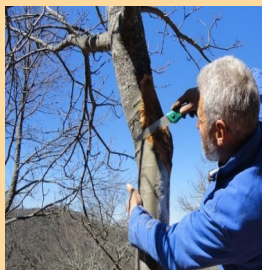
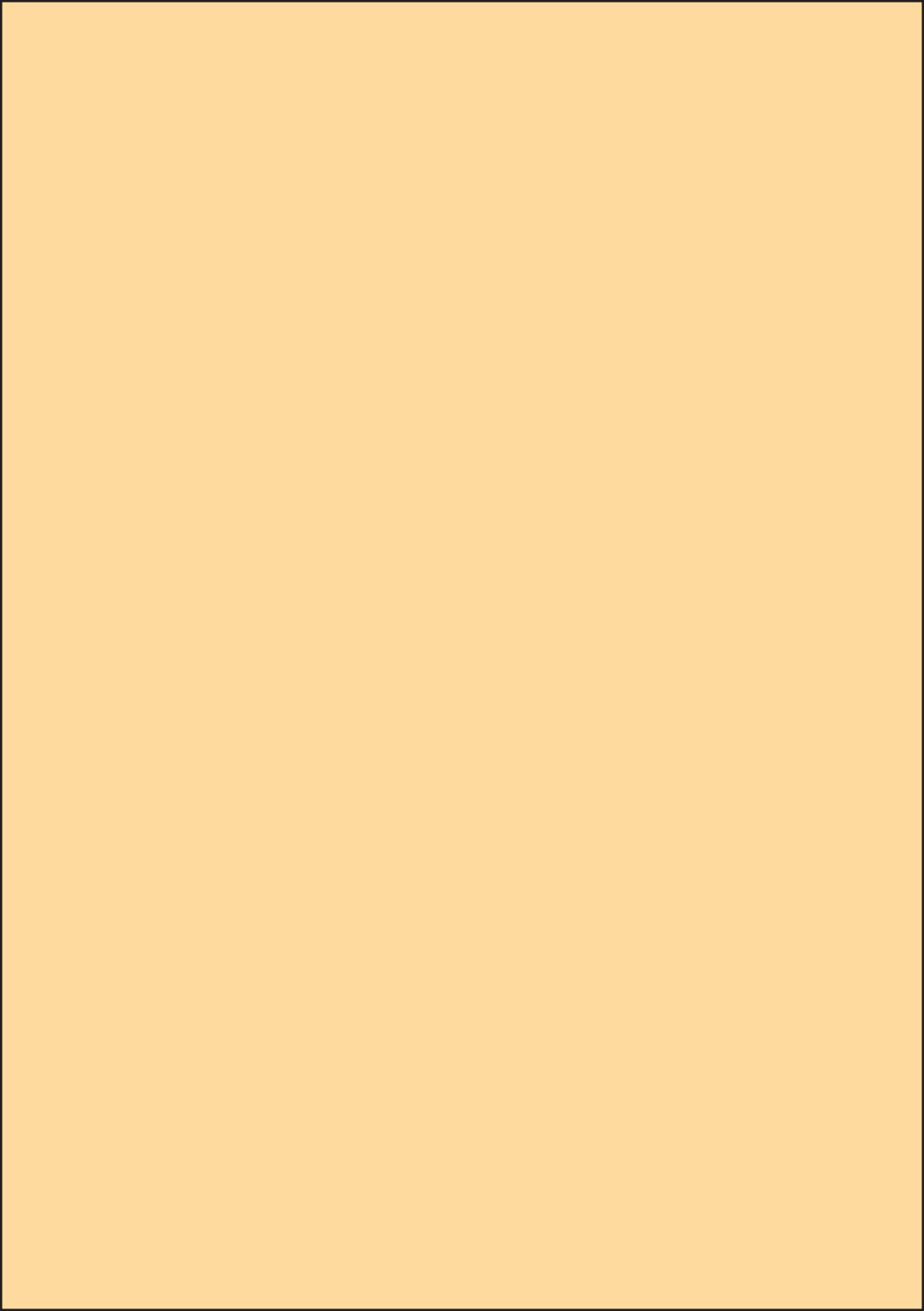


BioChestnut-IPM

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS PARA O TRATAMENTO BIOLÓGICO DO CANCRO DO CASTANHEIRO (*Cryphonectria parasitica*) EM PORTUGAL





Coordenação científica

Eugénia Gouveia

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS
PARA O TRATAMENTO BIOLÓGICO DO
CANCRO DO CASTANHEIRO
(*Cryphonectria parasitica*) EM PORTUGAL

Editor
CNCFS

FICHA TÉCNICA

TÍTULO

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS PARA O TRATAMENTO BIOLÓGICO DO CANCRO DO CASTANHEIRO (*Cryphonectria parasitica*) EM PORTUGAL

COORDENAÇÃO

Instituto Politécnico de Bragança – Eugénia Gouveia

AUTORES

Eugénia Gouveia (IPB/CIMO/ESA)

Helena Bragança (INIAV/IP)

Luísa Moura (IPVC/CISAS)

Valentim Coelho (IPB/CIMO/ESA)

EDIÇÃO

CNCFS

FOTOGRAFIAS

Eugénia Gouveia (IPB/CIMO/ESA)

Helena Bragança (INIAV/IP)

Luísa Moura (IPVC/CISAS)

DESIGN /PAGINAÇÃO

CNCFS

ISBN

978-989-54993-4-2

DATA

Dezembro de 2022

Fotografias – Todas as fotografias incluídas nesta publicação só podem ser usadas em periódicos, livros ou revistas com a permissão dos fotógrafos originais enviando o pedido para o CNCFS.

Índice

1. Introdução.....	1
2. O Cancro do Castanheiro - Descrição da Doença.....	2
3. Ciclo Biológico e Reprodução em <i>Cryphonectria parasitica</i>	4
4. Disseminação de <i>Cryphonectria parasitica</i> nos Soutos.....	5
5. Luta Biológica do Cancro do Castanheiro Baseado em Estirpes Hipovirulentas de <i>C. parasitica</i> (Estirpes CHV1).....	6
6. Etapas para Aplicação do Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro Baseado em Estirpes Hipovirulentas de <i>C. parasitica</i> - Estirpes CHV1.....	9
7. Exigências Legais e Concretização do Programa Experimental para Tratamento Experimental do Cancro do Castanheiro em Portugal.....	16
8. Entidades Envolvidas no desenvolvimento do Programa Experimental de Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro.....	17
9. Programa Experimental para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com Base em Estirpes Hipovirulentas de <i>Cryphonectria parasitica</i> - Estirpes CHV1.....	18
10. Considerações finais.....	23
11. Bibliografia.....	25

1. Introdução

O cancro do castanheiro é uma doença associada ao fungo *Cryphonectria parasitica* (Murril) Barr, espécie de origem asiática, invasora e muito agressiva em castanheiro que provoca a morte dos ramos e progressivamente de toda a árvore. A European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) categoriza o fungo *C. parasitica* como um organismo de quarentena da lista A2 ou seja, um organismo de quarentena mas já presente em muitos dos países da Europa (EPPO, 2022). A doença foi introduzida na Itália em 1938 e está presente em Portugal, com caráter epidémico desde 1989 (Abreu, 1992). Nos finais dos anos 90 a doença estava já presente em toda a área de castanheiro com uma taxa média de 10 % de árvores infetadas (Gouveia et al., 2001). A taxa de infeção é muito variável existindo locais com valores de 28,5 % de castanheiros doentes enquanto em outros locais a taxa de infeção é reduzida (1,8 %) ou não estava ainda presente. O desenvolvimento epidémico continuou e, em pouco tempo, atingiu em alguns locais valores de incidência superiores a 40% (Bragança, 2007). As medidas de quarentena e legislativas (então obrigatórias uma vez que a EU categorizava o fungo como organismo de quarentena), evidenciaram pouca eficácia e não evitaram a dispersão e avanço da doença.

Para controlar a doença não existem meios de luta eficazes e não estão disponíveis castanheiros resistentes à doença. A luta biológica com utilização de estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* (hipovirulência) é um meio de luta muito eficaz que promove a cicatrização dos cancros e a total recuperação dos castanheiros doentes e considerado pela EFSA (2016) como o meio mais adequado e mais eficaz para mitigar e controlar os elevados riscos que a doença coloca em termos económicos, sociais e ecológicos.

A luta biológica é uma estratégia de proteção das plantas que se baseia no conhecimento aprofundado do parasita, do hospedeiro e do ecossistema, e cujo objetivo é restabelecer o equilíbrio natural e evitar os elevados prejuízos ambientais e económicos. A hipovirulência é um meio de luta biológico que ocorre de forma natural na natureza mediado por processos biológicos e moleculares complexos que envolve o fungo parasita (*C. parasitica*), o agente de controlo biológico - o vírus (*Cryphonectria hypovirus 1 - CHV1*) que se multiplica exclusivamente no interior do fungo, o castanheiro (*Castanea sativa*) e ainda as muitas condições ambientais que determinam todo o processo.

