

# Tratamentos em campo com fungicidas e solução nutritiva em castanheiros: incidência de podridões e de *Gnomoniopsis smithogilvyi* na castanha pós-colheita

## Field trials with fungicides and nutrient solution in chestnut trees: incidence of rots and *Gnomoniopsis smithogilvyi* in post-harvest nuts

Ana Gomes<sup>1</sup>, Ana Sampaio<sup>1,2,\*</sup>, Paula Rodrigues<sup>3,4</sup> e José Gomes Laranjo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação e Tecnologia de Ciências Agroambientais e Biológicas (CITAB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801, Vila Real, Portugal

<sup>2</sup>Laboratório Associado Instituto para a Inovação, Capacitação e Sustentabilidade da Produção Agro-alimentar (Inov4Agro), UTAD, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

<sup>4</sup>Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), IPB, Campus de Santa Apolónia, 5300-253, Bragança, Portugal

(\*E-mail: [asampaio@utad.pt](mailto:asampaio@utad.pt))

<https://doi.org/10.19084/rca.27620>

Recebido/received: 2022.07.05

Aceite/accepted: 2022.10.24

### RESUMO

*Gnomoniopsis smithogilvyi* é o principal agente da podridão castanha em pós-colheita em castanhas representando uma ameaça à sustentabilidade do mercado Europeu. Com o objetivo de reduzir os níveis de infeção da castanha foi avaliado o impacto da aplicação de produtos comerciais, no campo, para o controlo de *G. smithogilvyi*. Árvores da variedade 'Bouche de Bétizac' com 8 anos foram tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens* e tebuconazol (2x em junho e 1x em julho) e óxido de silício (em junho, julho e agosto), aplicados por pulverização foliar. Foram colhidos 120 ouriços por tratamento para avaliação biométrica, 200 castanhas por tratamento para avaliação externa e interna e 10 castanhas por tratamento para a análise microbiológica no momento da colheita e após um e dois meses de conservação (4°C). Na análise biométrica as castanhas apresentaram melhores parâmetros perante a solução nutritiva. Nas análises microbiológicas, em todos os tratamentos foi detetado *G. smithogilvyi*, exceto nas castanhas tratadas com *B. amyloliquefaciens* ou tebuconazol no momento da apanha e, no caso do tebuconazol, após 1 e 2 meses de armazenamento (4°C). *B. amyloliquefaciens* poderá ser um substituto contra algumas podridões, e embora tenha tido algum efeito contra *G. smithogilvyi* após a apanha, é necessária mais investigação na sua capacidade em controlar este fungo. A atividade do tebuconazol contra *G. smithogilvyi* prolongou-se até dois meses de refrigeração. Porém, com a sua retirada do mercado europeu, os agentes de controlo biológicos como *B. amyloliquefaciens*, ou similares poderão ser uma alternativa.

**Palavras-chave:** castanhas, podridão castanha, souto, tebuconazol, *Bacillus amyloliquefaciens*, óxido de silício

### ABSTRACT

*Gnomoniopsis smithogilvyi* is the main causal agent of chestnut brown rot in post-harvest nuts, a threat to the sustainability in the European market. With the objective of reducing the infection levels in chestnuts, the impact of commercial products application in *G. smithogilvyi* control was evaluated at the field. Trees with 8-years-old of the 'Bouche de Bétizac' variety were treated with *Bacillus amyloliquefaciens*, tebuconazol (2x in June and 1x in July), and silicon oxide (in June, July and August), applied by foliar spray. For biometric evaluation 120 burrs per treatment were collected, 200 chestnut nuts per treatment for external and internal evaluation and 10 chestnuts nuts per treatment for microbiological analysis, after 1 and 2 months of storage (4°C). In the biometric evaluation, the nutrient solution treated chestnuts had the best parameters. In the microbiological analysis and for all treatments, *G. smithogilvyi* was detected, except in the chestnuts treated with *B. amyloliquefaciens* or tebuconazole, at the harvest, and the ones treated with tebuconazole after 1 and 2 months of storage (4°C). *B. amyloliquefaciens* could be a substitute against some rots, and although it had some effect against *G. smithogilvyi* after harvesting, more research is needed on its ability to control this fungus. Tebuconazole activity against *G. smithogilvyi* lasted up to two months of refrigeration. However, with its withdrawal from the European market, biological control agents such as *B. amyloliquefaciens*, or similar, could be an alternative.

**Keywords:** chestnuts, chestnut rot, grove, tebuconazole, *Bacillus amyloliquefaciens*, silicon dioxide

## INTRODUÇÃO

O fruto do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) é muito apreciado e tem uma importância económica elevada em Trás-os-Montes, no Nordeste de Portugal. A região é responsável por cerca de 80% da produção nacional de castanha, com 45 348 hectares dos 51 496 hectares de soutos em Portugal. (INE, 2021). A elevada qualidade da castanha nesta região foi reconhecida pela União Europeia com a Denominação de Origem Protegida (DOP) “Castanha da Terra Fria” (Regulamento (CE) N.º 1107/96; Rodrigues, 2010).

