cancro na área, fortes indícios de se tratar de casos em que as árvores já vinham contaminadas do viveiro. Segundo os mesmos autores, na maior parte destes casos as árvores tinham sido importadas por viveiristas nacionais. Este estudo reforça a hipótese que as técnicas culturais serão muito relevantes na disseminação do fungo. Esta hipótese é apoiada por dois fatores: os cancos encontram-se em maior número nos ramos, sem existir uma direção predominante para o seu aparecimento; o facto de serem as árvores mais sujeitas à intervenção humana (enxertias, podas, cortes e mobilizações) as que apresentam mais cancos.



Figura 1.4.6- Castanheiro com cancro que infetou a árvore através de lesões resultantes da poda (Felgueiras, 2013).

1.4.3.5 Meios de proteção

No caso de se verificar a presença de sinais e sintomas do cancro do castanheiro em soutos, e dado não existirem produtos eficazes que o combatam, é fundamental redobrar os cuidados, e ter especial atenção com as práticas culturais. Para tal o Serviço Nacional de Avisos Agrícolas publicou a Circular N° 2/2013 com medidas preventivas e de controlo do fungo que devem ser tomadas pelos agricultores. Entre estas medidas destacam-se as seguintes: utilizar garfos retirados apenas de árvores sãs; optar preferencialmente por podas ligeiras durante os primeiros anos de vida do castanheiro; se for detetado o cancro num ramo fino cortar de imediato, pelo menos, 20 cm abaixo da zona do cancro; caso o cancro apareça no tronco ou ramo grosso, retirar muito bem a casca fendilhada e toda a zona infetada até atingir o tecido são; retirar do souto e queimar todas as partes da planta infetadas com o cancro (casca e ramos finos ou grossos); proteger os golpes resultantes da enxertia e podas, ou de outra origem, com uma pasta cicatrizante à base de cobre; desinfetar sempre o material de corte, tanto nas enxertias como nas podas, com lixívia, antes e após cada utilização; e fazer um tratamento a todas as plantas do souto, com um produto à base de oxiclreto de cobre, antes da rebentação.

A protecção biológica utilizando estirpes hipovirulentas do fungo é a estratégia que tem revelado melhores resultados, sabendo-se que as populações europeias de *C. parasitica* reagem com êxito à introdução estirpes hipovirulentas (Aguín, et al., 2011). A regressão do cancro do castanheiro com recurso à hipovirulência caracteriza-se pela formação de tecido cicatricial que se opõe à progressão do fungo e de seguida a parte afetada fica isolada, seca e cai para dar lugar a novos tecidos (Abreu, 1992). A estirpe virulenta perde as suas características patogénicas e as defesas naturais da árvore podem eliminá-la, quando antes eram ineficazes contra a estirpe normal (Vrot e Grente, 1985).

Nas estirpes hipovirulentas foi detetada a fusão da *C. parasitica* com vírus de RNA de cadeia dupla de famílias distintas, mas apenas a família *Hipoviridae*, é considerada apropriada para o controlo biológico do cancro do castanheiro (Milgroom & Cortesi, 2004; Aguín et al., 2011).

Segundo Gouveia (2008), a hipovirulência no sistema “*Castanea sativa* – *C. parasitica*” é considerada o modelo biológico na interação vírus – fungo, constituindo assim, um meio natural de luta biológica com capacidade de alterar as características de virulência ao nível

da população de *C. parasitica*, diminuindo a incidência de cancro do castanheiro. A hipovirulência é transmitida horizontalmente através da anastomose das hifas em estirpes vegetativamente compatíveis e não verticalmente pelos ascósporos (esporos de origem sexuada), tendo uma taxa variável através de conídios. A disseminação dos hipovírus está diretamente relacionada com os grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) da população do fungo, pelo que existe a necessidade de estudar a estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica* e identificar os GCV presentes em cada souto.

Em Portugal estão descritos apenas seis GCV enquanto nos restantes países europeus como a Suíça, Itália e França existem cerca de 14 a 16 GCV distintos (Bragança, 2007). De acordo com estudos realizados por Bragança (2007) e Gouveia et al. (2001, 2010), Ibáñez et al. (2014) o grupo de compatibilidade vegetativa mais frequente em Portugal é o tipo europeu EU-11. De acordo com o primeiro autor, este GCV compreende 80,2% de todos os isolados e foi encontrado em todas as populações de *C. parasitica* em Portugal continental e ilhas, seguido do EU-12 e EU-66. Os estudos até agora realizados demonstraram que na Europa todas as estirpes hipovirulentas encontradas apresentam o hipovírus CHV1, com alta diversidade genotípica (Allemann et al., 1999). Esta diversidade genómica não é uniforme na Europa, e em Portugal apresenta variações populacionais relativamente baixas quando comparado com países como a Suíça, Itália ou França (Bissegger et al. 1997, Cortesi et al. 1996, Breuillin et al. 2006). A hipovirulência reproduz-se facilmente em laboratório o que possibilitou a sua utilização em programas de luta biológica. No essencial consiste em produzir as estirpes hipovirulentas adequadas para cada situação e fazer uma introdução por inoculação na extremidade dos cancros em crescimento, sendo esta aplicação anual. A eficácia deste meio de luta biológico, em castanheiro, depende da capacidade de transmissão dos hipovírus e dos mecanismos biológicos que a determinam, nomeadamente os relacionados com a capacidade de replicação e agressividade do vírus, o seu efeito no hospedeiro e a sua capacidade de conversão e transmissão, assim com a estrutura genética da população de *C. parasitica*, das condições ambientais em cada região concreta, e ainda das características da população de *C. sativa* que em parte determina a epidemiologia do fungo parasita (Bissegger, et al., 1997; Allemann et al., 1999; Milgroom & Cortesi, 2004; Gouveia, 2008). *C. parasitica* é um organismo de quarentena da lista A2 que se encontra regulamentado pela Diretiva 77/93/CEE. Para que as estratégias de luta baseadas na utilização estirpes hipovirulentas

atingam os resultados pretendidos, será necessário isolar o agente patogénico e estudar as características biológicas, epidemiológicas e patogénicas da população parasita presente nos diferentes locais.

1.5 Objetivos

Para que as estratégias de luta baseadas na utilização de estirpes hipovirulentas atinjam os resultados pretendidos, será necessário isolar o agente patogénico e estudar as características biológicas, epidemiológicas e patogénicas da população parasita presente nos diferentes locais.

Este trabalho tem como objetivos avaliar a incidência do cancro do castanheiro e analisar a estrutura das populações virulentas e hipovirulentas de *C. parasitica*, presentes em três soutos da Região do Entre Douro e Minho localizados em Felgueiras, Vila Verde e Ponte de Lima.

Este trabalho foi realizado no âmbito do PROJETO PTDC/AGR-PRO/4606/2012 “HiCC - Luta Biológica por Hipovirulência contra o Cancro do Castanheiro em Portugal”.

2 Material e Métodos

2.1 Localização de soutos analisados

2.1.1 Felgueiras

O souto de Felgueiras (Figura 2.1.1) localiza-se na freguesia de Sendim, pertence à Quinta de Sergude propriedade da Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (DRAPN). Apresenta uma área de cerca de 6000m² com uma plantação de 110 castanheiros em plena produção.



Figura 2.1.1- Vista aérea do Souto de Felgueiras, com indicação do grau de severidade de infeção por *C. parasitica* de todos os castanheiros do souto.

2.1.2 Vila Verde

O souto de Vila Verde (Figura 2.1.2) situa-se na Freguesia de Pico de Regalados, lugar do Tojal. Este souto pertence à Quinta Delícias do Tojal certificada no modo de produção biológico e apresenta uma área de souto de cerca de 1 ha. As cultivares presentes são a

Judia, Longal e Martáinha, com predominância da variedade Judia relativamente às restantes variedades. Este souto apresenta duas áreas com castanheiros de idade distinta, na área A os castanheiros têm mais de trinta anos e na área B os castanheiros estão em início de produção têm cerca de dez anos.

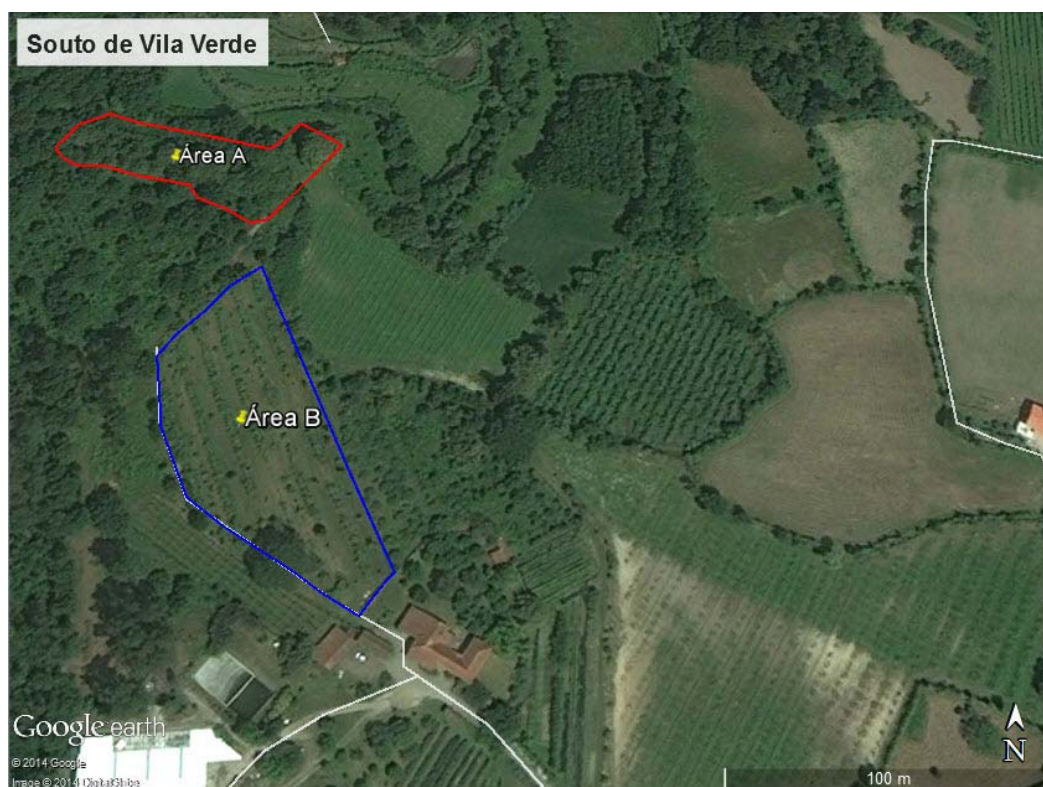


Figura 2.1.2- Vista aérea do Souto de Vila verde, com a delimitação das duas áreas deste souto, a linha a vermelho corresponde ao limite da área A e a linha a azul representa o limite da área B.

2.1.3 Cepões

O souto de Cepões (Figura 2.1.3) situa-se no Concelho de Ponte de Lima. Este souto pertence à Quinta Eido da Devesa certificada no modo de produção biológico, apresenta uma área de 8 ha, onde estão plantados 1000 castanheiros: 500 porta-enxertos de origem nacional e 500 porta-enxertos franceses. As variedades enxertadas nos porta-enxertos nacionais são a Marsol e Marigoule, estando por enxertar todos os 500 castanheiros de variedades francesas. Este é um souto jovem, plantado em 2006.



Figura 2.1.3- Vista aérea do Souto de Cepões, com a delimitação da área deste souto a vermelho.

2.2 Recolha de material vegetal contaminado

Nas propriedades visitadas efetuou-se uma amostragem em árvores que apresentavam sintomas de cancro: copa afetada com ramos secos, cancos e fendilhamento da casca, rebentação adventícia exuberante, ou em árvores que evidenciavam sinais do fungo, como a presença de picnídeos. Nos soutos estudados os procedimentos de campo envolveram a avaliação visual das árvores, num percurso sequencial, para observação geral do estado sanitário da parcela e procedeu-se a uma análise visual das árvores a fim de detetar os sintomas do cancro do castanheiro, incluindo morte de ramos ou árvores, folhas secas na copa, fendilhamento longitudinal da casca, rebentação adventícia exuberante ou sinais do fungo, como micélio e picnídios (Figura 2.2.1a). Observaram-se ainda as árvores com cancos curados nos ramos e nos troncos, registando-se a presença de cancos curados (Figura 2.2.1b). As árvores foram classificadas quanto à severidade da doença causada por *C. parasitica* com base na aplicação da seguinte escala de severidade proposta por Juhásová and Bernadovičová (2001): 1 – Árvore sã; 2 - Presença de um cancro com área reduzida; 3 - Presença de dois cancos ou um cancro de extensão razoável; 4 - Presença de três ou mais cancos e/ou áreas afetadas muito extensas; 5 - Árvore sem viabilidade biológica.

Para isolamento de estirpes de *C. parasitica* em laboratório, nos três soutos estudados recolheram-se amostras de várias árvores que apresentavam sintomas típicos da doença ou sinais do fungo (presença de picnídios) e ainda de cancos potencialmente curados.

As recolhas foram efetuadas até um máximo de 35 árvores por propriedade visitada. As parcelas escolhidas diferenciam-se pelo modo de produção e pelas idades dos soutos.

