

rizosfera de Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.)

An efficient assay for detection of *Phytophthora cinnamomi* in the rhizosphere of Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.)

E. Gouveia¹, V. Coelho, N. Sousa, S. Coutinho,
L. Nunes & Maria Loreto Monteiro

RESUMO

O ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi* Rands e *P. cambivora* (Petri) Buisman espécies associadas com a Doença da Tinta do Castanheiro, ocorre integralmente no ambiente solo. A presença de qualquer uma destas espécies parasitas inviabiliza as novas plantações de castanheiro e coloca sérios problemas à manutenção dos soutos já instalados. Para garantir a ausência de propágulos dos parasitas no material de multiplicação do castanheiro e avaliar o estado sanitário dos solos é necessário que os métodos de detecção sejam sensíveis e rápidos, o que nem sempre é conseguido com as espécies de *Phytophthora* cujo ciclo de vida ocorre no ambiente solo. Neste estudo desenvolveu-se e optimizou-se um método de biodetecção conjugado com a utilização de meios de cultura selectivos. Como material biológico utilizaram-se discos de folha de castanheiro (*Castanea sativa*), azevinho (*Ilex aquifolium*) e camélia (*Camellia japonica*), em condições de temperatura constante

(25°) e em condições normais de laboratório com a adição ou não de biocidas (pimaricina e penicilina) na água de diluição do solo. Os discos de folha de castanheiro foram mais eficientes na detecção de *Phytophthora*, obtendo-se maior percentagem de isolamentos positivos no meio de cultura selectivo (P₁₀VPH). Os resultados obtidos neste estudo permitiram estabelecer um protocolo experimental de fácil utilização e tornar mais eficiente a detecção de *Phytophthora cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro.

ABSTRACT

The life cycle of *Phytophthora cinnamomi* Rands and *P. cambivora* (Petri)Buisman, both species associated with Ink Disease of Chestnut, occurs entirely in soil. The presence of any of these parasitic species is a limiting constraint for new plantations of sweet chestnut and represents a serious problem for established groves. Sensitive and fast detection methods

¹ Instituto Politécnico de Bragança. Escola Superior Agrária de Bragança, Campus de Santa Apolónia - Apartado 1172, 5301-854 BRAGANÇA egouveia@ipb.pt

are necessary to guarantee the absence of inoculum in the propagation material and to evaluate the sanitary condition of soils. In this study a method that involved a baiting assay conjugated with selective agar medium was developed. As biological baits, leaf discs of sweet chestnut (*Castanea sativa*), holly trees (*Ilex aquifolium*) and camellia (*Camellia japonica*) were used, at 25 °C and normal laboratory conditions with or without addition of biocides (pimaricin and penicillin) in the water of soil dilution. The leaf discs of sweet chestnut were more efficient for detection of *Phytophthora* and greater percentage of positive isolations were always obtained in the selective medium P₁₀VPH. Results of this study allow us to establish an efficient protocol for detection of *P. cinnamomi* associated with Ink Disease of Chestnut in the rhizosphere of sweet chestnut.

INTRODUÇÃO

Phytophthora cinnamomi Rands e *P. cambivora* (Petri) Buisman, duas espécies do género *Phytophthora*, cujo ciclo de vida ocorre integralmente no ambiente solo, provocam no castanheiro sintomatologia semelhante (Tucker, 1931; Pimentel, 1947; Urquijo Landaluze, 1947; Crandall, 1950; Grente, 1961). Em Portugal foram identificadas as duas espécies (Fernandes, 1966) sendo *P. cinnamomi* considerada a espécie preponderante por ser mais frequentemente isolada. Em estudos mais recentes relacionados com a Doença da Tinta (Gouveia, 2004) indica a presença das duas espécies em plantas de castanheiro sendo *P. cinnamomi* de igual forma a mais frequente e com uma distribuição generalizada. Em França existem igualmente as duas espécies (Grente, 1961;1978) enquanto em Itália, apenas a espécie *P. cambivora* foi associada com a