Atualmente o tratamento do cancro do castanheiro em Portugal baseia-se preferencialmente na aplicação da luta biológica com base em estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* seguindo o estipulado no “Programa Experimental para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com Base em Estirpes Hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* - Estirpes CHV1” autorizado pela entidade nacional competente (DGAV - Ministério da Agricultura).

É objetivo deste Manual de Boas Práticas para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro (*Cryphonectria parasitica*) em Portugal comunicar e divulgar o novo método de tratamento do cancro do castanheiro baseado na utilização de estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* (Estirpes CHV1). Pretende-se ainda contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de recuperação das árvores e clarificar e elucidar o contexto da sua aplicação prática nos soutos para que as potencialidades do método sejam atingidas e assim se recupere a vitalidade e resiliência do ecossistema castanheiro.

O Manual de Boas Práticas destina-se a um conjunto alargado de utilizadores dos quais se destacam os produtores de castanheiro e técnicos agrícolas e florestais especializados e para todos os interessados em proteção vegetal em especial nos novos métodos e novas estratégias no tratamento das doenças das plantas.

O manual foi concebido para proporcionar a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de recuperação dos castanheiros e apresentar de forma integrada a atuação dos diferentes intervenientes em formato esquematizado com as diferentes etapas, objetivos e ações para uma aplicação informada da luta biológica no tratamento do cancro do castanheiro. Foram ainda incluídos de forma mais aprofundada e complementar em formato “caixa” os fundamentos científicos dos mecanismos biológicos que determinam a eficácia do método.

2. O Cancro do Castanheiro - Descrição da Doença

O fungo *Cryphonectria parasita* (Murril) Barr, anteriormente *Endothia parasitica* é o organismo responsável pelo cancro do castanheiro. É um fungo da micoflora natural dos castanheiros asiáticos, que embora com capacidade de infetar esses castanheiros, não adquire nestas espécies carácter epidémico. O fungo revelou-se muito virulento em *Castanea dentata* nos EUA e também em *C. sativa* na Europa e em todos os híbridos (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) comercializados como resistentes à doença da tinta.

Os sintomas do cancro são muito característicos nos troncos e ramos dos castanheiros. Os ramos mais jovens adquirem uma cor avermelhada e nos ramos de maior dimensão a casca fende sendo possível observar as placas miceliais do fungo de cor esbranquiçada em forma de leque. Nas zonas necrosadas dos ramos observam-se as frutificações do fungo em forma de pequenas pontuações de cor amarelo alaranjada (OEPP, 2005). Os cancros têm um crescimento muito rápido ocorrendo a morte dos ramos logo que o fungo circunda todo o perímetro dos tecidos corticais. As árvores infetadas ficam assinaladas nos soutos pela presença de ramos mortos ficando com as folhas necrosadas e secas aderentes nos ramos durante algum tempo.

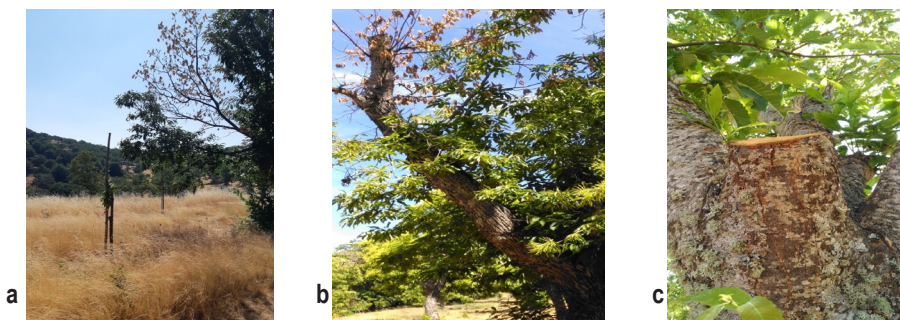


Figura 1: Sintomas do cancro do castanheiro em *Castanea sativa* (a, b). Morte dos ramos por infeção de *C. parasitica*, sintoma muito evidente em árvores adultas que identificam visualmente as árvores infetadas (flag), (c) corte de ramo e continuação da infeção nos tecidos corticais do castanheiro.

A presença dos cancos nos troncos enfraquece toda a árvore sendo particularmente graves quando a infecção ocorre na zona de inserção das pernadas.

O fungo não infeta as raízes, mas por vezes as infeções ocorrem no tronco junto ao solo. O inóculo para estas infeções resulta, muitas vezes, da sobrevivência do fungo nos tecidos infetados que ficam no solo quando se procede à remoção dos cancos.

Nos ramos jovens o fungo tem um crescimento muito rápido e a morte dos ramos ocorre num período de tempo muito reduzido.



Figura 2: Sintomas característicos do cancro do castanheiro. (a) Cancro muito extenso depois de algum tempo de evolução da doença na zona da bifurcação dos ramos, (b) cancro com desenvolvimento em toda a extensão do tronco desde a zona da bifurcação dos ramos até ao colo da planta.

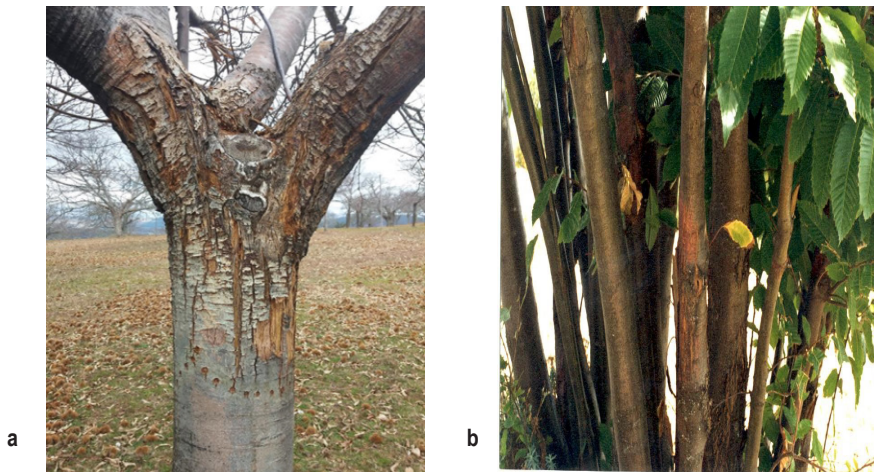


Figura 3: Sintomas característicos do cancro do castanheiro. (a) Cancro muito extenso na zona da bifurcação das pernadas depois de alguns anos de evolução da infeção, (b) cancos virulentos em ramos jovens de castanheiro apresentando a característica cor laranja-avermelhada.

É importante mencionar que muitos outros fungos podem ocasionalmente causar cancro nos troncos e ramos de castanheiro sendo os mais frequentes os fungos do género *Valsa* spp., e outros fungos como *Melanconis modonia* Tulasne & *C. Tulasne*, *Cryptodiaporthe castanea* (Tulasne) Wehmeyer, *Nectria cinnabarina* (Fries) Fries, *Nectria coccinea* (Fries) Fries, *Libertella* sp., *Diatrype stigma* (Hoffmann) Fries (Plant Protection Organization - EPPO, 2005). Os cancros associados a estes fungos são geralmente de menor dimensão e menos agressivos e as estruturas de frutificação, quando presentes, diferem claramente dos de *C. parasitica* o que permite identificar estes fungos e para os quais o tratamento com estirpes hipovirulentas CHV1 não é recomendado.

Para a aplicação das estirpes hipovirulentas o fungo *C. parasitica* deve ser claramente identificado. A identificação do fungo deve basear-se na observação das estruturas de frutificação formadas nos tecidos com sintomas ou observadas após incubação em condições de elevada humidade ou por isolamento do fungo em meio de cultura apropriado.

3. Ciclo Biológico e Reprodução em *Cryphonectria parasitica*

C. parasitica apresenta o ciclo de vida típico de um fungo ascomiceta filamentosos. É um fungo predominantemente haploide, cresce por alongação das hifas que, no seu conjunto, formam o micélio. Em cultura o micélio é branco quando jovem, tornando-se amarelo claro e depois amarelo alaranjado com o decorrer do tempo. No castanheiro o fungo forma placas miceliais em forma de leque de cor branco amarelada que se instalam no parênquima e no câmbio dos tecidos corticais. Os esporos assexuados (conídios) formam-se no castanheiro em picnídios com 100-300 µm de diâmetro. Por vezes os picnídios coalescem e formam conidiomas de maiores dimensões formados por lóculos irregulares no interior dos tecidos estromáticos (EPPO, 2005). Os conídios que se formam no interior dos picnídios em condições de elevada humidade são lançados para o exterior, envoltos numa substância gelatinosa, designada por cirro. Os conídios têm forma elipsoide, sem septos e hialinos com comprimento de 3-5 µm e largura de 1.5-2.0 µm. Os conídios são os propágulos vegetativos das novas infeções ou podem funcionar como gâmetas masculinos na reprodução sexuada.

