

## Avaliação da resistência do castanheiro (*Castanea sativa*) a *Phytophthora cinnamomi*

Eugénia Madureira Gouveia<sup>1</sup> e Carlos Gomes Abreu<sup>2</sup>

### RESUMO

Para obter plantas de castanheiro (*Castanea sativa*) resistentes à doença da tinta é necessário desenvolver metodologias específicas que evidenciem a interação hospedeiro/parasita. Resultados válidos podem ser obtidos utilizando vários métodos. Neste trabalho avaliou-se a resistência de 8 clones de castanheiro a *Phytophthora cinnamomi*, fungo mais frequentemente associado com a doença da tinta, pelo método de inoculação em tecidos destacados. O micélio do fungo é inoculado em ramos destacados de castanheiro quando os crescimentos anuais apresentam 30-40 cm e colocam-se a incubar em condições adequadas de temperatura e humidade a que se segue a avaliação da dimensão da lesão. Os resultados obtidos estão correlacionados com os obtidos com outros métodos de avaliação da resistência; inoculação do solo e inoculação por ferida em planta intacta.

Esta metodologia permite avaliar a resistência de árvores adultas, testar elevadas quantidades de material vegetal num período de tempo relativamente curto, é fácil de realizar e torna mais objectivos os critérios de selecção de material resistente.

**Palavras Chave:** Doença da tinta do castanheiro, *Phytophthora cinnamomi*, avaliação da resistência.

### ABSTRACT

#### Assessing resistance of chestnut to *Phytophthora cinnamomi*

To obtain resistant plants of chestnut (*Castanea sativa*) to ink disease the development of specific methods is necessary indicating the nature of the interaction between host and pathogen. Valid results may be obtained using several methods. In this work the resistance of 8 chestnut clones to *Phytophthora cinnamomi* Rands, fungus commonly associated with ink disease, was assessed using the excised stem inoculation method. Micelium was inoculated in excised chestnut stems, when plant annual growth was approximately 30-40 cm long. Stems were incubated in suitable temperature and humidity conditions and the lesion extension was measured. Results were well correlated with those from others inoculation methods; infesting the potting medium and by wound inoculation technics.

This method allows the assesment of mature trees resistance, is easy to undertake and makes the selection criteria more objective.

**Key-words:** Chestnut ink disease, *Phytophthora cinnamomi*, assessing resistance

<sup>1</sup> Escola Superior Agrária de Bragança, 5300 BRAGANÇA

<sup>2</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5400 VILA REAL

## 1 – INTRODUÇÃO

*P. cinnamomi* é o fungo mais frequentemente associado à doença da tinta do castanheiro. A acção devastadora desta doença tem-se feito sentir em todas as regiões castaneícolas do país e do mundo, sendo considerada pela generalidade dos autores como a principal causa do declínio e desaparecimento dos soutos em Portugal.

O combate a esta doença, apesar dos esforços empreendidos ao longo de várias décadas, não se tem revelado eficiente e duradouro. A utilização de plantas resistentes é um meio de luta que conjugado com outros meios complementares de defesa, biológicos, químicos ou culturais poderá proporcionar uma estratégia de protecção a longo prazo contra este grave problema fitossanitário.

As técnicas de melhoramento utilizadas para obter plantas resistentes às doenças, são, no essencial, idênticas às utilizadas para as características hereditariamente transmitidas. No entanto para avaliar a resistência é necessário desenvolver metodologias específicas que evidenciem a interacção hospedeiro/parasita. Têm como principal objectivo obter infecções em condições ambientais definidas que permitam diferenciar os vários génotipos.

Para avaliar a resistência a *P. cinnamomi* várias metodologias têm sido utilizadas. A inoculação de solos e substratos, onde o hospedeiro se desenvolve, é uma metodologia que apresenta como principal vantagem o facto de avaliar a infecção nos órgãos que em condições naturais são infectadas pelo fungo. Como desvantagens são frequentemente referidas a variabilidade dos resultados obtidos e a dificuldade na manutenção e reprodução das condições ambientais. A avaliação da infecção será mais rigorosa se a inoculação das raízes for realizada com quantidades definidas de inóculo. Este objectivo é atingido pelo método designado "tank test" de Zentmyer & Mircetich (1965). Para que a inoculação das raízes ocorra de forma uniforme e permita diferenciar os génotipos é necessário que a concentração de zoósporos na suspensão seja ajustada a níveis adequados, previamente determinados por ensaios preliminares e as plantas sejam transferidas para substratos esterilizados que não interfiram com o desenvolvimento do inóculo.

Em castanheiro, Fernandes (1953, 1966) utilizou, com êxito, a inoculação por ferida em planta intacta. Consiste na inoculação de micélio do parasita na zona cambial do colo da planta, fazendo para isso uma incisão em T na qual se coloca o inóculo. Para obter resultados adequados o autor referido entendia ser necessário um período de 3 anos (e por vezes 4 anos) e trabalhar com elevado número de plantas envasadas para conseguir obter plantas resistentes. Metodologia semelhante foi utilizada por Tippet *et al.* (1985) para avaliar a resistência do *Eucalyptus* ssp. a *P. cinnamomi* quando se verificou que este parasita além de invadir as raízes jovens também invadia os tecidos do floema das raízes mais grossas e podia mesmo progredir nesses tecidos até à zona do colo da planta.