A produção de frutos saudáveis para a alimentação pode ser afetada em várias dimensões, por fatores abióticos e bióticos como as doenças e as pragas. Estes problemas podem comprometer a produtividade e, consequentemente, a qualidade dos frutos ao longo da cadeia de produção. Um dos principais e graves problemas da atualidade no setor são as podridões que ocorrem desde a pré-colheita, sendo especialmente grave na pós-colheita, com as condições de armazenamento e as infestações de insetos (Washington *et al.*, 1997; Sieber *et al.*, 2007; Migliorini *et al.*, 2010). Nesse contexto a podridão castanha (‘brown rot’), constitui mais um desafio para os produtores e a indústria transformadora (Lione *et al.*, 2019), tendo sido comprovado que o seu principal agente responsável é uma espécie recentemente descrita do género *Gnomoniopsis*, *Gnomoniopsis smithogilvyi* L.A. Shuttleworth, E.C.Y. Liew and D.I. Guest, também conhecido por *Gnomoniopsis castanea* (Visentin *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2012; Shuttleworth *et al.*, 2013; Maresi *et al.*, 2013; Dar & Rai, 2015; Dennert *et al.*, 2015; Lione *et al.*, 2019; Shuttleworth & Guest, 2017; Vannini *et al.*, 2017; Lione *et al.*, 2019). A espécie parece também estar associada ao aparecimento de cancrios da casca do castanheiro, tanto na Europa como na Ásia (Dar e Rai, 2015; Pasche *et al.*, 2016).

Os sintomas característicos da podridão castanha causada por *G. smithogilvyi* em castanhas traduz-se no aparecimento de alterações de cor e na degradação da textura, embora em alguns casos a castanha possa aparecer calcificada e desidratada (Visentin *et al.*, 2012; Maresi *et al.*, 2013; Shuttleworth *et al.*, 2013). É de realçar o facto de estes sintomas poderem aparecer somente durante o armazenamento, sendo detetados quando a

castanha é aberta e visualizado o seu interior. Porém, em alguns casos, *G. smithogilvyi* pode viver como endófito em castanhas assintomáticas, impedindo a deteção visual da doença pelos sintomas descritos anteriormente (Dennert *et al.*, 2015; Ruocco *et al.*, 2016).

Os métodos de diagnóstico mais fiáveis para a deteção/identificação de *G. smithogilvyi* dependem da realização de técnicas microbiológicas convencionais como o isolamento em meios de cultura, entre eles o Agar Extrato de Malte (MEA), Agar de Extratos de Malte e de Levedura (MYA) e o Agar de Batata e Dextrose (PDA), com a posterior identificação de isolados por meio de métodos morfológicos e/ou biomoleculares (Shuttleworth *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012). Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos de deteção direta deste fungo na castanha, como o “Loop Mediated Isothermal Amplification” (LAMP) em tempo-real, V-LAMP (visual-LAMP) e “Real-time quantitative PCR”, qPCR (Vettraino *et al.*, 2021).

A investigação a nível internacional tem incidido no desenvolvimento de tratamentos pós-colheita para controlar as podridões da castanha, recorrendo ao uso de armazenamento refrigerado como na Grécia, Itália e Suíça (Mencarelli, 2001; Jermini *et al.*, 2006; Vekiari *et al.*, 2007), o armazenamento em atmosfera controlada, na Itália (Mencarelli, 2001), e tratamentos de água quente na Grécia, Itália, Suíça e EUA (Mignani e Vercesi, 2003; Panagou *et al.*, 2005; Rieger, 2005; Jermini *et al.*, 2006). Na China, Grécia, Itália, Nova Zelândia e EUA, banhos de compostos com atividade antifúngica como iodo, hipoclorito de sódio, natamicina, ácido paracético e outros ácidos orgânicos têm sido utilizados/testados (Paglietta e Bounous, 1979; Giacalone e Bounous, 1993; Mencarelli, 2001, Kader, 2002; Mignani *et al.*, 2003; Panagou *et al.*, 2005; Klinac, 2006; Yang *et al.*, 2006; Donis-Gonzalez, 2008; Donis-Gonzalez *et al.*, 2010).

Desde 1973 os azóis são usados na agricultura, correspondendo a 16% do volume global de fungicidas (Jørgensen e Heick, 2021). Apesar da sua importância e eficácia, os azóis ou os metabolitos resultantes da sua degradação, apresentam elevada toxicidade para a vida aquática com efeitos permanentes, podendo mesmo causar danos nos organismos neonatos (EU, 2022a). Em consequência,

muitos compostos, em especial na Europa, têm sido retirados do mercado (propiconazol, bitertanol), ou sê-lo-ão brevemente (epoxiconazol, tebuconazol, difenoconazol e metconazol), podendo provocar um impacto significativo no combate às doenças fúngicas, a curto e a médio prazo (Jørgensen e Heick, 2021). Os tratamentos biológicos usando microrganismos antagonistas como bactérias ou fungos (e.g. *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp.) têm sido eficazes na redução de doenças *in vitro* (Pasche *et al.*, 2016) e *in situ*, com a vantagem de serem mais sustentáveis para o meio ambiente (Filho *et al.*, 2010).

O presente estudo teve como objetivo principal estudar o impacto da aplicação de um fungicida químico e um biológico e outras substâncias (soluções nutritivas), homologados para culturas agrícolas (mas não para *C. sativa*), por forma a reduzir, na pré-colheita, os níveis de infeção da castanha por *G. smithogilvyi*. O impacto das aplicações na produtividade e na incidência das podridões (podridão castanha e outras) foi avaliado no final dos ensaios de campo e após um mês e dois meses de refrigeração das castanhas a 4 °C.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Áreas de estudo