A fertilização em *C. parasitica* ocorre quando um conídio e uma hifa recetiva (a estrutura reprodutiva feminina) se fundem para formar células dicarióticas (n+n) (plasmogamia). Divisões nucleares síncronas resultam num aglomerado de hifas dicarióticas dentro da estrutura de frutificação. Cada célula terminal (n+n) (asco inicial) sofre cariogamia (fusão dos núcleos), resultando numa breve fase diploide (2n) característica do ciclo de vida dos fungos filamentosos ascomicetas. Cada núcleo 2n sofre meiose, seguida de uma única mitose, resultando em oito ascósporos para cada asco maduro. Em *C. parasitica* os ascos formam-se dentro de uma estrutura de frutificação em forma de frasco designado periteca. A dispersão ocorre quando os ascósporos (podem existir milhares por periteca) são ejetados de forma explosiva através do ostíolo da periteca. Cada ascósporo haploide é disperso pelas correntes de ar sendo capaz de infetar as árvores e desenvolver novos cancros, completando assim o ciclo de vida do fungo.

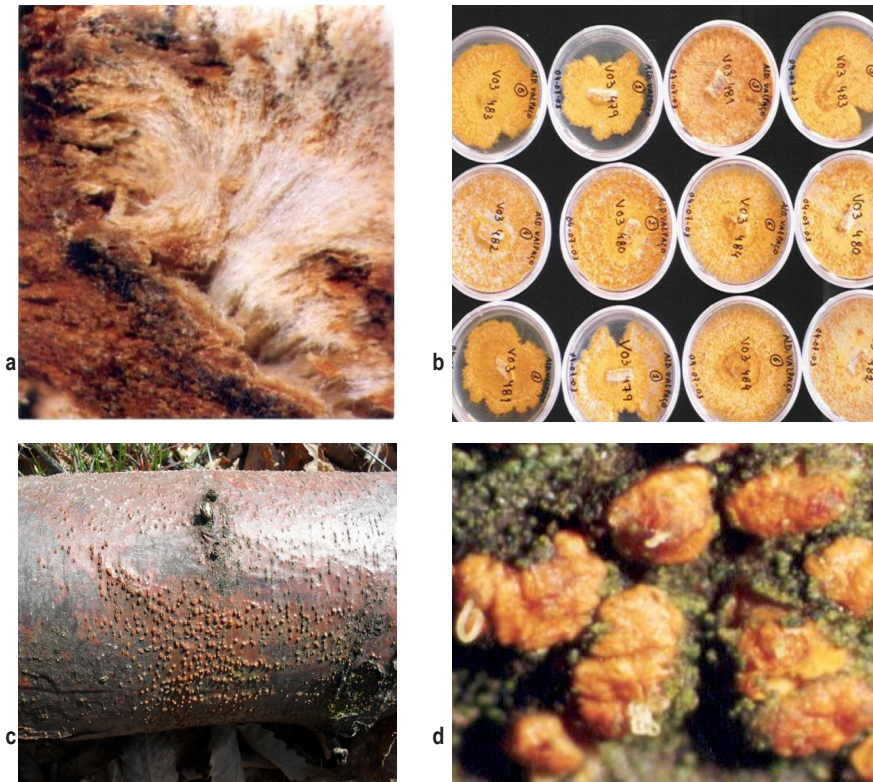


Figura 4: Estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo *Cryphonectria parasitica*. a) micélio de *C. parasitica* a crescer na casca do castanheiro, (b) isolados de *C. parasitica*, (c) picnidios laranja-amarelados, (d) estruturas de frutificação do fungo *C. parasitica* (picnidios) com presença dos cirros.

A reprodução sexuada do fungo é controlada geneticamente por um único locus (MAT) com dois alelos idiomórficos (MAT-1 ou MAT-2). A reprodução sexuada ocorre em populações onde estão presentes indivíduos, em proporções semelhantes, portadores do alelo MAT-1 ou MAT-2. No entanto, indivíduos portadores de ambos os alelos foram identificados em populações naturais tanto nos EUA (Marra and Milgrom, 2001; Mcguire et al., 2004) como na Europa e também em Portugal (Bragança et al., 2007; Gouveia et al., 2016).

4. Disseminação de *Cryphonectria parasitica* nos Soutos

Como já foi referido anteriormente, os conídios formam-se nas árvores infetadas no interior dos picnidios e que em condições de elevada humidade são lançados para o exterior envoltos numa substância gelatinosa. São dispersos pela chuva e arrastados ao longo dos caules e ramos onde irão causar novas infeções. Se atingem o solo podem ficar viáveis durante muito tempo e causar infeções junto do colo das árvores. As aves, insetos e os ácaros, mas também os ventos

fortes podem transportar os conídios e assim propagar a doença a grande distância do foco inicial. Os ascósporos, que se formam nas peritecas, como também foi referido anteriormente, são lançados de forma explosiva nas correntes de ar e são transportados a grandes distâncias contribuindo para a dispersão da doença para áreas cada vez mais alargadas. Outra componente importante na transmissão da doença é o micélio do fungo que é diretamente transferido através dos instrumentos de corte para outras plantas quando se realizam atividades culturais como as podas e as enxertias. O inóculo entra na árvore por feridas naturais associadas ao crescimento dos ramos ou resultantes de atividades culturais como os realizados nas atividades de limpeza das árvores, podas e nas enxertias, presença de feridas provocadas pelos insetos e outros animais que naturalmente estão presentes nos castanheiros e por outras atividades de gestão do souto.

Todas as atividades culturais relacionadas com a poda, enxertia e corte de ramos potenciam a disseminação da doença nos soutos. Em Portugal estes fatores tiveram muita importância no início da epidemia, nos anos 90, uma vez que os produtores de castanheiro não conheciam a doença e continuaram a realizar as atividades culturais no castanheiro sem os cuidados necessários com a desinfeção do material de corte e sem aplicação de pastas fungicidas para proteção das feridas. Atualmente os produtores de castanheiro fazem a proteção dos cortes da poda e dos cortes sanitários dos ramos, utilizando os produtos com base em cobre e tendo assim diminuído a dispersão da doença.

Para a proteção das zonas da enxertia não existem ainda soluções satisfatórias. Muitas enxertias ficam inviáveis por infeção com *C. parasitica* uma vez que não existe material vegetal com garantia sanitária para realizar as enxertias e não se conhece o efeito das estirpes CHV1 no processo da enxertia.

5. Luta Biológica do Cancro do Castanheiro Baseado em Estirpes Hipovirulentas de *C. parasitica* (Estirpes CHV1)

A hipovirulência é um mecanismo biológico de cicatrização e recuperação das árvores que ocorre de forma natural na natureza e que está associada com a redução da agressividade do fungo parasita quando este possui no seu citoplasma o vírus CHV1 da família *Hypoviridae*.

Na Europa a luta biológica baseada na aplicação de estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* (hipovirulência) é o meio de luta mais eficaz e o recomendado pela European Food Safety Authority (EFSA) para controlar o cancro do castanheiro quando a doença está presente e não existem, de forma natural, estirpes hipovirulentas (EFSA, 2016).

O vírus designado CHV1 (*Cryphonectria hypovirus* 1) é o mais frequente (Suzuki et al., 2018) e a espécie mais utilizada nos diferentes programas de luta biológica na Europa.

A hipovirulência foi identificada pela primeira vez em Itália por Grente & Sauret em 1969 e aplicada em programas de experimentação de luta biológica de forma sistemática desde os anos 80 em França (Robin et al., 2000) e mais recentemente na Grécia (Diamandis, 2018). O método de luta biológica por hipovirulência mostrou elevada eficácia levando à cicatrização dos cancros e recuperação completa dos castanheiros atacados como pode ser observado na Figura 5 com a aplicação de estirpes CHV1 em Portugal.



Figura 5: Cancro cicatrizado e recuperação dos tecidos corticais do castanheiro depois de tratados com estirpes CHV1. (a,b) Dois anos depois do tratamento, (c) três anos depois do tratamento.