Doença da Tinta (Anselmi *et al.*, 1996; Turchetti & Maresi, 2000). Vettrano *et al.*, (2001) em estudos de etiologia da Doença da Tinta em Itália confirmam essa relação, não tendo detectado *P. cinnamomi*, embora tenham obtido da rizosfera de castanheiros *P. cambivora*, *P. citricola*, *P. cactorum* e *P. gonapodyides*. A presença de diferentes espécies em doenças radiculares é uma situação frequente em *Phytophthora* e verificado em muitas outras situações epidémicas (Grente, 1961; Bolay, 1992) e por essa razão analisadas pela abordagem seguida por Wallace (1978) no contexto das doenças denominadas de etiologia complexa.

A Doença da Tinta conduz invariavelmente ao declínio e à morte do castanheiro e os parasitas, uma vez introduzidos no solo, rapidamente se multiplicam e disseminam para áreas cada vez mais alargadas. A produção de material de propagação de castanheiro isento de propágulos destes parasitas e a plantação em solos onde os parasitas não estejam presentes são assim requisitos básicos para o sucesso das novas plantações de castanheiro. Para se garantir a qualidade do material de propagação e conhecer o estado sanitário dos solos são necessários métodos de detecção sensíveis e rápidos. No entanto, as espécies de *Phytophthora*, cujo ciclo de vida ocorre no ambiente solo, são difíceis de isolar a partir dos tecidos vegetais, do solo e dos substratos utilizados na produção de plantas em viveiro (Tsao, 1970; 1987). Os métodos de biodeteção baseiam-se na patogenicidade selectiva das espécies de *Phytophthora* para o tecido utilizado como armadilha biológica (Eckert & Tsao, 1962) e os meios de cultura selectivos permitem o isolamento e o crescimento das espécies de *Phytophthora* em cultura (Tsao, 1987; 1990). As técnicas de biodeteção utilizam determinados órgãos de plantas susceptíveis, ou mesmo toda a planta, como meio privilegiado de desenvolvimento dos propá-

gulos de resistência dos parasitas (Dance *et al.*, 1975; Shew *et al.*, 1979; Erwin & Ribeiro, 1996). A eficiência destas técnicas dependem em grande medida da susceptibilidade do material utilizado como armadilha, do desenvolvimento de sintomas característicos nesses tecidos vegetais e das condições de incubação que maximizem as hipóteses de formação e libertação dos zoósporos, os propágulos primários no processo de infecção. Para a biodeteção de *P. cinnamomi*, uma espécie com capacidade de causar infecção em muitas espécies vegetais e invadir ecossistemas inteiros, estão descritos elevado número de protocolos utilizando os mais variados tecidos vegetais como radículas de tremoceiro (*Lupinus angustifolius*), cotilédones de eucalipto, frutos como o abacate, maçãs e peras assim como discos de folhas de abacateiro, azálea e ananás como o apresentado de forma detalhada em Zentmyer (1980); Tsao, (1987) e Erwin & Ribeiro (1996). Os métodos de biodeteção continuam a fazer parte integrante dos métodos de diagnóstico nas espécies de *Phytophthora* classificadas na Europa como organismos de quarentena como *P. fragariae* Hichman var. *fragariae* e *P. ramorum* e nas espécies considerados como organismos prejudiciais. Em termos práticos, a biodeteção constitui uma amplificação biológica do parasita e desempenha um papel importante na aplicação dos métodos imunológicos ou moleculares de diagnóstico. O teste de Cahill & Hardham (1994) baseado na utilização de anticorpos monoclonais, inicia-se como um teste clássico de biodeteção em que o geotropismo negativo dos zoósporos e a atracção para determinadas substâncias químicas permitem a sua captura e fixação em tiras que depois de incubadas com os anticorpos são visualizados pela deposição de um corante insolúvel por adição de um conjugado enzimático. Nos métodos moleculares de diagnóstico a bio-

deteção para além de constitui uma referência de comparação é também uma forma de obter DNA do parasita (Winton & Hansen, 2001; Bonants *et al.*, 2004) ou ainda para ultrapassar dificuldades relacionadas com a extracção do DNA do parasita a partir do solo (Nechwatal *et al.*, 2001).

