

Métodos de luta alternativos contra a doença da tinta do castanheiro

João Maria da Camara Archer de Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais

Orientador: Doutora Maria Helena Neves Machado

Coorientador: Professora Doutora Ana Paula Ferreira Ramos

Júri:

Presidente: Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Rita Maria Lourenço da Costa, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária de Veterinária

Doutora Maria Helena Neves Machado, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária de Veterinária

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer, em geral, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV) por me ter acolhido dando-me assim a hipótese de desenvolver o meu trabalho nas suas instalações ao mesmo tempo que me possibilitou contactar com as pessoas mais competentes, ao nível do país, na área da investigação. O INIAV é, com toda a certeza, um Instituto que vale a pena manter custe o que custar pelos serviços que presta na investigação agrária e florestal. Celebra, no presente ano, 40 anos de existência sendo 40 anos de *know how* que se devem preservar e transmitir para garantir a continuidade da investigação nestas áreas. Gostava de agradecer a todos os que estão e trabalham na Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal do INIAV (ex Estação Florestal Nacional), e que trabalham todos os dias para que a floresta do nosso país caminhe para a sustentabilidade de modo a que as gerações futuras possam usufruir economicamente e ambientalmente deste recurso. É reconfortante saber que o futuro da floresta em Portugal está em boas mãos.

Particularmente gostaria de agradecer a:

Doutora Rita Lourenço Costa por ter cedido o material vegetal (castanheiros) indispensável para os ensaios conduzidos no viveiro. Os clones de castanheiro utilizados nos ensaios foram obtidos por micropropagação, na Escola Superior Agrária de Coimbra, no âmbito do projeto FCT PTDC/AGR-CFL/101707/2008 – *Understanding Resistance to Pathogenic Fungi in Castanea sp.*, no qual o INIAV foi a Instituição proponente e a Dr.^a Rita Costa Investigadora Responsável. Por isto e por todo o trabalho desenvolvido para defender o castanheiro e outras espécies contra a doença da tinta o meu profundo agradecimento!

Carmen Santos por todo o apoio que deu ao longo da minha estadia na Estação Florestal. Essencialmente gostava de agradecer toda a transmissão de conhecimentos, o auxílio na execução dos protocolos laboratoriais com os quais eu não estava familiarizado e a simpatia. Por tudo o que aprendi muito obrigado!

Florinda Medeiros e Marina Soares por toda a ajuda no laboratório e não só. Foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho. Por toda a disponibilidade demonstrada todos os dias, muito obrigado!

Doutora Helena Machado pela grande ajuda em todo o delineamento deste trabalho. Apesar do muito trabalho com outros projetos abdicou sempre do seu precioso tempo para, com muita paciência, providenciar toda a teoria necessária para compreender os ensaios práticos. Foi graças à sua profundidade de conhecimentos e carácter altruísta que consegui tirar o maior partido deste trabalho, não só ao nível da aquisição de conhecimentos em fitopatologia mas também na área da micologia, tema pelo qual tenho e sempre terei grande interesse. Tive sorte em ser orientado pela Dr.^a Helena e para isto não há agradecimento suficiente!

Professora Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, em primeiro lugar, por me ter apresentado à Dr.^a Helena Machado e por se ter mostrado disponível para ajudar a encontrar um tema para a minha dissertação. Em segundo lugar pelo enorme esforço direccionado para o acompanhamento do trabalho e realização das correções da dissertação. No meio de tantas aulas e trabalho (à semelhança da Dr.^a Helena mas em contexto diferente) conseguiu sempre arranjar tempo e paciência extra para acompanhar o trabalho e ir fazendo as correções. Muito Obrigado!

Resumo

O castanheiro europeu (*Castanea sativa*) assume grande importância no nosso país principalmente através do seu fruto, a castanha. A sustentabilidade dos nossos sotos é ameaçada pela elevada suscetibilidade do castanheiro europeu a uma das mais importantes doenças associadas a esta essência florestal. A doença da tinta, causada pelo oomiceta *Phytophthora cinnamomi* é responsável por danos consideráveis, nas raízes, tronco e copa do castanheiro, causando perdas económicas consideráveis se não a morte da árvore. Nas últimas décadas, os métodos de controlo alternativos aos químicos têm ganho importância com o objetivo de reduzir os elevados custos económicos e ambientais da aplicação de produtos químicos.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estudar métodos de luta alternativos à luta química, nomeadamente através da utilização de fungos antagonistas ou produtos derivados do seu metabolismo. Foram realizados testes *in vitro* com o objetivo de selecionar fungos antagonistas de *P. cinnamomi*. Posteriormente realizaram-se ensaios *in planta* com o objetivo de estudar a aplicabilidade do fungo/produto derivado selecionado. Foi possível selecionar o fungo *Omphalotus olearius*, cujo extrato, testado *in vitro*, foi inibidor do crescimento e esporulação do agente patogénico *Phytophthora cinnamomi*.

Palavras-chave: *Castanea sativa*, *Phytophthora cinnamomi*, controlo alternativo, fungos antagonistas, inibição, *Omphalotus olearius*

Abstract

The European chestnut (*Castanea sativa*) is of great importance in our country through its fruit, the sweet chestnut. The sustainability of our groves is threatened by the high susceptibility of European chestnut to one of the most important diseases associated with this species. The ink disease caused by *Phytophthora cinnamomi* inflicts considerable damage in the chestnut (roots, trunk and canopy) causing substantial economic losses if not the death of the tree. In recent decades, alternative methods to chemical control have become increasingly important in order to reduce the high economic and environmental costs of the successive application of chemicals.

Thus, this work aimed to study and select a control method alternative to chemicals, namely the use of antagonistic fungi or their culture filtrates as biocontrol agents. *In vitro* tests were performed with the aim of selecting antagonistic fungi. Subsequently, *in planta* tests were conducted with the aim of studying the applicability of the fungus and cultures filtrates selected. *Omphalotus olearius* was the most potential fungus in inhibiting, *in vitro*, either the growth or the sporulation of *Phytophthora cinnamomi*.

Key-words: *Castanea sativa*, *Phytophthora cinnamomi*, alternative methods, antagonistic fungi, inhibition, *Omphalotus olearius*

Extended Abstract

The European chestnut (*Castanea sativa*) is highly important to Portugal, mainly because of its fruit, the chestnut, which has high economic value, mainly in winter, when it reaches the highest values. It is estimated that the world production of chestnut reaches about 1.2 million tonnes per year and Portugal produces about 2%. In 2012 stands of European chestnut in Portugal, managed to produce chestnut, occupied an area of 34,656 ha and in that year export earnings of this fruit exceeded EUR 30 million.

From the 70s of the XX century the area of European chestnut sharply decreased and reached a minimum, in 1986, of 14,600 ha. This decrease was mainly due to infections caused by pathogens that are lethal to the plants. One of the major pathogens associated with the decline of the European chestnut is the species *Phytophthora cinnamomi*, responsible for the so called ink disease. This species was considered the most important pathogen in *C. sativa* in Portugal and Spain.

The pathogen *P. cinnamomi* belongs to the kingdom Chromista and class Oomycetes. This species has long been assigned to kingdom Fungi despite possessing some singularities in relation to other so called fungi. For example, it doesn't synthesize sterols, which makes it insensitive to the fungicides that interfere with the sterol biosynthesis. This species reproduces asexually (by sporangia containing zoospores) or sexually (heterothallic species), although asexual reproduction is more common. The zoospores, produced in sporangia, are mobile and are considered the most efficient propagules in the infection process.

Phytophthora cinnamomi is a soilborne oomycete that infects the plants through the roots. The zoospores germinate and produce a germ tube that penetrates through the epidermis of the root, colonizing the tissues of the host inter- and intracellularly, feeding on nutrients present in the cell content. As the infection begins by roots, the early detection of the disease is quite difficult and when aboveground symptoms appear the disease is already in an advanced stage of development and the tree has a low chance of survival.

The species *C. sativa* is highly susceptible to *P. cinnamomi*. Thus, the control of ink disease should integrate different control methods: genetic, cultural, chemical and biological control

The use of biological methods, the target of this work, has been the subject of numerous researches, looking for alternatives to chemicals. Biological methods should be less expensive and environmentally friendly, while decreasing the risk of the population of the to develop resistance to fungicides used against Oomycetes. The use of fungi as a biological control method has been widely studied due to the fact that many of these compete with the oomycete becoming antagonists. The macrofungi associated with the chestnut tree are mostly ectomycorrhizal. Several studies suggest a protective effect of ectomycorrhizal fungi against *P. cinnamomi* in chestnut trees, which may be connected with their structural components (Hartig net and mantle).

The proven existence of antagonistic organisms to *P. cinnamomi* in the rhizosphere seems so important that its possible use can be recommended for controlling the pathogen. If the antagonistic organisms find favourable conditions to establish themselves in the rhizosphere, they might even have a longer lasting protective effect on plants than that of most active substances currently used.

Therefore, with the main objective of exploring control methods against *P. cinnamomi* that can be an alternative to the use of pesticides, the following tests were carried out:

1. *In vitro* evaluation and selection of antagonistic fungi to *P. cinnamomi*: 26 isolates of potentially antagonistic fungi belonging to 18 species (9 saprophytic species and 9 mycorrhizal species) were tested in confrontation with one isolate of *P. cinnamomi*. Results showed that, both among saprophytic and mycorrhizal fungi, there are isolates which have an inhibiting effect on the development of *P. cinnamomi*.

2. Subsequently, antagonistic tests were conducted in order to analyse the effect of the extract derived from the metabolism of the above selected fungi on the mycelial growth of *P. cinnamomi*. In this test it was possible to select the fungus *Omphalotus olearius* as the one that produced the extract with most promising results.

3. Next, the inhibitory effect of the extract of *O. olearius* on the mycelial growth of two isolates of *P. cinnamomi* was tested. The results showed that there was an inhibitory effect of the extract on the mycelial growth on both isolates of *P. cinnamomi*.

4. As the zoospores are the most efficient propagules in the infection process, it was decided to test the effect of the extract of *O. olearius* on the sporulation of *P. cinnamomi*. The results indicate that there is indeed an inhibitor effect of the extract on the production of sporangia of *P. cinnamomi*, although dependent on the concentration in which it is present.

5. In order to study the applicability of the extract of the fungus *O. olearius* as a method of control of *P. cinnamomi* in natural conditions, tests were conducted in chestnut trees kept in nursery conditions. The extract was applied, simultaneously or one week after inoculation of the soil with *P. cinnamomi*, by watering.

Due to the recognized protective effect conferred by ectomycorrhizal fungi against *P. cinnamomi* in chestnut trees and the diversity of species commonly found in association with this species, this work also evaluated the effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Laccaria bicolor*, on the tolerance of the plants to the pathogen.

This work proved the existence of antagonism between some fungi (mycorrhizal and saprophytic) and *P. cinnamomi*, and it was possible to select two fungi whose antagonism with *P. cinnamomi* was evident.

In controlled environment, the extract derived from the metabolism of the fungi *O. olearius* proved to be effective in controlling the oomycete, inhibiting the mycelial growth and the formation of sporangia. However, its effectiveness is dependent on the concentration. In nature, the dilution of the extract is an important factor to take into account, which could hamper its applicability.