O método da inoculação por ferida, inicialmente realizado em plantas

intactas, foi posteriormente testado em órgãos vegetais destacados, nomeadamente em raízes e ramos. A constatação de elevada correlação entre os resultados obtidos por este método e os obtidos com a inoculação por zoósporos, inoculação do solo com micélio ou ainda com a inoculação de ramos em planta intacta determinou a sua utilização em muitas interações hospedeiro/*Phytophthora*: nomeadamente, *Banksia grandis*/*P. cinnamomi* (Dixon *et al.*, 1984), *Eucalyptus* ssp./*P. cinnamomi* (Tippet *et al.* 1985, Shearer *et al.* 1987), abacateiro/*P. cinnamomi* (Dolan & Coffey, 1986), *Chamaecyparis lawsoniana*/*P. lateralis* (Hansen *et al.* 1989), macieira/*P. cactorum* (Lemoine & Gaudin, 1991).

Apesar do artificialismo do método de inoculação em ramo destacado, os resultados obtidos por este processo são idênticos aos obtidos por processos mais naturais de inoculação, apresentando a grande vantagem de permitir testar grande quantidade de material num período de tempo relativamente curto em condições facilmente reproduzíveis e uniformizadas. A estas características acrescenta-se ainda o facto de se quantificar a resistência pelo desenvolvimento da lesão, obtendo-se assim valores de natureza quantitativa que possibilitam a análise estatística dos resultados.

A inoculação em folhas destacadas, apesar de raramente aparecer referida como método de avaliação da resistência nas interações hospedeiro/*Phytophthora*, foi utilizada por Telhada (1988) para avaliar a agressividade de diferentes espécies de *Phytophthora* que atacam os citrinos, tendo obtido com este método resultados semelhantes aos de outros métodos de inoculação.

Neste trabalho avalia-se a resistência do castanheiro a *P. cinnamomi* pelo método de inoculação em ramo destacado, utilizando-se como material vegetal clones de castanheiro de reacção conhecida a este agente fitopatogénico.

A utilização desta metodologia possibilita testar elevadas quantidades de material vegetal nas primeiras fases do melhoramento, ou seja aumentar a intensidade de selecção e obter resultados num período de tempo relativamente curto constituindo ainda um critério de selecção valioso na escolha do material resistente a propagar vegetativamente.

Avaliou-se ainda a resistência por inoculação em disco destacado de folha e utilizou-se o índice de Elston (1963) como critério de ordenação e selecção dos clones em estudo.

## 2 — MATERIAL

### 2.1 — Isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*

Como inóculo, utilizaram-se subculturas dos isolamentos UTAD 79 e UTAD 80, com origem em Trás-os-Montes e que o International Mycological Institute confirmou tratar-se de *P. cinnamomi* e lhe atribuiu o código IMI 335 488 e IMI 335 492, respectivamente.

## 2.2 — Material vegetal

Os clones de castanheiro, utilizados neste estudo, são clones cujo comportamento em relação à doença da tinta é conhecido. São clones resultantes de programas de melhoramento em relação a esta doença e foram anteriormente testados por inoculação por ferida em planta intacta.

Algum deste material foi legado por Taveira Fernandes e propagado vegetativamente pelo Centro de Estudos do Castanheiro em Alcobaça, no Centro Regional de Investigação e Desenvolvimento Agrário de Bragança e na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, de onde provém o material aqui denominado UTAD 7, UTAD 9, UTAD 11, SATIVA 22 e VIMEIRO.

Como referência utilizou-se o clone considerado susceptível, UTAD 14 e o clone considerado resistente, o híbrido francês de *C. crenata* × *C. sativa* (CA 15) denominado MARIGOULE.

### QUADRO 1

Características e origem dos clones de castanheiro

Clones de Castanheiro	Reacção à doença da tinta		Origem dos clones	Material vegetal
	Resistente(R)	Susceptível(S)		
UTAD 9	R	—	Programa de Melhoramento de TAVEIRA FERNANDES (PMTF)	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 7	R	—	(PMTF)	<i>Castanea sativa</i>
VIMEIRO	R	—	(PMTF)	<i>C.crenata</i> × <i>C.sativa</i> (?)
UTAD 1	?	?	Seleção da UTAD	<i>Castanea sativa</i>
SATIVA 22	?	?	(PMTF)	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 11	?	?	(PMTF)	<i>Castanea sativa</i>
UTAD 14	—	S	Colecção de clones de castanheiro da UTAD	<i>Castanea sativa</i>
MARIGOULE	R	—	Híbrido francês em propagação comercial	<i>C. crenata</i> × <i>C. sativa</i>

## 2.3 — Metodologia

### 2.3.1 — Inoculação em ramo destacado

Dos clones referidos em Material Vegetal, e quando os ramos do ano apresentavam 30-40 cm de crescimento, seleccionaram-se 12 (doze) ramos de cada clone de diâmetro aproximadamente igual.