Com este trabalho pretende-se desenvolver um método com a utilização de discos de folha de castanheiro para a detecção de agentes da Doença da Tinta do Castanheiro e identificar e otimizar os factores e as condições ambientais que potenciam o isolamento positivo dos parasitas.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo para a detecção de *P. cinnamomi* associada com a Doença da Tinta do Castanheiro foi estabelecido com base na realização de um ensaio com quatro repetições por modalidade para avaliar o efeito do tecido utilizado como armadilha: castanheiro (*C. sativa*), azevinho (*I. aquifolium*), camélia (*C. japonica*), o efeito da presença de biocidas na água de diluição do solo (penicilina - 50 mg L⁻¹ e pimáricina - 50 mg L⁻¹) e o efeito das condições de incubação (temperatura ambiente, temperatura constante - 25 °C) ao abrigo da luz e o tempo de “armadilhagem” (período de tempo em que os discos de tecido foliar se mantêm na suspensão do solo). O ensaio foi estabelecido utilizando um substrato de terra vegetal e areia na proporção de 3:1 inoculado com 0.5% (v/v) de *P. cinnamomi*. Este substrato foi colocado em vasos com dez litros de capacidade onde se plantaram castanheiros que se mantiveram em estufa, com rega semanal por inundação e rega por nebulização a intervalos regulares durante o período diurno, durante três meses. O substrato de terra vegetal e areia onde cresceram os castanheiros foi diluído, para todas as modali-

dades e repetições, na proporção de 1:4 (v/v) (20 ml de substrato/80 ml de água) com água destilada ou água destilada a que se adicionou 50 mg L⁻¹ de penicilina e 50 mg L⁻¹ de pimaricina, como anteriormente referido e colocado em placas de Petri de 120 mm. Em cada modalidade colocam-se a flutuar vinte discos de 0,5 cm de diâmetro de folha de castanheiro, camélia ou azevinho e colocaram-se em condições normais de laboratório (Junho) e em estufa de incubação a 25±2°C. Passado 24, 48, 72 e 96 horas retiram-se de cada modalidade em estudo 5 discos por repetição e avalia-se em meio selectivo P₁₀VPH de Tsao & Guy (1977) a presença de *P. cinnamomi*. O parasita é confirmado por observação microscópica das hifas às 24, 48, 72 e 96 horas depois do processo de isolamento. Os resultados do isolamento são expressos em percentagem de isolamento positivo de *P. cinnamomi* tendo-se considerado para a análise estatística os valores cumulativos no final do período de observação. A análise estatística dos resultados foi realizada no software SPSS® 16.0.

RESULTADOS

O padrão de detecção de *P. cinnamomi* a partir dos tecidos vegetais utilizados como armadilha revelou que os discos de folhas

de castanheiro manifestaram um comportamento diferente e com uma percentagem de isolamento positivo de *P. cinnamomi* muito elevado quando comparado com as folhas de camélia ou azevinho. Em camélia e azevinho só se obtiveram isolamentos positivos às 96 horas de “armadilhagem” o que corresponde à não detecção do parasita em todos os outros tempos em estudo. Às 96 horas de “armadilhagem” os discos de folhas de camélia permitiram obter isolamentos positivos de *P. cinnamomi* em todas as modalidades ensaiadas, evidenciando ainda grande variabilidade entre modalidades e repetições e com percentagem de isolamento positivo muito inferior ao obtido com os discos de folhas de castanheiro. Os discos de folha de azevinho apresentam um padrão de detecção das espécies de *P. cinnamomi* ainda mais irregular e com reduzida capacidade de detecção na maioria das condições em estudo evidenciando, no entanto, uma elevada capacidade de detecção quando em condições de temperatura ambiente na presença de biocidas na água de diluição do solo (Quadro 1).