In the future it may be interesting to investigate the active substance (in this extract) responsible for these inhibitions.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Extended Abstract.....	iv
Índice de Figuras	1
Índice de Quadros.....	3
Nomes científicos citados no texto	5
1- Introdução.....	7
1.1. O castanheiro.....	7
1.1.1. Classificação e história.....	7
1.1.2. Distribuição, evolução e importância.....	8
1.1.3. Principais problemas do castanheiro.....	9
1.2. Doença da tinta	10
1.2.1. Agentes causais	10
1.2.2. Processo infeccioso e disseminação	12
1.2.3. Sintomatologia em Castanheiro	13
1.2.4. Métodos de luta.....	15
1.3. A rizosfera do castanheiro	23
1.3.1. Fungos Saprófitas	23
1.3.2. Fungos Micorrízicos	24
1.3.3. Ectomicorrizas do castanheiro.....	27
1.4. Objetivos do trabalho	28
2- Material e Métodos	30
2.1. Testes <i>in vitro</i>	30
2.1.1. Testes de antagonismo	30
2.1.2. Teste de antagonismo com extratos de fungos.....	33
2.1.3. Avaliação da ação do extrato de <i>Omphalotus olearius</i> no crescimento micelial de <i>Phytophthora</i>	34
2.1.4. Avaliação da ação do extrato de <i>Omphalotus olearius</i> na esporulação de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	35

2.2. Estudo do efeito do extrato <i>Omphalotus</i> em plantas inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	36
2.2.1. Preparação de inóculo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	37
2.2.2. Estudo em clones de híbridos de <i>Castanea sativa</i>	37
2.2.3. Estudo em plantas micropropagadas do híbrido SC32.....	38
2.2.4. Estudo em plantas micropropagadas do clone SM919.....	38
2.3. Estudo do efeito das ectomicorrizas na tolerância do castanheiro a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	39
2.3.1. Micorrização de plantas pré-estabelecidas	39
2.3.2. Inoculação das plantas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	40
2.4. Estudo do efeito do fungo <i>Lepista nuda</i> na tolerância do sobreiro (<i>Quercus suber</i>) a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	40
2.5. Análise de dados.....	41
3. Resultados e Discussão	42
3.1. Testes <i>in vitro</i>	42
3.1.1. Testes de antagonismo	42
3.1.2. Teste de antagonismo com extratos de fungos	46
3.1.3. Avaliação da ação do extrato de <i>Omphalotus olearius</i> no crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	47
3.1.4. Avaliação da ação do extrato de <i>Omphalotus olearius</i> na esporulação de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	50
3.2. Estudo do efeito do extrato de <i>Omphalotus</i> em plantas inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	52
3.2.1. Estudo em clones de híbridos de <i>Castanea sativa</i>	52
3.2.2. Efeito em plantas micropropagadas do mesmo clone (SC32)	53
3.2.3. Efeito do extrato <i>Omphalotus</i> em plantas inoculadas com terra contaminada com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	55
3.3. Estudo do efeito das ectomicorrizas na tolerância do Castanheiro a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	56
3.4. Efeito do fungo <i>Lepista nuda</i> na tolerância do sobreiro (<i>Quercus suber</i>) a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	57
4. Conclusões.....	58
5. Referências bibliográficas	59
6. ANEXOS.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Sintomas causados por <i>Phytophthora cinnamomi</i> em castanheiro ao nível da copa (a, b) (DRATM, 2003), tronco (c) (Robin, 2013) e raiz (d) (Hebard, 2014).....	14
Figura 2. a) Micorriza arbuscular. A seta aponta para uma hifa intercelular a partir da qual cresceu o arbúsculo. b) Micorriza ericoide. Ilustração das células epidérmicas mostrando a entrada da hifa e posterior enrolamento intracelular (Smith & Read, 2008).	25
Figura 3. Micorrização de <i>Betula alleghaniensis</i> pelo fungo <i>Pisolithus tinctorius</i> : a) Fases iniciais de uma micorriza, com presença de algumas hifas na superfície da raiz e numerosos pêlos radiculares sinalizados pelas setas; b) Manto de fina espessura formado na superfície da raiz; c) Manto compacto cobrindo a raiz onde já não são observados pêlos radiculares. Fotografias de microscópio eletrónico de varrimento, escalas = 100 µm (Massicotte <i>et al.</i> , 1990).....	26
Figura 4. Esquema da base da placa de Petri com as orientações das medições de diâmetro.....	33
Figura 5. Esquema da base da placa de Petri para o ensaio de confronto indireto, com extrato de fungo.....	34
Figura 6. Distribuição das 16 plantas de cada híbrido pelas modalidades do ensaio.....	40
Figura 7. Confrontação entre <i>Phytophthora cinnamomi</i> e: (a) <i>Lepista nuda</i> , isolado LN2011(JBA); (b) <i>Ganoderma lucidum</i> , isolado GR574; (c) <i>Macrolepiota procera</i> , isolado MP093; e (d) <i>Omphalotus olearius</i> , isolado OP598.	44
Figura 8. Confrontação entre <i>Phytophthora cinnamomi</i> e: (a) <i>Omphalotus olearius</i> (OP598); (b) <i>Pisolithus tinctorius</i> (PT027); (c) <i>Laccaria bicolor</i> (LB238); e (d) <i>Paxillus involutus</i> (PAIANU). A seta aponta para o local onde micélio de <i>Omphalotus olearius</i> se sobrepõe ao de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	45
Figura 9. Crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> na direcção da água destilada (Norte-Sul) e na direcção (E-O) do extrato proveniente do fungo (a) <i>Omphalotus olearius</i> ; (b) <i>Lepista Nuda</i> , isolado LN2011(JBA); (c) <i>Lepista Nuda</i> , isolado LN-091; (d) <i>Lactarius deliciosus</i> ; (e) <i>Lentinula edodes</i> , em spawn e (f) <i>Lentinula edodes</i> , em cavilhas de madeira. O crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> apresentado corresponde a sete dias em (a), (b), (c) e (d) e quatro dias em (e) e (f) após a inoculação das placas.....	47
Figura 10. Cultura líquida de <i>Omphalotus olearius</i> ao fim de 15 dias de incubação.	48
Figura 11. Crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (isolado PH107), ao quinto dia de incubação nas oito modalidades do ensaio. (a) Modalidades 1 (0% de extrato – Controlo), 2 (2,5% de extrato), 3 (5%) e 4 (7,5%); (b) Modalidades 5 (10%), 6 (20%), 7 (50%) e 8 (100%). Nas modalidades 7 e 8 não houve desenvolvimento de micélio.	49
Figura 12. Aspectos microscópicos das hifas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (isolado PH107) (a) na modalidade 20% de extrato de <i>Omphalotus olearius</i> e (b) na modalidade testemunha (0% de extrato).....	50
Figura 13. Efeito do extrato <i>Omphalotus</i> na esporulação de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (a) Caixa de Petri com os discos foliares a flutuar. (b) Disco foliar com três dias e observada à lupa, onde se registou formação de esporângios (nesta armadilha foram contados 276 esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i>). (c) Disco foliar com três dias, observado à lupa, onde não ocorreu	

produção de esporângios e na periferia do qual é possível observar a necrose dos tecidos (seta). (d) Pormenor da periferia do disco (b) com formação de esporângios. (e) Rede de micélio formada no disco foliar (c) onde ocorreu inibição da formação de esporângios.....52

Figura 14. (a) Planta do clone SC32, 40 dias após inoculação com *Phytophthora cinnamomi* onde é visível a lesão necrótica externa do caule (seta). (b) Aspeto da lesão interna caracterizada pelo enegrecimento dos tecidos condutores (seta). (c) Lesão ao nível do colo, caracterizada pelo escurecimento do cilindro central (seta).....55

Figura 15. Micorrizas de *Cenococcum geophilum* em castanheiro.....56

Índice de Quadros

Quadro 1. Evolução da área de castanheiro em Portugal e efeito sobre a produção de castanha (Fonte: AFN, 2010; FAO, 2013)	9
Quadro 2. Espécies antagonistas da espécie <i>Phytophthora cinnamomi</i> e respetivos mecanismos de ação (Malajczuk, 1983; Gouveia, 1993)	19
Quadro 3. Substâncias activas de fungicidas sistémicos, contra organismos da classe <i>Oomycetes</i> (Erwin & Ribeiro, 1996).....	22
Quadro 4. Sequência da formação da ectomicorriza, pelo fungo <i>Pisolithus</i> sp., em eucalipto usando a técnica <i>paper-sandwich</i> (Malajczuk <i>et al.</i> ,1990)	26
Quadro 5. Características dos principais tipos de micorrizas. Os carateres estruturais apresentados são referentes ao estado de maturidade e não de desenvolvimento ou estado senescente (Smith & Read, 2008)	27
Quadro 6. Isolados utilizados nos testes de antagonismo com referência ao hospedeiro, origem geográfica, ano de obtenção, Grupo trófico (Moreau <i>et al.</i> , 2004; Smith & Read, 2008) e modalidade (Mod) em que foram testados	32
Quadro 7. Fungos utilizados para obtenção de culturas líquidas.....	34
Quadro 8. Modalidades do ensaio consoante a percentagem de extrato <i>Omphalotus</i> utilizado (para um total de 150 mL).....	35
Quadro 9. Modalidade do ensaio consoante a percentagem de extrato <i>Omphalotus</i> , em relação à água destilada, utilizada para saturar a terra contaminada.....	36
Quadro 10. Lista dos híbridos e clones utilizados no ensaio do efeito do extrato <i>Omphalotus</i> em clones híbridos de <i>Castanea sativa</i> inoculados com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	37
Quadro 11. Notação radicular em função da percentagem de raízes principais lesionadas.....	38
Quadro 12. Grupos consoante a percentagem de micorrização estimada a partir da observação das quatro faces do torrão.....	41
Quadro 13. Valores médios da percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> por isolado testado e valores médios da percentagem de inibição por espécie (letras diferentes representam diferenças significativas para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))	42
Quadro 14. Valores médios da razão C/T por isolado e por espécie. Letras diferentes para a Razão C/T de cada espécie representam diferenças significativas entre as espécies para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$)	43
Quadro 15. Valores médios da percentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> consoante o isolado de cada fungo. Letras diferentes para a inibição (%) de cada isolado representam diferenças significativas entre os isolados para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).....	46
Quadro 16. Valores médios do crescimento diametral de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (isolados PH107 e PH1160) ao sétimo dia seguidos dos respetivos desvios padrão e valores em percentagem de inibição (letras diferentes para o Diâmetro (cm) e Inibição (%) representam diferenças significativas entre a percentagem de extrato para o teste de Tukey HSD ($p < 0,05$)).....	48