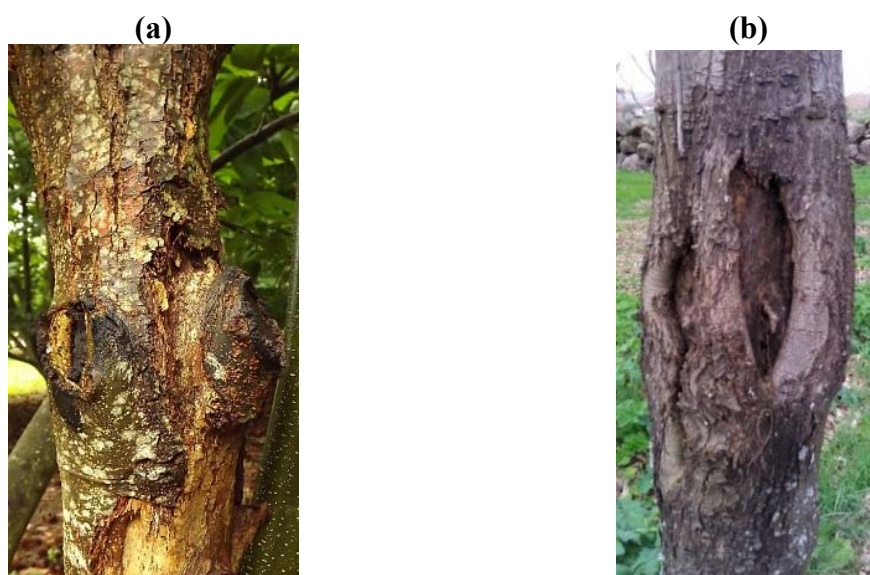


Figura 2.2.1- (a) Árvore com sintomas de *C. parasitica* (Cepões, 2014); (b) Árvore com cancos curados (Felgueiras, 2013)

Das árvores doentes que se retirou material vegetal para isolamento e caracterização da população de *C. parasitica*, recolheram-se amostras em locais da árvore em que os cancos estavam presentes, sendo as amostras designadas Vir (virulento). As amostras onde os cancos estavam curados foram designadas Hip (hipovirulentos). Nos soutos de Felgueiras e Vila Verde as amostras foram retiradas com a ajuda de uma navalha, sistematicamente desinfetada durante 5 minutos com etanol a 96 % antes de proceder ao corte de material de uma nova árvore. As amostras foram colocadas em sacos devidamente identificados e transportados para o laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima e guardadas no frigorífico, até posterior isolamento do fungo.

No souto de Cepões para colheita de amostras utilizou-se um *punch* e retiram-se três porções com 3 mm de diâmetro e cerca de 0.5 cm de profundidade da região central e zonas de expansão dos cancos, que foram colocados em tubos eppendorf de 1,5ml, sendo

o *punch* desinfetado entre cancos mergulhando-o em álcool a 95%. As amostras recolhidas foram devidamente identificadas e transportadas para o laboratório.

Depois de recolhidas as amostras dos castanheiros, todas as feridas foram protegidas para evitar a dispersão da doença

Para efeitos de amostragem o souto de Felgueiras foi dividido em duas parcelas, designadas por área 1 e área 2. Na área 1, recolheram-se 28 amostras de 21 árvores e na área 2 recolheram-se 6 amostras de 6 árvores (Quadro 2.2.1) o que perfaz um total de 34 amostras de tecidos de castanheiro correspondentes a 27 árvores.

Quadro 2.2.1- Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de castanheiros na área 1 e área 2 do souto de Felgueiras.

Área 1			Área 2	
Nº da Árvore	Amostras Virulentas	Amostras Hipovirulentas	Nº da Árvore	Amostras Virulentas
1	1 I Vir	-	9	9 II Vir
2	2 I Vir	-	12	12 II Vir
3	3 I Vir	-	22	22 II Vir
4	4 I Vir	4 I Hip	33	33 II Vir
5	5 I Vir	5 I Hip	38	38 II Vir
6	6 I Vir	-	52	52 II Vir
7	7 I Vir	-		
8	8 I Vir	-		
9	9 I Vir	9 I Hip		
10	10 I Vir	10 I Hip		
11	11 I Vir	11 I HipA; 11I HipB		
12	12 I Vir	-		
13	13 I Vir	-		
14	14 I Vir	-		
15	-	15 I Hip		
17	17 I Vir	-		
21	21 I Vir	21 I Hip		
29	-	29 I Hip		
34	34 I Vir	-		
38	38 I Vir	-		
44	44 I Vir	-		

O souto localizado em Vila Verde foi igualmente dividido em duas parcelas, designadas por área A e área B, tendo-se recolhido no total 50 amostras de tecidos de 28 castanheiros. Na área A recolheram-se 23 amostras de 13 árvores e na área B recolheram-se 27 amostras de 16 árvores (Quadro 2.2.2).

Quadro 2.2.2 - Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de cada árvore na área A e B do souto de Vila Verde.

Área A			Área B		
Nº da Árvore	Amostras Virulentas	Amostras Hipovirulentas	Nº da Árvore	Amostras Virulentas	Amostras Hipovirulentas
11	A1 Vir	A1 Hip	2	B1 Vir	B1 Hip
9	A2 Vir	A2 Hip	3	B2 Vir	B2 Hip
8	A3 Vir	A3 Hip	4	B3 Vir	B3 Hip
6	A4 Vir	A4 Hip	5	-	B4Hip; HipA; HipB
2	A5 Vir	A5 Hip	10	B5 Vir	B5 Hip; HipA
28	A6 Vir	A6 Hip	14	B6 Vir	-
1	A7 Vir	-	25	B7 Vir	B7 Hip
27	A8 Vir	-	14	B8 Vir	B8 Hip
24	A9 Vir	-	21	-	B10 Hip
21	A10 Vir	A10 Hip	22	-	B11 Hip
20	A11 Vir	A11 Hip	24	-	B12 Hip
17	A12 Vir	A12 Hip	31	B13 Vir	B13 Hip
15	A13 Vir	A13 Hip	38	B14 Vir	B14 Hip
-	-	-	37	B15 Vir	B15 Hip
-	-	-	34	B16 Vir	-

No souto de Cepões, Ponte de Lima, colheram-se 48 amostras de 35 árvores (Quadro 2.2.3). Este souto não foi dividido em parcelas distintas por se tratar de um souto instalado em vários socalcos de pequena dimensão.

Quadro 2.2.3- Designação das amostras virulentas (Vir) e hipovirulentas (Hip) retiradas de cada árvore no souto de Cepões.

Nº da Árvore	Amostras Virulentas	Amostras Hipovirulentas	Nº da Árvore	Amostras Virulentas	Amostras Hipovirulentas
1	1 Vir	-	19	19 Vir	19 Hip
2	2 Vir	-	20	20 Vir	20 Hip
3	3 Vir	-	21	21 Vir	-
4	4 Vir	-	22	22 Vir	-
5	5 Vir	5 Hip	23	23 Vir	23 Hip
6	6 Vir	-	24	24 Vir	24 Hip
7	7 Vir	7 Hip	25	25 Vir	25 Hip
8	-	8 Hip	26	-	26 Hip
9	-	9 Hip	27	27 Vir	-
10	10 Vir	-	28	28 Vir	-
11	11 Vir	-	29	29 Vir	29 Hip
12	12 Vir	-	30	30 Vir	-
13	13 Vir	13 Hip	31	31 Vir	31 Hip
14	14 Vir	14 Hip	32	32 Vir	32 Hip
15	-	15 Hip	33	33 Vir	-
16	16 Vir	-	34	34 Vir	34 Hip
17	17 Vir	-	35	35 Vir	-
18	18 Vir	-	-	-	-

2.3 Isolamento, identificação e caracterização das estirpes de *C. parasitica*

Para o isolamento de *C. parasitica* utilizou-se o meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, 39g L⁻¹), distribuído em placas de Petri. As placas foram identificadas com a data em que foi feito o isolamento, o número da árvore, identificando também se se tratava de uma amostra virulenta (Vir) ou hipovirulenta (Hip).

O manuseamento do material vegetal e os isolamentos foram realizados em condições de assepsia. De cada amostra de castanheiro foi cortada uma seção de 2 cm², que foi desinfetada superficialmente e de seguida colocada em etanol a 70% durante dois minutos. Lavou-se a amostra em água destilada esterilizada, secou-se em papel de filtro esterilizado e cortou-se em dez partes. Para cada amostra foram utilizadas duas placas de Petri onde se colocaram cinco porções da amostra inicial (Figura 2.3.1).

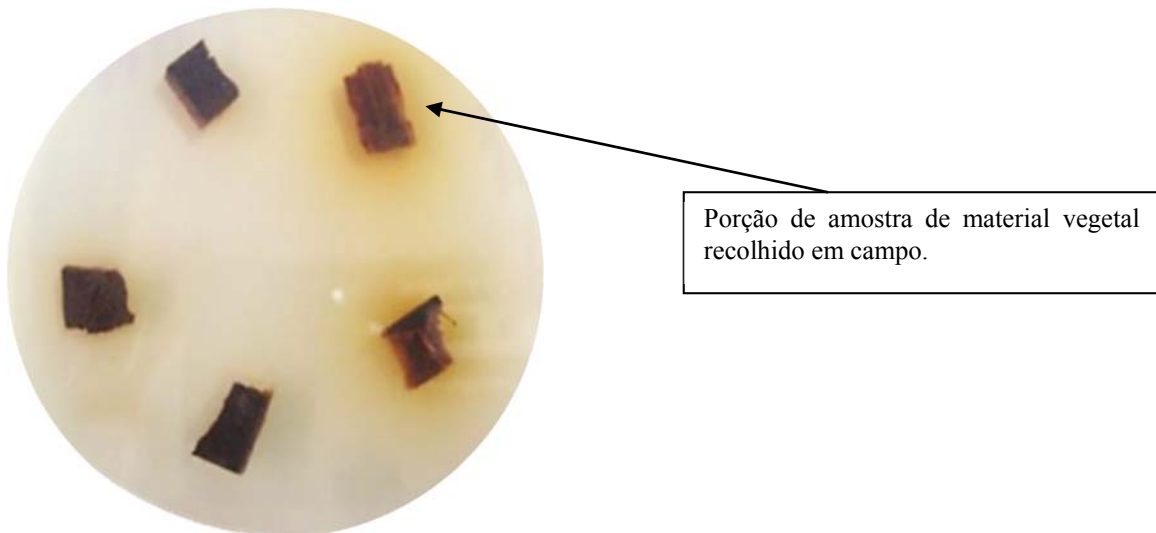


Figura 2.3.1- Isolamento a partir da amostra de material vegetal de um cancro curado em meio de cultura PDA – placa 14 I Hip.

As placas foram incubadas a 25°C na ausência de luz durante 7 dias, tendo posteriormente sido expostas à luz do laboratório durante 8 dias para desenvolvimento de esporos. Dois isolados de cada amostra foram selecionados e guardados para estudo. Os isolados obtidos de *C. parasitica* foram seguidamente purificados por repicagem de uma porção de micélio, transferido para novas placas com meio PDA (Figura 2.3.2). Os isolamentos puros de *C. parasitica* foram conservados em tubos de ensaio com PDA inclinado à temperatura de 4°C.

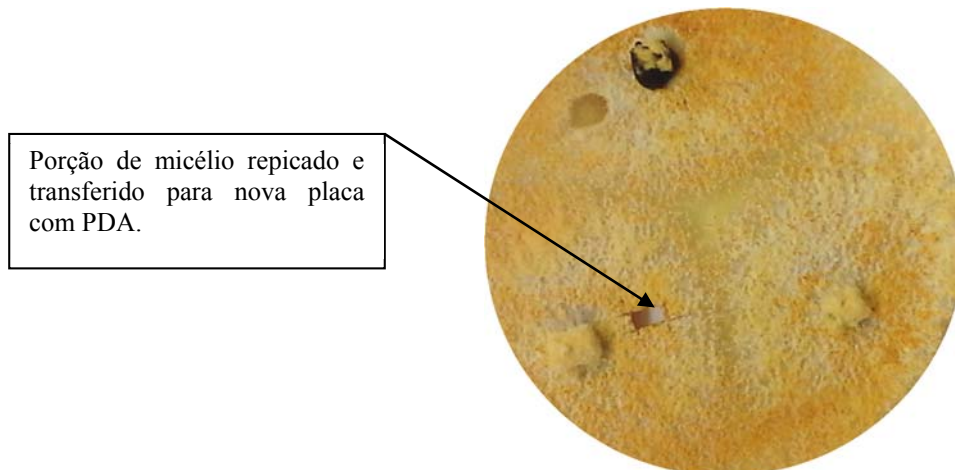


Figura 2.3.2- Crescimento de *C. parasitica* da amostra 23 Vir, 7 dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante 8 dias. A seta indica uma porção do micélio utilizada para repicagem e purificação do isolado.

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada por observação dos crescimentos microbianos em meio PDA, após incubação a 25°C durante 7 dias na ausência de luz, seguida de exposição à luz durante 8 a 15 dias. Os crescimentos foram examinados ao oitavo e décimo quinto dia após exposição à luz, tendo-se avaliado: i) o padrão de crescimento do micélio, ii) a presença de micélio aéreo, iii) a cor da colônia, iv) a presença de esporos, v) a cor e padrão de organização dos esporos (Figura 2.3.3).

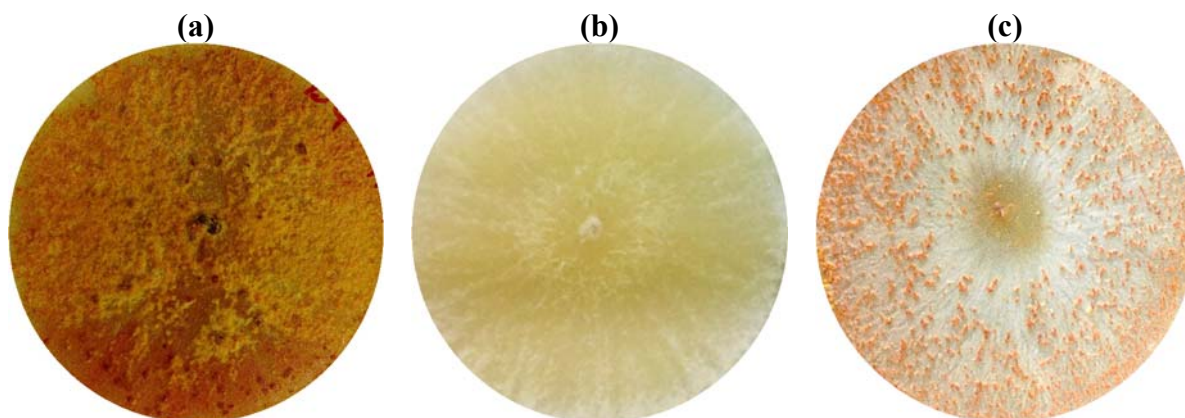


Figura 2.3.3- Isolados de *C. parasitica* purificados por repicagem de uma porção de micélio, transferido para novas placas com meio de PDA. (a) Isolado virulento da amostra 4I Vir; (b) Isolado hipovirulento da amostra A5 Hip; (c) Isolado virulento da amostra 28 Hip.