Para comprovar estatisticamente as diferenças entre hospedeiros, no que se refere à capacidade de isolamento positivo de *P. cinnamomi*, optou-se por uma abordagem de análise estatística não-paramétrica por se averiguar que não eram cumpridos os pressupostos de normalidade e homogeneidade

QUADRO 1 – Percentagem de isolamento positivo médio de *Phytophthora cinnamomi* em meio selectivo P₁₀VPH obtido a partir dos discos de folha de castanheiro, camélia e azevinho nas diferentes modalidades e nos diferentes tempos de “armadilhagem”

Modalidade	Isolamento positivo médio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (%)											
	Castanheiro				Camélia				Azevinho			
Tecido hospedeiro	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Tempo “armadilhagem” (horas)	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Temperatura Ambiente	45	50	60	60	0	0	0	5	0	0	0	5
Temperatura Constante	65	45	50	60	0	0	0	40	0	0	0	0
Temp. Amb com Biocidas	75	65	60	70	0	0	0	40	0	0	0	85
Temp. Const. com Biocidas	65	40	25	70	0	0	0	20	0	0	0	20

de variâncias entre grupos (hospedeiros) para a variável “isolamento positivo”. O pressuposto de normalidade foi avaliado através de teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e o pressuposto de homogeneidade de variâncias foi avaliado através do teste de Levene. Tentaram-se ainda, sem êxito, diversas transformações das variáveis.

Assim, para testar se as porcentagens de isolamentos positivos observadas são significativamente diferentes entre hospedeiros, trabalhou-se com as ordens das observações, tendo-se utilizado a ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de uma comparação múltipla de médias das ordens pelo teste de Tukey (Zar, 1999).

Os resultados evidenciaram que o hospedeiro tem um efeito significativo sobre o número de isolamentos positivos ($X^2_{kw}(2) = 111.6; p < 0,001; N = 192$). Atendendo à comparação múltipla de médias das ordens para um nível de probabilidade $\alpha = 0,05$, verifica-se que o castanheiro, apresenta uma porcentagem de isolamentos positivos significativamente diferente dos restantes dois hospedeiros, a camélia e o azevinho ($p < 0,001$), com um número de isolamentos positivos claramente superior. Repare-se que em camélia e em azevinho se registam maioritariamente valores de 0% de isolamento positivo, com as observações de porcentagem de isolamento positivo superior a 0% a aparecerem identificadas como “outliers” (símbolo *) no diagrama de extremos e quartis (Figura 1).

Após a verificação estatística da maior eficiência do castanheiro no isolamento de *P. cinnamomi* averiguou-se se as condições de incubação (Modalidade) e o tempo de “armadilhagem” (Tempo) tiveram influência significativa na porcentagem de isolamento positivo observada em castanheiro. Recorreu-se a uma ANOVA a dois factores não-paramétrica com repetições, trabalhando com as ordens das observações através da técnica

de Scheirer-Ray-Hare (Sokal & Rohlf, 1995).

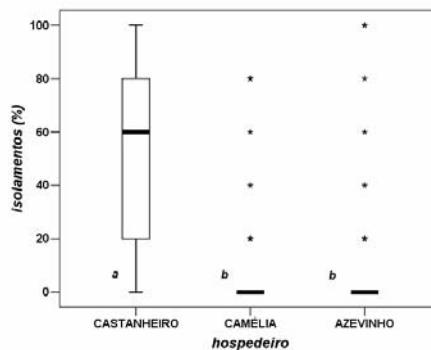


Figura 1 – Distribuição da percentagem de isolamento positivo de *Phytophthora cinnamomi* obtida em castanheiro, camélia e azevinho. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre distribuições de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido de uma comparação múltipla de médias das ordens pelo teste de Tukey para $\alpha = 0,05$. (*) valores identificados como “outliers”

A análise estatística, para um nível de significância $\alpha = 0,05$, não evidenciou diferenças significativas, quer ao nível dos factores condições de incubação e tempos de “armadilhagem”, quer ao nível da interação, no que respeita a percentagem de isolamento positivo de *P. cinnamomi* (Quadro 2).