Quadro 17. Número médio de esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em cada modalidade (percentagem de extrato de <i>Omphalotus</i>) correspondente à primeira contagem (letras diferentes representam diferenças significativas entre os extratos para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))	50
Quadro 18. Valores médios da extensão das lesões externa, interna e do colo, da notação radicular e dos dias de sobrevivência das plantas (letras diferentes para cada tipo de medição representam diferenças significativas, entre as modalidades, da extensão das lesões, da notação da raiz ou dos dias de sobrevivência para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$)).....	53
Quadro 19. Valores médios da extensão das lesões externa, interna e do colo, da notação radicular e dos dias de sobrevivência das plantas do clone SC32 (letras diferentes para cada tipo de medição representam diferenças significativas, entre as modalidades, da extensão das lesões, da notação da raiz ou dos dias de sobrevivência para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))	53
Quadro 20. Valores médios dos dias de sobrevivência consoante a inoculação nos dois híbridos	56

Nomes científicos citados no texto

Acacia pulchella R. Br.
Agaricus brunnescens Peck
Aleuria aurantia (Pers.) Fuckel
Amanita rubescens Pers.
Boletus aereus Bull.
Boletus edulis Rostk.
Cantharellus cibarius Fr.
Castanea alnifolia Nutt
Castanea ashei Sudw
Castanea crenata Sieb & Zucc
Castanea davidii Dode
Castanea dentata (Marshall) Borkh
Castanea floridana (Sarg.) Ashe
Castanea henry (Skan) Rehder & E.H.Wilson
Castanea mollissima Blume
Castanea ozarkensis Ashe
Castanea paucispina (L.) Miller
Castanea pumila (L.) Miller
Castanea sativa Miller
Castanea sequinii Dode
Cenococcum geophilum Fr.
Cinnamomum burmannii (Nees & T. Nees) Blume
Cortinarius elatior Fr.
Cryphonectria parasitica (Murrill) M.E. Barr
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.
Ganoderma resinaceum Boud.
Hebeloma crustuliniforme (Bull.) Quéf.
Inocybe maculata Bond.
Laccaria bicolor (Maire) P. D. Orton
Leccinum duriusculum (Schulzer ex Kalchbr.) Singer
Lentinula edodes (Berk.) Pegler
Lepista nuda (Bull.) Cooke
Macrolepiota procera (Scop.) Singer
Medicago sativa L.
Omphalotus olearius (DC.) Singer
Paxillus involutus (Batsch) Fr.
Phytophthora cambivora (Petri) Buisman
Phytophthora cinnamomi Rands
Phytophthora cryptogea Pethybr. & Laff.

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary
Phytophthora sojae Kaufm. & Gerd.
Pinus radiata D. Don.
Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch
Pleurotus djamor (Rumph. ex Fr.) Boedijn
Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.
Quercus ilex L.
Quercus suber L.
Scleroderma citrinum Pers.
Thelephora terrestris Ehrh.
Tricholoma sulphureum (Bull.) P. Kumm.
Xerocomus rubellus (Krombh.) Quéf.

1- Introdução

1.1. O castanheiro

1.1.1. Classificação e história

O castanheiro europeu, *Castanea sativa*, é uma espécie pertencente ao género *Castanea* da família das *Fagaceae*. Além do castanheiro europeu, que tem interesse económico pelo fruto e pela madeira, o género *Castanea* engloba ainda outras espécies de elevado interesse económico como *C. dentata* (castanheiro americano), *C. mollissima* (castanheiro chinês) e *C. crenata* (castanheiro japonês), assim como outras com valor económico reduzido ou desconhecido como *C. alnifolia*, *C. ashei*, *C. davidii*, *C. floridana*, *C. henry*, *C. ozarkensis*, *C. paucispina*, *C. pumila* e *C. seguinii*. Estas espécies variam no seu porte sendo que algumas apresentam porte arbustivo (*C. davidii*, *C. alnifolia* e *C. paucispina*) enquanto outras podem alcançar 20 a 35 metros (*C. dentata*, *C. sativa* e *C. henry*) (Bergougnoux & Verlhac, 1978; Vieitez *et al.*, 1996; Corredoira *et al.*, 2004).

O castanheiro europeu é uma espécie de folha caduca, as folhas são simples, de 10-25 cm de comprimento por 5-8 cm de largura, com a margem serrada. Trata-se de uma espécie monóica com floração de Maio a Junho. As flores masculinas estão dispostas em amentilhos eretos e são amarelas com 10 a 20 cm de comprimento. As flores femininas encontram-se em amentilhos, envolvidas por um involúcro de brácteas. Os frutos, vulgarmente conhecidos por castanhas, são glandes rodeadas por uma cúpula acrescente e espinhosa (designada por ouriço), e a sua maturação ocorre de Outubro a Novembro. Normalmente o castanheiro começa a frutificar aos 20 anos. É uma árvore adaptada a climas húmidos, luminosos, sem temperaturas muito elevadas (Serrazina, 2004; Silva, 2007).

Por ser uma espécie de origem muito antiga e por ser cultivada pelo homem há muito tempo, é difícil estimar a área de distribuição primitiva do castanheiro. Contudo muitos autores concordam com a hipótese de o castanheiro ser originário da Ásia Menor (também designada por Anatólia) (Silva, 2007).

Na Europa o castanheiro está presente desde o final da era Mesozoica, ou mais seguramente desde a era Cenozoica, época em que se deu a sua expansão. A existência de *C. sativa* na Europa vem de tempos tão longínquos que é difícil perceber, em determinadas regiões, quais as populações autóctones e quais as que foram cultivadas e se tornaram posteriormente selvagens (Bergougnoux & Verlhac, 1978; Silva, 2007).

Até à data pensava-se que o castanheiro tinha sido introduzido em Portugal pelos romanos, que começaram a ocupar a Península Ibérica há cerca de 2000 anos. Em sondagens realizadas em turfeiras da Serra da Estrela, a 1600 m, foram descobertas concentrações polínicas fósseis com 8000 anos (período Paleolítico). Embora ainda seja preciso saber com maior exatidão a datação do pólen encontrado é possível considerar que a ocorrência do castanheiro em Portugal é bastante anterior aos romanos, colocando-se a hipótese de ser uma espécie já existente no nosso país desde a época pré-histórica (Van Den Brink & Janssen, 1985).

1.1.2. Distribuição, evolução e importância

Na Europa, mais propriamente a norte da Bacia do Mediterrâneo, encontra-se a espécie *C. sativa* vulgarmente designada por castanheiro europeu. Este castanheiro cobre uma área total de 2,53 milhões de hectares, dos quais, dois milhões correspondem a florestas em que esta espécie é dominante e uma área de 530 000 ha é ocupada por povoamentos geridos para produção de fruto. Esta espécie tem especial incidência em Espanha, França, Grécia, Itália, Portugal e Turquia. A área de ocupação da espécie *C. dentata* está, hoje em dia, restrita ao sudeste do continente norte-americano. A espécie *C. mollissima* é originária da China podendo ser também encontrada na Coreia do Norte. Já *C. crenata* encontra-se estabelecida no Japão e Coreia do Sul. (Bergougnoux & Verlhac, 1978; Corredoira *et al.*, 2004; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011).

Em Portugal a cultura do castanheiro está espalhada por todo o país porém, é em Trás-os-Montes e Beira-Alta que se encontra mais concentrada. Podem ser encontradas algumas manchas bem delimitadas em Alcobaça, Fundão, Monchique e Portalegre (Práxis, 2000). Dados recentes do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2012) apontam para 34 656 hectares de área ocupada por castanheiro em 2012, dos quais 30 586 ha (88%) estão situados na região Norte (maioritariamente Trás-os-Montes), 3 529 ha na região Centro (10%), 520 ha no Alentejo (1,5%), distribuindo-se a restante área pelo Algarve, Lisboa e ilhas.

Em Portugal é possível encontrar dois tipos de povoamento de castanheiro europeu que apresentam características diferentes, resultado da exploração/gestão aplicada a cada um. Os castiçais são povoamentos geridos com o objetivo de produzir madeira, muito utilizada na indústria do mobiliário, consistindo numa exploração em talhadia onde as varas são aproveitadas para a cestaria. Os soutos são povoamentos de castanheiro cuja exploração é orientada para a produção de fruto, onde os castanheiros são propagados por enxertia em porta-enxertos de variedades não produtivas. A castanha tem elevado valor económico principalmente no Inverno quando o seu preço atinge os valores mais altos. Em Portugal existem quatro “Denominações de Origem Protegida” (DOP) para a castanha: Castanha da Terra Fria, Castanha dos Soutos da Lapa, Castanha da Padrela e Castanha de Marvão. As variedades mais comuns são a ‘Judia’, a ‘Longal’, a ‘Côta’ e a ‘Martaínha’. A variedade Judia representa 50% das castanhas produzidas em Portugal (Silva, 2007; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

De acordo com os dados da Food and Agriculture Organization (FAO, 2013), a produção mundial de castanha é estimada em 1,2 milhões de toneladas para uma área de cerca de 360 000 hectares. A China é o maior produtor mundial com um volume anual de 1 milhão de toneladas, o que representa 73% da produção mundial. A Europa produz 9% da produção mundial, onde a Itália lidera com 4% (55 000 toneladas) seguindo-se Portugal com 2% (23 000 toneladas). O Quadro 1 apresenta a evolução da área e produção de castanha em Portugal nos últimos anos.

Quadro 1. Evolução da área de castanheiro em Portugal e efeito sobre a produção de castanha (Fonte: AFN, 2010; FAO, 2013)

	Área (ha)	Produção (ton)	Produtividade (kg/ha)	Exportação (ton)	Valor Exportado (x10 ³ €)	Preço* ¹ (€/kg)
1995	41 000	-	-	-	-	-
2000	29 101	33 317	1 145,0	8 553	11 072	0,62
2005	30 276	22 327	737,4	4 372	7694	1,40
2006	30 265	30 900	1021	8 639	10 969	1,04
2007	33 117	24 251	732,3	7 774	14 869	1,45
2008	33 732	23 916	709,0	5 538	12 605	1,53
2009	34 591	24 305	702,6	7 154	13 793	1,10
2010	34 600	22 350	646,0	6 842	16 003	1,44
2011	34 648	18 271	527,3	8 984	18 127	1,44
2012	34 656	18 926	546,1	13 046	32 293* ²	1,64

*¹ Preço pago no produtor

*² Dados provisórios

Em 2011, Portugal exportou castanha principalmente para França, Espanha e Brasil, com receitas que rondaram os 18 milhões de euros (Anuário Agrícola, 2012).

1.1.3. Principais problemas do castanheiro

Na Europa, durante o século XX a produção de fruto de castanheiro diminuiu acentuadamente com uma perda de cerca 300 milhões de euros. Na América do Norte, na mesma época, os povoamentos de *C. dentata* quase desapareceram. Este decréscimo de produção na Europa e de área nos Estados Unidos deve-se essencialmente a infeções causadas por agentes patogénicos que são letais para a planta. A doença da tinta, provocada pelos oomicetas *Phytophthora cinnamomi* (espécie mais virulenta) e *Phytophthora cambivora*, e o cancro do castanheiro, provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica*, são as principais e mais graves doenças do castanheiro (Silva, 2007; Costa *et al.*, 2011).