2.4. Determinação de Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV)

A determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) dos isolados com características virulentas obtidos em laboratório, foi efetuada de acordo com a resposta Barreira *versus* Fusão proposta por Anagnostakis (1988) e adaptada por Bissegger et al. (1997), Cortesi (1998) e Rigling (2000). Para tal, efetuaram-se pareamentos de todos os isolados portugueses purificados, com os isolados Europeus (“European Testers”) EU-1, EU-2, EU-11, EU-12 e EU-66. Utilizou-se meio PDA (Difco 39g L⁻¹) e cada placa foi dividida em cinco partes. Cada uma destas seções foi inoculada com conídeos da estirpe EU-1, e a uma distância de 5 mm em cada seção, inocularam-se conídeos de cinco isolados portugueses dos soutos em estudo. Repetiu-se o mesmo procedimento para as restantes estirpes europeias EU2, EU-11, EU-12 e EU-66 (Figura 2.3.4).

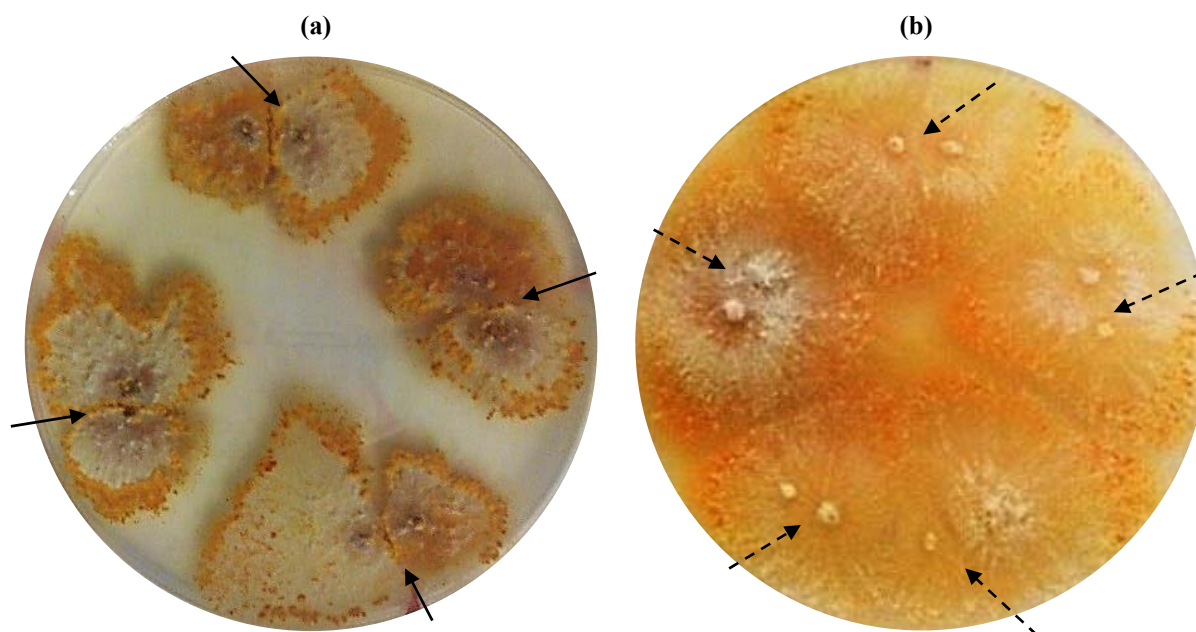


Figura 2.3.4- Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa (GCV): (a) Pareamento do isolado europeu EU-12 com isolados 12A Vir; 12B Vir; 12C Vir e 13A Vir do Souto de Cepões, todos os pareamentos são incompatíveis: →; (b) Pareamento do isolado europeu EU-11 com isolados A2 Vir; A2 Hip; A4 Hip e A13 Hip do Souto de Vila Verde, todos os pareamentos são compatíveis: ->

As estirpes hipovirulentas, caracterizadas por apresentarem um micélio branco após crescimento a 25°C e exposição à luz durante 8 dias ou mais, sem desenvolvimento de esporos, foram também classificadas quanto aos GCV. Para tal, retirou-se 2 mm de micélio desenvolvido em PDA e procedeu-se da forma anteriormente descrita para os isolados

virulentos. As placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias na ausência de luz, seguindo-se um período de exposição à luz do laboratório de 8 dias.

Quando o micélio das colónias das duas estirpes pareadas se fundem significa que são do mesmo grupo de compatibilidade (Fusão), ao contrário quando se verifica a existência de uma linha/barreira ou um de um espaço que impede o contacto entre as estirpes pareadas (Barreira), as estirpes não são compatíveis, pelo que não são do mesmo GCV (Figura 2.3.5).

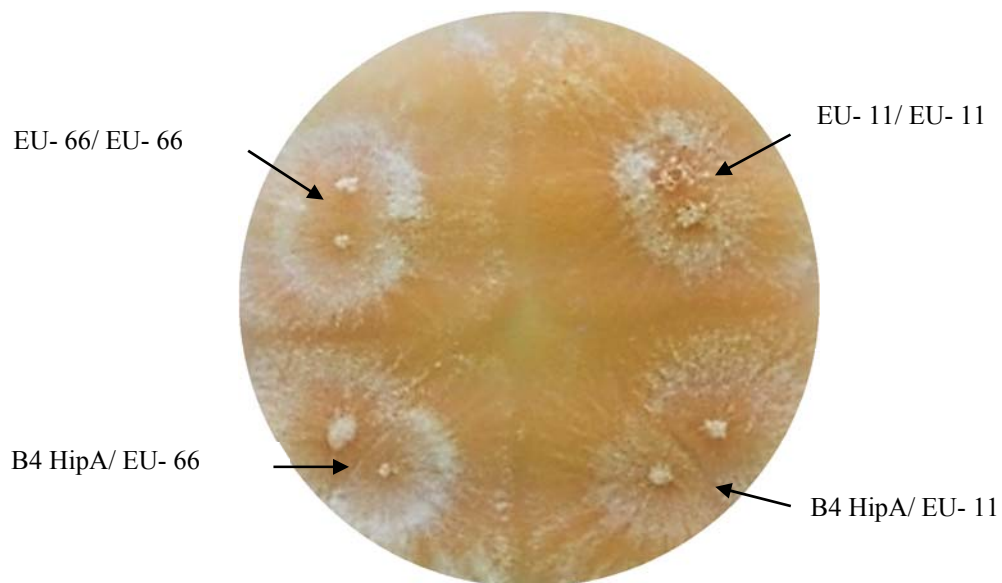


Figura 2.3.5- Pareamento dos isolados Europeus EU-11 e EU-66 com o isolado hipovirulento B4 HipA. Os pareamentos deste isolado com os isolados europeus são incompatíveis.

3 Resultados

3.1 Severidade da doença

3.1.1 Souto de Felgueiras

O souto de Felgueira é constituído por 110 castanheiros. Avaliou-se a incidência da doença no souto e as árvores foram classificadas quanto à severidade da doença provocada por *C. parasitica* com base na aplicação da escala de severidade de 1 a 5 (Figura 3.1.1).

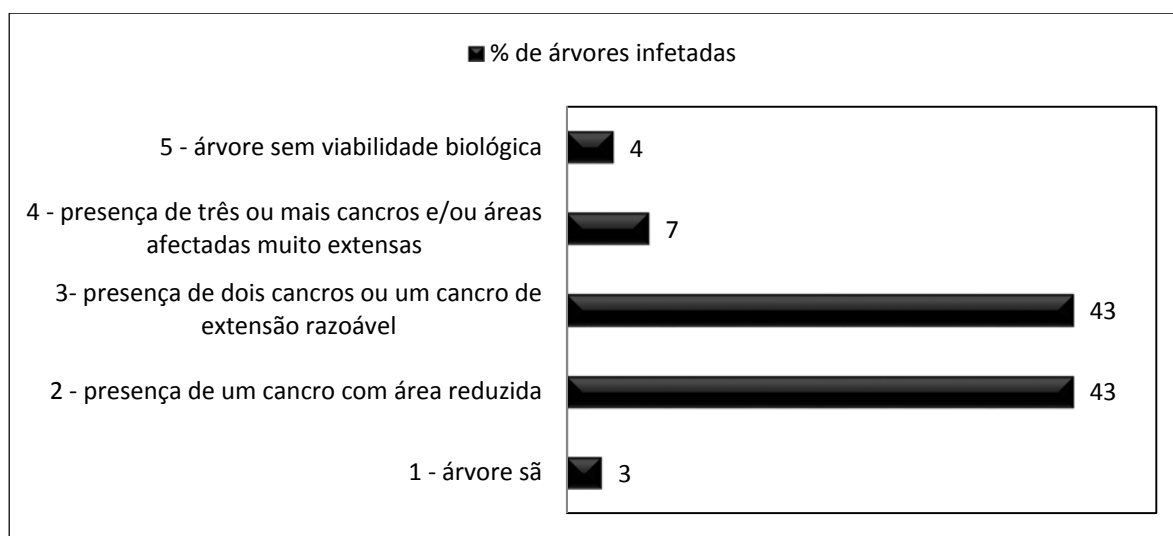


Figura 3.1.1- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Felgueiras. Percentagem de árvores para cada nível de infeção.

Considerando a totalidade das árvores deste souto, conclui-se que apenas 3% das árvores não apresentam sintomas do cancro do castanheiro, e na maioria dos castanheiros (86%) a doença manifesta-se com severidade de grau 2 ou 3. A percentagem das árvores que estão gravemente afetadas pelo cancro, em que se observou a presença de 3 ou mais cancros e/ou áreas afetadas muito extensas é de 7%. As árvores que perderam a sua viabilidade biológica devido à doença são de 4%.

Os resultados da análise da severidade da doença dos castanheiros do souto de Felgueiras de onde se recolheram amostras de material vegetal para o isolamento do fungo em laboratório, apresentam um grau severidade da doença variável entre 2 e 5 (Figura 3.1.2). Assim, dos 27 castanheiros analisados, 7,4% foram classificados com grau 2, 48,2%

classificados com grau 3, 37% classificados com grau 4 e 7,4% classificados com grau 5 (árvore sem viabilidade biológica).

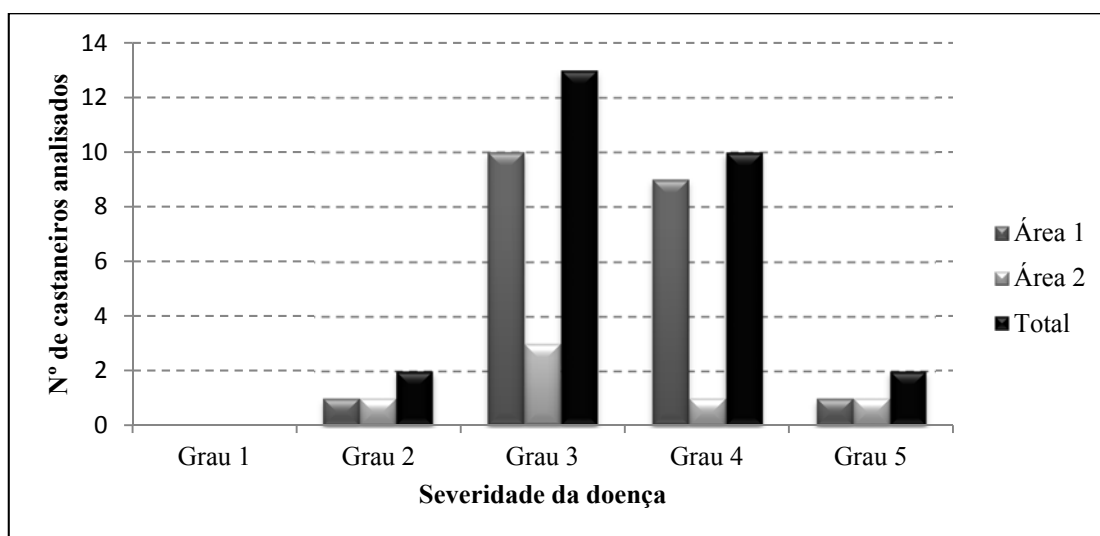


Figura 3.1.2- Incidência e severidade do cancro do castanheiro nas árvores onde se recolheram amostras de material vegetal para isolamento de *C. parasitica* – Souto de Felgueiras

As observações relativas à presença de picnídios apenas foram realizadas nas árvores em que se recolheram amostras de tecidos vegetais infetados com cancro do castanheiro. Os resultados mostram que as frutificações do fungo estão presentes em 10 árvores do total de árvores analisadas na área 1, não se tendo observado estas estruturas em nenhuma árvore analisada na área 2.

3.1.2 Souto de Vila Verde

No souto de Vila Verde existem 76 castanheiros. Avaliou-se a incidência da doença no souto e as árvores foram classificadas quanto à severidade da doença provocado pelo fungo *C. parasitica* com base na aplicação da escala de severidade de 1 a 5 (Figura 3.1.3).