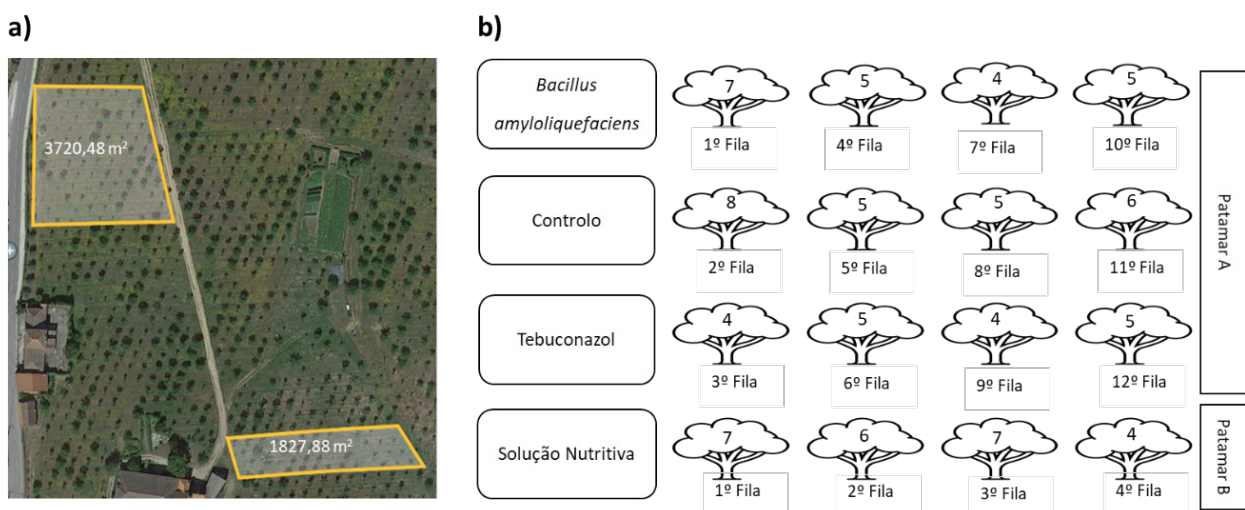
O presente estudo foi realizado ao longo do ano de 2021, num souto com castanheiros da variedade

‘Bouche de Bétizac’, com 8 anos de idade e à altitude de 508 – 525 m. A figura 1 (a) ilustra a área de estudo do souto.

### Descrição do Ensaio de Campo

As árvores dispostas em fileiras estão separadas entre si por 3 metros. Durante o período da floração (23, 30 de junho e 7 de julho de 2021) foram individualmente aplicados dois fungicidas, um químico (tebuconazol) e um biológico (*Bacillus amyloliquefaciens*), e uma solução nutritiva (óxido de silício, óxido de potássio, aminoácidos livres) aplicados a 30 de junho, 30 de julho e 30 de agosto. Os fungicidas foram aplicados em 4 linhas distintas e intercaladas, totalizando 12 linhas no patamar A (figura 1 (a)), com as 4 linhas do controlo (sem tratamento). A solução nutritiva foi aplicada em 4 linhas seguidas no patamar B como ilustra a Figura 1 (a). Todos os tratamentos foram aplicados por pulverização foliar. O número de árvores tratadas variou entre 18 e 24 conforme o tratamento (Figura 1 (b)). As fileiras de castanheiros não apresentavam o mesmo número de árvores devido à mistura de variedades presente no souto.

O Quadro 1 descreve os tratamentos aplicados no souto: produto, composição, princípio ativo, ação, dose e aplicação.



**Figura 1 -** a) Vista aérea do souto do estudo e b) Número de árvores por tratamento e em cada fila, nos patamares A e B.

**Quadro 1** - Descrição dos tratamentos aplicados no souto. Data das aplicações: Serenade® ASO e Horizon® - (23 e 30 de junho, 7 de julho 2021); Codasil - 30 de junho, 30 de julho e 30 de agosto 2021

Princípio ativo	Ação	Composição	Dose	Aplicação
<i>B. amyloliquifaciens</i> (Serenade® ASO)	Biofungicida de contacto com ação bacteriostática de largo espectro	Suspensão concentrada com 1.34% de <i>B. amyloliquifaciens</i> QST 713 (1 x 10 <sup>9</sup> ufc/g)	1 L/100 L	3 X
Tebuconazol (Horizon®)	Fungicida sistémico contra oídio da videira	Emulsão óleo em água com 250 g/L de tebuconazol	1 L/100 L	3 X
Óxido de silício, óxido de potássio, aminoácidos livres (Codasil)	Solução nutritiva	SiO <sub>2</sub> (26,10 p/v) + K <sub>2</sub> O (14,62 p/v) + aminoácidos livres (5,22 w/v)	360 mL/100 L	3 X

A recolha dos ouriços foi feita no dia 22 de setembro de 2021 (Quadro 2). Por fila foram colhidos 30 ouriços correspondendo 6-8 por árvore. Na apanha houve o cuidado de colher os ouriços de alturas e exposições solares diferentes. No laboratório, as amostras foram colocadas num lugar fresco e efetuada a avaliação morfológica e da produtividade o mais rápido possível por forma a minimizar as perdas de peso por desidratação.

### Qualidade externa

A qualidade externa dos frutos foi avaliada pela visualização de defeitos e sinais visíveis de danos pós-colheita: i) rachaduras; ii) sinais de infestação (presença de orifícios de saída causados pelo gorgulho da castanha); iii) sinais de infeção fúngica (crescimento de bolor visível), conforme descrito por Overy *et al.* (2003). Os sintomas observados fo-

**Quadro 2** - Parâmetros de avaliação e número de castanhas na respetiva amostragem

Parâmetros	Ensaio de campo
Avaliação da Produtividade	120 ouriços/tratamento (30 x 4filas)
Qualidade Externa	200 castanhas/tratamento (50 x 4filas)
Qualidade Interna	200 castanhas/tratamento (50 x 4filas)
Avaliação Microbiológica	10 castanhas/tratamento

### Avaliação da Produtividade

As amostras foram analisadas no Laboratório de Tecnologias Agro-ambientais da UTAD.