O material vegetal seleccionado foi cortado e transportado para o local da realização do ensaio com os cuidados necessários para evitar a dessecação dos ramos.

A inoculação foi realizada com micélio, obtido por crescimento em PDA (PDA Difco, 39g/l) de *P. cinnamomi* e dividido em quantidades iguais, imediatamente antes de se iniciar o processo de inoculação.

Para realizar a inoculação seccionou-se o ápice do ramo, transferiu-se um disco de micélio e meio de cultura e foi posto em contacto com a secção transversal praticada. Para evitar a dessecação dos tecidos e criar um ambiente húmido, cobriu-se a zona próxima da inoculação com papel de alumínio.

A inoculação foi realizada com cada um dos isolamentos de *P. cinnamomi* já mencionados e em 5 ramos por clone de castanheiro em ensaio.

Para avaliar o avanço da infecção mediu-se o comprimento da lesão provocada pelo desenvolvimento do fungo nesses tecidos, manifestada pela necrose dos tecidos do ramo inoculado.

Realizaram-se medições da dimensão da lesão (DL), expressas em milímetros, ao 3.º, 6.º e 10.º dias após a inoculação, altura em que os ramos destacados começaram a evidenciar amarelecimento e queda das folhas da base.

A extremidade basal dos ramos destacados foi mantida imersa em água durante todo o período do ensaio.

O ensaio decorreu numa estufa com cobertura de fibra de vidro, temperatura regulada e com sistema de nebulização programável.

Durante o período da realização do ensaio a temperatura e a humidade relativa do ar (HR) foram registadas num termohigrógrafo. A temperatura oscilou dos 12º aos 25º e a HR dos 60% aos 100%.

O ensaio delineado corresponde a um ensaio factorial com três factores fixos: Clones de castanheiro (C), Isolamentos de *P. cinnamomi* (P) e Tempo (T), que parametricamente se representa:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + P_j + CP_{ij} + T_k + CT_{ik} + PT_{ik} + e_{ijkl}$$

com:

$$i = 1 \text{ a } 8; j = 1 \text{ a } 2; k = 1 \text{ a } 3 \text{ e } l = 1 \text{ a } 5$$

Para ordenar os clones de castanheiro quanto ao grau de resistência, procedeu-se à comparação das médias pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

### 2.3.2 — Inoculação em disco destacado de folha

Dos mesmos clones de castanheiro e no mesmo dia da realização do ensaio da inoculação em ramo destacado, retiraram-se discos de folhas com um anel cortante, que se inocularam, por deposição de micélio de *P. cinnamomi* e meio e cultura, com 4mm de diâmetro. Para que a humidade fosse mantida a níveis adequados para o desenvolvimento do parasita, os discos de folha foram colocados sobre papel de filtro humedecido com água destilada.

Avaliou-se o período de tempo, em horas, entre a inoculação e os

primeiros sintomas claramente visíveis, período de incubação, utilizando-se para isso um dispositivo constituído por uma fonte de luz, mesa translúcida e lente monocular 10X. A incubação decorreu a temperatura e humidade constantes.

O esquema do ensaio corresponde a um ensaio factorial com dois factores fixos: Clones de castanheiro (C) e Isolamentos de *Phytophthora* (P).

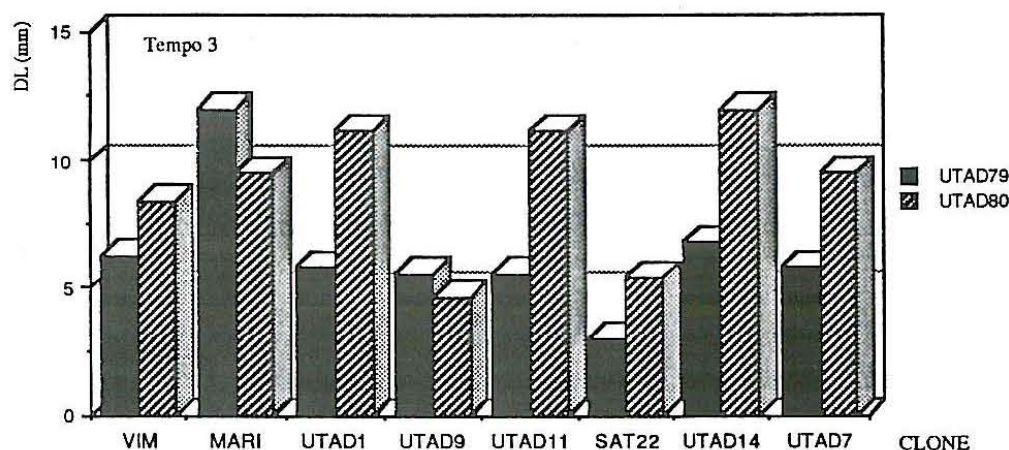
Ordenaram-se os clones pela comparação múltipla das médias com base nos critérios de Tukey e compararam-se com os resultados obtidos pelo método de inoculação de ramo destacado.