A presença do vírus CHV1 reduz a virulência do fungo *C. parasitica* (hipovirulência), modifica drasticamente alguns aspectos morfológicos do fungo hospedeiro como a pigmentação passando a apresentar colônias de cor branca e reduz ainda significativamente a capacidade de produzir esporos de origem assexuada. O vírus induz esterilidade feminina o que impede ou reduz a multiplicação sexuada das estirpes infetados com o vírus (Nuss, 2005).

Os hipovírus associados à hipovirulência em *C. parasitica* multiplicam-se apenas no seu fungo hospedeiro, não possuem uma fase exterior ao fungo, e são transmitidos para outros indivíduos através dos esporos assexuados (conídios) e das estirpes hipovirulentas para as estirpes agressivas do fungo por anastomose das hifas (Anagnostakis, 1987, Gobbin et al., 2003). A transmissão dos vírus através de esporos de origem sexuada (ascósporos) não é conhecida.

CAIXA1: Características dos vírus da Família Hypoviridae

A família *Hypoviridae* inclui apenas o género *Hypovirus*. São vírus sem capsídeo, possuem genoma RNA de sentido positivo (+ ssRNA), com 9,1–12,7 kb e possuem uma única ORF grande ou duas ORFs. As ORFs são traduzidas do RNA genómico por mecanismos que não seguem a estrutura mais usual, sendo mediada por um local interno do ribossoma (IRES) com paragem/reinício da tradução. Os hipovírus foram detetados em fungos filamentosos (ascomicetas e basidiomicetas) e são replicados nas vesículas lipídicas do complexo de Golgi, do seu fungo hospedeiro, que contém o RNA na forma replicativa. Alguns hipovírus induzem hipovirulência, enquanto outros não possuem essa capacidade.

Todos os vírus classificados no género *Hypovirus* infetam o fungo *Cryphonectria parasitica* associado ao cancro do castanheiro. Os hipovírus induzem virulência reduzida (hipovirulência) em *Cryphonectria parasitica* e morfologia alterada do fungo em cultura com alteração da pigmentação e reduzida ou nula produção de conídios. Alguns vírus relacionados com o género *Hypovirus* infetam outros fungos filamentosos, como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Valsa ceratosperma*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, e *Agaricus bisporus*. A infeção do micélio do fungo ocorre através da fusão ou anastomose de hifas infetadas com hifas não infetadas.

A frequência de transmissão do hipovírus por esporos assexuados (conídios) apresenta grande variabilidade, apresentando valores de percentagem de transmissão muito baixos a valores próximos de 100%. A transmissão dos vírus através de esporos de origem sexuada (ascósporos) não é conhecida.

Tabela 1: Características da Família Hypoviridae

Característica	Descrição
Organismo de referência	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i> , estirpe EP713 (M57938), espécie <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> , género <i>Hypovirus</i>
Virião	Vírus sem capsídeo incapaz de formar partículas rígidas
Genoma	9,1–12,7 kb de RNA linear de sentido positivo e não segmentado
Replicação	A replicação (síntese do RNA complementar) e a transcrição (síntese de RN genómico) ocorrem no citoplasma nas vesículas membranosas do complexo de Golgi
Tradução	Diretamente do RNA genómico bi ou monocistronico contendo um possível local de entrada ribossómica interna na região 5' não codificante
Hospedeiros	Fungos
Taxonomia	Um único género incluindo 4 espécies

Como apenas um género está atualmente reconhecido, a descrição do género corresponde à descrição da família

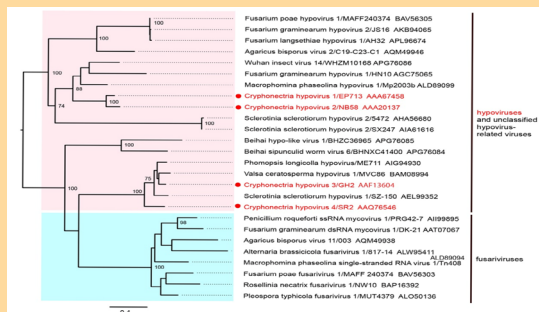


Figura 6: Análise filogenética molecular de hipovírus e vírus relacionados com a família Hypoviridae. O sombreado rosa indica vírus do género *Hypovirus* atribuídas a espécies (indicadas a vermelho) ou vírus relacionados a *Hypoviridae* mas ainda não classificados (indicados a preto). O sombreado azul indica fusarivirus ainda não classificados. A árvore está baseada nos fusarivirus como grupo externo. Os números nos nós indicam suporte de bootstrap acima de 70% (100 réplicas).

Adaptado de <https://ictv.global/report/chapter/hypoviridae/hypoviridae>, aceder para mais informação e bibliografia.

6. Etapas para Aplicação do Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro Baseado em Estirpes Hipovirulentas de *C. parasitica* - Estirpes CHV1

6.1. ETAPA 1.

6.1.1. - Estudos Científicos e Técnicos a Realizar (Pré- Aplicação)

Para garantir a eficácia da luta biológica por hipovirulência é necessário conhecer antecipadamente a estrutura genética da população do fungo parasita quanto ao sistema de incompatibilidade vegetativa (*vic* genes) uma vez que o hipovírus CHV1, presente nas estirpes hipovirulentas, é transmitido para os isolados virulentos do fungo pelo processo de anastomose das hifas. O processo só ocorre entre isolados da mesma espécie e com o mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (*vc* type) o que garante a este meio de luta elevada seletividade e especificidade.

Para que a anastomose entre hifas ocorra é necessário que sejam geneticamente compatíveis, ou seja, que sejam do mesmo tipo de compatibilidade vegetativa (*vc* type).

Um dos fatores determinantes do sucesso deste meio de luta biológico é conhecer a estrutura populacional dos *vc* type na população do fungo virulento presente nos locais a tratar. A luta biológica será tanto mais eficaz quanto mais reduzida for a variabilidade dos *vc* type na população do fungo presente nesses locais (Comejo et al., 2018).

6.1.2. - Estudo da Estrutura Genética (*vc* type) da População Virulenta do Fungo *C. parasitica* em Portugal (Pré- Aplicação)

Conhecer a estrutura genética da população virulenta do fungo quanto aos *vc* type é um requisito da maior importância uma vez que determina a seleção das estirpes hipovirulentas compatíveis a introduzir como agentes de controlo biológico e garante a transmissão do vírus pelo processo de anastomose.

A incompatibilidade vegetativa nos fungos é determinada geneticamente pelo conjunto dos *vic* genes e as reações de incompatibilidade pós-fusão ocorrem devido a diferenças nos loci dos *vic* genes. (ver Figura 12(A) e (B) - CAIXA 2).

Cada espécie de fungo tem um conjunto de genes (*vic*) que determinam a incompatibilidade vegetativa. Em *C. parasitica* estão identificados seis *vic* loci cada um com dois alelos o que determina 64 genótipos *vic* a que correspondem 64 tipos diferentes de *vc* type.

Em Portugal a estrutura populacional dos *vc* type caracteriza-se globalmente pela presença dominante do *vc* type EU11 em todas as regiões do castanheiro como pode ser observado na (Figura 7) (Bragança, 2007).

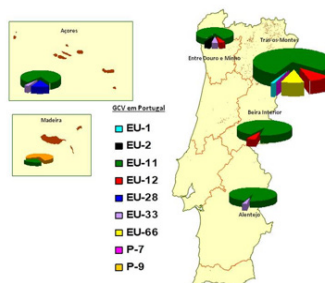


Figura 7: Distribuição dos *vc* types em Portugal.

No global foram identificados 9 vc type diferentes. Em Trás-os-Montes e Beira foram identificados 4 vc type: EU11, EU01, EU66, EU12. No Minho o grupo EU11 também é dominante e estão presentes em situação minoritária o EU01, EU12 e EU33. No Parque Natural da Serra de São Mamede (PNSSM-Marvão) foram identificados 2 vc type: EU11 e o EU33. Nos Açores estavam presentes três vc types diferentes, EU11, EU28 e o EU33. Na Madeira o vc type EU11 é um grupo minoritário e foi identificado um novo grupo denominado P9.

Estudos mais recentes realizados em Trás-os-Montes no contexto da aplicação do “Programa Experimental do Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro” realizados ao nível das diferentes freguesias do concelho de Bragança (Figura 8), 25 anos depois da introdução da doença, evidenciaram uma estrutura vc type semelhante à população de *C. parasitica* inicialmente estabelecida, com o aparecimento de apenas um novo vc type (EU02) numa das freguesias estudadas sendo, no entanto, nesse local o grupo dominante. Como evidenciado na Figura 8 o vc type EU11 é o grupo dominante e o mais difundido nas diferentes freguesias do concelho de Bragança. O vc type EU66 e o EU11 aparecem agrupados nos mapas das freguesias estudadas, uma vez que os estudos moleculares evidenciaram a capacidade de conversão do grupo EU11 e EU66 pela estirpe CHV1 utilizada como agente de controlo biológico. O EU12 continua presente e aparece como grupo minoritário em muitas das freguesias estudadas. Nos concelhos de Vinhais, Vimioso e Macedo de Cavaleiros os estudos realizados permitem o mesmo grau de conhecimento da estrutura da população do fungo virulento o que garante a escolha da formulação mais eficaz para os diferentes locais de aplicação.