QUADRO 2 – ANOVA não paramétrica da percentagem de isolamento positivo de *Phytophthora cinnamomi* obtido com discos de folha de castanheiro (*Castanea sativa*) nas diferentes condições ambientais (Modalidade) e tempo de “armadilhagem” (Tempo)

Fonte de variação	SQ	GL	H	P
Modalidade	810,969	3	2,424	0,48910
Tempo	1291,094	3	3,860	0,27701
Modalidade *	1428,063	9	4,269	0,89281
Tempo				
Repetições	3530,125	15		

SQ – soma dos quadrados das ordens; GL – graus de liberdade; H – estatística de teste H; P – valor-p do teste

As condições de temperatura (temperatura

constante e temperatura ambiente) não influenciaram o padrão de detecção em castanheiro, apresentando valores muito semelhantes e sem diferenças significativas nas duas modalidades em estudo. A presença de pimaricina (50 mg L⁻¹) e penicilina (50 mg L⁻¹) na água de diluição do solo proporcionou um ligeiro aumento da percentagem de

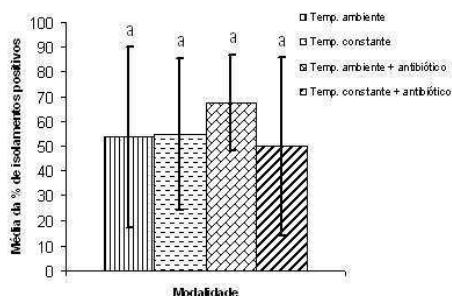


Figura 2 – Média da percentagem de isolamento positivo de *Phytophthora cinnamomi* nas diferentes modalidades. Isolamento em meio selectivo P₁₀ VPH, em 5 discos de folha de castanheiro, por cada modalidade e repetição. As barras delimitam o valor do desvio padrão da média de isolamento positivo. Colunas com a mesma letra indicam diferenças não significativas para um nível de significância $\alpha = 0,05$.

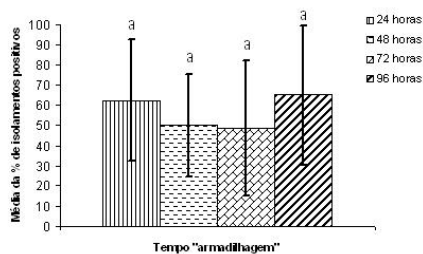


Figura 3 – Média da percentagem de isolamento positivo de *Phytophthora cinnamomi* nos diferentes tempos de "armadilhagem". Isolamento em meio selectivo P₁₀ VPH, em 5 discos de folha de castanheiro, por cada tempo de "armadilhagem" e repetição. As barras delimitam o valor do desvio padrão da média de isolamento positivo. Colunas com a mesma letra indicam diferenças não significativas para um nível de significância $\alpha = 0,05$.

isolamento positivo quando em condições de temperatura ambiente embora com diferenças estatisticamente não significativas em relação às outras condições em estudo (Figura 2). O tempo de "armadilhagem" também não alterou o padrão de detecção de *P. cinnamomi*, não existindo diferenças significativas entre os valores obtidos para os diferentes tempos em estudo (Figura 3).

DISCUSSÃO

Os métodos de detecção biológicos por se basearem na patogenicidade das espécies de *Phytophthora* para um determinado hospedeiro ou tecido vegetal dependem directamente das condições que favoreçam o processo de patogénese. O sucesso do método depende da formação e da libertação dos zoósporos, os propágulos primários da infecção dos tecidos vegetais e da susceptibilidade dos tecidos utilizados como armadilha (Cameron & Carlile 1977; Newhook *et. al.*, 1981; Carlile, 1987; Tsao, 1987). As condições experimentais de temperatura e luminosidade são igualmente determinantes da eficácia do método assim como a proporção solo/água.