### 3 — Resultados e Discussão

#### 3.1 — Inoculação em ramo destacado

A dimensão da lesão obtida por este processo de inoculação, nas condições e com o material vegetal com os isolamentos de *P. cinnamomi* anteriormente referidos, encontra-se expressa nas figuras 1, 2 e 3.

Fig. 1 — Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 3 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).



Neste estudo o termo resistência é utilizado como sinónimo funcional, ou seja, da maior ou menor capacidade dos clones limitarem o desenvolvimento do fungo nos seus tecidos depois de artificialmente inoculados.

Os resultados das inoculações revelaram que os clones se comportaram de forma diferente em relação a *P. cinnamomi*, tendo todos os clones evidenciado um grau de resistência igual ou superior ao clone UTAD14, que por outros processos de inoculação foi classificado como susceptível. Nenhum dos clones evidenciou um nível de resistência total, uma vez que o fungo infectou e colonizou em maior ou menor extensão os clones em estudos.

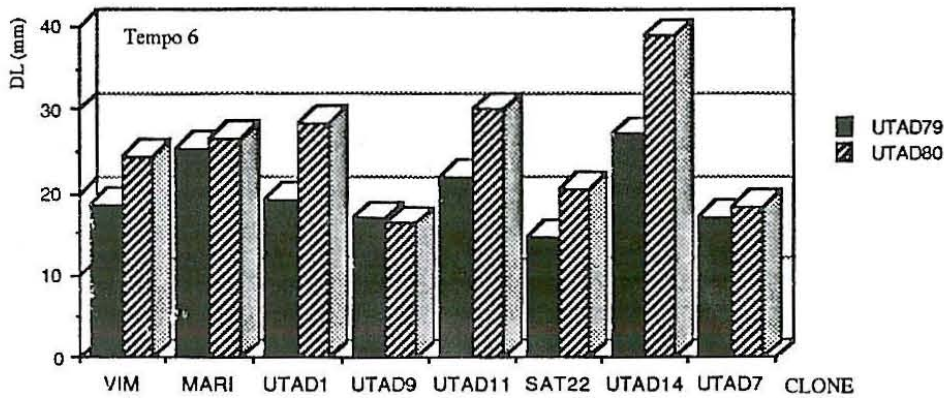


Fig. 2 — Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiros 6 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).

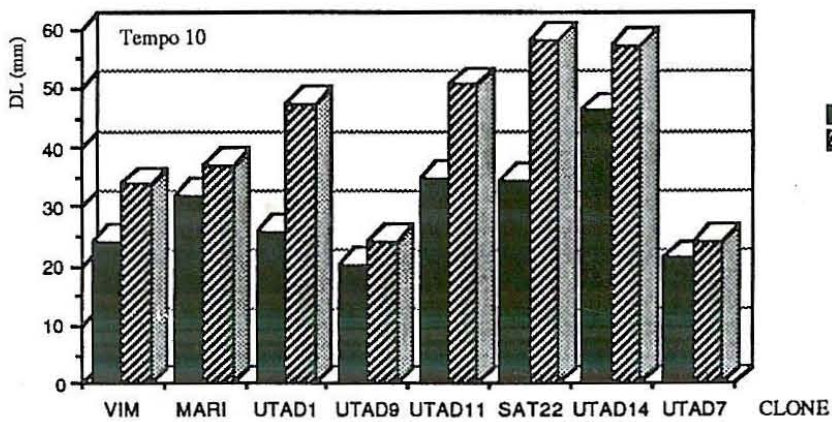


Fig. 3 — Dimensão da lesão nos ramos destacados de castanheiro 10 dias depois da inoculação com o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79) e IMI 335 492 (UTAD 80).

Pode observar-se pelas Figuras 1,2 e 3 que o desenvolvimento da lesão é diferente conforme o isolamento de *Phytophthora* considerado, sendo também diferente o comportamento dos clones quanto ao avanço da lesão ao longo do tempo.

Estas diferenças podem ser avaliadas pela análise estatística do ensaio a que corresponde um ensaio factorial com três factores fixos: Clones de castanheiro (C), Isolamentos de *Phytophthora* (P) e Tempo (T).

No Quadro 2 indicam-se os resultados dessa análise.

Os resultados da análise da variância evidenciam uma influência acentuada do factor tempo no desenvolvimento da lesão. Também é possível inferir que os isolamentos de *Phytophthora* têm diferente agressividade e que os clones em estudo possuem graus diferentes de resistência.

Detectam-se, ainda, diferenças altamente significativas na interacção Tempo  $\times$  *Phytophthora*, Clone  $\times$  Tempo, Clone = *Phytophthora*.