O cancro do castanheiro teve origem na Ásia Oriental e entrou na América do Norte onde foi responsável pelo desaparecimento de 95% da área de castanheiro americano (*C. dentata*) (Bergougnoux & Verlhac, 1978). Foi detetado por Mekel em Nova Iorque, em 1904, espalhando-se rapidamente pelos povoamentos de castanheiro americano dos estados vizinhos (Silva, 2007). Em 1950 o cancro do castanheiro apareceu na Europa mais propriamente em Itália e depois em Espanha, França e Suíça (Vieitez *et al.*, 1986). Em Portugal a espécie *C. parasitica* foi descrita pela primeira vez por Câmara (1929) em castanheiro japonês (*C. crenata*) na Beira Interior (Bragança *et al.*, 2007). Em 1989, apenas foram encontrados dois focos de doença em *C. sativa* na região de Trás-os-Montes e Alto Douro (Abreu, 1992). Os resultados do trabalho de prospeção e distribuição geográfica do cancro do castanheiro em Portugal, em Bragança *et al.* (2007), sugerem que a distribuição e a severidade do cancro, no nosso país, são causa de preocupação. O fungo *C. parasitica* penetra por feridas na planta, coloniza a zona cortical, o câmbio e alastra para o lenho; as plantas apresentam cancros no tronco e nos ramos, bem como ramos mortos e secos, como sintomas da doença (Connors *et al.*, 2002; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

Vettraiño *et al.* (2001) consideram a espécie *P. cinnamomi* o agente patogénico mais importante em *C. sativa* na Península Ibérica. A doença da tinta foi a causa de enormes devastações em povoamentos de castanheiro europeu na Europa no final do século XIX, havendo relatos de graves crises em Itália, Espanha, França e Portugal (Bergougnoux & Verlhac, 1978). Em Portugal a doença da tinta terá aparecido no Minho em 1838 (Costa *et al.*, 2011). O avanço da doença foi de tal forma alarmante e devastador que J. Vieira Natividade abordou o problema em 1945 fazendo um levantamento do avanço da doença e elaborando um plano de intervenção de combate à doença, que se centrava nos tratamentos, na prevenção e seleção clonal (Gouveia, 1993; Práxis, 2000). Segundo Gouveia (1993), citando outros autores, o efeito da doença da tinta pode ser avaliado pela área de ocupação de castanheiro que era de 38 236 ha em 1908 regredindo para os 15 400 ha em 1989. Sendo considerada por muitos a principal causa do declínio e degradação dos soutos, a doença da tinta atinge, atualmente, proporções epidémicas em Portugal (Gouveia, 1993; Abreu *et al.*, 1999).

O castanheiro europeu é uma das espécies mais suscetível ao ataque de oomicetas do género *Phytophthora*. O castanheiro americano embora possa ser infetado por *Phytophthora* spp. é mais suscetível ao cancro provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica*. O castanheiro japonês é considerado tolerante aos agentes patogénicos do género *Phytophthora* enquanto o castanheiro chinês (*C. mollissima*) tolera o fungo *C. parasitica* (Seabra & Pais, 1998; Corredoira *et al.*, 2004 & 2007; Barakat *et al.*, 2009).

1.2. Doença da tinta

1.2.1. Agentes causais

A doença da tinta é provocada por duas espécies pertencentes ao género *Phytophthora*, *Phytophthora cinnamomi* e *Phytophthora cambivora*. A palavra “Phytophthora” deriva do grego e quer dizer destruidor de plantas (phyto-plantas, pthora-destruidor). O género *Phytophthora* pertence ao reino Chromista, classe Oomycetes, ordem Peronosporales e família Pythiaceae. Por terem características muito semelhantes aos fungos, estas espécies foram durante muito tempo incluídas no reino *Fungi* (*Myceteeae*) apesar de se atribuir, desde sempre, singularidades biológicas e fisiológicas a este género em relação ao reino onde se inseria (Erwin & Ribeiro, 1996; Gouveia, 2004). Zentmyer (1987) apontou para características no género *Phytophthora* que não eram comuns em organismos classificados como fungos:

- Os zoósporos produzem uma parede celular durante o processo de enquistamento necessário para que possam germinar e causar infeção;
- Os zoósporos possuem dois flagelos morfologicamente diferentes;
- A parede celular é constituída essencialmente por celulose e por β -glucanas ao contrário dos fungos em cuja parede o principal constituinte é a quitina;
- Durante a fase vegetativa são organismos diploides ao contrário dos fungos que são haploides;
- Acumulam como substância de reserva micolaminarinas (β 1-3-glucanas e manitol) enquanto os fungos acumulam como principal substância de reserva o manitol;

- Não sintetizam esteróis e por essa razão não são sensíveis aos fungicidas que interferem com a sua biossíntese.

Apesar de *P. cinnamomi* e *P. cambivora*, espécies responsáveis pela doença da tinta, causarem sintomatologia muito semelhante em castanheiro, Fernandes (1966) considerou a primeira daquelas espécies o agente patogénico preponderante no desenvolvimento da doença da tinta em Portugal. Este autor isolou apenas três culturas de *P. cambivora* em largas dezenas de isolados identificados como *P. cinnamomi*.

A espécie *Phytophthora cinnamomi* foi descrita pela primeira vez na ilha de Sumatra, em 1922, por Rands. O hospedeiro, a árvore da canela (*Cinnamomum burmanii*), deu o nome a este oomiceta. Desde então esta espécie provou ser um sério agente patogénico causador da podridão das raízes e, segundo Zentmyer (1980), afeta perto de um milhar de espécies de taxonomias distintas em todo o mundo (Erwin & Ribeiro, 1996).

O micélio de *P. cinnamomi* é constituído por hifas tubulares (com 8 µm de diâmetro médio), cenocíticas (asseptadas multinucleadas que resultam da divisão repetida do núcleo sem que haja divisão do citoplasma) e de cor hialina (cristalina quase transparente). As hifas apresentam numerosas dilatações esféricas (*swellings*) (característica distintiva). O crescimento do micélio dá-se na extremidade de cada hifa e as ramificações laterais apresentam geralmente uma ligeira constrição na base (Erwin & Ribeiro, 1996).

As espécies de *Phytophthora* podem ter reprodução assexuada ou sexuada, embora a reprodução assexuada seja mais comum. Em Robin (2013) é afirmado que, na Europa, não existe relatos de reprodução sexuada de *Phytophthora cinnamomi*. Os esporos assexuados (zoósporos) são produzidos no interior do esporângio ou zoosporângio (*sporangium* significa recipiente de esporos). Os esporângios produzidos pela espécie *P. cinnamomi* são ovoides ou elipsoides, não papilados com um tamanho médio de 75x40 µm (comprimento x largura). Os zoósporos libertados dos esporângios são reniformes (em forma de rim) com dois flagelos morfologicamente distintos, um mais comprido que o outro (*heterokont*), que emergem da parte côncava do zoósporo conferindo-lhe mobilidade. A espécie *P. cinnamomi* produz abundantemente clamidósporos em cultura e em tecidos infetados. Os clamidósporos são de forma globosa, com 41 µm de diâmetro médio, e a parede celular é mais espessa que a dos esporângios, embora seja mais fina do que a maioria das espécies de *Phytophthora*. Estas estruturas podem aparecer nas extremidades das hifas ou então intercaladas, sendo separadas do micélio por um septo (Erwin & Ribeiro, 1996; Gouveia, 1993; Gouveia, 2004).

Os esporos sexuados do género *Phytophthora* designam-se oósporos e são resultantes da conjugação de dois gametângios morfologicamente distintos (anterídeo e oogónio). Dentro do género *Phytophthora* existem espécies homotáticas (cujo micélio, ou talo, é auto-fértil) e espécies heterotáticas (cujo micélio é auto-incompatível) que necessitam de micélio compatível para que haja reprodução sexuada. A espécie *P. cinnamomi* é heterotática e forma oósporos por pareamento com a espécie *Phytophthora cryptogea*. A produção de oósporos pode também ser estimulada por fatores externos, como seja a libertação de substâncias químicas por outros fungos (por exemplo, *Trichoderma*) ou extratos de raízes (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996).

Os zoósporos são considerados os propágulos mais eficientes no processo de infecção das plantas. A rapidez com que a espécie *P. cinnamomi* produz esporângios e zoósporos, sobre tecidos infetados, em condições favoráveis, nomeadamente água livre no solo, faz com que seja um agente patogénico de elevado risco. É possível que esta espécie assuma proporções epidémicas num local onde, pouco tempo antes, o inóculo era muito reduzido, ou indetetável (Gouveia, 1993).

1.2.2. Processo infeccioso e disseminação

Phytophthora cinnamomi é um oomiceta do solo que ataca as raízes e todo o seu ciclo de vida é passado na rizosfera, dependendo diretamente das condições de humidade e temperatura, sendo a Primavera a altura do ano em que as condições para a infecção são mais favoráveis. A existência de água livre no solo induz a libertação dos zoósporos que se deslocam, graças aos flagelos, para encontrar um hospedeiro. As raízes das plantas libertam exsudados que atraem os zoósporos, que se acumulam nas raízes novas ou lesionadas, iniciando-se assim o processo de infecção. As raízes com lesões são mais suscetíveis à infecção devido a uma maior libertação de exsudados e conseqüentemente uma maior atração de zoósporos. Esta atração através da libertação de substâncias químicas para a rizosfera (vitaminas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, etc.) é designada por quimiotaxia (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996). Alguns autores, citados em Gouveia (1993), defendem que o movimento dos zoósporos é induzido por cargas elétricas das partículas designando-se este fenómeno por eletrotaxia.

Os zoósporos nadam durante algum tempo e quando cessam o movimento desenvolvem uma parede celular num processo designado por enquistamento. Nesta altura, os zoósporos possuem a característica de aderirem com facilidade a uma superfície sólida que, no caso das raízes, deixa os zoósporos numa situação privilegiada para infetarem os tecidos radiculares. A germinação dos zoósporos enquistados (quistos) dá-se através da emissão de um ou mais tubos germinativos que penetram na epiderme. Uma vez no interior da planta o tubo germinativo cresce e o micélio desenvolve-se entre e dentro das células (inter e intra-celular) alimentando-se dos nutrientes presentes no conteúdo celular. Normalmente a infecção tem início nas raízes mais finas (novas) não lenhificadas, propagando-se às raízes lenhificadas, colo e posteriormente a toda a árvore (Gouveia, 1993; Gomes-Laranjo *et al.*, 2009).

Além do efeito na mobilidade dos zoósporos, os exsudados radiculares exercem também um efeito indutor na germinação de clamidósporos, estruturas primárias de sobrevivência de *P. cinnamomi*. A germinação ocorre, também, por emissão de um ou mais tubos germinativos com posterior desenvolvimento de micélio e está dependente das condições nutricionais do meio (quantidade de exsudados radiculares) (Mircetich & Zentmyer, 1970, citado em Gouveia, 1993).