A produtividade foi avaliada pelos parâmetros: peso dos ouriços, com e sem castanhas, peso das castanhas, índice de fertilidade, aspeto (enrugadas *versus* lisas), cor das castanhas, número de castanhas bichadas e podres. O peso dos ouriços e das castanhas foi medido em gramas numa balança digital (Petit Balance MK - 200B) com capacidade de 200 g e precisão de 0,01 g. Após esta avaliação as castanhas foram mantidas separadas por tratamento e refrigeradas (4 °C) até ao seu processamento.

ram contabilizados para cada castanha de modo a calcular a percentagem média de infeção externa e de infestação por tratamento.

### Qualidade Interna

Após a inspeção externa, as castanhas foram imersas em lixívia comercial a 5% por 5 minutos, seguidas de três lavagens consecutivas com água destilada e estéril. As castanhas foram secas com papel absorvente e, imediatamente antes da avaliação interna, foram desinfetadas com etanol a 70%. Para a avaliação interna as castanhas foram cortadas longitudinalmente, desinfetando a faca de corte entre cada observação e considerando os seguintes parâmetros: presença/ausência de larvas, infeção

fúngica e tipo de podridão visível. A percentagem de superfície com podridão de cada castanha foi estimada visualmente para determinar o nível de infeção conforme proposto por Donis-González *et al.* (2016). Foram considerados cinco níveis de infeção: L0 (0%), L1 (1-25%), L2 (26-50%), L3 (51-75%) e L4 (76-100%).

### Avaliação microbiológica

A monitorização do efeito dos tratamentos sobre a carga microbiana das castanhas foi feita imediatamente na pós-colheita e após um mês e dois meses de refrigeração (4 °C). Em cada tratamento, foram separadas 10 castanhas saudáveis por tratamento para a pesquisa de fungos contaminantes, principalmente de *G. smithogilvyi*. Em cada castanha foram assepticamente retiradas de cinco partes diferentes provenientes do hilo, cotilédone, embrião, lado direito e esquerdo, e inoculadas em placa de Petri de 9 cm com meio PDA. Das 200 castanhas por tratamento da avaliação interna e de todas as que apresentavam podridão visível no seu interior, foi adotado o procedimento anterior. Após a inoculação as placas foram fechadas com parafilme® e incubadas a 25 °C por 14 dias. A identificação de *G. smithogilvyi* foi feita por características culturais e microscópicas por comparação com culturas puras existentes no laboratório e identificadas por biologia molecular a partir das sequências consenso da região ITS (códigos de acesso GenBank OK326904, OK326907 e MW165483). As nossas culturas de referência estão depositadas na Micoteca da Universidade do Minho (MUM) sob os códigos MUM 21.76 (=UTAD3), MUM 21.79 (=UTAD6) e MUM 20.139 (=IPB-GS1).

Todas as amostras foram tratadas em condições assépticas numa câmara de biossegurança BSL2,

a fim de evitar qualquer tipo de contaminação secundária.

### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando os programas EXCEL 2010 e STATISTICS 12, Versão 20. A análise envolveu a estatística descritiva (médias e respetivos desvios-padrão e percentagens).

Para comparar médias de amostras independentes, foram utilizados testes não paramétricos, como o teste ANOVA Ranks de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas (Z-teste). A hipótese nula foi rejeitada quando o nível de significância crítica foi inferior a 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da Produtividade

Com base nos resultados obtidos, em termos de produtividade, o Quadro 3 apresenta os pesos médios dos principais parâmetros avaliados no ensaio. A média de valores para o ouriço completo e das castanhas bem formadas foi superior em todos os tratamentos realizados quando comparados com o controlo, excetuando o tratamento com tebuconazol, onde os valores médios de todos os parâmetros biométricos foram inferiores. Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nos pesos 'ouriço completo' ( $p < 0,001$ ), 'ouriço' ( $p < 0,0001$ ), e 'castanhas bem formadas' ( $p < 0,0001$ ). No Quadro 3 encontra-se assinalado as comparações múltiplas entre os vários tratamentos. No parâmetro 'castanhas bem formadas' não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos controlo/agente de controlo biológico, e controlo/

**Quadro 3** - Avaliação da produtividade dos tratamentos efetuados no souto. Valores médios e desvios-padrão (DP) dos parâmetros: ouriço completo, ouriço, castanhas bem formadas (n=120).

Tratamento	Ouriço completo (g)	Ouriço (g)	Castanhas bem formadas (g)
Controlo	77,8±21,7 <sup>a</sup>	30,8±9,0 <sup>a</sup>	18,2±6,4 <sup>a, b, d</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	78,7±26,1 <sup>a</sup>	30,4±11,3 <sup>a</sup>	17,6±7,6 <sup>a, b</sup>
Tebuconazol	48,4±14,2 <sup>b</sup>	23,7±7,5 <sup>b</sup>	8,6±3,1 <sup>c</sup>
Solução nutritiva	82,3±29,8 <sup>a</sup>	32,3±11,5 <sup>a</sup>	20,8±7,8 <sup>a, d</sup>

Letras iguais significam ausência de diferenças significativas ( $p > 0,05$ )

solução nutritiva. No entanto, existiram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos agente de controlo biológico/solução nutritiva. Em termos de produtividade (peso/castanha), o tratamento com tebuconazol foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior à dos restantes, seguindo-se do tratamento com *B. amyloliquefaciens* e solução nutritiva.