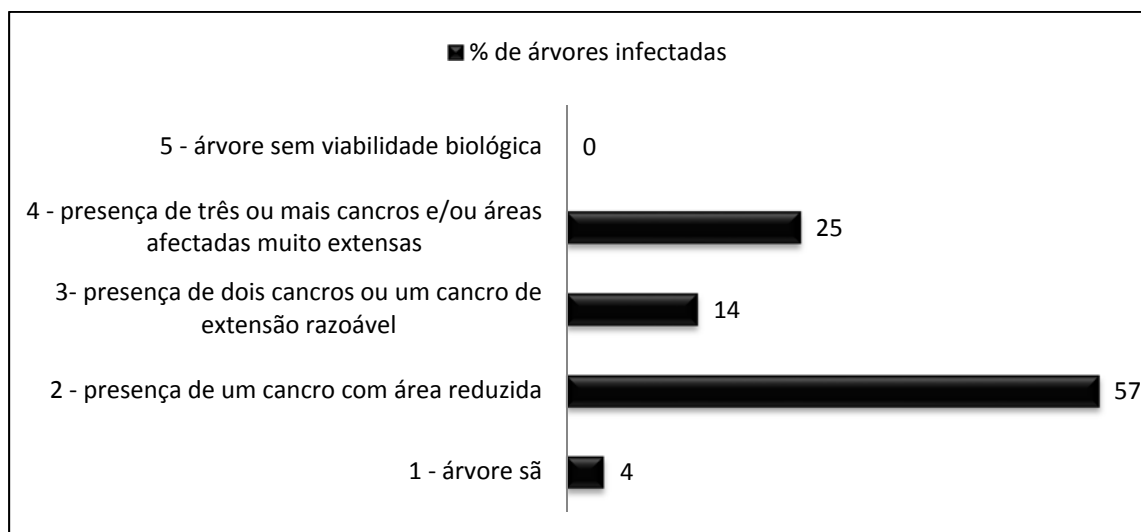


Figura 3.1.3- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Vila Verde. Percentagem de árvores para cada nível de infecção.

Neste souto apenas 4% das árvores estão sãs e não se verificou a existência de castanheiros sem viabilidade biológica, no entanto 25% dos castanheiros apresentam vários cancros e/ou cancros com áreas extensas. Estes castanheiros pertencem à área A do souto, parcela com castanheiros com mais de 30 anos. As árvores em questão não apresentam morte de ramos ou árvores, folhas secas na copa ou rebentação adventícia exuberante, mas nota-se a existência de cancros curados. Estas evidências aplicam-se a todos os castanheiros desta área, independentemente da severidade com que a doença se manifesta. Os castanheiros da área B do souto são muito jovens, em início de produção, e a quase totalidade destas árvores apresenta um cancro com área reduzida e cancros curados. Em alguns castanheiros já não se verificam os sinais e sintomas de cancro, verifica-se apenas a existência de cancros curados nos troncos ou ramos.

Os castanheiros deste souto de onde se recolheram amostras vegetais para proceder ao isolamento do fungo em laboratório apresentam um grau severidade da doença variável entre 2 e 4. Assim, dos 28 castanheiros analisados, 57,1% foram classificados com grau 2; 14,3% classificados com grau 3; 28,6% classificados com grau 4. Das árvores analisadas nenhuma árvore foi considerada sã (Figura 3.1.4).

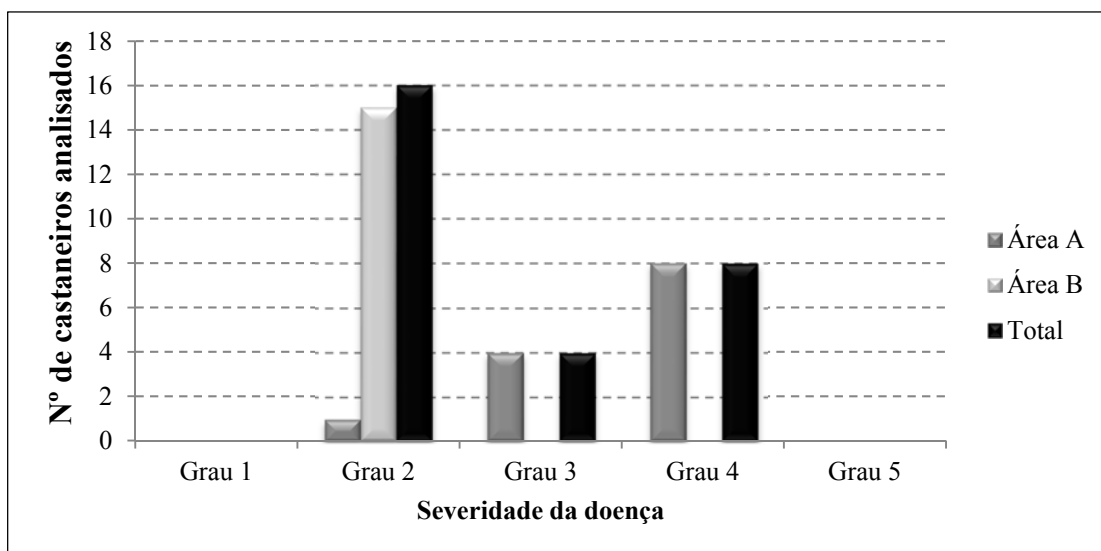


Figura 3.1.4 - Incidência e severidade do cancro do castanheiro nas árvores onde se recolheram amostras de material vegetal para isolamento de *C. parasitica* - Souto de Vila Verde.

Os resultados das observações relativas à presença de picnídios mostram que estes são pouco frequentes, estando apenas presentes em 4 árvores da área A e em 2 árvores da área B. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de a recolha de amostras vegetais ter sido realizada no verão, estação seca e pouco propensa à ocorrência de frutificações.

3.1.3 Souto de Cepões

Os castanheiros deste souto de onde se recolheram amostras vegetais para proceder ao isolamento do fungo em laboratório apresentam um grau de severidade da doença variável entre 2 e 4. Dos 35 castanheiros analisados, 26% foram classificados com grau 2; 23% com grau 3 e igual percentagem com grau 4. Das árvores analisadas, 10 foram consideradas sãs (29%) (Figura 3.1.5).

A maioria das árvores analisadas apresentavam fendilhamento da casca (88,6%), e a presença de picnídeos foi evidente em 22 árvores (63%). Neste souto observou-se igualmente a existência de cancos curados, com uma incidência de 31%.

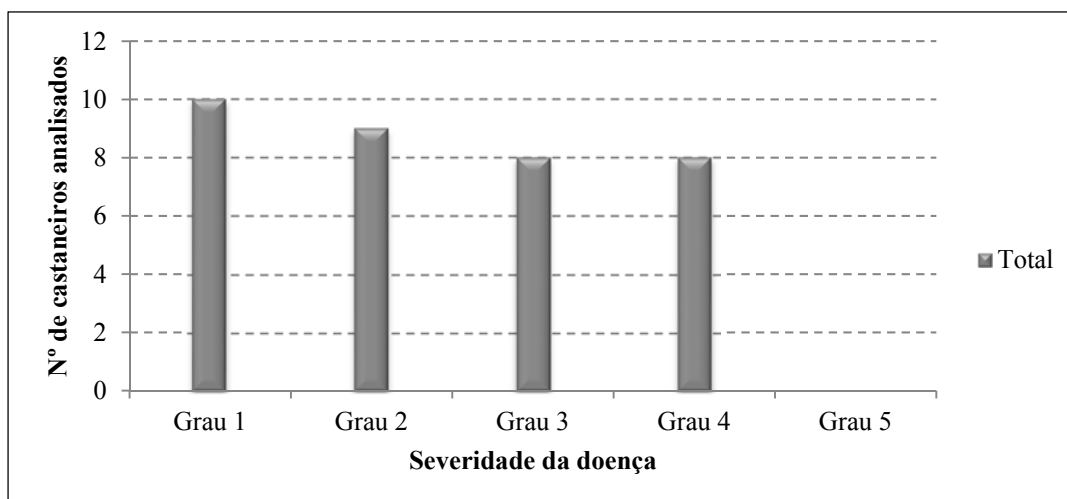


Figura 3.1.5- Incidência e severidade do cancro do castanheiro no souto de Cepões- Ponte de Lima. Percentagem de árvores para cada nível de infeção.

3.2 Isolamento, identificação e caracterização das estirpes de *C. parasitica*

Sete dias após incubação a 25 °C na ausência de luz, o crescimento de *C. parasitica* isolado de amostras de castanheiro era bem visível (Figura 3.2.1a). Após exposição à luz durante oito dias a amostras evidenciaram características virulentas (Figura 3.2.1b) e hipovirulentas (Figura 3.2.1c). No caso dos isolados obtidos de amostras virulentas foi possível observar a coloração alaranjada, característica, do micélio e a presença de esporos. Nos isolados hipovirulentos observou-se a continuação da coloração branca do micélio e a ausência de esporos.

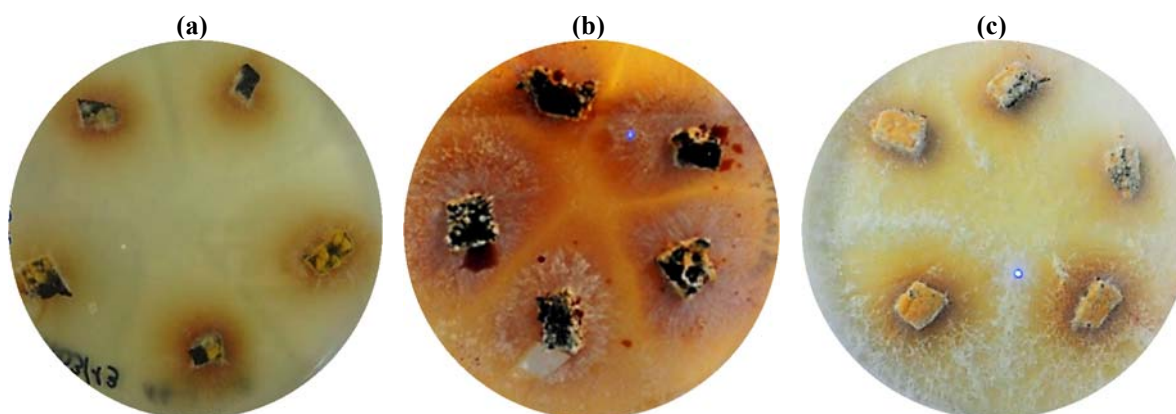


Figura 3.2.1- Crescimento de *C. parasitica*: (a) amostra 14 I Vir, sete dias após incubação a 25°C na ausência de luz. (b) amostra 9 II Vir, sete dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias, apresentando características virulentas. (C) amostra B15 Vir, sete dias após incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias, apresentando características hipovirulentas.

Após repicagem destas culturas, colocadas a incubar a 25°C na ausência de luz, seguindo-se oito dias de exposição à luz do laboratório, os isolados evidenciaram características virulentas e hipovirulentas. Nos isolados virulentos registou-se a formação de esporos, a coloração do micélio e a morfologia de dispersão das estruturas de reprodução (Figura 3.2.2a). Os isolados hipovirulentos apresentam micélio aéreo branco, menor esporulação e portanto, virulência reduzida (Grente y Berthelay- Sauret, 1978).

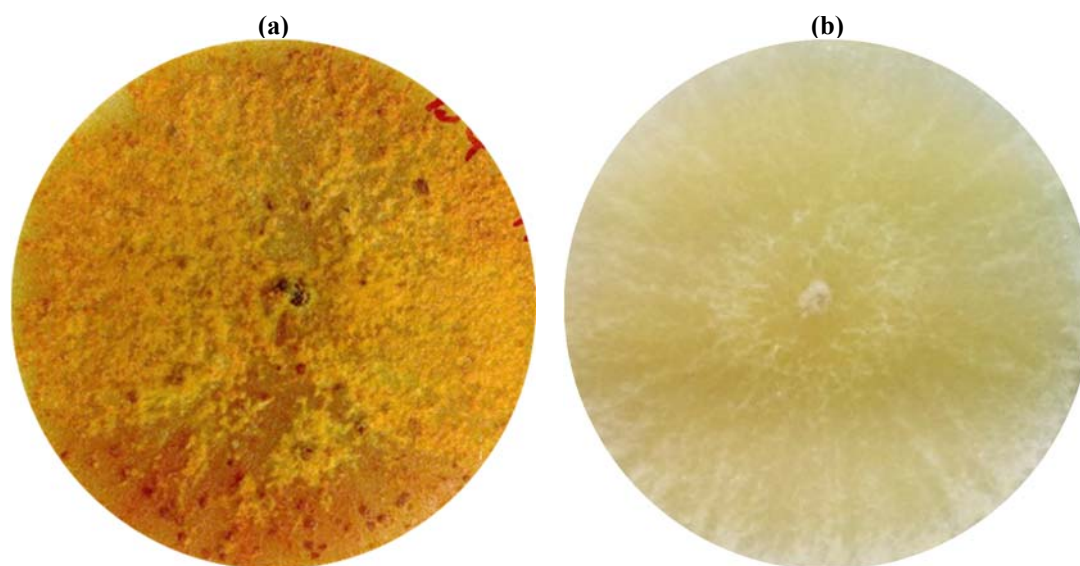


Figura 3.2.2- Crescimentos dos isolados sete dias após repicagem e incubação a 25°C, seguido da exposição à luz durante oito dias. (a) Isolado Virulento; (b) Isolado hipovirulento

Nos três soutos em estudo, Felgueiras, Vila Verde e Cepões, recolheram-se um total de 132 amostras vegetais de cancos ativos (virulentos) e de cancos curados (hipovirulentos). No souto de Felgueiras recolheram-se 34 amostras de tecido vegetal, divididas em 25 amostras recolhidas de cancos ativos (19 área I + 6 área II) e 9 amostras recolhidas de cancos curados (todas da área I). Os isolados purificados deste souto resultaram num total de 38 isolados viáveis divididos em 32 isolados virulentos (26 área I + 6 área II) e 6 isolados hipovirulentos (5 área I + 1 área II) (anexo 1).

No souto de Vila Verde recolheram-se 50 amostras de tecido vegetal, das quais 24 foram recolhidas de cancos ativos (13 área A + 11 área B) e 26 foram recolhidas de cancos curados (10 área A + 16 da área B). Purificaram-se no total 44 isolados, dos quais 26 isolados apresentam características virulentas (16 área A + 10 área B) e 18 isolados apresentam características hipovirulentas (7 área A + 11 área B) (anexo 2).

No souto de Cepões recolheram-se 48 amostras de tecido vegetal, das quais 31 foram retiradas de cancro ativos e 17 retiradas de cancro curados. Obtiveram-se 85 isolados purificados, mas todos desenvolveram características virulentas (anexo 3).