A disseminação da espécie *Phytophthora cinnamomi* é potenciada pela água que transporta os propágulos (zoósporos, clamidósporos e oósporos) e fragmentos de micélio no sentido da drenagem natural dos solos e linhas de água. No campo a sua dispersão é feita em forma de mancha de óleo e no sentido do declive do terreno (por onde escorre a água). Em operações culturais realizadas na agricultura e na floresta, as movimentações de solo e o transporte de material infetado constituem também uma forma de propagação do oomiceta, nomeadamente através da utilização de

maquinaria nas operações culturais, que é suscetível de disseminar o inóculo a partir de solos contaminados. Também os animais podem contribuir para o transporte de propágulos de *P. cinnamomi* (Gouveia, 1993).

A severidade da doença da tinta em determinado local (por exemplo, um povoamento) está dependente de três elementos: o ambiente, o agente patogénico e o hospedeiro. Estes elementos interagem entre si, podendo determinar o carácter epidémico da doença (Erwin & Ribeiro, 1996).

Quanto às condições ambientais, como já foi referido, é fundamental a existência de água livre no solo para induzir a produção de esporângios e para a libertação e dispersão dos zoósporos. O excesso de água no solo leva a condições de anaerobiose que interfere, também, diretamente com o hospedeiro. Sob estas condições as plantas reagem aumentando a produção de exsudados radiculares (que induzem a germinação dos zoósporos) e a proliferação de raízes secundárias (raízes não lenhificadas facilitam a entrada do tubo germinativo). A anaerobiose do solo, causada pelo excesso de água, enfraquece o hospedeiro e propicia o desenvolvimento da doença, observando-se assim uma influência indireta do excesso de água na interação agente patogénico-hospedeiro (Gouveia, 1993).

A temperatura também é um fator preponderante exercendo influência direta no crescimento de *P. cinnamomi* e na produção de esporângios. Em abacateiro, Zentmyer (1981) verificou que a infeção de *P. cinnamomi* ocorria entre 15°C e 27°C (com o ótimo acima dos 21°C) e que acima dos 33°C não se desenvolvia infeção (Gouveia, 1993).

Em relação ao agente patogénico, a espécie *P. cinnamomi*, na ausência de hospedeiros, sobrevive no solo sob a forma de micélio, até 60 dias, e os zoósporos têm uma longevidade de 2 a 8 semanas. Porém são os clamidósporos que garantem a sobrevivência a longo prazo, dado que resistem no solo até 6 anos, para depois, sob condições ideais, germinarem e rapidamente haver reposição de inóculo para níveis suficientes para se dar a infeção de novos hospedeiros (Hwang & Ko, 1978).

O hospedeiro, *C. sativa*, é uma espécie com grande suscetibilidade à doença da tinta não possuindo mecanismos de defesa, físicos ou bioquímicos, ao nível das raízes que impeçam a entrada do agente patogénico *P. cinnamomi*. A suscetibilidade de um hospedeiro conjugado com um agente patogénico agressivo e condições ambientais favoráveis levam ao desenvolvimento de doenças de carácter epidémico.

1.2.3. Sintomatologia em Castanheiro

A espécie *Phytophthora cinnamomi* é o fitopatogénio causador da chamada doença da tinta. O nome advém do facto de as plantas infetadas exsudarem um líquido de cor violeta ou azul escuro a partir dos tecidos afetados, que é consequência da oxidação dos polifenóis libertados pelas células corticais, do floema ou do câmbio.

Como já foi referido, este oomiceta inicia o processo de infeção pela raiz (Figura 1d). Nas raízes mais finas observa-se um enegrecimento ficando com um aspeto apodrecido que é resultado da decomposição do córtex. As raízes de maior diâmetro e lenhificadas, posteriormente infetadas, apresentam manchas de cor escura consequência da degradação do córtex e câmbio (Grente, 1961).

O aparecimento de sintomas ao nível da copa (Figura 1a e 1b) é indicador de que a doença está num estado avançado e a sobrevivência da árvore é pouco provável. Assim, a deteção precoce da doença da tinta com base na visualização dos sintomas torna-se muito difícil. Na copa os sintomas têm uma evolução basípeta: de início é evidente uma clorose acentuada das folhas, que posteriormente murcham e acabam por secar. As folhas caem ou, no caso de dessecação rápida, ficam agarradas à árvore mesmo na altura de repouso vegetativo. Na Primavera as folhas podem apresentar-se mal desenvolvidas, pequenas ou enroladas. As flores masculinas caem, muitas vezes, prematuramente sem terem polinizado as flores femininas que raramente se formam. Os ramos apresentam entrenós curtos e epiderme espessa e vão secando até morrer. Os ouriços, quando se formam, permanecem agarrados à árvore e podem ser de pequeno tamanho. Os frutos não se formam no interior dos ouriços ou quando se formam são mal formados ou de pequenas dimensões. Ao nível do colo é possível, apesar de não ser sintoma constante, observar-se uma mancha escura em forma de cunha ou de contornos irregulares (Figura 1c). Também ocorre rebentamento de ramos junto ao colo da árvore (Fernandes, 1966).



Figura 1. Sintomas causados por *Phytophthora cinnamomi* em castanheiro ao nível da copa (a, b) (DRATM, 2003), tronco (c) (Robin, 2013) e raiz (d) (Hebard, 2014).

1.2.4. Métodos de luta

1.2.4.1. Fundamentos para a estratégia de controlo de uma doença

A grande capacidade de sobrevivência de *P. cinnamomi* dificulta em muito as estratégias de combate a este oomiceta (Hwang & Ko, 1978).

Para efetuar um controlo eficiente de um agente patogénico ao menor custo é necessário uma investigação de todas as opções disponíveis. Para isto é necessário conhecer o agente e quando é que este se encontra na fase mais suscetível do seu ciclo de vida efetuando-se um controlo ao nível do agente patogénico; é necessário conhecer o hospedeiro e o que o torna mais suscetível ao agente agressor, agindo-se ao nível do hospedeiro (*C. sativa*); e, por fim, como é que o ambiente exerce influência tanto no agente patogénico como no hospedeiro, controlando-se as condições ambientais que propiciam a doença. O agente patogénico, o hospedeiro e o ambiente constituem os três elementos mais importantes em que os métodos de controlo se devem basear. Quando se aplicam medidas que afetam a sua interação efetua-se um controlo eficaz da doença (Erwin & Ribeiro, 1996).

1.2.4.2. Medidas de higiene e sanitárias

Segundo Coffey (1987) a resposta para o combate à doença provocada pelo oomiceta *P. cinnamomi* em abacateiro reside na integração dos vários métodos de luta (luta genética, cultural, química e biológica) que devem englobar quatro princípios: higiene e sanitização, controlo cultural e biológico, porta-enxertos resistentes e fungicidas.

As medidas sanitárias consistem na prevenção de aparecimento de inóculo no solo e diminuição da quantidade de inóculo presente no solo através da remoção de material vegetal infetado do local. No campo, a remoção de material vegetal infetado é considerado insuficiente para o controlo das doenças provocadas por *Phytophthora* spp., pois, como já foi referido, uma vez no solo, estes oomicetas tem a capacidade de se multiplicar e disseminar rapidamente. Esta medida pode, no entanto, evitar a sua dispersão generalizada. Evitar a contaminação do solo em áreas ainda não contaminadas por *P. cinnamomi* é fundamental sendo, em alguns casos, a primeira linha de defesa contra a doença da tinta. Sem inóculo não há desenvolvimento de doença, porém uma vez no solo a sua erradicação não é economicamente viável ou mesmo exequível. A prevenção do aparecimento de inóculo no solo tem, portanto, grande significado e ainda mais quando aplicada em viveiros onde as medidas sanitárias além de adequadas deveriam ser um requisito. Nos viveiros é fundamental a obtenção de material de propagação isento de *P. cinnamomi* para evitar o transporte de inóculo para o campo. Em Portugal, a maioria dos soutos é composta por plantas obtidas a partir de semente proveniente de campos infetados ou suspeitos de estarem infetados com a doença da tinta (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996).

Coffey (1987) sugeriu um conjunto de medidas sanitárias básicas para serem utilizadas nos viveiros com o fim de evitar a propagação de inóculo de *P. cinnamomi* aquando da multiplicação do abacateiro:

- Tratamento das sementes utilizadas na propagação por imersão em água a 48-52°C, durante 30 minutos;

- Esterilização dos substratos por calor ou fumigação química;
- Utilização de substratos arejados e com boa drenagem;
- Os locais de multiplicação devem ter acesso vedado e na entrada deve-se proceder à desinfecção do calçado com um banho em mistura de calda bordalesa;
- Colocação de uma barreira física para separar o viveiro da vegetação que possa existir em redor.

Em Portugal algumas destas medidas poderiam ser facilmente aplicadas nos viveiros onde os castanheiros são propagados, evitando a disseminação de inóculo de *P. cinnamomi* (Gouveia, 1993).

A esterilização de substratos recorrendo à fumigação com produtos químicos acarreta desvantagens. Este tipo de tratamento leva, com frequência, ao aparecimento de novas doenças devido à destruição dos seus antagonistas pelo produto; pode também conduzir ao fenómeno de vácuo biológico podendo propiciar uma colonização mais severa do agente patogénico e a alterações químicas e nutricionais do solo. Esta técnica não é, portanto, recomendada pelo que será preferível ter cuidados redobrados na reutilização de substratos, efetuando-se sempre testes de despiste da presença de *P. cinnamomi* (Gouveia, 1993).

A solarização do solo consiste na captação de calor radiante proveniente do sol, através do uso de filmes de polietileno colocados na superfície do solo, previamente humedecido. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na destruição de agentes patogénicos e infestantes do solo. A solarização tem um efeito mais positivo em locais onde os verões são quentes e os dias são, maioritariamente, limpos (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996). Barbercheck & Von Broembsen (1986) verificaram, *in vitro*, que os clamidósporos de *P. cinnamomi* ficavam inativos quando submetidos a temperaturas de 44°C durante 10 minutos ou 38°C durante 30 minutos. No solo, estes autores demonstraram que o oomiceta *P. cinnamomi* era suprimido até uma profundidade de 30 cm quando submetido a um período de seis semanas de solarização. Em três semanas de solarização a supressão não foi total, com sobrevivência do oomiceta rondando os 9%.

1.2.4.3. Métodos culturais

As práticas culturais têm sido aplicadas com o objetivo de controlar a severidade da podridão radicular causada por *P. cinnamomi*. Um dos métodos culturais mais eficazes, demonstrado por Coffey (1987), foi a plantação de abacateiros em câmaras de 1-1,5 m de diâmetro e 0,5-1,0 m de altura. Segundo o autor, este método pode também ser aplicado, com resultados positivos, em solos arenosos leves. A vantagem do método de plantação em câmara está na mobilização do solo que tem de ser descompactado para construir o câmara, resultando um solo de plantio geralmente friável na textura e com melhor drenagem. O facto de a árvore estar elevada em relação ao solo pode evitar o contacto das plantas com a água livre presente num solo encharcado (Coffey, 1987; Erwin & Ribeiro, 1996).