Neste trabalho utilizou-se uma proporção solo/água elevada por ser considerada mais eficaz na detecção de *Phytophthora* sp. como o referido na revisão de Tsao (1987). Os discos de folha de castanheiro foram os tecidos mais eficientes na detecção de *P. cinnamomi* tendo ainda evidenciado maior percentagem de isolamento positivo do parasita e da mesma ordem de grandeza em todas as modalidades estudadas. Camélia e azevinho, espécies de folha persistente e incluídas na lista de hospedeiros de *P. cinnamomi* (Zentmyer, 1980) evidenciaram menor eficácia na detecção de *P. cinnamomi* apresentando

variações acentuadas entre as diferentes modalidades em estudo. Estas espécies vegetais, por terem a capacidade de detectar *P. cinnamomi*, e serem de folha persistente, podem constituir uma alternativa à utilização do castanheiro desde que as condições de ensaio sejam optimizadas. As condições de temperatura não influenciaram o padrão de detecção e a eficácia de detecção de *P. cinnamomi* nos discos de castanheiro, embora as condições de temperatura constante tenham sido mais favoráveis em camélia. A adição de biocidas à água de diluição do solo (pimaricina - 50 mgL⁻¹ e penicilina - 50 mgL⁻¹) aumentou a percentagem de isolamentos positivos em todas as armadilhas biológicas e permitiu mesmo aumentar a eficácia de isolamento em camélia e azevinho que, sem a adição destas substâncias, apresentavam valores de isolamento positivo muito baixo ou mesmo nulo no caso do azevinho. A conjugação da detecção biológica e dos meios de cultura selectivos constitui um método eficiente e de fácil concretização para a detecção de *P. cinnamomi*. A biodetecção permite obter tecidos vegetais recentemente infectados e os meios selectivos possibilitam o seu fácil isolamento em cultura, crescimento e identificação, aumentando assim a eficácia da detecção no ambiente solo. A uma maior eficácia do método de detecção acresce ainda a diminuição do tempo necessário para concretizar o teste, uma vez que não é necessário esperar pelo aparecimento de sintomas característicos nos tecidos vegetais como o referido em muitos dos protocolos. Este método possibilita ainda um processamento adequado das amostras mesmo quando em número elevado o que permite a sua utilização em laboratórios de diagnóstico fitopatológico.

O trabalho realizado permitiu optimizar as condições de detecção de *P. cinnamo-*

mi sendo recomendado a utilização de água destilada e esterilizada na proporção de 1:4 e utilizar como tecido armadilha discos de folha de castanheiro colocadas a flutuar em placas de Petri de 120 mm à temperatura ambiente. O isolamento em meio selectivo deve ser efectuado passado 24 horas da realização do teste de biodetecção e a observação microscópica das hifas ser iniciada às 24 horas de incubação e deve ser mantida até às 96 horas.

Este método, optimizado a partir de substratos de terra vegetal inoculado com *P. cinnamomi*, que corresponde a uma situação simplificada em relação à complexidade existente nos solos naturais, está a ser utilizado com sucesso na detecção a partir do solo das espécies de *Phytophthora* associadas com a Doença da Tinta em plantações jovens de castanheiro (dados não apresentados). Será também utilizado em estudos posteriores como referência para avaliar a sensibilidade dos métodos moleculares de diagnóstico e da sua validade como métodos de detecção de *Phytophthora* associadas com a Doença da Tinta do Castanheiro presente nos solos e substratos utilizados em viveiro na produção de material vegetal de propagação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anselmi, N., Giordano, E., Vannini, A., Troiani, L., Napoli, G., Crivelli L. 1996. Il mal dell'inchostro del castagno in Italia: una vecchia malattia ritorna attuale. *Linea Ecologica*, **5** (27): 39-44.
- Bolay, A. 1992. Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse Romande et au Tessin. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*, **24** (5): 281-292.