A primeira das interacções significativas revela que o avanço médio da

**QUADRO 2**

Análise da variância dos valores referentes à dimensão da lesão (DL) apresentada ao 3.º, 6.º e 10.º dias de incubação (T) pelos clones de castanheiro (C) quando inoculados com dois isolamentos diferentes de *Phytophthora cinnamomi* (P). (5 repetições/clone)

Origem daVariação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	6268,520	895,509	30,653	0,000
TEMPO (T)	2	31930,460	15965,230	546,482	0,000
PHYTOPHITHORA (P)	1	2516,843	2516,843	86,150	0,000
TEMPO × PHY (T×P)	2	845,373	422,688	14,468	0,000
CLONE × TEMPO (C× T)	14	4581,062	327,219	11,201	0,000
CLONE × PHY (C× P)	7	1138,430	162,602	5,566	0,000
P × C × T	14	488,302	34,879	1,194	0,283
ERRO	189	5521,550	29,215		

lesão produzida por cada um dos isolamentos de *P. cinnamomi* não é idêntico, avançando um dos isolamentos mais rapidamente que o outro, considerando a globalidade dos clones.

Nos tecidos destacados do hospedeiro, o isolamento IMI 335 492 (UTAD 80) manifestou maior capacidade de colonização (maior dimensão da lesão) do que o isolamento IMI 335 488 (UTAD 79), diferença que pode ser interpretada como maior agressividade desse isolamento.

A interacção significativa Clone × Tempo, revela que o avanço médio da lesão não é igual nos diferentes clones, avançando mais rapidamente nuns clones que noutros, tendo em conta os dois isolamentos de *Phytophthora*.

Finalmente a interacção significativa Clones × *Phytophthora* evidencia que os clones de castanheiro manifestam comportamento diferente em relação aos isolamentos de *Phytophthora*, ou seja, possuem graus de resistência diferente.

Para ordenar os clones de castanheiro quanto ao grau de resistência considerou-se a dimensão média da lesão ao 10.º dia de inoculação e

**QUADRO 3**

Análise da variância dos valores referentes à dimensão da lesão (DL) ao 10.º dias após a inoculação dos oito clones de castanheiro (C) quando inoculados com os dois isolamentos de *P. cinnamomi* (P) (5 repetições/clone)

Origem daVariação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	8667,346	1181,049	23,103	0,000
PHYTOPHITHORA (P)	1	2664,093	2664,093	52,111	0,000
CLONE × PHY (C× P)	7	1084,636	154,948	3,031	0,008
ERRO	63	3220,750	51,123		



aplicaram-se os testes de comparação múltipla das médias com base nos critérios de Tukey.

Como os isolamentos de *P. cinnamomi* manifestaram graus de agressividade diferente compararam-se os valores médios da dimensão da lesão, 10 dias depois da inoculação, quando inoculados com cada um dos isolamentos de *cinnamomi*. Os resultados expressos nos Quadros 4 e 5 permitem separar os clones resistentes dos clones susceptíveis.

#### QUADRO 4

Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 488

CLONE	DL (média) (mm)			
UTAD9	20,2	A*		
UTAD7	21,6	A	B	
VIMEIRO	24,2	A	B	
UTAD1	26,0	A	B	
MARIGOULE	32,2	A	B	C
SATIVA22	34,8	A	B	C
UTAD11	35,0		B	C
UTAD14	46,4			C

Tukey, nível de significância ( $\alpha = 5\%$ )

\* Valores médios com letras em comum não são significativamente diferentes.

#### QUADRO 5

Comparação múltipla das médias da dimensão da lesão dos 8 clones de castanheiro 10 dias depois de inoculados com o isolamento IMI 335 492

CLONE	DL (média) (mm)			
UTAD9	24,2	A*		
UTAD7	24,2	A		
VIMEIRO	33,8	A	B	
MARIGOULE	37,3	A	B	
UTAD1	47,4		B	C
UTAD11	50,8		B	C
UTAD14	57,6			C
SATIVA22	58,2			C

Tukey, nível de significância ( $\alpha = 5\%$ )

\* Valores médios com letras em comum não são significativamente diferentes.

A separação das médias não permite individualizar classes de resistência definidas e alguns clones ocupam posições diferentes na ordenação. Apesar disso as classes de resistência extremas, considerando-se as três maiores ou menores dimensões de lesão, incluem os mesmos clones. Como clones mais resistentes (menor dimensão da lesão) aparecem o UTAD9, UTAD7 e VIMEIRO

e como clones susceptíveis (maior dimensão de lesão) o UTAD14, UTAD11 e o SATIVA22.

Os resultados obtidos pelo método de inoculação em ramo destacado estão de acordo com o conhecimento que se tinha dos clones em estudo e com os obtidos por inoculação em ramo de planta intacta, permitindo mesmo uma maior separação dos clones quanto ao grau de resistência.