A incorporação de compostos orgânicos no solo tem sido outra prática cultural estudada para combater doenças causadas por *Phytophthora* spp. Foram obtidos resultados positivos com a aplicação de farinha de alfafa (também conhecida por luzerna, *Medicago sativa*) em substratos contaminados com *P. cinnamomi*. A redução da incidência da podridão radicular em abacateiro, após

aplicação ao solo da farinha de alfafa, está associada com a produção de amónia (NH₃) e o aumento do número de microrganismos competidores no solo. A incorporação de compostos orgânicos com uma razão carbono/azoto elevada, como por exemplo a palha, mostrou-se menos eficaz na redução da podridão radicular do que os compostos com uma baixa razão C/N como é o caso da farinha de alfafa. Foram obtidos resultados mais positivos com a farinha de alfafa misturada com a totalidade do solo infetado (possível apenas em estufa) do que aplicada por *mulching*, que consiste na aplicação de uma camada de material orgânico sobre o solo. Estes resultados demonstram a dificuldade da aplicabilidade dos compostos orgânicos na luta contra a podridão radicular (Erwin & Ribeiro, 1996).

Em locais onde os povoamentos são regados e a chuva não é abundante, a gestão da irrigação, por forma a evitar o encharcamento do solo, é uma medida passível de ser aplicada com resultados contra a podridão radicular. Porém, em sítios onde a fonte principal de água é a precipitação, e se esta for abundante, torna-se fundamental que haja uma drenagem horizontal e vertical ótima do solo (Erwin & Ribeiro, 1996).

A aplicação de extratos de plantas tem-se mostrado eficaz na inibição de algumas espécies de *Phytophthora*. Existem relatos de que o crescimento e patogenicidade da espécie *P. cinnamomi* são inibidos pela casca de *Pinus radiata* aplicada na água e em substrato. Extratos voláteis das raízes da espécie *Acacia pulchella* (arbusto da família *Fabaceae*) inibiram o crescimento micelial, suprimiram a produção e germinação de esporângios e reduziram a germinação de zoósporos em cultura (Gerrettson-Cornell *et al.*, 1976; Whitefiled *et al.*, 1981).

1.2.4.4. Métodos de controlo biológicos

O controlo biológico consiste na utilização de organismos, genes ou produtos génicos (resultantes da expressão de um gene) com o objetivo de reduzir o inóculo de uma espécie patogénica, retardar ou inibir a infeção ou promover os mecanismos de resistência do hospedeiro. Para alguns autores o controlo biológico pode englobar o desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, assim como a utilização de métodos de controlo culturais, que promovam a atividade de microrganismos no solo podendo levar à criação de solos supressivos (Erwin & Ribeiro, 1996).

Solos supressivos são solos onde os agentes patogénicos não se conseguem desenvolver ou não iniciam o processo infeccioso, mesmo estando presentes no solo. Este tipo de solos intrigou durante muitos anos os investigadores. Muitas pesquisas foram feitas no sentido de descobrir a razão pela qual este tipo de solos suprime o desenvolvimento da doença, ou mesmo o desenvolvimento do organismo patogénico. Muitos autores atribuíram a supressividade de alguns solos a uma maior concentração de microrganismos antagonistas no solo. Logo, solos que promovam a proliferação de microrganismos antagonistas (bactérias, actinomicetas, fungos, etc.) na rizosfera aumentam a possibilidade de se tornarem supressivos face a um dado agente patogénico. Através dos exsudados radiculares as plantas podem interferir no desenvolvimento e variedade da microflora ao nível da rizosfera, inclusivamente microflora antagonista. Erwin & Ribeiro (1996) compilou relatos de vários autores acerca de solos supressivos ao agente patogénico *P. cinnamomi* na Austrália. A percentagem da população de bactérias, nomeadamente actinomicetas, antagonistas ao agente patogénico *P. cinnamomi* em solos argilosos, considerados supressivos, foi maior (4,2%) do que em solos

lateríticos (0,75%), considerados permissivos e onde ocorre favorecimento do desenvolvimento de doença. Solos lateríticos são solos muito alterados que se formam pela ocorrência de lixiviação (devido, por exemplo, a excesso de chuva), formando uma crosta composta por nutrientes lixiviados, nomeadamente ferro e alumínio, que se torna impermeável (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996).

A existência de solos supressivos e o conhecimento deste tipo de solos pode ser importante para definir uma estratégia de luta contra *P. cinnamomi*. Em solos onde há expressão da doença da tinta, a criação de condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos pode aumentar a população de antagonistas na rizosfera, criando um ambiente hostil ao agente patogénico. Esta promoção de desenvolvimento da microflora na rizosfera pode ser conseguida pela modificação (redução) da razão C/N no solo através da aplicação de compostos ao solo. A aplicação de compostos azotados no solo baixa a razão C/N promovendo o desenvolvimento de microrganismos (Gouveia, 1993).

O hiperparasitismo (parasitismo de um parasita) e o antagonismo causado por microrganismos é um fenómeno que explora, no meio ambiente, os efeitos de um ou mais organismos contra um agente patogénico. A introdução de antagonistas no solo tem sido muito estudada com o objetivo de substituir ou reduzir a aplicação de produtos químicos. Existem muitas bactérias, actinomicetas e fungos antagonistas de *Phytophthora* sp., porém o controlo biológico tem-se debatido com dificuldades inerentes às características epidemiológicas destas espécies, como sejam: a capacidade de produzirem, com rapidez e repetidamente, diferentes tipos de inóculo (zoósporos, esporângios, clamidósporos, oósporos e micélio); a capacidade de infetar plantas num curto intervalo de tempo; a capacidade de sobreviver em profundidade no solo, onde não são afetadas pelos antagonistas; e em alguns casos a variabilidade de hospedeiros que podem infetar. Apesar das dificuldades, numerosos estudos contribuíram para a ideia de que o controlo biológico é viável apesar do conceito ainda não ser totalmente compreendido a ponto de se desenvolver um sistema de controlo aplicável no campo (Erwin & Ribeiro, 1996).

Segundo Coffey (1987) o organismo ideal para ser utilizado no controlo biológico deve ter a capacidade de aumentar a sua população paralelamente ao crescimento das raízes responsáveis pela absorção de nutrientes; deve competir com outros organismos e ser competente na rizosfera; e após inoculação no solo deve aumentar rapidamente a sua população e colonizar a camada superficial do solo providenciando proteção às raízes novas. De acordo com este autor, para controlar a podridão radicular em abacateiros, o controlo biológico era apenas uma boa ideia sem aplicações práticas (na Califórnia). Apesar disso, como já foi referido, existem estudos que apontam para várias bactérias, actinomicetas e fungos como antagonistas da espécie *P. cinnamomi*. O Quadro 2 sumariza os organismos antagonistas que foram descritos por Malajczuk (1983) e Gouveia (1993).

Quadro 2. Espécies antagonistas da espécie *Phytophthora cinnamomi* e respectivos mecanismos de ação (Malajczuk, 1983; Gouveia, 1993)

Organismos antagonistas	Mecanismo de proteção
Bactérias (Gouveia, 1993) :	
– <i>Bacillus</i> sp.	– Produção de antibióticos
– <i>Pseudomonas fluorescens</i>	– Lise do micélio
– <i>Streptomyces</i> sp.	– Colapso dos esporângios
– <i>Streptomyces griseoalbus</i>	– Produção de antibióticos
Fungos do filo <i>Ascomycota</i> (Gouveia, 1993):	
– <i>Dactylella spermatophaga</i>	– Parasitismo das hifas e oósporos
– <i>Trichoderma harzianum</i>	– Lise das hifas por produção de antibióticos
– <i>Trichoderma viride</i>	– Lise das hifas por produção de antibióticos; parasitismo das hifas
Fungos do filo <i>Basidiomycota</i> (Malajczuk, 1983):	
– <i>Agaricus langei</i>	
– <i>Bovista brunnea</i>	
– <i>Clavulina amethystina</i>	
– <i>Clitocybe eucalyptorum</i>	
– <i>Clitocybe infundibuliformis</i>	
– <i>Collybia butyracea</i>	
– <i>Collybia</i> sp.	
– <i>Cortinarius austrovenetus</i>	
– <i>Cortinarius walkeri</i>	
– <i>Geastrum</i>	
– <i>Gymnopilus</i>	
– <i>Hyphophoropsis aurantiaca</i>	
– <i>Hygrophorus niveus</i>	
– <i>Lactarius deliciosus</i>	
– <i>Leucopaxillus cerealis</i> var. <i>piceina</i>	
– <i>Naematoloma fasciculare</i>	
– <i>Omphalina</i> sp.	
– <i>Rhizopogon vinicolor</i>	
– <i>Scleroderma bovista</i>	
– <i>Suillus luteus</i>	

Segundo Rodrigues & Martins (2005), citando outros autores, os fungos micorrízicos têm sido apontados como potenciais agentes de controlo biológico. A proteção das plantas por fungos micorrízicos contra agentes patogénicos foi demonstrada pela primeira vez em raízes de plantas germinadas do género *Pinus* e inoculadas com *P. cinnamomi*. Desde então vários estudos, em ambiente controlado ou natural, obtiveram resultados positivos na proteção de plantas contra *P. cinnamomi* utilizando, entre outros, os fungos *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus* sp. e *Laccaria laccata*. Os estudos feitos neste campo, em relação ao castanheiro, são reduzidos apesar de esta espécie estabelecer micorrizas com fungos referidos por alguns autores como antagonistas para *P. cinnamomi*. *Pisolithus tinctorius* é o exemplo de um fungo micorrízico descrito como antagonista, tendo-se observado que em plantas previamente micorrizadas com este fungo a sobrevivência das plantas infetadas por *P. cinnamomi* era maior. Martins (1997) refere, citando outros autores, que os mecanismos inerentes ao efeito protetor dos fungos micorrízicos não são ainda conhecidos, havendo apenas hipóteses que os possam explicar:

- Melhoria do estado nutricional da planta, por estímulo do vigor vegetativo e equilíbrio fisiológico;

- Estabelecimento de uma barreira física, através da formação do manto (rede de Hartig), que dificulta a penetração dos agentes patogénicos;
- Produção de substâncias para a rizosfera que impedem o crescimento de potenciais agentes causadores de doenças;
- Competitividade com o agente patogénico;
- Hiperparasitismo;
- Pré-indução de mecanismo de defesa na planta, na altura da infeção pelo fungo micorrízico;
- Alteração das propriedades da rizosfera tornando-a num ambiente hostil ao agente patogénico.

Na revisão sobre os métodos de controlo biológico, Erwin & Ribeiro (1996) sublinham as contradições no efeito antagonista de alguns organismos. Por exemplo, em alguns trabalhos, fungos do género *Trichoderma* revelaram excelentes resultados como agentes de controlo biológico de determinados agentes patogénicos, ao passo que em outros casos não revelaram qualquer efeito antagonístico contra *P. cinnamomi*. Estas contradições, segundo aqueles autores, refletem um desconhecimento das complexas interações que ocorrem no solo. Porém, por ser um método de controlo com grande potencial a nível de segurança ambiental justifica-se que mais investigação seja desenvolvida nesta área, nomeadamente para entender melhor as diversas interações que se estabelecem entre agente patogénico, hospedeiro e agente de controlo biológico. O desenvolvimento de técnicas que façam do controlo biológico um método realmente exequível é um desafio à investigação que parece valer a pena (Erwin & Ribeiro, 1996).