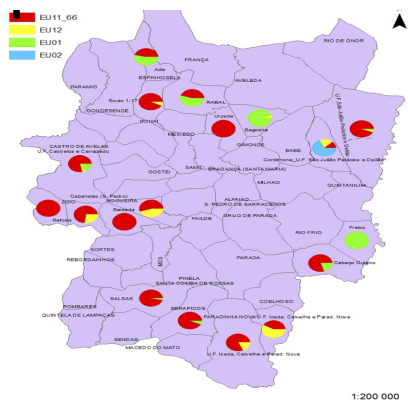


Figura 8: Distribuição dos vc types na região de Bragança.

O conhecimento da estrutura genética da população de *C. parasitica* ao nível da freguesia é uma estratégia de grande utilidade prática na região de Trás-os-Montes uma vez que garante a escolha criteriosa das estirpes CHV1 a introduzir em cada local.

No Minho o castanheiro apresenta uma distribuição descontínua e dispersa e com áreas de ocupação pouco extensas. A organização da produção é pouco estruturada o que tem dificultado a aplicação da luta biológica como meio preferencial de tratamento do cancro do castanheiro. No projeto Biochestnut - IPM estudou-se a estrutura vc type da população do fungo *C. parasitica*

em soutos localizados em Ponte de Lima, Ponte da Barca e Arcos de Valdevez. Concluiu-se que existe grande diversidade das populações de *C. parasitica* no Minho, predominando o grupo europeu EU11, mas estando também presentes os grupos EU01, EU02, EU12 e EU66. Contudo, é muito relevante que no conjunto dos soutos estudados, 27% dos isolados não ficaram incluídos em nenhum dos 5 vc type mais frequentes em Portugal.

Para a realização de ensaios de eficácia do tratamento dos cancro através da luta biológica, foi selecionado um soto localizado em Oleiros, Ponte da Barca, com prevalência do vc type EU11 (Figura 9). Todas as árvores que apresentavam cancro ativos foram georreferenciadas e foram tratados com estirpes CHV1 em agosto de 2020, usando a técnica da pincelagem de cancro. Em dois soutos onde a variabilidade da população de *C. parasitica* é elevada (Figura 9 e Figura 10), considerou-se não ser possível o tratamento dos cancro por aplicação das estirpes hipovirulentas disponibilizadas atualmente no bioproduto.

De destacar, no entanto, que nos soutos em estudo se observou a cicatrização e recuperação dos castanheiros por hipovirulência natural (Figura 11) que ocorre com alguma frequência em todas as sub-regiões estudadas no Minho. Conhecer e caracterizar os vírus presentes nestas populações e os mecanismos de dispersão entre as diferentes árvores do soto e nas diferentes regiões no Minho será importante para potenciar a eficácia da hipovirulência natural ou de introdução assistida para o controlo do cancro do castanheiro que continua a provocar elevada mortalidade das árvores quando introduzida numa região de produção de castanheiros onde anteriormente não existia.

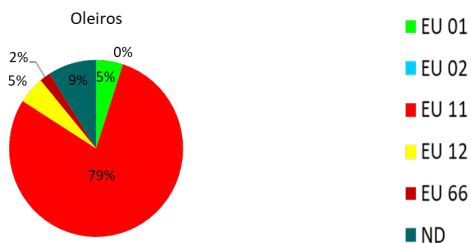


Figura 9: Estrutura populacional vc type de *C. parasitica* - Soto em Ponte da Barca, 2018-2019 (ND - Não Determinado)

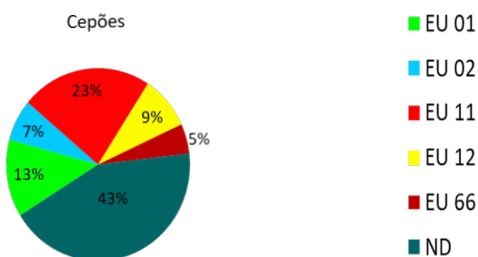


Figura 10: Estrutura populacional vc type de *C. parasitica* - Soto em Ponte de Lima, 2018-2019 (ND - Não Determinado)



Figura 11: Cancros curados por hipovirulência natural

No PNSSM-Marvão os estudos realizados no projeto Biochestnut - IPM revelaram que em dois dos três soutos havia uma prevalência de 100% do vc type EU11 e num terceiro souto revelou a existência de outros vc types diferentes de EU11. No que diz respeito à caracterização dos mating-types (MAT-1 e MAT-2), o MAT-1 foi predominante. Apenas uma amostra revelou o MAT-2. A presença de apenas um mating-type nos povoamentos ou de uma proporção desequilibrada entre os dois é favorável para a reprodução vegetativa do fungo o que reduz a diversidade genética na população e a presença de grupos de incompatibilidade vegetativa, permitindo a transmissão da hipovirulência na população de *C. parasitica*. Estas condições são essenciais para a aplicação de um programa de biocontrolo do fungo, o que se verificou nas duas parcelas selecionadas para aplicação do bioproduto formulado com a estirpe CHV1 compatível com o vc type dominante presente nos soutos.

6.1.3. - Outros Estudos Científicos e Técnicos a Concretizar (Pré-Aplicação)

Para que a luta biológica por hipovirulência possa ser aplicada pelos produtores de castanheiro é necessário concretizar muitos outros estudos dos quais é importante referir os seguintes:

- Obter, identificar e caraterizar estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* compatíveis com as estirpes virulentas do fungo dominantes nos diferentes locais.
- Produzir em laboratório o agente biológico e garantir a reprodutibilidade das características no decurso de “scale-up” do processo de produção.
- Garantir a qualidade dos produtos das formulações produzidas.
- Testar e validar os métodos e épocas de aplicação para o tratamento terapêutico dos cancros.
- Formar os aplicadores e divulgar o novo método e o novo produto.
- Cumprir as exigências e procedimentos legais resultantes da autorização oficial (DGAV) de utilização.

CAIXA 2: Anastomose e Incompatibilidade Vegetativa em Fungos Filamentosos

Durante o crescimento vegetativo dos fungos as hifas que crescem em estreita proximidade podem fundir-se num processo que se designa anastomose.

A anastomose nos fungos permite trocas citoplasmáticas e nucleares sendo também o processo mais usual para a transferência de vírus permitindo a sua passagem para estirpes não infetadas.

A incompatibilidade vegetativa nos fungos é determinada geneticamente. Em *C. parasitica* estão identificados seis vic loci cada um com dois alelos o que determina 64 genótipos vic a que correspondem 64 tipos diferentes de vc.

Para que a anastomose (fusão das células) ocorra e seja viável as estirpes têm que possuir todos os vic genes do mesmo tipo (Figura 12 (A)).

As reações de incompatibilidade pós-fusão ocorrem devido a diferenças nos loci dos vic genes (Figura 12 (A)).

Os genes de incompatibilidade vegetativa (vic genes) evitam trocas citoplasmáticas por incompatibilidade pré-fusão ou pós-fusão. A incompatibilidade pré-fusão é rara entre fungos da mesma espécie sendo a incompatibilidade pós-fusão a mais frequente. Inicialmente as hifas fundem-se, mas depois ocorre uma reação de incompatibilidade. As reações de incompatibilidade pós-fusão resultam na morte das células fundidas e também das que se encontram na sua proximidade, evitando assim trocas genéticas entre as duas estirpes.

A co-cultura (pareamento) de duas estirpes, em meios sintéticos, permite observar as reações de incompatibilidade vegetativa pós-fusão com a formação de uma zona de células mortas que ocorre quando as duas colónias se encontram, "barrage". A co-cultura de duas estirpes compatíveis forma uma única colónia com a fusão viável das hifas na zona de contato, "merge". Os isolados de *C. parasitica* pertencem ao mesmo vc type, ou seja, são vegetativamente compatíveis quando possuem os mesmos alelos em todos os vic loci (Figura 12 (A) e (B)).