Nos soutos de Felgueiras e Vila Verde, das amostras vegetais recolhidas a partir de cancro ativos (vir) obtiveram-se, após isolamento em laboratório, culturas com características virulentas e hipovirulentas. Do mesmo modo, amostras vegetais recolhidas de cancro curados por hipovirulência natural, após isolamento em laboratório, originaram colónias características de isolados virulentos e hipovirulentos (Figura 3.2.3).

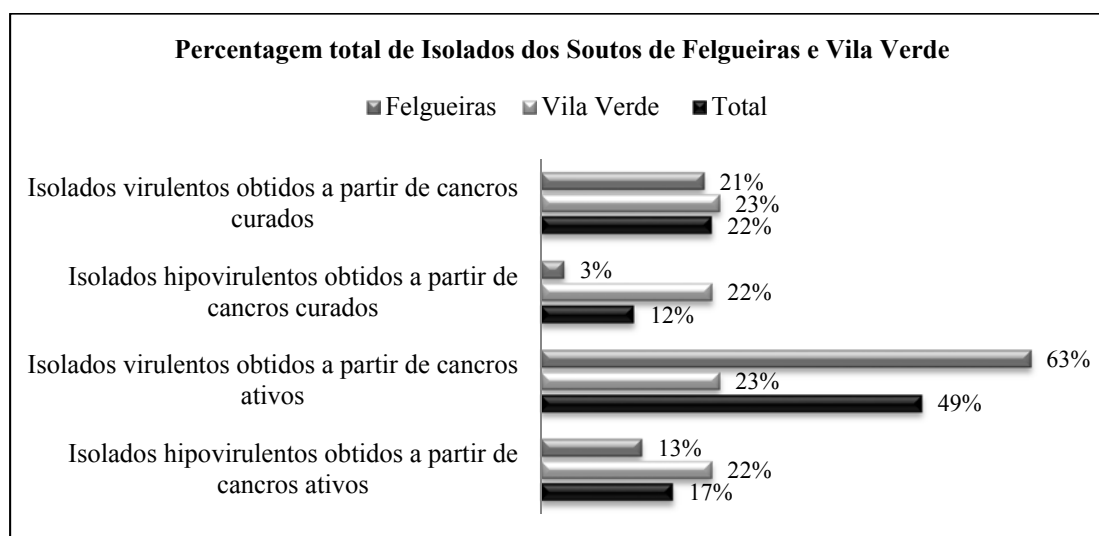


Figura 3.2.3- Percentagem de isolados virulentos e hipovirulentos obtidos a partir de amostras vegetais de cancro curados e cancro ativos dos Soutos de Felgueiras e Vila Verde.

Nestes soutos observou-se existirem muitos cancro curados, o que indica que os hipovírus se dispersam no interior desta população de castanheiros, razão que pode explicar a obtenção de isolados com características hipovirulentas quando as amostras vegetais foram recolhidas em cancro ativos (vir).

No souto de Cepões todos os isolados obtidos em laboratório, a partir das amostras vegetais recolhidas quer de cancro ativos (vir) quer de cancro curados, revelaram características virulentas. Apesar de se verificar a existência de inúmeros cancro curados, não se conseguiu, em laboratório, obter isolados com características hipovirulentas.

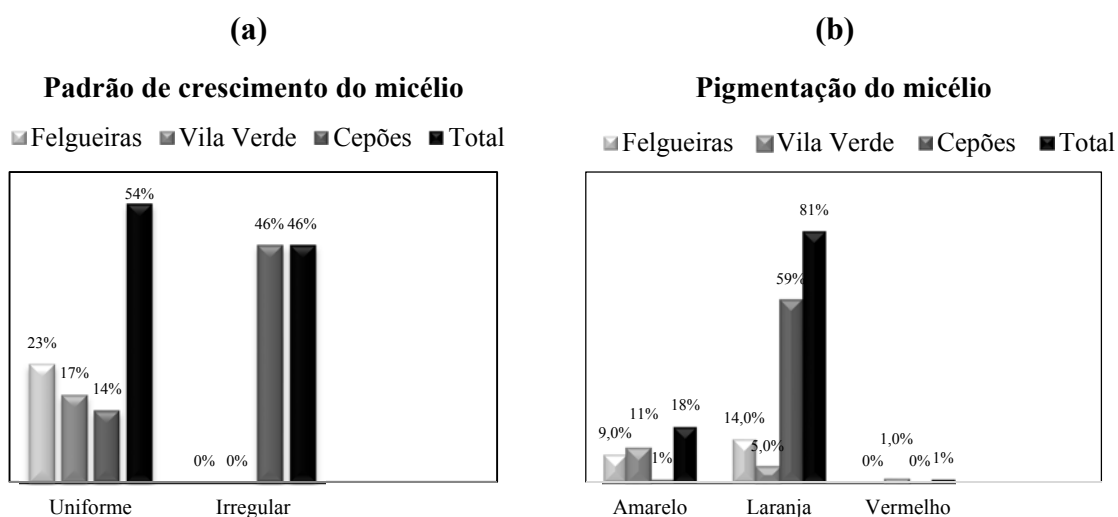
A percentagem de isolados virulentos obtidos a partir de amostras vegetais de cancro curados é 22% no total dos dois soutos (Felgueiras e Vila Verde). O mesmo não se pode afirmar quando se analisa a percentagem de isolados hipovirulentos obtidos a partir de amostras vegetais de cancro ativos, pois neste caso a percentagem de isolados é de 22%

no souto de Vila Verde e de apenas 13% no souto de Felgueiras. Aparentemente a dispersão natural do hipovirus dentro da população de castanheiros é superior no souto de Vila Verde, relativamente ao souto de Felgueiras.

É de salientar que oito isolados hipovirulentos foram obtidos a partir de repicagens de amostras vegetais recolhidas de cancos ativos em castanheiros com grau de severidade 3 ou 4 (presença de cancos muito agressivos), nomeadamente os castanheiros 5, 9, 11, 38, 44 e 9 do Souto de Felgueiras e os castanheiros 1, 2, 5, 6, 9 e 28 do souto de Vila Verde.

A análise da conjunta da caracterização morfológica dos isolados virulentos de *C. parasitica* dos três soutos em estudo permitiu, observar no total 141 isolados virulentos: 32 isolados virulentos de Felgueiras; 24 isolados virulentos de Vila Verde e 85 isolados virulentos de Cepões.

Verificou-se que após sete dias de crescimento a 25°C na ausência de luz, todos os isolados apresentaram uniformidade morfológica, com micélio aéreo com crescimento característicos de *C. parasitica*. Ao fim de oito dias de exposição à luz, todos os isolados que em laboratório revelaram micélio característico de estirpes virulentas de *C. parasitica* apresentavam presença de esporos. Nestes isolados virulentos, avaliaram-se as seguintes características morfológicas: padrão de crescimento do micélio, pigmentação do micélio, padrão de distribuição da massa de esporos no micélio e cor da massa de esporos. (Figura 3.2.4)



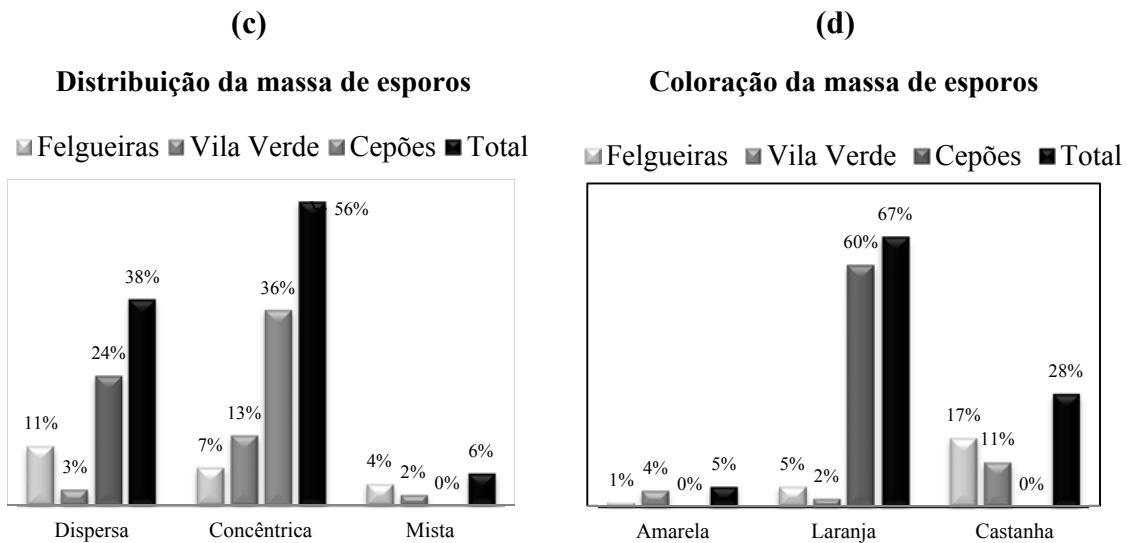


Figura 3.2.4- Classificação morfológica dos isolados virulentos obtidos nos três soutos em estudo: (a) Forma de crescimento do micélio de isolados de *C. parasitica* em meio PDA; (b) Pigmentação do micélio de *C. parasitica*; (c) Padrão de distribuição dos esporos no micélio de isolados de *C. parasitica*; (d) Coloração dos picnídeos de *C. parasitica*.

No que diz respeito ao padrão de crescimento do micélio de *C. parasitica* em meio PDA, verificou-se que apenas os isolados do souto de Cepões apresentaram crescimento irregular do micélio. Nos outros dois soutos em estudo (Felgueiras e Vila Verde) o crescimento do micélio dos isolados obtidos foi uniforme.

A coloração do micélio predominante nos isolados virulentos Soutos de Felgueira e Cepões é laranja, tendo neste último souto uma expressão muito significativa (81%). No souto de Vila Verde existe um predomínio da coloração amarela do micélio dos isolados. A coloração vermelha alaranjada do micélio dos isolados de *C. parasitica* apresenta valores residuais, 1% dos isolados.

A percentagem de esporos com distribuição dispersa no micélio de *C. parasitica* é mais representativa nos soutos de Vila Verde e Cepões (13% e 36%, respetivamente), enquanto no souto de Felgueiras, é mais representativa a distribuição concêntrica dos esporos no micélio (11%). A distribuição dos esporos no micélio considerada mista, apenas ocorre nos soutos de Felgueiras e Vila Verde.

A coloração laranja dos esporos está presente em todos os isolados do souto de Cepões. As colorações amarela e castanha dos esporos estão presentes nos isolados dos soutos de Felgueiras e Vila Verde, predominando a coloração castanha nos dois soutos.

Na Figura 3.2.5 estão representados alguns exemplos de isolados virulentos que exemplificam a caracterização morfológica dos isolados virulentos obtidos nos três souts em estudo.

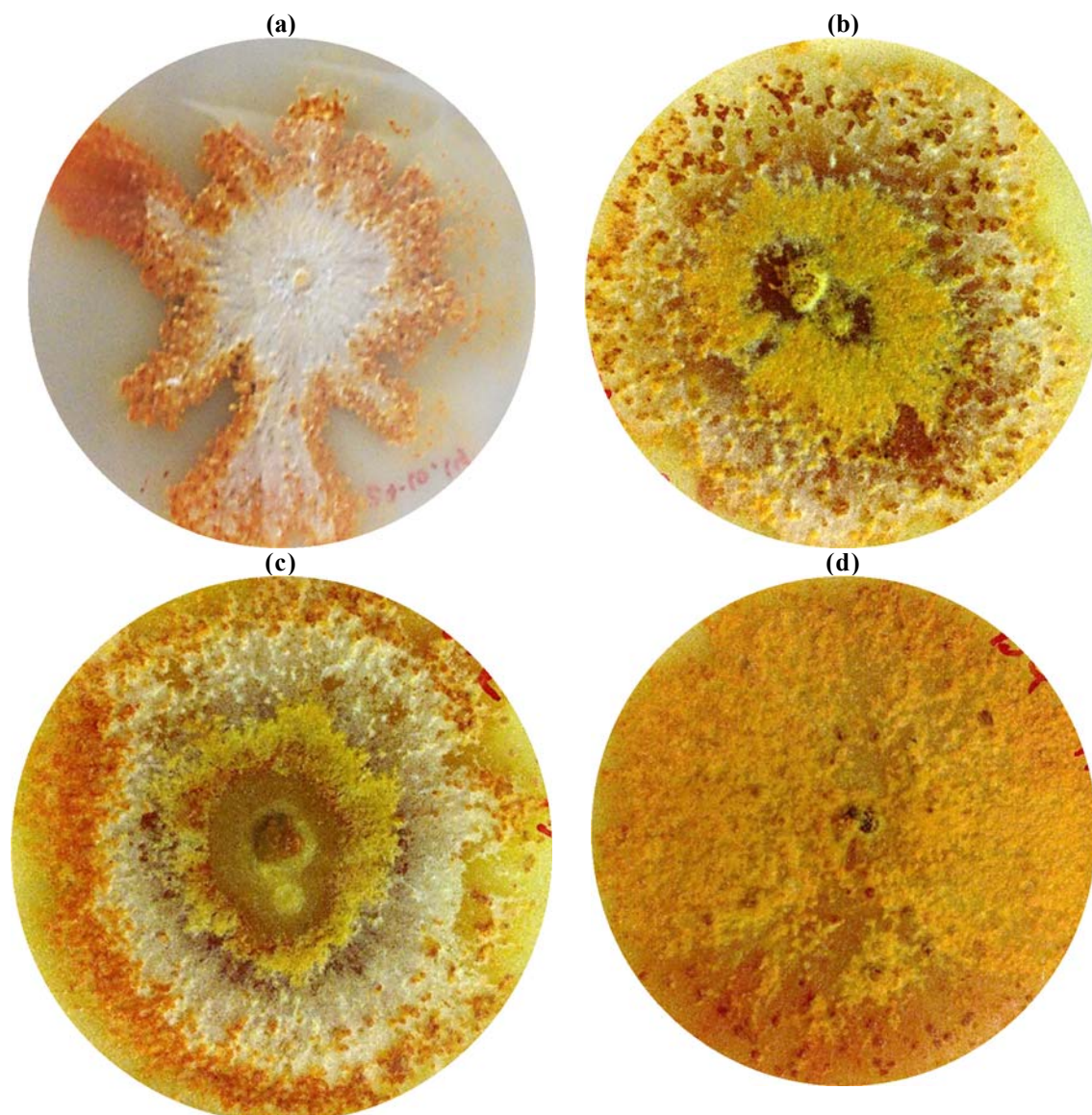


Figura 3.2.5- (a) Isolado virulento 34 Vir - micélio com crescimento laranja irregular com esporos cor de laranja distribuídos de forma concêntrica no micélio de *C. parasitica*; (b) Isolado virulento A8 Vir - micélio amarelo uniforme com esporos castanhos distribuídos de forma dispersa no micélio de *C. parasitica*; (c) Isolado virulento B16 Vir - micélio com crescimento laranja uniforme com esporos cor de laranja distribuídos de forma mista (concêntrica/dispersa) no micélio de *C. parasitica*; (d) Isolado virulento B4 Hip- micélio laranja uniforme com esporos cor de laranja distribuídos de forma dispersa no micélio de *C. parasitica*.