No método de inoculação em ramo de planta intacta classificam-se como resistentes, os clones onde a inoculação provoca lesões confinadas e a ferida cicatriza como nas plantas testemunha e como clones susceptíveis os que desenvolvem lesões que evoluem de forma sistemática até à morte da árvore. Por este processo de inoculação alguns clones, como o SATIVA22, apresentam lesões que no ano de inoculação aparecem confinadas, mas no ano seguinte o fungo retoma a sua actividade, originando lesões que progressivamente vão aumentando e conduzem à morte da árvore num período de tempo mais ou menos longo.

Por este processo os clones foram classificados como o indicado no Quadro 6.

#### QUADRO 6

Classificação dos clones de castanheiro quanto ao nível de resistência a *P. cinnamomi* avaliados pelo método de inoculação em ramo de planta intacta

CLONES	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA	
	ANO DA INOCULAÇÃO	ANO SEGUINTE
UTAD9	R	R
UTAD7	R	R
VIMEIRO	R	R
MARIGOULE	—	—
UTAD1	R	R
UTAD11	R	R
SATIVA22	R (?)	S
UTAD14	S	S

R — resistente, S — susceptível, — não foi avaliado

### 3.2 — Inoculação em discos destacados de folha

O número médio de horas entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas claramente visíveis, em cada clone e para cada isolamento de *Phytophthora*, estão indicados no Quadro 7.

A análise de variância evidencia que os clones possuem graus diferentes de resistência e que os isolamentos de *P. cinnamomi* têm graus de agressividade diferente (Quadro 8).

Os clones mais resistentes são os que manifestaram maior número de horas para o aparecimento dos primeiros sintomas. Se se considerar a agressividade dos isolamentos de *Phytophthora* como a capacidade do fungo colonizar

**QUADRO 7**

Tempo, em horas, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas claramente visíveis

CLONE	TEMPO (horas)	
	Isolamento IMI 335 488	Isolamento IMI 335 492
VIMEIRO	106,8 ± 13,01*	69,6 ± 15,06*
MARIGOULE	67,2 ± 26,97	38,4 ± 13,14
UTAD1	54,0 ± 18,49	58,8 ± 9,86
UTAD9	108,0 ± 14,07	115,2 ± 2,68
UTAD11	92,4 ± 22,69	49,2 ± 19,63
SATIVA22	97,2 ± 21,38	60,0 ± 18,49
UTAD14	52,8 ± 10,73	24,0 ± 0,00
UTAD7	103,2 ± 15,53	87,6 ± 17,28

\* Número de horas ± desvio padrão da média

**QUADRO 8**

Análise da variância dos valores referentes ao número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro (C) quando inoculados com dois isolamentos diferentes de *Phytophthora cinnamomi* (P) (5 repetições/clone)

Origem da Variação	GL	SQ	QM	F	P
CLONE (C)	7	42034,00	6004,91	22,267	0,000
PHYTOPHTHORA (P)	1	10215,00	10215,20	37,880	0,000
CLONE × PHY (C × P)	7	6610,40	944,34	3,502	0,003
ERRO	64	17259,20	269,67		

rapidamente os tecidos do hospedeiro, o isolamento — IMI 335 492 (UTAD80), manifestou na generalidade dos clones maior agressividade, como aliás era também evidente quando se aplicou o método de inoculação em ramo destacado.

Os resultados obtidos por inoculação em disco destacados de folha, que avalia o número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas, dá origem a uma separação de clones, com base na comparação múltipla de médias pelo método de Tukey (Quadros 9 e 10), idêntica à obtida por inoculação em ramo destacado. Classifica como clones mais resistentes o UTAD9, UTAD7 e o VIMEIRO introduzindo, no entanto, alguma variação nos clones mais susceptíveis, uma vez que inclui nesta classe o UTAD1 e o MARIGOULE que pelo método de inoculação em ramo destacado seriam classificados como moderadamente resistentes.

A resistêntica do castanheiro a *P. cinnamomi* sendo de tipo Horizontal,

**QUADRO 9**

Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculadas com o isolamento IMI 335 488 (5 repetições/clone)

CLONE	DL(média) (mm)		
UTAD 9	108,0	A*	
VIMEIRO	106,8	A	
UTAD 7	103,2	A	
SATIVA 22	97,2	A	
UTAD 11	92,4	A	
MARIGOULE	67,2	A	B
UTAD 1	54,0		B
UTAD 14	52,8		B

Tukey, nível de significância ( $\alpha = 5\%$ )

\*médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes.

**QUADRO 10**

Comparação múltipla das médias do número de horas desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas dos 8 clones de castanheiro quando inoculadas com o isolamento IMI 335 492 (5 repetições/clone)

CLONE	DL(média) (mm)					
UTAD 9	115,2	A*				
UTAD 7	87,6	A	B			
VIMEIRO	69,6		B	C		
SATIVA 22	60,0		B	C		
UTAD 1	58,8			C	D	
UTAD 11	49,2			C	D	E
MARIGOULE	38,2				D	E
UTAD 14	24,0					E

Tukey, nível de significância ( $\alpha = 5\%$ )

\*média seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes.