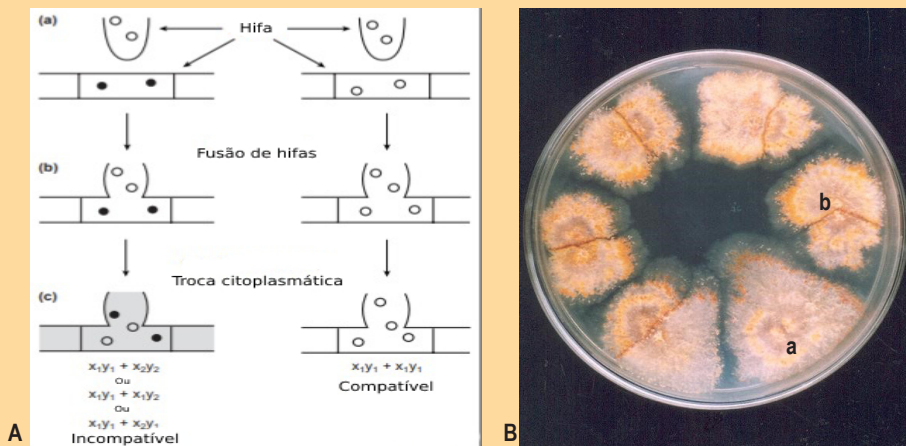


Figura 12: (A) - (a) contato das hifas, (b) fusão das hifas (c) trocas genéticas e citoplasmáticas. (B)- Co-cultura (pareamento) de cada isolado virulento com EU-testers de referência. (a) "merge" - Quando ocorre indica pareamento compatível, ou seja, do mesmo vc type. (b) "barrage"- Quando ocorre entre as duas colónias indica pareamento incompatível e os isolados são de grupos vc type diferentes.

6.2. ETAPA 2

6.2.1. Aplicação dos Tratamentos do Cancro do Castanheiro

O novo método para o tratamento do cancro do castanheiro é um meio de luta biológico baseado em estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* (Estirpes CHV1) muito seletivo e eficaz, desenvolvido pelo Instituto Politécnico de Bragança e autorizado pelo Ministério da Agricultura (DGAV) de acordo com o artigo 54º (investigação e desenvolvimento) do Regulamento (CE) nº1107/2009 de 21 de outubro complementado pelo Protocolo IPB/DGAV e respetiva prorrogação..

O bioproduto a aplicar para tratamento dos cancros foi desenvolvido especificamente para o tratamento do cancro do castanheiro em Portugal sendo distribuído aos aplicadores autorizados com o nome Dictis.

O Dictis é um bioproduto em aplicação experimental que não tem venda livre no mercado e só pode ser utilizado pelos aplicadores que aderem ao “Programa Experimental para tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com estirpes hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*.” pela assinatura informada do termo de referência.

Dictis é a formulação do agente biológico baseado em estirpes hipovirulentas obtidas em Portugal e distribuído aos aplicadores autorizados em frascos de 250 mL com rolha inviolável e etiquetado com as informações relacionadas com o modo de aplicação nos castanheiros, condições de conservação e identificação do lote de produção.

O Dictis aplica-se no tratamento dos cancros ativos nos troncos e ramos do castanheiro associados com o fungo *C. parasitica*.

Dictis é uma suspensão concentrada de Estirpes CHV1 autorizadas e depositadas na Micoteca da Universidade do Minho – MUM.

O Dictis pode conter apenas uma Estirpe CHV1 de determinado vc type ou conter uma mistura de Estirpes CHV1 de diferentes vc type para garantir a eficácia do tratamento.

As misturas das Estirpes CHV1 são decididas em função do conhecimento prévio da população do fungo virulento no local onde vai ser aplicado.

O Dictis pode ser aplicado durante todo o período de atividade vegetativa do castanheiro (março a novembro) para tratamento nos cancros ativos.

6.2.2. Métodos de Aplicação das Formulações das Estirpes Hipovirulentas

O bioproduto Dictis pode ser aplicado por furos ou por “pincelagem”. Deve ser colocado na extremidade dos cancros, na zona sã, mas o mais próximo possível da zona doente.

Os tecidos necrosados dos cancros não devem ser retirados dos castanheiros e devem ficar na árvore durante todo o processo de cicatrização dos cancros.

6.2.2.1. Aplicação por Furos

1º - Identificar a extremidade do cancro e encontrar a zona de tecido sã (ainda verde).

2º - Com um “vazador” fazer furos de 2,0 em 2,0 cm à volta do cancro.

3º - Com a ajuda de uma pipeta (fornecida) colocar o bioproduto em cada um dos furos.

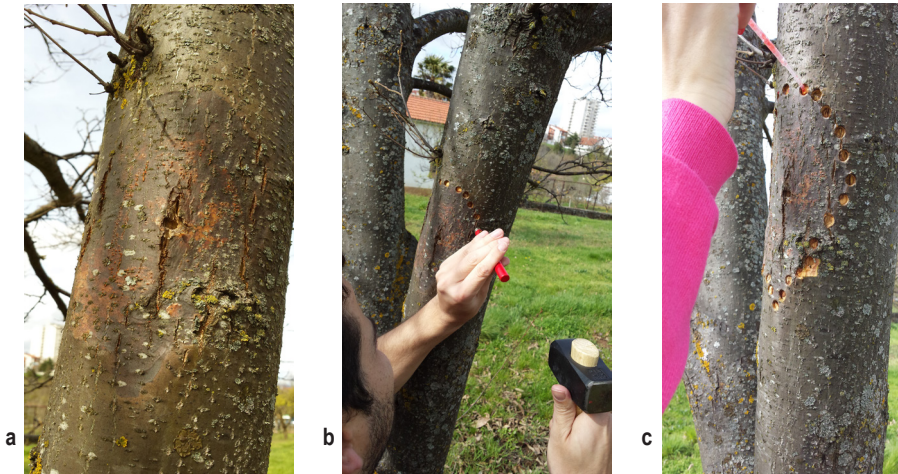


Figura 13: Aplicação por furos. (a)- Identificação do cancro ativo. (b) fazer furos de 2 em 2 cm com um vazador (c) com uma pipeta (fornecida) aplicar o bioproduto em cada furo.

6.2.2.2. *Aplicação por Pincelagem*

1º- Com um objeto cortante ou um “pico” fazer feridas pouco profundas na extremidade do cancro (zona entre o tecido são e o tecido doente) e ainda de forma dispersa por toda a superfície do cancro.

2º- Com um pincel (trincha) aplicar o bioproduto em toda a superfície escarificada



Figura 14: Aplicação por pincelagem. (a) escarificação por “pico”, escarificação dos tecidos, (c) pincelagem do bioproduto com uma trincha.

6.3. ETAPA 3

6.3. 1. Monitorização e Avaliação da Eficácia dos Tratamentos

O resultado do tratamento dos cancro com o novo bioproducto não é imediato sendo necessário algum tempo para que o agente biológico se instale na árvore e exerça o seu efeito curativo.

A primeira observação deve ser realizada 1-2 meses depois da aplicação do bioproducto e verificar se o cancro parou de crescer e não se observam tecidos infetados no exterior da zona tratada.

No entanto, se existe crescimento para fora da zona tratada numa pequena região do cancro deve de imediato ser feita a retificação do tratamento nessa zona e manter a observação da evolução da situação.

Se o cancro continua ativo e a infeção é observada no exterior de toda a zona tratada marcar a arvore com uma fita (tirar uma foto se possível) e reportar a localização do caso.

6.3.2. Estudo dos Casos de Falta de Eficácia

É possível que o tratamento dos cancro possa não ser eficaz em todos os casos e é mesmo previsível que possa acontecer numa percentagem muito reduzida de casos. É muito importante que estes casos sejam reportados e sejam avaliados para se encontrar uma solução alternativa e não constituam uma fonte de inóculo que perpetuará a doença.

A avaliação da falta de eficácia tem como objetivo determinar as causas do insucesso, nomeadamente as associadas à presença de um vc type diferente que determina diretamente a falta de eficácia ou dos fatores ambientais e de aplicação do tratamento que condicionam o estabelecimento do agente biológico.

O trabalho continuado de identificação e estudo da estrutura da população virulenta de *C. parasita* em Portugal, assim como a caracterização biológica e molecular dos isolados CHV1 obtidos na região e dos estudos de eficácia (Gouveia et al., 2010; Bragança et al., 2007) e da validação dos métodos e épocas de aplicação constituíram a base científica e de desenvolvimento experimental que possibilitou a autorização experimental e a introdução da hipovirulência como meio de luta preferencial para o tratamento do cancro do castanheiro em Portugal.

7. Exigências Legais e Concretização do Programa Experimental para Tratamento Experimental do Cancro do Castanheiro em Portugal

Em Portugal a autorização experimental da aplicação da luta biológica para tratamento do cancro do castanheiro baseia-se na concretização do protocolo entre o Instituto Politécnico de Bragança e o Ministério da Agricultura (DGAV) baseado num pedido de autorização fundamentado nos dados existentes que permitiu a concretização do “Programa Experimental para o Tratamento do Cancro do Castanheiro com base em estirpes hipovirulentas (estirpes CHV1) de *C. parasitica*”.