3.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (GCV)

Os resultados da determinação dos grupos de compatibilidade (GVC) entre os isolados Europeus EU-1, EU-2, EU-11, EU-12, EU-66 e os isolados obtidos nos soutos de Felgueiras, Vila Verde e Cepões figuram no anexo 7. Apenas um isolado não pertence a nenhum GCV estudado, o A2 HipA obtido no souto de Vila Verde. Os isolados hipovirulentos pertencem aos mesmos GCV dos isolados virulentos correspondentes, ou seja, em todos dos casos em que a partir da mesma amostra vegetal se obteve um isolado virulento e outro isolado hipovirulento, ambos pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa. Exemplificando, da amostra 16 recolhida de um cancro ativo num castanheiro da área B do souto de Vila verde (B16 Vir), obtivemos dois isolados, um isolado virulento e outro isolado hipovirulento, ambos pertencem ao GCV EU-12. O mesmo caso verifica-se nos isolados: 3I Vir, 5I Vir, 38I Vir, 9II Vir, A2 Vir, A2 Hip, A4 Hip, A5 Vir, A6 Vir, A7 Vir, A13 Hip, B4 HipB, B7 Vir, B7 Hip, B 14 Vir, B14 Hip, e B15 Vir.

No souto de Felgueiras 84,2% dos isolados pertencem ao GCV EU-11; 13,2% ao GCV EU-2 e 2,6% enquadra-se no GCV EU-1 (Figura 3.3.1).

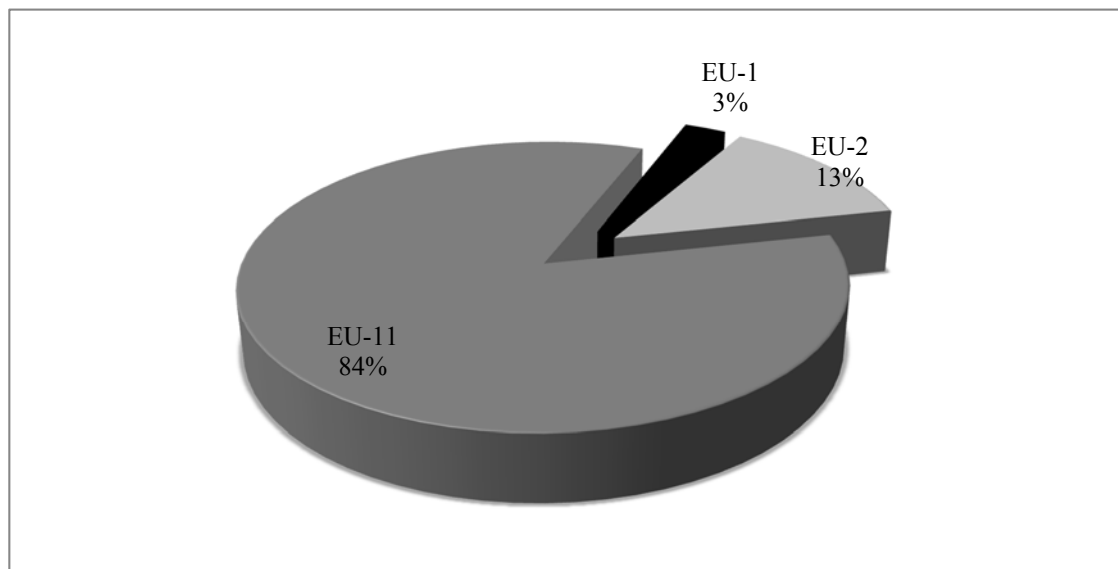


Figura 3.3.1- Percentagem de isolados de *C. parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Felgueiras.

O souto de Vila Verde apresenta uma maior diversidade de GCV. Assim, os isolados deste souto pertencem a seis GCV: EU-1, EU-2, EU-11, EU-12, EU-66 existindo ainda o isolado A2 HipA que não pertence a nenhum dos GCV estudados. Neste souto 43,5% dos isolados pertencem ao GCV EU-11, 30,4% dos isolados pertencem ao GCV EU-2, 13% dos isolados pertencem ao GCV EU-12, 8,7% dos isolados pertencem ao GCV EU-66 e 2,2% dos isolados pertencem ao GCV EU-1. Os isolados que não ficaram agrupados em nenhum destes grupos representam 2,2% dos isolados deste souto (figura 3.3.2).

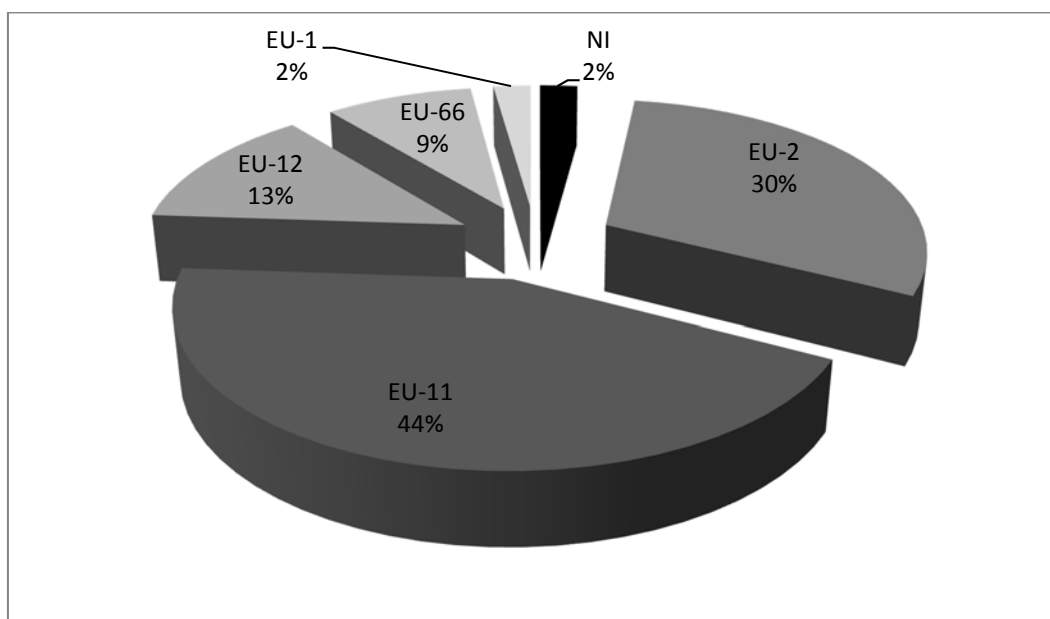


Figura 3.3.2- Percentagem de isolados de *C. parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Vila Verde. *NI- GCV não identificado.

Os resultados obtidos neste souto mostram que o GCV EU-11 apenas representa 43,5% dos isolados, valor que está muito afastado da média de 80%, referida em 2007 para os soutos portugueses analisados por Bragança (2007). De forma a compreender a diversidade de grupos de compatibilidade vegetativa existentes no souto de Vila Verde, analisou-se cada área do souto em separado. A Figura 3.3.3 apresenta os resultados dos GCV dos isolados da área A e da área B.

A análise dos resultados apresentados na figura 3.3.3 mostra a variabilidade dos GCV nestas duas áreas deste souto, que apresentam características muito distintas. Assim, na área A os isolados de *C. parasitica* pertencem a cinco GCV (EU-1, EU-2, EU-11, EU-66 e a um grupo não identificado). O GCV EU-11 é o mais representativo (50% dos isolados)

seguido do grupo EU-2 com 25% dos isolados. O GCV EU-66 representa 16,6% dos isolados. O GCV EU-1 e o GCV não identificado, representam cada um, 4,2% dos isolados obtidos neste souto.

A área B deste souto está apenas representada pelos GCV EU-2, EU-11, e EU-12. Os GCV EU-12 e EU-2 apresentam igual número de isolados, com uma percentagem de 30%. O grupo EU-11 é o mais representado com 40% dos isolados.

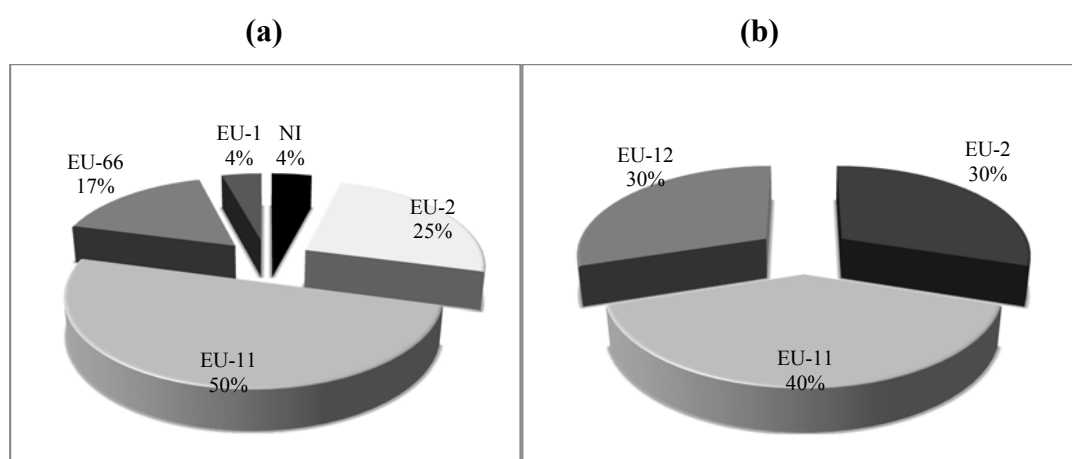


Figura 3.3.3- Grupos de compatibilidade vegetativa presentes nas duas áreas do Souto de Vila Verde: (a) GCV presentes na Área A do souto de Vila Verde e respetiva representatividade; (b) GCV presentes na Área B do souto de Vila Verde e respetiva representatividade.

O souto de Cepões apresenta uma grande variabilidade de GCV. Os isolados deste souto pertencem a cinco GCV: EU-1, EU-2, EU-11, EU-12, EU-66. Neste souto, 60% dos isolados pertencem ao GCV EU-11, 16,5% dos pertencem ao GCV EU-2, 9,4%, ao EU-12, 8,2 % ao GCV EU-1 e 5,9% ao EU-66 (figura 3.3.4).

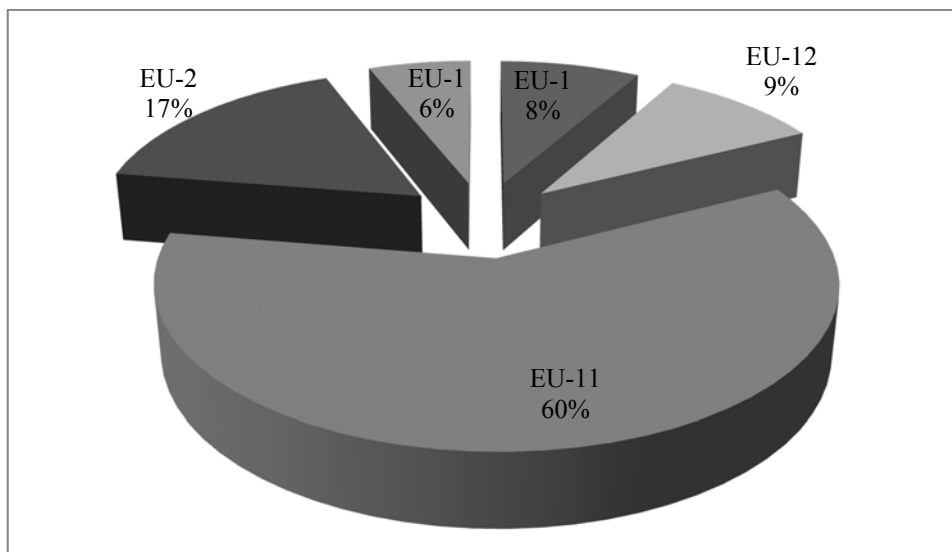


Figura 3.3.4- Percentagem de isolados de *C. parasitica* em cada grupo de compatibilidade vegetativa no souto de Vila Verde.

4 Discussão e Conclusão

4.1 Recolha de material vegetal

Estudou-se a população de *C. parasitica*, começando pela recolha de amostras vegetais de castanheiros de três soutos da Região de Entre Douro e Minho, localizados nos concelhos de Felgueiras, Vila Verde e Ponte de Lima. O estudo da incidência e severidade do cancro do castanheiro foi realizado nos três soutos. Dos 221 castanheiros analisados nos três soutos, vinte e um não apresentavam sintomas de cancro e quatro não possuíam viabilidade biológica. Estes soutos apresentavam uma elevada incidência de cancro do castanheiro, mas também se observou a existência de muitos cancos curados. Estes resultados são concordantes com os obtidos por outros autores (Prospero et al., 2006) que referem que soutos com hipovirulência generalizada são caracterizados pela elevada incidência da doença, com baixo grau de gravidade ficando os castanheiros com um ou mais cancos curados e superficiais, devido à baixa esporulação do fungo.