### Qualidade Externa e Interna

Os resultados obtidos na avaliação externa estão apresentados no Quadro 4. A maior percentagem de danos, ranhuras ou fissuras na casca da castanha, foi registada nas amostras nos tratamentos com tebuconazol (4,5%) e *B. amyloliquefaciens* (3,5%), embora em valores relativamente baixos. As castanhas de todos os tratamentos apresentaram mais sinais de infestação e de podridões do que o controlo, embora a diferença não seja significativa. É também de salientar diferenças na maturação nas castanhas tratadas com tebuconazol, onde as castanhas imaturas ou verdes representaram 14,5% e 3,5%, respetivamente. No momento da apanha dos frutos, os castanheiros tratados com tebuconazol apresentavam folhas secas e acastanhadas, que poderão ter afetado a produtividade fotossintética e, deste modo, atrasado o desenvolvimento dos frutos, relativamente ao controlo.

Relativamente à Qualidade interna (visual) os níveis de infeção fúngica foram baixos, predominando o nível L1; em nenhum dos tratamentos não se observou níveis acima de L2 (Quadro 5). O nível mais elevado, L2 foi observado nas amostras do tratamento com *B. amyloliquefaciens* (0,5%). Nas amostras tratadas com tebuconazol não foi detetada infeção fúngica visível em nenhuma castanha.

A presença de larvas não foi detetada em nenhuma das castanhas tratadas.

As castanhas avaliadas como saudáveis, por inspeção visual, e sobrantes do ensaio, foram refrigeradas e, após um e dois meses, inspecionadas internamente para determinar os níveis de infeção fúngica. Este acompanhamento foi realizado nas mesmas condições das avaliações anteriores, mas com um número menor de castanhas para cada tratamento ( $n = 10$ ). É de referir que, nas inspeções externas das castanhas, após um e dois meses de armazenamento não foram detetados danos, sinais de infestação ou de podridão em nenhum tratamento. Os resultados da inspeção interna observados nas castanhas dos diferentes tratamentos estão apresentados no Quadro 6. No momento da colheita o nível máximo de infeção fúngica encontrado foi o L2 e as percentagens de infeção variaram entre os 0 - 2%. Após um mês de armazenamento, e para o nível de infeção L1, as percentagens de

**Quadro 4** - Qualidade externa das castanhas nos diferentes tratamentos do ensaio de campo, expressa em %, de: danos, infestação, podridões, castanhas imaturas e castanhas verdes ( $n = 200$  castanhas/tratamento)

Tratamento	Danos	Infestação	Podridões	Imaturas	Verdes
Controlo	1,5	0,0	0,0	1,0	0,0
Tebuconazol	4,5	0,5	1,0	14,5	3,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,5	1,0	1,0	2,5	0,0
Solução nutritiva	1,0	1,0	0,5	1,5	1,0

**Quadro 5** - Qualidade interna das castanhas (observação visual) nos diferentes tratamentos do ensaio de campo. Níveis de infeção (L0 (0%), L1 (1-25%), L2 (26-50%), L3 (51-75%) e L4 (76-100%) e tipo de podridão (%) (castanha, negra) ( $n = 200$  castanhas/tratamento)

Tratamento	Infeção fúngica (%)				Tipo de podridão (%)	
	L1	L2	L3	L4	Castanha	Negra
Controlo (a)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
Tebuconazol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1,0	0,5	0,0	0,0	1,0	0,5
Solução nutritiva	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0

**Quadro 6** - Avaliação interna das castanhas nos diferentes tratamentos do ensaio de campo depois de um e dois meses de armazenamento. Níveis de infecção fúngica (L0 (0%), L1 (1-25%), L2 (26-50%), L3 (51-75%) e L4 (76-100%) e tipo de podridão (%) castanha, outras. (n= 10 castanhas/tratamento)

Armazenamento	Tratamento	Infecção fúngica (%)				Tipo de podridões (%)	
		L1	L2	L3	L4	Castanha	Outras
1 mês	Controlo	40	0	0	0	40	0
	Tebuconazol	0	0	0	0	0	0
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	20	0	0	0	20	0
2 meses	Solução nutritiva	40	0	0	0	40	0
	Controlo	10	0	0	40	50	0
	Tebuconazol	20	0	0	10	30	10
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	50	0	30	80	0
	Solução nutritiva	0	20	0	40	50	10

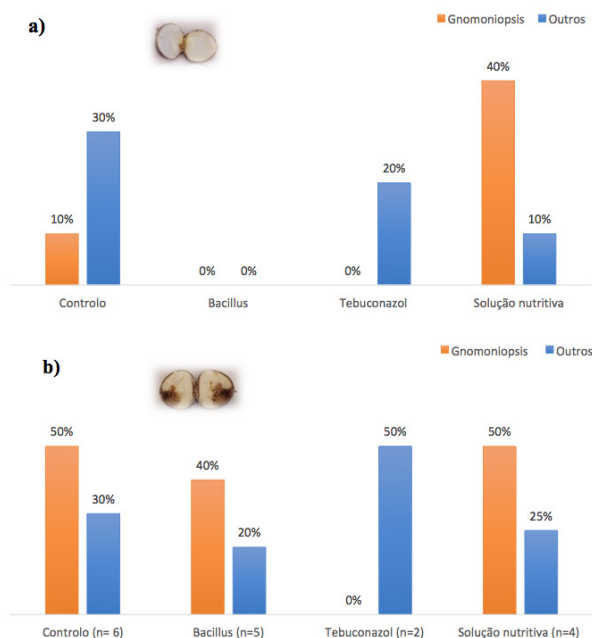
infecção variaram entre os 0 - 40%. Após dois meses de refrigeração, o nível máximo foi atingido nas castanhas de todos os tratamentos (L4), com percentagens entre os 10 - 40%. As amostras do tratamento com tebuconazol foram as que apresentaram menores níveis de infecção fúngica, quer no momento da colheita, quer após um mês de armazenamento não apresentando sinais visuais de infecção fúngica (0%). Só ao fim de dois meses é que apresentaram sinais de infecção, cerca de 20% (L1) e 10% (L4). Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Driss (2019), que reportou níveis de infecção de nível L4 em castanhas armazenadas não esterilizadas das variedades ‘Martainha’ e ‘Longal’.