O protocolo estabelece as condições de utilização e as normas de atuação assim como as obrigações das diferentes entidades que participam no programa e do seu financiamento.

8. Entidades Envolvidas no desenvolvimento do Programa Experimental de Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro

O IPB implementa o Programa Experimental em parceria com diversas entidades interessadas no desenvolvimento deste método de luta biológica, nomeadamente:

- Associações dos Produtores de castanheiro
- Produtores individuais
- Municípios e outras entidades públicas.

As Associações de Produtores e os produtores individuais de castanheiro associam-se ao programa experimental mediante a assinatura de um termo de adesão, aceitando cumprir todas as normas pelas quais se rege o Programa Experimental de Tratamento Biológico do Cancro do castanheiro 2020-2025, sendo que participam em diversas fases do programa, nomeadamente na aplicação de formulações de estirpes hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* autorizadas pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (Dictis - nome de código atribuído pelo IPB) e contribuem para o financiamento do plano de experimentação.

Os Municípios, interessados em apoiar os produtores de castanheiro e as suas organizações e a economia do seu Município, associam-se igualmente ao Programa mediante a assinatura de um protocolo de cooperação com o IPB e contribuem para o financiamento do programa. Esta contribuição para o financiamento do programa pode traduzir-se na contratualização direta com o IPB de algumas fases de desenvolvimento do Plano Experimental em cada Município, ou na atribuição de um apoio aos produtores ou às organizações de produtores que queiram participar ativamente no programa experimental.

Podem ainda associar-se ao programa outras entidades, públicas ou privadas, interessadas em contribuir para o desenvolvimento do Programa.



Figura 15: Castanheiro recuperado depois da aplicação do Dictis, com cicatrização das feridas (5 anos depois de uma única aplicação).

9. Programa Experimental para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com Base em Estirpes Hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica* - Estirpes CHV1

Para a Eficácia do Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com Estirpes CHV1 é necessário concretizar as seguintes etapas:

Etapa 1 - Estudos Científicos e técnicos (Pré- Aplicação). Estudo da População do Fungo Parasita Presente nos Soutos, Produção e Formulação do Bioproduto, Desenvolvimento Experimental.

Etapa 2 - Tratamento dos Cancros, por furos ou pincelagem com as Estirpes CHV1 Compatíveis

Etapa 3 - Monitorização e Avaliação da Eficácia dos Tratamentos

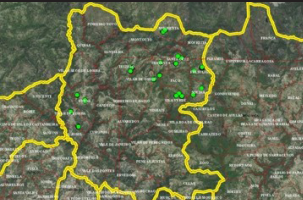




Etapa 4 – Cumprimento dos Compromissos Regulamentares Assumidos IPB, Produtores de Castanheiro, Associações de Produtores, Outras Entidades Autorizadas

Etapa 1 - Estudos Científicos e Técnicos (Pré- Aplicação)

Estudo da População do Fungo Virulento Presente nos Soutos.
Produção e Formulação do Bioproduto.

Entidade Coordenadora - Instituto Politécnico de Bragança (IPB)


Participação de Entidades do Ensino Superior (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Instituto Politécnico de Viana do Castelo IPVC), INIAV-IP, Ministério da Agricultura e Câmaras Municipais

Objetivos	Ações	
1- Conhecer a distribuição e severidade da doença nos soutos.	Prospecção e amostragem representativa da doença nos soutos das diferentes regiões de castanheiro em Portugal	
2- Conhecer a população do fungo que causa a doença presente nos diferentes locais.	Isolar, purificar e caracterizar a população do fungo que causa a doença <i>Cryphonectria parasitica</i> .	
3 - Conhecer a estrutura genética da população do fungo <i>C. parasitica</i> (vc type) que causa a doença nos castanheiros.	Estudos fisiológicos e moleculares para determinar a estrutura vc type da população de <i>C. parasitica</i>	
4- Conhecer a presença e distribuição de hipovirulência natural (Estirpes CHV1)	Estudos morfológicos e moleculares das estirpes CHV1	
Conhecer a estrutura populacional dos vc type nos diferentes locais	Métodos SIG e utilização de bases de dados com identificação dos vc type nas áreas a tratar	


Etapa 2 - Tratamento dos Cancros com Estirpes CHV1 Compatíveis

Instituto Politécnico de Bragança, Produtores de Castanheiro, Associações de Produtores / Outras Entidades

Tratamento dos Cancros com Estirpe(s) CHV1 - Aplicação por Pincelagem

Método de Aplicação/Execução	Aplicação por Pincelagem
<p>1º - Identificar a extremidade do cancro;</p> <p>2º - Com um objeto cortante fazer pressão para obter feridas pouco profundas na extremidade do cancro (zona entre o tecido são e o tecido doente);</p> <p>3º - Com um pincel (trincha) aplicar o bioproduto (Dictis) em toda a superfície escarificada.</p>	<p>Método fácil de executar e com maior capacidade de cicatrização dos cancros</p> 

Tratamento dos Cancros com Estirpe(s) CHV1 – Aplicação por Furos


Método de Aplicação/Execução	Aplicação por Furos
<p>1º - Identificar a extremidade do cancro.</p> <p>2º - Com um vazador fazer furos separados 1,5-2,0 cm à volta do cancro na zona são mas o mais próximo possível da zona doente.</p> <p>3º - Com a ajuda de uma pipeta (fornecida) colocar o bioproduto (Dictis) em cada um dos furos</p>	<p>Com um vazador fazer os furos na zona são na proximidade da zona infetada e aplicar também na zona interior do cancro</p> 

Etapa 3 - Monitorização e Avaliação dos Tratamentos dos Cancros com Estirpes CHV1

Avaliação da Eficácia dos Tratamentos

Instituto Politécnico de Bragança / Produtores de castanheiro/Associações de Produtores/
Outras Entidades

1ª Avaliação da Eficácia dos Tratamentos

Avaliação da Eficácia	Resultados do Tratamento
<p>O resultado do tratamento com o bioproduto não é imediato sendo necessário esperar algum tempo para exercer a sua ação curativa.</p> <p>A primeira indicação da eficácia do tratamento é a paragem do crescimento do cancro para o exterior da zona tartada (Observar 2 - 3 meses depois do tratamento).</p> <p>Com o tempo (1-3 anos) o cancro cicatriza e os tecidos vasculares ficam funcionais. Quando os cancros são muito extensos pode não fechar completamente.</p> <p>Cicatrização do cancro 3 anos depois do tratamento (Rio Bom).</p>	<p>Cicatrização do cancro 3 anos depois do tratamento (Rio Bom).</p> 

Etapa 4 - Cumprimento dos Compromissos Legais Assumidos

Todas as Entidades Envolvidas no Programa

Instituto Politécnico de Bragança, Produtores de Castanheiro, Associações de Produtores, Outras Entidades

O Programa Experimental para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com base em Estirpes Hipovirulentas CHV1 baseia-se num elevado nível de cooperação e colaboração entre os diferentes intervenientes, estabelecendo também as competências e obrigações de cada uma das entidades onde se incluem o cumprimento das as obrigações legais e regulamentares assumidas.

As Organizações de Produtores e os Produtores de Castanheiro colaboraram no desenvolvimento do Programa Experimental através da aplicação do agente biológico na sua área territorial e cumprem todas as normas de utilização aplicados aos produtos autorizados na proteção das plantas, devendo ainda em termos regulamentares no contexto do Programa Experimental:

- Aceitar submeter-se a um programa de monitorização e controlo e prestar todos os esclarecimentos que lhes forem solicitados, no âmbito do presente programa, pelo IPB ou pela DGAV;

- Todos os tratamentos realizados serão registados e fornecidos ao IPB. Por cada tratamento deverão obrigatoriamente ser registados os seguintes elementos: identificação do produtor, da parcela (com nº de parcelário), referência e quantidade do bioproduto utilizado, data da realização do tratamento, aplicadores envolvidos na aplicação, referência e quantidade de formulação utilizada e método de aplicação.

- Os aplicadores de formulações contendo estirpes hipovirulentas de *C. parasitica* deve ainda observar as precauções de utilização definidas pela DGAV.

Competem ao Instituto Politécnico de Bragança todos os aspetos científicos, técnicos e de desenvolvimento experimental para aplicação da luta biológica e inclui em termos de obrigações regulamentares o compromisso de informar a DGAV das atividades anuais desenvolvidas e coordenadas, ou seja:

- Submeter à DGAV no final do 1.º trimestre de cada ano subsequente ao ano de experimentação e enquanto durar o período experimental um relatório de todos os tratamentos realizados, onde devem constar: identificação do produtor, da parcela (com n.º parcelário), referência e quantidade de formulação utilizada, método de aplicação, número e data(s) de tratamento, identificação do(s) aplicador(es) envolvido(s) no tratamento.