No souto de Vila Verde não se verificou a existência de ramos mortos e de folhas amarelcidas. Segundo o produtor, este souto não manifesta quebras de produção. A área A do souto de Vila Verde apresenta uma enorme incidência de cancos mais ou menos extensos, nas árvores mais velhas do souto; na área B (constituída por árvores muito jovens, em início de produção), quase todos os castanheiros apresentam pequenos cancos virulentos e cancos potencialmente curados. A proximidade de castanheiros infetados pode ter disseminado a doença através de dispersão natural das estruturas sexuadas (peritecas) ou assexuadas (picnídeos) de *C. parasitica*, por ação do vento ou insetos, uma vez que a doença se apresenta amplamente presente nas populações de castanheiros, justificando desta forma a infeção das árvores mais jovens da área B. A existência de cortes provocados pela enxertia ou pela passagem de alfaias agrícolas nas árvores da área B, poderá ter também contribuído para a infeção dos castanheiros jovens, facilitando a dispersão da doença nesta área. Contudo, pela análise dos GCV dos isolados obtidos nas duas áreas, verificamos que existe um GCV na área B que não se encontrou na área A (EU-12), e um GCV que existe na área A que não se encontrou na área B (EU-66). A contaminação vertical não consegue explicar a ocorrência de todos os cancos, pelo que somos levados a supor que a compra de porta-enxertos e de varas para enxertia

contaminados poderão ajudar a explicar as diferenças encontradas nas duas áreas do Souto de Vila Verde. Bragança et al. (2005a) também constataram existirem plantações muito jovens com vários casos de doença onde praticamente não haviam condições para a contaminação local, o que indicou existirem fortes indícios de serem casos em que os castanheiros já vinham contaminados do viveiro.

A presença de picnídeos nos castanheiros do souto de Vila Verde foi baixa, muito provavelmente porque a visita ao pomar para recolha de material vegetal ocorreu no verão, estação seca e pouco propensa à formação de estruturas de reprodução. Por oposição, no souto de Cepões encontrou-se uma elevada presença de picnídeos muito provavelmente porque a recolha de material vegetal ocorreu no outono, época favorável à formação destas estruturas de reprodução. Não se encontrou em nenhum dos soutos presença de peritecas. As duas estruturas de reprodução desempenham funções opostas no controlo natural do cancro do castanheiro. Enquanto os picnídeos desempenham um papel fundamental na disseminação dos hipovírus, as peritecas por seu lado contribuem para a disseminação da forma virulenta de *C. parasitica* e fomentam o aumento dos GCV pela recombinação genética (Prospero et al., 2006).

4.2 Isolamento, identificação e caracterização das estirpes de *C. parasitica*

A análise morfológica realizada segundo a metodologia de Bissegger et al. (1997) permitiu separar os isolados que apresentavam características virulentas, dos isolados que apresentavam características hipovirulentas. Verificou-se que, dos isolados obtidos a partir de amostras de cancros curados, 36 isolados não apresentaram micélio com características hipovirulentas, apresentando pelo contrário características morfológicas de estirpes virulentas de *C. parasitica*. Resultados semelhantes foram também obtidos nos estudos realizados por Bryner et al. (2014), que também isolaram estirpes virulentas a partir de amostras de cancros curados.

Em alguns isolamentos realizados em laboratório, partindo de uma mesma amostra de material vegetal recolhidas tanto em cancros ativos como em cancros curados, conseguiu-se obter isolados com características morfológicas virulentas e hipovirulentas. Estes resultados são idênticos aos descritos por Bissegger et al. (1997) que nos seus estudos também obtiveram ambos os isolados (virulentos e hipovirulentos) em cancros ativos de *C.*

parasitica. Estes resultados poderão ser explicados pela dispersão natural do hipovírus nas populações de castanheiros, o que indica que os isolados virulentos obtidos de cancos ativos estavam infetados pelo hipovírus. O estudo realizado por Bryner et al. (2014) demonstrou que a propagação do vírus ocorre efetivamente em florestas de castanheiros europeus e que este sistema de controlo biológico é muito dinâmico. Estudos recentes realizados por Ibáñez et al. (2014) no mesmo souto em Felgueiras, mostram que no período de 1 ano existiu remissão natural de muitos cancos levando à recuperação dos castanheiros doentes.

O número de isolados hipovirulentos obtido no Souto de Vila Verde é muito superior ao obtido no souto de Felgueiras, uma justificação para este facto pode dever-se à capacidade de resiliência das árvores do souto de Vila Verde. Este souto está certificado no modo de produção biológico, e as técnicas culturais inerentes a este modo de produção, como a utilização de práticas que favorecem a presença de mecanismos de antagonismo natural, e a preservação de um sistema de solo vivo, são facilitadores dos meios de luta biológica natural, fornecendo deste modo maiores oportunidades de resistência à doença.

Relativamente à caracterização dos isolados virulentos, os três soutos apresentam variabilidade nas características analisadas. No souto de Felgueiras há predominância de isolados com micélio de cor laranja, distribuição concêntrica dos esporos com cor castanha, apresentado todos os isolados um padrão crescimento uniforme do micélio. No souto de Vila Verde há predominância de isolados com micélio de cor amarela, distribuição concêntrica dos esporos com cor castanha e padrão crescimento uniforme do micélio. No souto Cepões os isolados apresentam predominantemente micélio de cor laranja com crescimento irregular e esporos cor de laranja distribuídos de forma concêntrica.

4.3 Grupos de compatibilidade vegetativa (GCV)

No souto de Felgueiras 84 % dos isolados obtidos pertence ao GCV EU-11, facto pouco comum no resto da Europa e muito comum em Portugal. Os estudos realizados por outros autores (Gouveia, 2001; Bragança (2007) têm tido resultados coincidentes no que diz respeito à superior representatividade do GCV EU-11. Neste souto, para além da baixa variabilidade de GCV, os isolados hipovirulentos obtidos pertencem ao mesmo GCV (EU-

11) que os isolados virulentos da população de *C. parasitica*, o que terá favorecido a generalização da hipovirulência natural, facilitando a recuperação das árvores infetadas e doentes.

No souto de Vila Verde, a variabilidade dos GCV dos isolados hipovirulentos é superior à registada em Felgueiras, tendo-se identificado isolados pertencentes a quatro GCV, EU-2, EU-11, EU-12 e EU-66. Esta variabilidade de estirpes hipovirulentas pertencentes a vários GCV, está de acordo com a variabilidade dos GCV dos isolados virulentos, o que pode justificar o elevado número de cancro curados encontrados nos castanheiros deste souto.

Nos resultados do Souto de Vila Verde existe grande variabilidade de GCV, tendo-se identificado seis grupos de compatibilidade vegetativa EU-1, EU-2, EU-11, EU-12, EU-66 e ainda um grupo não identificado. O GCV mais representado é o EU-11 (44%), seguido do GCV EU-2 com 30% dos isolados. Quando analisamos as áreas deste souto em separado verificamos que é a área A, com castanheiros mais velhos, a que apresenta mais variabilidade de GCV, cinco no total, com prevalência para os GCV EU-11, EU-2 e EU-66. Nesta área encontraram-se isolados hipovirulentos pertencentes aos GCV EU-2, EU-11 e EU-66, que correspondem aos GCV mais representativos dos isolados virulentos. Na área B, com castanheiros jovens, existem apenas três GCV EU-2, EU-11 e EU-12, e os isolados hipovirulentos pertencem aos GCV EU-2, EU-11 e EU-12, os mesmos a que pertencem os isolados virulentos. Estes resultados nas duas áreas vão ao encontro das observações feitas nos castanheiros no campo, em que quase todos os castanheiros do souto apresentavam cancro curados e existia hipovirulência natural generalizada.

O souto de Cepões é composto por castanheiros de origem nacional e castanheiros importados de França. Verifica-se que existe elevada variabilidade de GCV, ao todo quatro grupos EU-2, EU-11, EU-12, EU-66. O grupo predominante é claramente o EU-11 (60%), seguido do EU-12 (17%), valores semelhantes aos encontrados nos soutos nacionais (Bragança, 2005a; Gouveia et al., 2001, 2010). A importação de porta-enxertos e varas para enxertos, franceses, pode ter influenciado a maior variabilidade de GCV encontrada neste souto, mas a disseminação do cancro do castanheiro pelo souto parece ter partido dos porta-enxertos nacionais, pois o GCV EU-11 é pouco comum no resto da Europa e muito comum em Portugal (Bragança, 2007; Gouveia et al., 2010).

Neste souto não se conseguiu isolar estirpes hipovirulentas, mas verificou-se que existem muitos castanheiros com cancro curados, pelo que se conclui que a hipovirulência natural também está presente neste souto.

Os resultados deste trabalho, realizado em soutos do Entre Douro e Minho mostram que a diversidade de grupos de compatibilidade vegetativa está a aumentar. Estudos realizados por Leal et al. (2014) demonstraram que em dez anos, na freguesia de Parada, passou-se de um GCV, o EU-11, para quatro GCV, o que demonstra uma alteração importante na estrutura da população de *Cryphonectria parasitica*. A hipovirulência como meio de luta preferencial contra o cancro do castanheiro, não está comprometida pois no estudo realizado nos três soutos do Entre Douro e Minho também se encontrou variabilidade de GCV em isolados hipovirulentos. A variabilidade de GCV de estirpes virulentas e hipovirulentas são similares nestes soutos. Este método de luta biológica de elevada seletividade, sem efeitos adversos para a saúde humana, vida selvagem e ambiente, deve ser complementada com a inclusão nas explorações das mediadas preventivas descritas no Serviço Nacional de Avisos Agrícolas (SNAA).

De acordo com Bissegger et al. (1997) o sucesso da hipovirulência natural observada na Europa depende da capacidade dos hipovírus para infetar grandes porções da população de fungos, presumivelmente como resultado da transmissão frequente do vírus dentro e entre as populações dos GCV presentes num determinado povoamento. A baixa variabilidade dos GCV é fundamental para o sucesso da hipovirulência natural ou introduzida por meio de luta biológica (Prospero et al, 2006), sabendo-se que os grupos de compatibilidade vegetativa restringem a transmissão dos vírus (Milgroom, 2004, Bryner, 2012). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a luta biológica contra o cancro do castanheiro em Portugal, inoculando as áreas doentes dos castanheiros infetados com as estirpes hipovirulentas adequadas, ou seja, do mesmo GCV da população virulenta, é promissora. A eficácia deste meio de luta biológico, em castanheiro, depende da capacidade de transmissão dos hipovírus e dos mecanismos biológicos que a determinam, nomeadamente os relacionados com a capacidade de replicação e agressividade do vírus, o seu efeito no hospedeiro e a sua capacidade de conversão e transmissão, das condições ambientais em cada região concreta, e ainda das características da população de *C. sativa*,

pelo que novos estudos são necessários para compreensão destas interações e aplicação da luta biológica com sucesso.

5 Referências Bibliográficas

- Abreu, C. (1992). Castanheiros: Uma saudade no futuro? *Finisterra* 27 (53-54): pp. 3–16.
- Aguín, O., Montenegro, D., Sainz, M. J., Hermida, M., & Mansilla, J. P. (2008). Caracterización morfológica y molecular de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en castaños de Galicia, 581–594.
- Aguín, O., Sainz, M. J., Montenegro, D., & Mansilla, P. (2011). Biodiversidad e hipovirulencia de *Cryphonectria parasitica* en Europa: implicaciones para el control biológico del cancro del castaño. *Recursos Rurais*, (7), 35–47.
- Alleman, C., Hoegger, P., Heiniger, U., Rigling, D. (1999). Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8(5): 843-854.
- Anagnostakis S. (1988). *Cryphonectria parasitica*: cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology* 6: 123-136.
- Bazzigher, G.; Lawrence, S. L.; e Ritter, F. (1982). “Vernebrung and Anfrucht der Kastanie”. *Beriche* N°. 240, pp. 5-35. Edigenosschi Anstalt fur das Forstliche Verouchwese. Birmensdorf.
- Barr M. (1978). The diportales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. *Mycol. Mem. N° 7 Lehre Germany*: J. Cramer Publisher.
- Bissegger, M., Rigling, D., & Heiniger, U. (1997). Population Structure and Disease Development of *Cryphonectria parasitica* in European Chestnut Forests in the Presence of Natural Hypovirulence. *Ecology and Epidemiology*, 87(1), 50–59.
- Borges, O., Carvalho, J. L. , Silva, A. P. , Costa, R. , & Costa, H. . (2007). Avaliação e Caracterização de Variedades de Castanheiro na Área da DRAP Norte (DRAPN.). *Mirandela*. doi:269667/08
- Bragança H., Simões, S., Santos, N., Marcelino, J., Tenreiro, R. & Rigling, D. (2005a). Chestnut blight in Portugal - Monitoring and vc types of *Cryphonectria parasitica*. *Acta Horticulturae* 693: 627-634.
- Bragança, H., Simões, S., & Onofre, N. (2005b). “Cancro do castanheiro”- dispersão da doença em Pontugal. Caso-estudo para determinação de factores de dispersão, *Acta Horticulturae* 693: 627-634.
- Bragança, H. (2007). Chestnut blight in Portugal: spread and populational structure of *Cryphonectria parasitica*. Tese Doutoramento, 153 pp, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Bragança, H., Simões, S., & Capelo, M. (2008). Prospeção e distribuição geográfica do cancro do castanheiro em Portugal. *Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.*, 148 - 158.
- Breullin F., C. Deutch, C. Robin (2006). Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research* 110:288-296.