1.2.4.5. Utilização de porta-enxertos resistentes

Nos últimos anos tem-se trabalhado muito no sentido de tornar o castanheiro europeu mais resistente ao agente patogénico responsável pela doença da tinta, mantendo as propriedades que o valorizam (o fruto). Segundo Gouveia (1993), para o melhoramento do castanheiro em relação à doença da tinta (isto é, obtenção de material vegetal resistente à doença) é necessário:

- Identificar as fontes de resistência
- Identificar os mecanismos de resistência ligando-os com os genes responsáveis
- Desenvolver metodologia para transmitir a resistência para a espécie *Castanea sativa*
- Monitorizar a resistência ao longo do tempo para diferentes condições ambientais

Através da elaboração do plano de intervenção por parte de Vieira da Natividade em 1945 e mais tarde, em 1961, por parte de Columbano Fernandes, empreendeu-se a primeira fase do projeto (primeira etapa da estratégia de luta à doença da tinta) que consistia na seleção clonal de castanheiros nativos. A segunda etapa consistiu na substituição do castanheiro europeu por espécies que exibiam resistência natural à doença da tinta, o castanheiro japonês (*C. crenata*) e o castanheiro chinês (*C. mollissima*). O facto de estas espécies produzirem fruto de qualidade inferior e a dificuldade de adaptação ao clima apresentada por algumas proveniências, levou os investigadores a optarem por uma linha de intervenção que procurasse reunir, na mesma planta ou população, a resistência à doença (conferida pelas espécies asiáticas) e a qualidade do fruto (conferida pelo

castanheiro europeu). As primeiras hibridações surgiram como resposta a esta nova linha de intervenção, realizadas por Guerreiro (1957) e continuada por Columbano Fernandes (Fernandes, 1996). Em programas de melhoramento foram obtidos castanheiros resistentes à doença da tinta recorrendo à hibridação de *C. sativa* com *C. crenata*, embora com diferentes graus de resistência. Além dos híbridos mencionados, a espécie *C. mollissima* também tem sido testada em hibridações com o castanheiro europeu (Gouveia, 1993, Práxis, 2000).

A equipa do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) tem, desde o ano 2006, uma linha de investigação direcionada para a proteção do castanheiro contra agentes patogénicos, nomeadamente contra *P. cinnamomi*. Em 2010 iniciaram um projeto FCT (PTDC/AGR-CFL/101707/2008 – *Understanding Resistance to Pathogenic Fungi in Castanea sp.*) no qual o INIAV foi a Instituição proponente. Este projeto teve como objetivo a compreensão dos mecanismos de defesa da planta e a identificação das regiões genómicas envolvidas na resistência do castanheiro (*Castanea sativa*) à doença da tinta.

1.2.4.6. Métodos de controlo químico

A utilização de produtos químicos no controlo de oomicetas tem sido um tema abordado em diversas investigações. A sua posição taxonómica num reino diferente da generalidade dos fungos dá origem a uma estratégia de controlo específica para esta classe. Assim, fungicidas utilizados com sucesso no controlo de fungos podem não ter qualquer efeito em oomicetas, como é o caso das polioxinas que inibem a síntese de quitina, e de substâncias inibidoras da biosíntese dos esteróis como o benomil (Erwin & Ribeiro, 1996).

Apareceram então no mercado substâncias químicas seletivas contra organismos pertencentes à classe *Oomycetes*. O aparecimento dos fungicidas sistémicos (Quadro 3) constituiu uma nova linha de defesa das plantas contra as doenças causadas por espécies do género *Phytophthora*, mostrando-se mais eficazes, a longo prazo, do que os fungicidas protetores (que atuam na superfície da planta criando uma barreira para o fungo). Nos fungicidas sistémicos a substância ativa é absorvida pelas folhas, tronco ou raízes da planta sendo translocada para outra parte da planta. A translocação pode ocorrer transversalmente à folha (translaminar), no sentido ascendente em direção ao ápice (apoplástico) e descendente (simplástico), embora a maioria dos fungicidas sistémicos sejam translocados no sentido ascendente através do fluxo respiratório da planta (Gouveia, 1993; Erwin & Ribeiro, 1996).

Quadro 3. Substâncias activas de fungicidas sistémicos, contra organismos da classe *Oomycetes* (Erwin & Ribeiro, 1996)

Grupo Químico	Substância ativa	Marca comercial homologada em Portugal p/ Castanheiro ^{*1} , Formulação ^{*2}
Carbamatos	protiocarbe	—
	propamocarbe	—
Isoxazóis	himexazol	—
Acetamidas	cimoxanil	—
Fosfonatos	fosetil de alumínio	ALLETTE FLASH (BAYER), WG ETYLIT PREMIER (SAPEC), WP FOSBEL-80 PM (PROBELTE), WP ALFIL (AFRASA), WP
Fenilamidas (Acilalaninas)	metalaxil	—
	benalaxil	—
	furalaxil	—

^{*1}(Fonte: DGAV, 2014) ^{*2}WG - grânulos dispersíveis em água; e WP - Pó molhável

O aparecimento do metalaxil representou um grande avanço na luta química contra a podridão radicular e outras podridões causadas por espécies do género *Phytophthora*. Do grupo das fenilamidas, o metalaxil é a substância ativa mais usada, é solúvel na água e eficaz contra todas as espécies de *Phytophthora*, não afetando porém fungos não pertencentes à classe *Oomycetes*. É um fungicida sistémico, com translocação apoplástica, que interfere com a síntese de RNA das espécies de *Phytophthora*, podendo ser aplicado como fungicida terapêutico (curativo) em plantas já infetadas. Segundo Geissler & Katekar (1983), observou-se uma inibição da libertação de zoósporos de 90% quando era aplicado o metalaxil numa concentração de 25µg/mL (dosagem *in vitro*). Bruck & Kenerley (1983) demonstraram também que além de ter propriedades curativas o metalaxil pode também possuir propriedades profiláticas (preventivas), reduzindo os propágulos no solo (testes realizados em estufa).

A grande desvantagem do metalaxil, assim como de outros fungicidas semelhantes, está na sua ação predominantemente fungistática, ou seja, a não destruição da população de oomicetas no solo. Assim, quando o metalaxil é quimicamente transformado no solo o inóculo latente de *Phytophthora* pode reaparecer e repor concentrações de inóculo suficientes para gerar doenças letais, devido à sua capacidade de rápida regeneração. Apesar de ainda não haver evidências de desenvolvimento de resistência ao metalaxil por parte da espécie *P. cinnamomi* (e outros agentes patogénicos do solo), este fenómeno constitui um problema na medida em que ao aplicar o fungicida as populações resistentes rapidamente vão dominar em relação às que são sensíveis, pois a produção de propágulos sensíveis é suprimida. Este caso foi observado com a espécie *Phytophthora infestans* na Irlanda e Holanda, onde populações resistentes se tornaram dominantes num ano fazendo com que a aplicação de metalaxil fosse inútil no seu combate, sendo banido posteriormente desses países (Erwin & Ribeiro, 1996).

Em Portugal, o metalaxil é comercializado combinado com outras substâncias ativas mas não tem homologação específica para aplicação em castanheiro (DGAV, 2014).

Outro marco na luta química foi o aparecimento do fosetil de alumínio que também se mostrou eficaz no combate a doenças provocadas pelo género *Phytophthora*. Foi o primeiro fungicida com a capacidade de ser translocado no sentido ascendente (transportado no xilema juntamente com a água absorvida) e no sentido descendente (transportado no floema com os açúcares resultantes da fotossíntese). Pode ser aplicado nas raízes, no tronco (injeções) ou nas folhas. Este fungicida demonstrou-se eficaz no controlo da podridão radicular causada pela espécie *P. cinnamomi* em abacateiro porém, nas espécies *P. infestans* (em batateira) e *P. sojae* (em soja) o fosetil-Al foi relativamente ineficaz. Existe controvérsia entre a hipótese de o modo de atuação do fosetil-Al no controlo das espécies de *Phytophthora* ser por atividade fungitóxica direta ou, por combinação de fungitoxicidade e aumento da resistência por parte do hospedeiro (Erwin & Ribeiro, 1996). Em Portugal existem nove marcas comerciais homologadas para utilização em castanheiro (DGAV, 2014).

1.3. A rizosfera do castanheiro

Lorenz Hiltner foi o primeiro cientista, em 1904, a utilizar o termo “rizosfera”, definindo-a como sendo a região do solo cuja atividade biológica é influenciada pelas raízes das plantas. A rizosfera é também definida como a região onde o solo e as raízes entram em contacto. É no plano da rizosfera que os microrganismos do solo, como as bactérias, os fungos, os nematodes, as algas etc., estabelecem a maior parte das interações com as plantas. Estas interações podem ser benéficas ou prejudiciais para a planta, consoante a resposta desta às interações raiz-solo-microrganismo (Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999; Barea *et al.*, 2005; Fageria & Stone, 2006).

As raízes libertam exsudados de baixo peso molecular (monossacáridos, aminoácidos, vitaminas, etc.) para a rizosfera tornando-a um local atrativo para os microrganismos. Neste plano a proliferação de bactérias chega a ser o dobro do que no espaço não-rizosférico do solo. A rizosfera é também um habitat favorável ao desenvolvimento de populações fúngicas onde a proximidade com as raízes estimula a germinação dos esporos dormentes presentes no solo não-rizosférico (Dantas *et al.*, 2009).

Com efeito, entre os inúmeros organismos que se encontram na rizosfera, os fungos representam um grupo importante, podendo ter efeitos benéficos consideráveis para as plantas i) ao decomporem a matéria em compostos mais simples suscetíveis de serem assimilados pelas plantas; ii) no antagonismo com organismos da rizosfera prejudiciais à planta; iii) no estabelecimento de relações simbióticas mutualistas, onde planta e fungo são beneficiados (micorrizas) e iv) na estimulação da germinação de sementes. Porém, podem também ser prejudiciais para a planta quando causam doenças (caso dos fungos fitopatogénicos) (Klein & Paschke, 2004).

1.3.1. Fungos Saprófitas

Apesar de haver cerca de 80 000 espécies de fungos identificadas e descritas, os micologistas estimam que possam existir um total de 1,5 milhões de espécies de fungos (Rogers,

2011). São organismos heterotróficos (não realizam fotossíntese) alimentando-se por absorção através das hifas, desempenhando um importante papel ecológico nos mais diversos ecossistemas como saprófitas, simbioses mutualistas, parasitas ou hiperparasitas (Stamets, 1993; Webster & Weber, 2007).

Juntamente com as bactérias, os fungos saprófitas são responsáveis pela decomposição de matéria orgânica, sendo os principais recicladores no nosso planeta. A rede de hifas, que constitui o micélio, é concebida para penetrar entre e dentro das paredes celulares das plantas. As enzimas e ácidos produzidos pelos fungos degradam compostos moleculares complexos em compostos simples. O resultado da atividade destes fungos é o retorno de carbono, hidrogénio, azoto e minerais ao ecossistema em moléculas assimiláveis pelas plantas, insetos e outros organismos. Os fungos alimentam-se e prosperam na presença de açúcares simples (glucose, frutose, etc.), amido, aminoácidos (como fonte de azoto), etc. (Stamets, 1993; Rogers, 2011).