### Avaliação microbiológica

Na avaliação microbiológica das castanhas saudáveis, i.e., sem sinais visuais de infecção fúngica (Figura 2), *G. smithogilvyi* foi detetado nas castanhas do controlo (10%) e no tratamento com a solução nutritiva (40%). Curiosamente, para as restantes podridões, estas foram expressivas em ambos os controlos (30%). No tratamento com tebuconazol 20% das castanhas apresentavam podridões, estando, no entanto ausente a podridão castanha.

Das castanhas com sinais visíveis de podridão (Figura 2b) e pertencentes aos grupos controlo, solução nutritiva e *B. amyloliquefaciens*, entre 40 a 50 % estavam contaminadas com *G. smithogilvyi*.

No geral e em relação à avaliação microbiológica, o tratamento com tebuconazol foi mais eficaz no

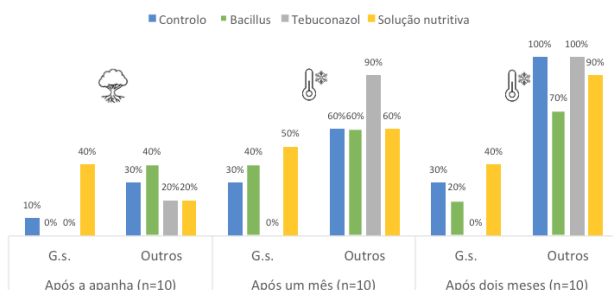


**Figura 2** - Percentagem de castanhas contaminadas com fungos: a) sem infecção visível (n=10 castanhas/tratamento) e b) com infecção visível (n= todas as castanhas com podridão visível).

combate contra *G. smithogilvyi*, pois não foi detetada nenhuma castanha contaminada com este fungo. Num estudo onde discos de batata-doce foram infetados com *Ceratocystis fimbriata*, o agente da podridão negra na batata-doce, seguindo-se a aplicação da mistura tebuconazol + trifloxistrobina, houve a inibição do crescimento de micélio de *C. fimbriata* (Mohsin *et al.*, 2021). Num estudo recentemente publicado foi avaliada a atividade *in vitro* e *in situ* de vários fungicidas contra *G. smithogilvyi*. Os fungicidas mais eficazes *in vitro* foram os que

tinham como princípios ativos o difenoconazol ou a piraclostrobina. Nos ensaios de campo, a combinação destas duas substâncias mostrou ter grande eficácia, diminuindo os níveis de infecção nas castanhas (Silva-Campos *et al.*, 2022). As duas substâncias pertencem a grupos químicos distintos: a piraclostrobina é um metoxi-carbamato, enquanto o difenoconazol é um triazol, tal como o tebuconazol, testado no presente trabalho. O tebuconazol é um fungicida usado para controlar podridões em culturas de hortícolas, forrageiras, oleaginosas, frutícolas, flores e plantas ornamentais (EPA, 2012). Entre as frutícolas, é usado na líchia, prunóideas, noqueira-pecã, entre outras. Porém, na Europa, não está homologado para o castanheiro.

A Figura 3 apresenta os valores médios percentuais dos resultados microbiológicos obtidos desde a apanha da castanha até dois meses de armazenamento a temperatura de refrigeração (4 °C).



**Figura 3** - Distribuição dos valores percentuais microbiológicos obtidos ao longo do armazenamento das castanhas dos respectivos tratamentos. G.s. – *G. smithogilyvi*; Outros – outros bolores.

Perante os resultados obtidos nas análises microbiológicas para a pesquisa de *G. smithogilyvi* ao longo do armazenamento (Figura 3), conclui-se mais uma vez que o tratamento tebuconazol foi o mais eficaz contra *G. smithogilyvi* ao longo de 2 meses de armazenamento a 4 °C. Em contrapartida verificou-se um aumento gradual das outras podridões fúngicas nas castanhas de todos os tratamentos, incluindo nas do tebuconazol. Também Washington *et al.* (1997) verificaram que a incidência da colonização fúngica em castanhas saudáveis armazenadas a 0 °C variava bastante ao longo de 152 dias, mostrando que as castanhas colonizadas no momento da colheita, em especial com fungos endófitos, têm o potencial de causar podridões. Mais recentemente Driss (2019) concluiu que a

proliferação de fungos aumenta com o período de armazenamento das castanhas. Estes resultados reforçam a necessidade de controlar a carga fúngica das castanhas no campo, de modo a diminuir a podridão destes frutos na pós-colheita. O tratamento com tebuconazol mostrou ser capaz de inibir a carga microbiana no momento da colheita e a podridão castanha, i.e. por *G. smithogilyvi*, ao longo do armazenamento (2 meses). Apesar do resultado promissor, o tebuconazol só poderá ser usado até 31 de agosto de 2023, por determinação da Comissão europeia (EU, 2022b). É pois importante encontrar alternativas eficazes. O tratamento com *B. amyloliquefaciens* poderia ser uma alternativa ao tratamento com tebuconazol. No presente trabalho, a aplicação de *B. amyloliquefaciens* mostrou ser menos eficaz contra *G. smithogilyvi*, apesar de alguma eficácia na redução das restantes podridões, quer na colheita quer na pós-colheita - máximo de 70% de contaminação após 2 meses de armazenamento, contra 90% no tebuconazol.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo atentam para a atual problemática do setor da castanha, relacionada com a podridão castanha causada por *G. smithogilyvi*, o principal agente desta podridão, sendo o seu controlo importante para garantir a sustentabilidade do mercado Europeu. O controlo deste agente na pré-colheita reduziria os níveis de infecção nas castanhas, e o seu impacto económico. Nos vários tratamentos propostos, no tratamento com a solução nutritiva as castanhas apresentaram parâmetros biométricos mais favoráveis quando comparadas com as dos outros tratamentos. Já as castanhas tratadas com tebuconazol apresentaram algum atraso na maturação e mais danos externos ao nível da casca, embora não sejam significativos. Na qualidade interna, as castanhas tratadas com a solução nutritiva apresentaram níveis de infecção fúngica mais elevados, comparativamente aos restantes tratamentos. Pelo contrário, os tratamentos com tebuconazol e com *B. amyloliquefaciens* foram mais eficazes, respetivamente, contra a podridão castanha e as outras podridões. Assim, o fungicida tebuconazol foi o mais eficaz no controlo pré-colheita e pós-colheita (até 2 meses) de *G. smithogilyvi*. Como este composto será banido a partir de setembro de 2023, é urgente encontrar tratamentos