- Bonants P. J. M., Gent-Pelzer, M. P. E., Hooftman, R., Cooke, D. E. L., Guy, D. C. and Duncan, J. M. 2004. A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real-time quantitative fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants. *European Journal of Plant Pathology*, **110**: 689-702.
- Cahill, D. M. and Hardham, A. R. 1994. A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Phytopathology*, **84**: 1284-1292.
- Camerom, J. N. and Carlile, M. J. 1977. Negative geotaxis of zoospores of the fungus *Phytophthora*. *Journal of General Microbiology*, **98**: 599-602.
- Carlile, J. M. 1987. Motility, taxis and tropism in *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki- Garcia, P. H. Tsao (Eds.), *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 95-107.
- Crandall, S. B. 1950. The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthora*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. *Plant Disease Reporter*, **34** (6): 194-196.
- Dance, M. H., Newhook, F. J., Cole, J. S. 1975. Bioassay of *Phytophthora* spp. in soil. *Plant Disease Reporter*, **59**: 523-527. (Cit: Tsao, 1987).
- Eckert, J. W., Tsao, P. 1962. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. *Phytopathology*, **52**: 771-777.
- Erwin, C. & Ribeiro, K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. APS Press.
- Fernandes, C. T. 1966. A "Doença da Tinta" dos castanheiros. *Parasitas do género Phytophthora* de Bary. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça.
- Gouveia, M. E. 2004. *Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de Phytophthora cambivora (Petri) Buisman e Phytophthora cinnamomi Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro*. UTAD, Vila Real.
- Grente, J. 1961. La maladies de l'encre du chataignier. I-Étiologie et biologie. *Annual Epiphyties*, **12** (1): 6-24.
- Grente, J. 1978. Les maladies du châtaignier. In Bergougnoux, F., Verlhac, A., Breisch, H., Chapa, J. (Eds.) *Le châtaignier. Production et culture*. Journées Nationales du Chataignier de Brive - Malemort, Nov. 1978.
- Nechwatal, J., Schlenzig, A. Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. and Oswald, W. F. 2001. A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *Forest Pathology*, **31**: 85-97.
- Newhook, F. J., Young, B. R., Allen, S. D., Allen, R.N. 1981. Zoospore motility of *Phytophthora cinnamomi* in particulate substrates. *Phytopathologische Zeitschrift*, **101**: 202-9.
- Pimentel, A. L. 1947. A *Phytophthora cinnamomi* Rands, um outro agente, extremamente virulento, da "doença da tinta" do castanheiro. Separata da *Agronomia Lusitana*, Volume IX, Tomo III.
- Shew, H. D., Benson, D. M., Grand, L. F. 1979. A comparison of baits for isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil. (Abstr.) *Phytopathology*, **69**: 532. (cit: Tsao, 1987).
- Sokal, R. S., & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*, Ed. 3. W. H. Freeman, New York.
- Tsao, H. P. & Guy, O. S. 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology*, **67**: 796-801.

- Tsao, H. P. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, **8**: 157-186.
- Tsao, H. P. 1987. Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao (Eds.) *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press : 219-236.
- Tsao, H.P. 1990. Why many Phytophthora root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *Bulletin OEPP/EPPO*, **20**:11-27.
- Tucker, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Barry. *Missouri Agricultural. Experimental. Station. Research. Bulletin.*, **153**. Cit: Grente, J. 1961. La maladies de l'encre du chataignier. I-Étiologie et biologie. *Ann. Epiphyties*, **12** (1): 6-24.
- Turchetti, T. and Maresi, G. 2000. Effects of diseases on chestnut orchards and forest ecosystems. *Ecologia Mediterrânea*, **26** (1-2): 113-121.
- Urquijo Landaluze, P. 1947. Revisión taxonómica de los hongos productores de la enfermedad del castaño llamada de la "tinta". Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. *Estación de Fitopatología Agrícola de la Coruña. Trabajos (serie Fitopatología)*, **188**. Madrid.
- Vettraino, A. M., Natili, G., Anselmi, N. and Vannini, A. 2001. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of Ink Disease in *Castanea Sativa* in Italy. *Plant Pathology*, **50** (1): 90-96.
- Wallace, H. R. 1978. The Diagnosis of plant diseases of complex etiology. *Annual. Review Phytopathology*, **16**:376-402.
- Winton, L. M. & Hansen, E. M. 2001. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *Forest Pathology*, **31**: 275-283.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice-Hall International Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zentmeyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi and the Diseases it Causes*. Monograph 10. American Phytopathological Society. St Paul (USA).