*sensu* Van Der Plank (1963), pode ser considerada como um processo de bloqueamento mais ou menos eficiente do ciclo infeccioso do fungo parasita. A dimensão da lesão (DL) e o período de incubação (PI), avaliados neste estudo pelo método de inoculação em ramo destacado e por inoculação em disco destacado de folha, constituem mecanismos pelos quais o processo infeccioso pode em certa medida ser bloqueado, sendo incluídos como componentes da resistência por Parlevliet (1979).

Para seleccionar simultaneamente para duas ou mais características utilizam-se com frequência em melhoramento vegetal, os índices de selecção.

Abreu *et al.* (1991) utilizaram o Índice de Elston (1963) para ordenar os clones de castanheiro quanto ao nível de resistência, uma vez que este índice de selecção não entra em consideração com parâmetros genéticos e de parentesco, baseando-se apenas no valor fenotípico observado. Assume-se ainda

que cada característica tem o mesmo valor na selecção e ordenação dos indivíduos.

Porque a análise estatística revelou diferença de agressividade dos isolamentos de *P. cinnamomi*, aplicou-se o índice de Elston aos valores fenotípicos obtidos como isolamento mais agressivo, o IMI 335 492 (UTAD 80).

O Índice de Elston para p características toma a forma:

$$I_E = \prod_{i=1}^p (Y_i - C_i)$$

onde, para efeitos de ordenação,  $Y_i$  é o valor da i-ésima característica e

$$C_i = \frac{[n (\text{mínimo } Y_i) - \text{máximo } Y_i]}{(n-1)}$$

sendo n o número de genótipos considerados.

Se numa determinada característica os valores mais baixos correspondem aos objectivos do melhorador, multiplicam-se todos os valores por -1, ou então considera-se o recíproco de cada um dos valores. Neste caso concreto considerou-se o recíproco do valor da dimensão da lesão que se multiplicou por 1000, antes da transformação logarítmica. Nesta característica interessam os valores mais baixos dado que corresponde a uma maior resistência à colonização dos tecidos.

#### QUADRO 11

Cálculo do Índice de Elston e ordenação dos clones

CLONES	VALOR FENOTÍPICO ( $Y_i$ )			$\ln (Y_i - C_i)^b$		ÍNDICE	ORDEM
	DL(mm)	PI (h)	1/DL	1/DL <sup>a)</sup>	PI		
UTAD9	24,2	115,2	0,0413	3,32	4,64	15,40	1º
UTAD7	24,2	87,6	0,0413	3,32	4,33	14,38	2º
VIMEIRO	33,8	69,6	0,0295	2,76	4,07	11,23	3º
MARIGOULE	37,3	38,4	0,0268	2,58	3,31	8,54	4º
UTAD1	47,4	58,8	0,0210	1,99	3,86	7,68	5º
UTAD11	50,8	49,2	0,0196	1,78	3,64	6,48	6º
SATIVA22	58,2	60,0	0,0171	1,24	3,89	4,82	7º
UTAD14	57,6	24,0	0,0173	1,29	2,56	3,30	8º

a) Os valores da característica 1/DL foram multiplicadas por 1000 antes da transformação logarítmica.

b)  $C_i = [n (\text{mínimo } Y_i) - \text{máximo } Y_i]/(n-1)$

A ordenação obtida pela aplicação do Índice de Elston classifica como clones mais resistentes o UTAD9, UTAD7 e o VIMEIRO e como clones mais susceptíveis o UTAD11, SATIVA22 e UTAD14, que coincide com a classificação obtida através do método de inoculação em ramo destacado.

#### 4 — Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo, pelo método de inoculação em ramo destacado e por inoculação de discos destacados de folha, permitem separar os clones de castanheiro quanto ao nível de resistência que manifestam em relação a *P. cinnamomi*.

A metodologia de inoculação em ramo destacado utilizada inicialmente para avaliar a agressividade dos isolamentos de *Phytophthora*, foi posteriormente testada para avaliar a resistência dos diferentes genótipos. Dixon *et al.* (1984), Tippet *et al.* (1985), Dolan & Coffey (1989) e Abreu *et al.* (1991), concluíram que esta metodologia permitia separar os diferentes genótipos quanto ao grau de resistência a *P. cinnamomi*.

Resultados semelhantes foram obtidos em relação a outras espécies de *Phytophthora* que atacam o sistema radicular de plantas lenhosas, nomeadamente em *P. cactorum* (Lemoine & Gaudin, 1991) e *P. lateralis* (Hansen *et al.*, 1989).