alternativos. Os agentes de controlo biológico como *B. amyloliquefaciens* poderão ser um substituto contra algumas podridões, sendo necessário mais investigação na sua capacidade em controlar *G. smithogilyoi*.

## AGRADECIMENTOS

Projeto “ValorCast - Valorização da castanha e otimização da sua comercialização” no âmbito da Ação 1.1 «Grupos Operacionais», integrada na

Medida 1. «Inovação» do PDR 2020 – Programa de Desenvolvimento Rural do Continente (PDR2020-101-032030), financiado pelo Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural (FEADER) e Estado Português. AG agradece pelo financiamento da Bolsa de Investigação (BI/UTAD/5/2021), do ValorCast. AG, AS, JGL agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro através de fundos nacionais FCT/MCTES ao CITAB (UIDB/04033/2020) e Inov4Agro (LA/P/0126/2020). PR agradece ao CIMO (UIDB/00690/2020) e ao SusTEC (LA/P/0007/2020).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dar, M.A. e Rai, M.K. (2015) - *Gnomoniopsis smithogilyoi* a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report. *Mycosphere*, vol. 6, n. 3, p. 327–336. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/3/8>
- Dennert, F.G.; Broggin, G.A.L.; Gessler, C. e Storari, M. (2015) - *Gnomoniopsis castanea* is the main agent of chestnut nut rot in Switzerland. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 54, p. 41–53. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14712](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14712)
- Donis-González, I.R.; Guyer, D.E. e Fulbright, D.W. (2016) - Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible 41 chestnuts in Michigan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 96, n. 13, p. 4514–4522. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7667>
- Donis-Gonzalez, I.R. (2008) - *Management of Microbial Decay of Fresh and Peeled Chestnuts in Michigan*. M.Sc. Thesis. Michigan State University.
- Donis-Gonzalez, I.R.; Ryser, E.T.; Guyer, D. e Fulbright, D.W. (2010) - Shell mold and kernel decay of fresh chestnuts in Michigan. *Acta Horticulturae*, vol. 866, p. 353–358. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.866.45>
- Driss, J.O. (2019) - *Chestnut rots: disease incidence and molecular identification of causal agents*. Dissertation for Master Degree in Biotechnological Engineering, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. [cit. 2022-03-20].
- EU (2022a) - *Inventário de C&R*. [cit. 2022-06-16].
- EU (2022b) - *Base de Dados de Pesticidas da UE Substância ativa*. [cit. 2022-06-16].
- EPA (2012) – Tebuconazol 3.6F Fungicide. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC20460. [cit. 2022-06-16] [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/069361-0002720121218.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/069361-0002720121218.pdf)
- Filho, R.; Ferro, H. e Pinho, R. (2010) - Controlo biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, vol. 4, n. 2, p. 12.
- Giacalone, G. e Bounous, G. (1993) - Tradizione e innovazione nella trasformazione nell'utilizzo delle castagne. *Monti e Boschi*, vol. 5, p. 33–34.
- INE (2021) - *Estatísticas Agrícolas 2020*. (em linha). Instituto Nacional de Estatística, Lisboa.
- Jermi, M.; Conedera, M.; Sieber, T.N.; Sassella, A.; Schärer, H.; Jelmini, G. e Höhn, E. (2006) - Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 86, n. 6, p. 877–855. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2428>
- Jørgensen, L.N. e Heick, T.M. (2021) - Azole use in agriculture, horticulture, and wood preservation – is it indispensable? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 11, art. 730297. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.730297>
- Kader, A.A. (2002) - *Produce facts chestnuts. Recommendations for maintaining post-harvest quality and safety. Post-harvest Technology. Maintaining produce quality*. Department of Pomology. University of California, Davis. <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/chestnut/> [cit. 2022-06-16].