10. Considerações finais

A introdução de espécies exóticas e invasoras constitui um elevado risco para os ecossistemas agrícolas e florestais e são fatores de degradação ambiental e perda de biodiversidade. O fungo *C. parasitica* muito virulento em castanheiro, quando introduzido em Portugal em 1989, provocou elevados prejuízos económicos. As medidas legislativas e de quarentena tiveram um alcance limitado no controlo da doença tendo a doença atingido rapidamente proporções epidémicas em todas as áreas de castanheiro. A hipovirulência, método biológico considerado muito eficaz no controlo do cancro do castanheiro (EFSA, 2016) foi desenvolvido para recuperar o ecossistema castanheiro e garantir o vigor das árvores atacadas em Portugal. Encontrar as melhores práticas e desenvolver as ferramentas de atuação e interação entre os diferentes participantes foi um dos objetivos do projeto GO - Biochestnut -IPM- implementar medidas de luta eficazes em castanheiro e amendoeira. A participação dos investigadores, técnicos e produtores de castanheiro assim como das diferentes entidades da organização da produção, da gestão do território e das entidades oficiais permitiram que se concretizasse a transferência de tecnologia e a adoção do novo método de luta biológica no tratamento do cancro do castanheiro. O sucesso alcançado traduz-se no tratamento de 4028 (parcelas) soutos e nos 59452 castanheiros recuperados garantindo assim a produtividade para os produtores, mas também a sustentabilidade e resiliência do ecossistema castanheiro de elevado valor ambiental nas regiões de montanha de Portugal.

O “Programa Experimental para o Tratamento Biológico do Cancro do Castanheiro com Base em Estirpes Hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*- Estirpes CHV1” resolve de forma eficaz e continuará a garantir a resiliência do ecossistema castanheiro a longo prazo.

No entanto, eventuais fatores que alterem a estabilidade da população virulenta do fungo, com a introdução de novas estirpes podem, potencialmente, reduzir a eficácia do controlo biológico. Em Portugal a população virulenta do fungo não se alterou de forma significativa durante os 25 anos que tem sido estudada, situação que também se verifica na Europa, onde a doença existe desde 1938 e a luta biológica por hipovirulência continua a desempenhar um papel importante no controlo da doença.

A comercialização de plantas para plantação de castanheiro entre diferentes países EU e mesmo dentro do mesmo país apresentam elevado risco de introdução de novas formas virulentas do fungo e assim originarem novos surtos epidémicos e redução da eficácia da hipovirulência pela introdução de desequilíbrios na estrutura populacional do fungo parasita. A qualidade sanitária das plantas para plantação é assim um requisito que apenas os esquemas oficiais de certificação podem garantir, mas que não foram desenvolvidos para o material de propagação de castanheiro Na Europa apenas se aplica ao material de propagação de castanheiro a exigência oficial de serem produzidas numa área onde não exista a doença e a realização de inspeção visual sanitária no local de produção.

Outros aspetos, incluídos nos princípios da Proteção Integrada, para garantir o vigor dos castanheiros e minorar as infeções dos troncos e ramos e, que todos os produtores de castanheiro devem ter em consideração, estão relacionadas com as medidas culturais a aplicar nos castanheiros e das quais de referem como primordiais as seguintes:

- evitar podas e cortes desnecessários,

- proteger todos os cortes com pastas fungicidas e/ou pastas cicatrizantes autorizadas,
- não podar em tempo chuvoso,
- desinfetar sempre os instrumentos de corte quando se realizam cortes nos castanheiros,
- em ramos sem viabilidade biológica fazer o corte 20 cm abaixo do cancro,
- queimar no local as partes doentes,
- obter material para enxertia em sotos sãos,
- não aplicar produtos fungicidas se fez tratamento com o novo bioproduto.

A luta biológica por hipovirulência baseia-se na redução da virulência do fungo fitopatogénico e está diretamente associado com a capacidade de expressão dos genes de virulência do fungo mediado pelo hipovírus CHV1 (*Cryphonectria hypovirus 1*). Os mecanismos moleculares que promovem a cicatrização dos cancos e a recuperação das árvores, que na natureza se evidencia de forma evidente e surpreendente, não são ainda completamente conhecidos. As novas técnicas de sequenciação (NTS) constituem uma nova ferramenta biotecnológica que permite conhecer e modular a expressão dos genes. As técnicas genéticas permitirão encontrar soluções para as doenças das plantas que poderão vir a estar disponíveis para as doenças dos ramos e troncos de grande importância económica em macieira, cerejeira, vinha e outras árvores florestais e agrícolas.

11. Bibliografia

Abreu, C., 1992. A hipovirulência como forma de luta natural contra o cancro do castanheiro. *Revista das Ciências Agrárias*, Vol. XV, 1–2: 167–169.

Anagnostakis, S.L., 1987. Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79: 23-37.

Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R., Rigling, D., 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal - Diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology*, 37: 391-402.

Bragança, M.H.P., 2007. Chestnut blight in Portugal: spread and populational structure of *Cryphonectria parasitica*. Tese de Doutoramento, Lisboa, 136p.

Cornejo, C., Šever, B., Kupper Q., Prospero S., Rigling, D., 2019. A multiplexed genotyping assay to determine vegetative incompatibility and mating type in *Cryphonectria parasitica*. *Eur J Plant Pathol* (2019) 155:81–91. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01751-w>.

Cortesi, P., Milgroom, M., 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64: 2988-2994.

Diamandis, S., 2018. Management of Chestnut Blight in Greece Using Hypovirulence and Silvicultural Interventions. *Forests*, 9, 492; doi:10.3390/f9080492

EFSA Panel on Plant Health, 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. *EFSA Journal* 2014;12(10):3859, 42 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3859. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2016. Scientific opinion on the risk assessment and reduction options for *Cryphonectria parasitica* in the EU. *EFSA Journal* 2016;14(12):4641, 54 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4641.

EPPO. 2022. <https://gd.eppo.int/taxon/ENDOPA/distribution> (consultado em 03/02/23).

Gobbin, D, Hoegger, P.J., Heiniger, U., Rigling, D., 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, 97: 39-46.

Gouveia, E., Coelho, V., Monteiro, M.L., 2010. Potential of local Hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* for biological control of chestnut blight. *Acta Horticulturae*, 866, 443–448.

Gouveia, E., Pereira, E., Araújo, A., Coelho, V., Castro, J., Bragança, H., Martins, L. 2016. Cancro do Castanheiro em Trás-os-Montes (Portugal): Incidência atual e estudo da estrutura populacional de *Cryphonectria parasitica* para a introdução da luta biológica por hipovirulência. *Gaia Scientia*, 10(2), 75–83.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M. and Ćurković Perica, M., 2008. Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. *Plant Pathology*, 57: 1086-1096. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01905.x>

Marra, R., Milgroom, M., 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity*, 86: 134-143.

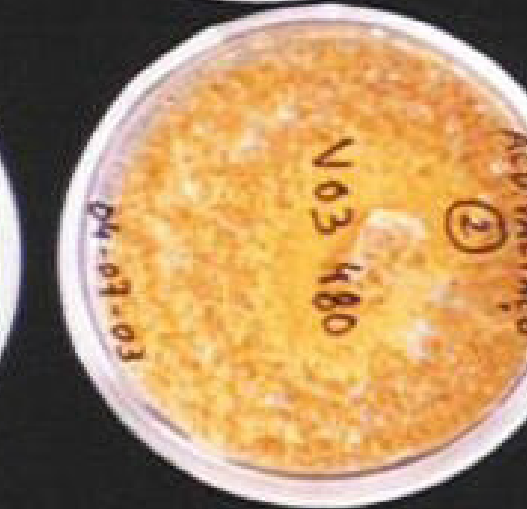
McGuire, I., Marra, R., Milgroom, M., 2004. Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 521-533.

Nuss, D.L., 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, p. 632-642.

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. 2005. Diagnostic PM/7(1), *Cryphonectria parasitica*, OEPP/ EPPO Bulletin, 35: 295-298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00836.x>.

Robin, C., Heiniger, U., 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research Editorial*, 76(3), 361–367.

Suzuki, N., Ghabrial, S.A., Kim, K., Pearson, M., Marzano, S.L., Yaegashi, H., Xie, J., Guo, L., Kondo, H., Koloniuk, I., Hillman, B.I., 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile. Hipoviridae. *Journal of General Virology*, 99: 615–616.





BioChestnut-IPM

Agradecimento: BioChestnut- IPM - Implementar estratégias de luta eficazes contra doenças do castanheiro e amendoeira - PDR2020-1.0.1-030943