- Bryner, S.F., Rigling, D. (2012). Hypovirus Virulence and Vegetative Incompatibility in Populations of the Chestnut Blight Fungus. *Population Biology. Phytopathology* 102 (12) . 1161-1167.
- Bryner, S.F., Prospero, S., Rigling, D.(2014). Dynamics of *Cryphonectria* hypovirus infection in chestnut blight cankers. *Phytopathology*, 104, 918-25.
- Carvalho, M., Gouveia, M. E., & Monteiro, L. (2000). O “Cancro do Castanheiro” no Nordeste Transmontano Medidas para Travar o seu Desenvolvimento. *Silva Lusitana* Vol. 8 no2, 8, 239–244.
- Cortesi P., M. Milgroom, M. Bisiach (1996). Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycological Research* 100: 1087-93.
- Cortesi P., M. Milgroom (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2988-2994.
- Cortizo, E., Madriñán, M. L., & Madriñán, F. (1999). O castiñeiro : Biología e Patología. (C. da C. Galega, Ed.) (p. 282). Santiago de Compostela: 1087-2000.
- Costa, R. L., Bragança, H., Machado, H. (2011). Os últimos 75 anos de investigação para o melhoramento do castanheiro em Portugal. *Agrorural: Contributos Científicos*. 907–918.
- DRATM (2011). Cancro do castanheiro. Projecto AGRO No 219. Divisão de controlo fitossanitário. Folheto 2pp.
- Elliston, J. E. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to Hypovirulence. *Phytopathology*, 75(2): 151-158.
- Fernandes, C.T., 1949. Doenças do castanheiro. A *Endothia parasitica* (Murr.). Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, 8 pp.
- Gomes-Laranjo, J. et A. (2007). Na rota da castanha em Trás-os-Montes. J. Gomes-Laranjo, J. Ferreira-Cardoso, & F. Peixoto, Eds. Programa Agro - 943 p. 128. Vila Real.
- Gouveia, Eugénia; Cardoso, Patrícia; Monteiro, Maria do Loreto (2001). Incidence of chestnut blight and diversity of vegetative compatible types of *Cryphonectria parasitica* in Trás-os-Montes (Portugal). *Forest Snow and Landscape Research*. 76:3, p. 387-390.
- Gouveia, Eugénia; Coelho, Valentim; Portela, Ester (2003) - Cancro do castanheiro: a luta cultural na redução do inóculo e manutenção sustentada dos soutos. In 6º Encontro Nacional de Protecção Integrada. Castelo Branco. p. 230-236.
- Gouveia, E., Coelho, V., Azevedo, J., (2005). Epidemiologia do cancro do castanheiro da distribuição espacial de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. 5º Congresso Florestal Nacional. Viseu. 12 pp.
- Gouveia, E. (2008). Limitação Natural em Fitopatologia. In Atas do 1º Congresso Nacional de Produção Integrada, VIII Encontro Nacional de Protecção Integrada. Escola Superior Agrária Ponte de Lima: pp. 43–53

- Gouveia, E., Coelho, V., Monteiro, L., 2010. Potential of local hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* for biological control of Chestnut Blight. *Acta Horticulturae*, *Acta Horticulturae*, 866:443-448.
- Gouveia, M. E., (2013). Cancro do Castanheiro- Implementação de uma Estratégia de Luta Biológica. 7º Congresso Florestal Nacional- Resumos. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. Vila Real e Bragança. Minerva Transmontana, Tipografia, Lda. ISBN: 978-972-99656-3-0. Dep. Leg. 359255/ 13
- Grente, J., Berthelay-Sauret, S. (1978). Biological control of chestnut blight in France. *Proc. Am. Chestnut Symp.* 4-5:30-34.
- Gryzenhout, M., Myburg, H., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2006). *Cryphonectriaceae (Diaporthales)*, a new family including *Cryphonectria*, *Chrysosporthe*, *Endothia* and allied genera. *The Mycological Society of America*, *Lawrence*, 98 (2), 239–249.
- Ibáñez, I., Moura, L., Castro, J. P., Gouveia, E. (2014). Hipovirulência natural em *Cryphonectria parasitica*. Um caso de estudo, Sergude – Minho – Portugal. 1º Simpósio SCAP/ Livro de Resumos do 7º Congresso da SPF. Novos desafios na proteção das Plantas. Oeiras. p. 85.
- INE. (2013). Estatísticas Agrícolas 2013. (I. N. de Estatística, Ed.) (Edição 201., p. 168). Lisboa. doi:0079-4139.
- Juhásová G., Bernadovičová S. (2001). *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr and *Phytophthora* spp. in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Slovakia. *For. Snow Landsc. Res.* 76 (3): 373–377.
- Kirk P., Cannon, P.F. , David, J., Stalpers, J. (2001). *Dictionary of the fungi*. 9th edition. CAB International, Wallingford, UK, 655 pp.
- Kuhlman, E.G. 1983. Effects of hypovirulence in *Cryphonectria parasitica* and of secondary blight infections on dieback of American chestnut trees. *Phytopathology*, 73(7): 1030-1034
- Leal, A., Gouveia, A., Castro, J., Martins, L. (2014). Cancro do castanheiro na Terra Fria Transmontana. 1º Simpósio SCAP/ Livro de Resumos do 7º Congresso da SPF. Novos desafios na proteção das Plantas. Oeiras. p. 85.
- Lopes, S. (2007). Alterações bioquímicas em clones de castanheiro inoculados com *Phytophthora cinnamomi*. Dissertação de Mestrado, 83 pp, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Micales, J., & Stipes, R. (1987). A Reexamination of the fungal Genera *Cryphonectria* and *Endothia*. *Phytopathology* 77(5), 650–651.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 42 N° 102. pp 311–38.
- Monteiro, P. R. (2010). Da semente se faz a árvore - Reprodução por semente de árvores e arbustos autóctones. Castelo Branco: Cadernos Quercus - Série D - N° 06. p. 73

- Nevado, C., Merino, S., & Fernandez, A. (2004). *Mycosphaerella maculiformis* (Pers.) Shroter. Laboratório de Diagnóstico del Servicio de Sanid Vegetal de Extremadura. 2pp.
- Prospero et al. (2006). Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. *Ecology and Epidemiology* Vol. 96, N°. 12. Doi: 10.1094/Phyto-96-1337, pp1337-1344.
- Rigling, D. (2000). Methods for research on *C. parasitica*. Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research. Birmensdorf, Suíça.
- Roane, M.K.; Griffin, G.J. & Elkins, J.R. (1986). Chestnut blight, other *Endothia* diseases and the genus *Endothia*. APS Monograph Series. St Paul, Minnesota, USA.
- Silva, J. (2007). Árvores e Florestas de Portugal: Do Castanheiro ao Teixo. As outras espécies florestais (Público, C., p. 86). Lisboa.
- SNAA. (2014). Avisos Agrícolas. Circular No 16/2014 - Estação de Avisos de Entre Douro E Minho, p. 8. Senhora da Hora.
- Soler, C. (2009). Caracterización de *Cryphonectria hypovirus* (CHV) mediante patrones rflp en cepas hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr de Cataluña. TPT de ETF- Explotaciones Forestales, 75 pp, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària.
- Sofia, Jorge Carvalho (2010). Principais Doenças do Castanheiro na Região do Dão - Estação de Avisos do Dão. Acção de divulgação. 12 de março de 2010.
- Suarez, P.C, (1989). Fitopatologia del castaño (*Castanea sativa* Miller). Boletim de Sanidad Vegetal, Misnistério de Agricultura, Pesca e Alimentacion, Madrid (16) : 129 pp.
- Teroso, J., Honrado, J., Pinto, A., & Rego, F. (2011). Florestas do Norte de Portugal. História, Ecologia e Desafios de Gestão. (J. Teroso, J. Honrado, A. Pinto, & F. Rego, Eds.) p. 436). Porto.
- Vázquez, C. (2009). Inventário dos Patóxeneos e Pragas máis Frecuentes nos Cultivos de Galicia e Norte de Portugal (Xunta de G., p. 308). Pontevedra. doi:C 1491-2009
- Vrot, F.; Grente, J. 1985. Le chancre de l'écorce du châtaignier. *Phytoma- Défense des cultures*: 35-37.

ANEXOS

Anexo 1

Identificação dos isolados virulentos e hipovirulentos do Souto de Felgueiras. E presença de Picnídeos nos castanheiros onde se recolheu amostras vegetais.

Área 1				Área 2		
Isolados Virulentoss	Picnídios	Isolados Hipovirulentoss	Picnídios	Isolados Virulentoss	Isolados Hipovirulentos	Picnídios
1 I Vir	-	3 I Vir	-	9 II Vir	9II Vir	-
2 I Vir	-	5 I Vir	+	12 II Vir		-
3 I Vir	-	11 Hip A	+	22 II Vir		-
4 I Vir	+	38 I Vir	-	33 II Vir		-
4 I Hip	+	44I vir	-	38 II Vir		-
5 I Vir	+			52 II Vir		-
5 I HipB	+					
6 I Vir	+					
7 I Vir	+					
8 I Vir	+					
9 I Vir	+					
9 I Hip	+					
10 I Vir	+					
10 I Hip	+					
11 I Vir	+					
11 I HipB	+					
12 I Vir	-					
13 I Vir	-					
14 I Vir	+					
15 I Hip	-					
17 I Vir	-					
21 I Vir	-					
21 I Hip	-					
29 I Hip	-					
34 I Vir	+					
38 I Vir	-					

Anexo 2

Identificação dos isolados virulentos e hipovirulentos do Souto de Vila Verde. Presença de Picnídeos nos castanheiros onde se recolheu amostras vegetais.

Área A				Área B		
Isolados Virulentos	Picnídeos	Isolados Hipovirulentos	Picnídeos	Isolados Virulentos	Isolados Hipovirulentos	Picnídeos
A1 Hip	-	A2 Vir	+	B1 Vir	B4 Hip	-
A2 Vir	+	A2 Hip	+	B4 HipB	B4 HipA	-
A2 Hip	-	A4 Hip	-	B5 Vir	B4 HipB	-
A4 Hip	-	A5 Vir	+	B5 Hip A	B5 Vir	-
A5 Vir	+	A6 Vir	-	B7 Vir	B5 HipB	-
A5 Hip	+	A7 Vir	-	B7 Hip	B7 Vir	-
A6 Vir	-	A13 Hip	-	B14 Vir	B7 Hip	-
A6 Hip	-			B14 Hip	B14 Vir	-
A7 Vir	-			B15 Vir	B14 Hip	-
A8 Vir	-			B16 Vir	B15 Vir	-
A9 Vir	+				B16 Vir	-
A 10 Vir	+					
A11 Vir	-					
A12 Vir	-					
A13 Vir	-					
A13 Hip	-					

Anexo 3

Identificação dos isolados virulentos do Souto de Cepões.

Souto de Cepões					
Isolados Virulentos					
1A Vir	6D Vir	17B Vir	23C Vir	33B Vir	20B Hip
1B Vir	6E Vir	17C Vir	24A Vir	34A Vir	20C Hip
1C Vir	7A Vir	19A Vir	24B Vir	34B Vir	23A Hip
3A Vir	7B Vir	19B Vir	24C Vir	34C Vir	23B Hip
3B Vir	7C Vir	19C Vir	25A Vir	35A Vir	23C Hip
4A Vir	7D Vir	20A Vir	25B Vir	35B Vir	24A Hip
4B Vir	10A Vir	20B Vir	25C Vir	5A Hip	24B Hip
4C Vir	10B Vir	20C Vir	27A Vir	5B Hip	24C Hip
5A Vir	10C Vir	21A Vir	27B Vir	5C Hip	29A Hip
5B Vir	12A Vir	21B Vir	28A Vir	7A Hip	29B Hip
5C Vir	12B Vir	22A Vir	28B Vir	7B Hip	
5D Vir	12C Vir	22B Vir	29A Vir	7C Hip	
6A Vir	13A Vir	22C Vir	29B Vir	8A Hip	
6B Vir	13B Vir	23A Vir	31A Vir	8B Hip	
6C Vir	17A Vir	23B Vir	33A Vir	20A Hip	

Anexo 4

Grupos de Compatibilidade vegetativa dos isolados dos soutos de Felgueiras, Vila Verde e Cepões

EU-1	EU-2	EU-11	EU-12	EU-66		
22II Vir	15I Hip	1I Vir	1A Vir	35B Vir	B4 hipB*	A2 Vir*
A13 Vir	13I Vir	2I Vir	1B Vir	7C Hip	B7 Hip*	A9 Vir
4A Vir	10I Hip	3I Vir*	1C Vir	8A Hip	B16 Vir*	A12 Vir
4B Vir	A4 Hip*	4I vir	3A Vir	8B Hip	5D Vir	6B Vir
4C Vir	A7 Hip	4I Hip	3B Vir	23A Hip	7A Vir	6D Vir
12B Vir	14I Vir	5I Vir*	5A Vir	23B Hip	7D Vir	7C Vir
12C Vir	21I Hip	5I Hip B	6A Vir	23C Hip	5A Hip	10A Vir
13A Vir	A2 Hip*	6I Vir	6C Vir	29A Hip	7A Hip	10B Vir
	A10 Vir	7I Vir	7B Vir	29B Hip	7B Hip	
	A13 Hip*	8I Vir	12A Vir	20A Hip		
	B4 Hip	9I Vir	13B Vir	20B Hip		
	B4 Hip A	9I Hip	17A Vir	B14 Hip*		
	B5 Hip A	10I Vir	17B Vir			
	B5 HipB	11I Vir	17C Vir			
	B15 Vir*	11I HipA	19A Vir			
	5C Vir	11I Hip B	19B Vir			
	6E Vir	12I Vir	19C Vir			
	20C Vir	17I Vir	20A Vir			
	22C Vir	21I Vir	20B Vir			
	25A Vir	29I Hip	21A Vir			
	25C Vir	38 I Vir*	21B Vir			
	33A Vir	34I Vir	22A Vir			
	34A Vir	44I Vir	22B Vir			
	5B Hip	9II Vir*	23A Vir			
	5C Hip	12II Vir	23B Vir			
	20C Hip	33II Vir	23C Vir			
	24A Hip	38II Vir	24A Vir			
	24B Hip	52II Vir	24B Vir			
	24C Hip	A1 Hip	24C Vir			
	29C Hip	A4 Vir	25B Vir			
		A5 Vir*	27A Vir			
		A5 Hip	27B Vir			
		A6 Vir*	28A Vir			
		A6 Hip	28B Vir			
		A7 Vir*	29A Vir			
		A8 Vir	29B Vir			
		A11 Vir	31A Vir			
		B1 Vir	33B Vir			
		B5 Vir	34B Vir			
		B5 Hip A	10C Vir			
		B7 Vir*	5B Vir			
		B14 Vir*	35A Vir			

*Representam dois isolados (um virulento e outro hipovirulento)