- Klinac, D.J. (2006) - *Chestnut. Guidelines for handling and storage of chestnuts*. New Zealand Chestnut Council. New Zealand. <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/chestnut/> [cit. 2022-06-16] .
- Lione, G.; Giordano, L.; Sillo, F. e Gonthier, P. (2015) - Testing and modelling the effects of climate on the incidence of the emergent nut rot agent of chestnut *Gnomoniopsis castanea*. *Plant Pathology*, vol. 64, n. 4, p. 852–863. <https://doi.org/10.1111/ppa.12319>
- Lione, G.; Danti, R.; Fernandez-Conradi, P.; Ferreira-Cardoso, J. V.; Lefort, F.; Marques, G.; Meyer, J. B.; Prospero, S.; Radócz, L.; Robin, C.; Turchetti, T.; Vettraino, A. M. e Gonthier, P. (2019) - The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: the challenge posed by a versatile fungus. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 153, n. 3, p. 671–685. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1597-2>
- Maresi, G.; Oliveira Longa, C.M. e Turchetti, T. (2013) - Brown rot on nuts of *Castanea sativa* Mill: An emerging disease and its causal agent. *IForest*, vol. 6, n. 5, p. 294–301. <https://doi.org/10.3832/ifer0952-006>
- Mencarelli, F. (2001) - *Postharvest handling and storage of chestnuts. "Working document of the project: TCP/CPR/8925 "Integrated Pest Management and Storage of Chestnuts in XinXian County, Henan Province, China"*. Food and Agriculture Organization United Nations. <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/chestnut/> [cit. 2022-05-26].
- Migliorini, M.; Funghini, L.; Marinelli, C.; Turchetti, T.; Canuti, S. e Zanoni, B. (2010) - Study of water curing for the preservation of marrons (*Castanea sativa* Mill., Marrone fiorentino cv). *Postharvest Biology and Technology*, vol. 56, n. 1, p. 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.001>
- Mignani, I. e Vercesi, A. (2003) - Effects of postharvest treatments and storage conditions on chestnut quality. *Acta Horticulturae*, vol. 600, p. 781-785. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.600.120>
- Mohsin, S.; Hasanuzzaman, M.; Parvin, K.; Masahiro Morokuma, M. e Fujita, M. (2021) - Effect of tebuconazole and trifloxystrobin on *Ceratocystis fimbriata* to control black rot of sweet potato: processes of reactive oxygen species generation and antioxidant defense responses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, n. 9, art. 148. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03111-5>
- Overy, D.P.; Seifert, K.A.; Savard, M.E. e Frisvad, J.C. (2003) - Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, n. 1, p. 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00086-2)
- Paglietta, R. e Bounous, G. (1979) - *Il castagno da frutto*. Edagricole. Bologna, Italia. p. 189.
- Panagou, E.Z.; Vekari, S.A.; Sourris, P. e Mallidis, C. (2005) - Efficacy of hot water, hypochlorite, organic acids and natamycin in the control of post-harvest fungal infection of chestnuts. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 80, n. 1, p. 61-64. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511892>
- Pasche, S.; Crovadore, J.; Pelleteret, P.; Jermini, M.; Mauch-Mani, B.; Oszako, T. e Lefort, F. (2016) - Biological control of the latent pathogen *Gnomoniopsis smithoglyvyi* in European chestnut grafting scions using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiology*, vol. 75, p. 113–122. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.075.011>
- CE (1996) - *Regulamento (CE) N.º 1107/96 da Comissão de 12.06.1996 – L 148/1*. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31996R1107&from=PT> [cit. 2022-07-04]
- Rieger, M. (2005) - *Chestnuts. Castanea spp. Introduction to fruit crops*. CRC Press, USA
- Rodrigues, P. (2010) - *Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialization*. Ph.D. thesis, Universidade do Minho, Escola de Engenharia.
- Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Lombardi, N.; Varlese, R.; Aliberti, A.; Carpenito, S.; Woo, S.; Scala, F. e Lorito, M. (2016) - New tools to improve the shelf life of chestnut fruit during storage. *Acta Horticulturae*, vol. 1144, p. 309-316. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.46>
- Shuttleworth, L.A.; Guest, D.I. e Liew, E.C.Y. (2012) - *Fungal Planet Description Sheet 107: Gnomoniopsis smithoglyvyi. Persoonia*, vol. 28, p. 142–143. <https://doi.org/10.3767/003158512X652633>
- Shuttleworth, L.A.; Liew, E.C.Y. e Guest, D.I. (2013) - Survey of the incidence of chestnut rot in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, vol. 42, p. 63–72. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0170-2>
- Sieber, T.N.; Jermini, M. & Conedera, M. (2007) - Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and molds. *Journal of Phytopathology*, vol. 155; n. 7-8, p. 497–504. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01269.x>

- Silva-Campos, M.; Islam, Md T. e Cahill, D.M. (2022). Fungicide control of *Gnomoniopsis smithogilvyi*, causal agent of chestnut rot in Australia. *Australasian Plant Pathology*, vol. 51, p. 483–494. <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00879-4>
- Vannini, A.; Vettraiño, A.; Martignoni, D.; Morales-Rodríguez, C.; Contarini, M.; Caccia, R.; Paparatti, B. e Speranza, S. (2017) - Does *Gnomoniopsis castanea* contribute to the natural biological control of the chestnut wasp? *Fungal Biology*, vol. 121, n. 1, p. 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.013>
- Vekiari, SA.; Panagou, E. e Mallidis, C. (2007) - The effects of cold storage on the quality of peeled, raw or blanched Greek chestnuts packed under vacuum. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 82, n. 6, p. 967-973. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512334>
- Vettraiño, A.M.; Luchi, N.; Rizzo, D.; Pepori, A.L.; Pecori, F. e Santini, A. (2021) - Rapid diagnostics for *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) in chestnut nuts: new challenges by using LAMP and real-time PCR methods. *AMB Express*, vol. 11, art. 105. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01266-w>
- Visentin, I.; Gentile, S.; Valentino, D.; Gonthier, P.; Tamietti, G. e Cardinale, F. (2012) - *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology*, vol. 94, n. 2, p. 411–419. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.045>
- Washington, W.S.; Allen, A.D. e Dooley, L.B. (1997) - Preliminary studies on *Phomopsis castanea* and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage. *Australasian Plant Pathology*, vol. 26, n. 1, p.37–43. <https://doi.org/10.1071/AP97006>
- Yang, X.H.; Liang, L.S. e Wang, G.X. (2006) - Effects of post-harvest treatment with sodium hypochlorite solution on the storage quality of chestnut in modified atmosphere cold storage. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, vol. 22, n. 9, p. 215-218.