A inoculação em discos destacados de folha evidenciou resultados similares aos obtidos pelo método de inoculação em ramo destacado. Observou-se, no entanto, maior dispersão nos resultados e introduziu algumas alterações na ordenação dos clones. Salesses *et al.* (1993), que também usaram metodologia semelhante, verificaram que existia comportamento diferencial das folhas em função da sua posição no ramo, quando analisaram este método de avaliação de resistência do castanheiro à *P. cinnamomi*. Concluíram, no entanto, que este método permitia separar os clones de castanheiro desde que as folhas fossem retiradas de ramos em activo crescimento e situadas entre a 6.<sup>a</sup> e 10.<sup>a</sup> folha a contar do ápice do ramo.

O método de inoculação em ramo destacado, pela facilidade de execução, permite avaliar a resistência de plantas adultas, tornando-o especialmente indicado para avaliar a resistência de grande quantidade de árvores, aumentando assim a pressão de selecção nas primeiras fases dos programas de melhoramento.

O período de tempo necessário para avaliar a resistência, situa-se pelos processos tradicionais nos 3 ou 4 anos (Fernandes, 1953), e em 2 anos, pelo método de inoculação em ramo de planta intacta. Com o método de inoculação em ramo destacado o período de tempo para avaliar a resistência fica substancialmente reduzido, obtendo-se resultados válidos apenas numa época de crescimento anual do hospedeiro.

Este método, porque avalia a resistência pela dimensão da lesão e são possíveis várias repetições de material geneticamente igual, permite a análise estatística dos resultados que evidenciam, de forma mais clara, as interações que se estabelecem entre o hospedeiro e o parasita.

A utilização do índice de selecção de Elston (1963) que neste estudo conduziu a uma ordenação de clones igual à obtida pelo método de inoculação em ramo destacado, poderá ser um critério de selecção valioso, nas situações em que se avaliam diferentes mecanismos de resistência, nomea-

damente a resistência constitutiva devido, por exemplo, á presença de compostos fenólicos e a resistência à colonização dos tecidos.

Os resultados dos testes de inoculação avaliados neste trabalho, foram obtidos quando os crescimentos do ano apresentavam um crescimento aproximado de 30-40cm (fins de Maio) e apenas se poderão reportar a esta época do ano, podendo conduzir a resultados diferentes se realizados no período de repouso ou noutra altura do desenvolvimento vegetativo do hospedeiro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, C.A., Gouveia, E.M., Colaço, J.A., Gomes, A.L & Cardoso, A.O. 1991. Clones autóctones de castanheiro resistentes à tinta?. *Congreso Galego de Proteccion Vexetal*. Santiago de Compostela, 28-29 Nov. 1991.
- Dixon, W.K., Thinlay & Sivasithamparam, K. 1984. Technique for rapid assessment of tolerance of *Banksia* spp. to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, **68**: 1077-1080.
- Dolan, T.E. & Coffey, M.D. 1986. Laboratory screening technique for assessing resistance of four avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, **70** (2): 115-118.
- Elston, R.C. 1963. A weight-free index for the purpose of ranking or selection with respect to several traits at a time. *Biometrics*, **19**: 85-87.
- Fernandes, C. Taveira 1953. A luta contra a "doença da tinta" dos castanheiros em Portugal. *Separata das publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas*. Vol XX, Tomo II: 153-158.
- Fernandes, C. Taveira 1966. A "Doença da Tinta" dos castanheiros. *Parasitas do género Phytophthora* de Bary. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaca, 95pp.
- Grente, J. & Sauret, S. 1961. Épreuve de la résistance a l'encre et a l'endothia sur des cultures de tissus de clones de châtaignier. *Ann. Epiphyties*, **12** (1): 61-63.
- Hansen, E.M., Hamm, P.B. & Roth, L.F. (1989). Testing Port-orford-cedar for resistance to *Phytophthora*. *Plant Disease*, **73**: 191-194.
- Lemoine, J. & Gaudin, J. 1991. Porte-greffe du pommier et sensibilité au *Phytophthora cactorum*. *L'Arboriculture Fruitière*, **445**: 19-23.
- Parlevliet, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopath.*, **17**: 203-22.
- Salleses, G., Ronco, L., Chauvin, J.-E. & Chapa, J. 1993. Amélioration génétique du chataignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. *L'Arboriculture Fruitière*, **458**: 103-10.
- Shearer, B.L., Michaelsen, B.J. & Warren, H.J. 1987. Comparative behaviour of *Phytophthora* species in the secondary phloem of stems and excised roots of *Banksia grandis* and *Eucalyptus marginata*. *Aust. J. Bot.*, **35**: 103-10.
- Telhada, J.A. 1988. *Micoses dos Citrinos Causadas por Espécies de Phytophthora*. *Contribuição Para o Seu Estudo em Portugal*. Dissertação para obtenção do grau de doutor em Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Tippett, J.T., Hill, T.C. & Shearer, B.L. (1985). Resistance of *Eucalyptus* spp. to invasion by *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, **33**: 409-18.
- Van Der Plank, J.E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic Press, New York, 349 pp.
- Zentmyer, G. & Mircethich, S.M. 1965. Testing for resistance of avocado to *Phytophthora* in nutrient solution. *Phytopathology*, **55**: 487-489.