Segundo Stamets (1993), entre os fungos saprófitas ou decompositores podem distinguir-se decompositores primários, decompositores secundários e decompositores terciários. O primeiro grupo refere-se aos fungos decompositores de rápido crescimento e que são os primeiros a colonizar qualquer tecido vegetal morto. Estes fungos produzem micélio que adere ao tecido vegetal decompondo-o. A decomposição dá-se por ação das enzimas produzidas pelos fungos, essencialmente lenhinas e celulasas que quebram as moléculas de lenhina e de celulose da parede celular vegetal. Os fungos pertencentes ao género *Pleurotus* e a espécie *Lentinula edodes* são considerados decompositores primários.

Após a quebra das componentes estruturais lenhina-celulose por parte das enzimas os decompositores secundários decompõem o material resultante em matéria ainda mais simples. Além dos fungos decompositores secundários, também actinomicetas, bactérias e leveduras diversas degradam estes compostos. Como consequência são libertados como subprodutos energia, dióxido de carbono, amoníaco e outros gases. A espécie *Agaricus brunnescens* está descrita como decompositor secundário.

Já os decompositores terciários têm a capacidade de ocupar substratos onde a matéria já se encontra muito simplificada, aparentemente inabitável para a maioria dos fungos. É o caso da espécie *Aleuria aurantia*.

Num solo florestal existe, repetidamente, deposição de matéria orgânica. Assim, decompositores primários, secundários e terciários podem coexistir no mesmo local. Os fungos interagem entre si e com o ambiente em redor (outros microrganismos, plantas, animais e insetos) e o estudo destas interações e como elas influenciam o habitat florestal é de enorme complexidade (Stamets, 1993).

1.3.2. Fungos Micorrízicos

O termo micorriza deriva do grego (*mykes* – fungo e *rhiza* – raiz) e designa uma associação de carácter simbiótico e mutualista entre um fungo e as raízes de plantas. Heinrich Anton de Bary é considerado o “pai” do termo simbiose utilizando-o para explicar a relação entre parasita e hospedeiro e para descrever associações em que dois organismos saem beneficiados de uma relação. Este

mesmo autor, em 1879, observou que por detrás da formação dos líquenes estava uma relação entre um fungo e uma alga em que os dois tiravam proveito da associação. Em 1885, Albert Bernhard Frank utilizou o termo simbiose como uma relação que não implicava parasitismo. Com o passar do tempo, o termo simbiose tem sido cada vez mais um termo utilizado para descrever associações mutuamente benéficas entre dois organismos, enquanto o termo parasitismo descreve uma associação parasítica de um organismo com o seu hospedeiro (Martins, 1997; Smith & Read, 2008).

De acordo com Martins (1997) as micorrizas dividem-se basicamente em três grandes grupos:

1. Endomicorrizas, nas quais o fungo se instala (coloniza) predominantemente no espaço intracelular. É um grupo bastante diverso tanto nas características estruturais como na variedade de características funcionais. Este grupo engloba as micorrizas arbusculares (tipo de micorrizas mais comum) (Figura 2a), micorrizas ericoideis (que ocorrem apenas na ordem Ericales) (Figura 2b) e micorrizas das orquídeas (que suportam a nutrição na germinação de plantas da família Orchidaceae) (Dighton, 2003; Smith & Read, 2008).

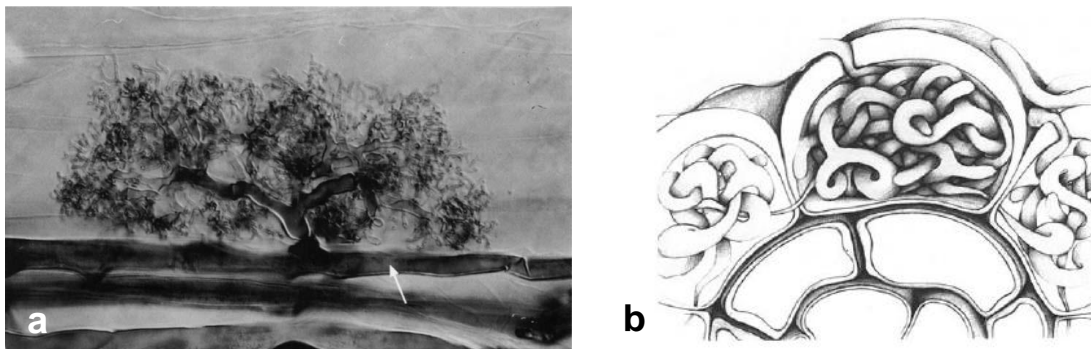


Figura 2. a) Micorriza arbuscular. A seta aponta para uma hifa intercelular a partir da qual cresceu o arbúsculo. b) Micorriza ericoide. Ilustração das células epidérmicas mostrando a entrada da hifa e posterior enrolamento intracelular (Smith & Read, 2008).

2. Ectomicorrizas, que são caracterizadas pela presença de três componentes estruturais: o manto fúngico que envolve a raiz, um conjunto de hifas intercelulares (entre as células da epiderme e as do córtex) que constituem a rede de Hartig e um sistema de elementos de hifas que crescem para o exterior (micélio exterior) que criam ligações essenciais ao solo. É um grupo estruturalmente uniforme e característico, possuindo porém uma grande diversidade de fungos associados a este tipo de associações (Martins, 1997; Smith & Read, 2008). Segundo Molina *et al.* (1992) estima-se a existência de 5 000 a 6 000 espécies de fungos que formam associações ectomicorrízicas.

Através da técnica de micorrização *paper-sandwich*, Malajczuk *et al.* (1990) conseguiram obter uma sincronização da colonização das primeiras raízes de uma espécie de *Eucalyptus* pelo fungo *Pisolithus* sp. num período de horas. A sequência da formação da ectomicorriza do eucalipto é apresentada no Quadro 4. A Figura 3 mostra a colonização de uma raiz de bétula pelo fungo *Pisolithus tinctorius*.

Quadro 4. Sequência da formação da ectomicorriza, pelo fungo *Pisolithus* sp., em eucalipto usando a técnica *paper-sandwich* (Malajczuk et al.,1990)

Tempo	Etapa de desenvolvimento	Características Anatômicas
0 – 12h	Pré-colonização	– Contacto das hifas com a raiz
12 – 24h	Início da simbiose	– Fixação do fungo à epiderme*
24 – 48h	Colonização pelo fungo	– Camadas iniciais do manto – Penetração das hifas entre as células da epiderme
48 – 96h	Diferenciação da simbiose	– Acumulação rápida das hifas constituintes do manto – Proliferação da rede de Hartig
96h – 7dias	Funcionamento simbiótico	– Manto bem formado e firmemente pressionado contra as células epidérmicas – Cessação de crescimento da rede de Hartig

*A ligação do fungo à epiderme parece dever-se à libertação de polissacáridos por parte da raiz (Nylund, 1980, citado por, Martins, 1997).

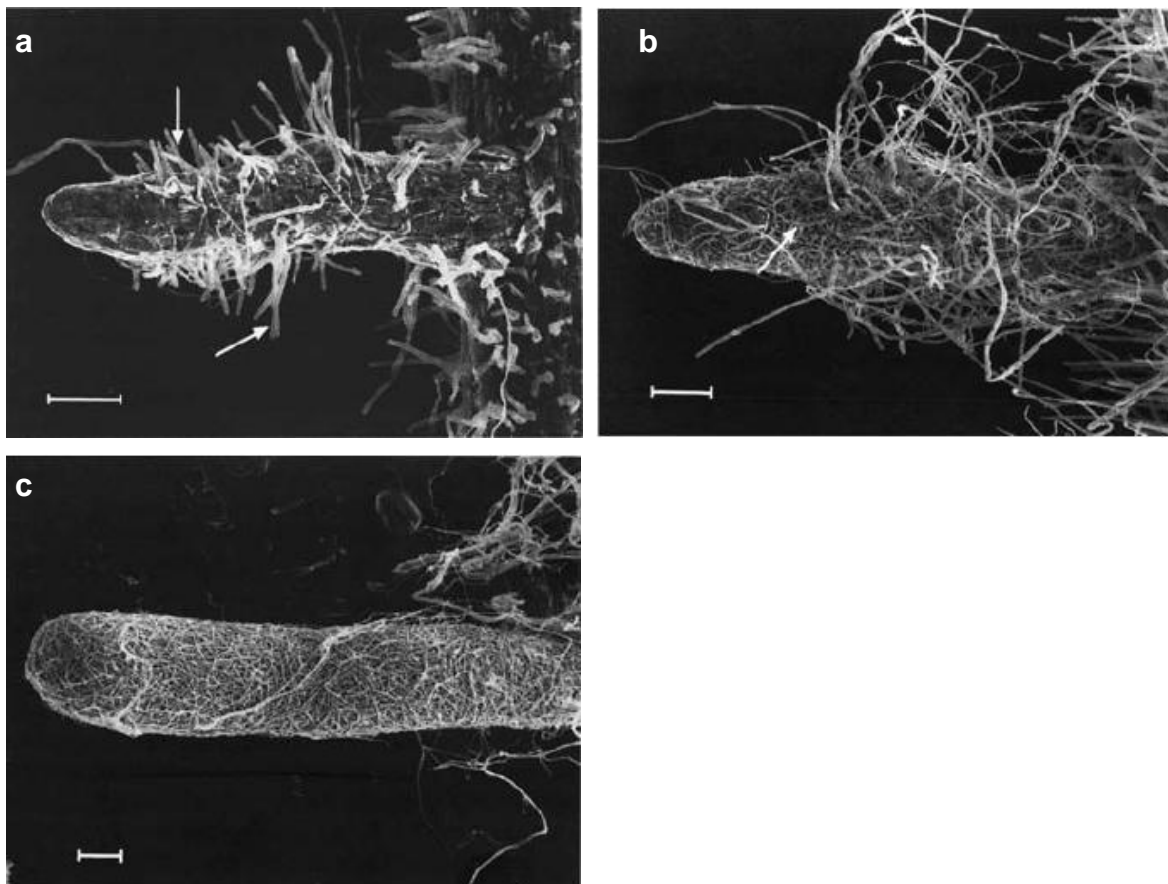


Figura 3. Micorrização de *Betula alleghaniensis* pelo fungo *Pisolithus tinctorius*: a) Fases iniciais de uma micorriza, com presença de algumas hifas na superfície da raiz e numerosos pêlos radiculares sinalizados pelas setas; b) Manto de fina espessura formado na superfície da raiz; c) Manto compacto cobrindo a raiz onde já não são observados pêlos radiculares. Fotografias de microscópio eletrônico de varrimento, escalas = 100 μ m (Massicotte et al., 1990).

3. **Ectendomicorrizas**, que são micorrizas que partilham muitas características com as ectomicorrizas mas que apresentam um elevado grau de penetração intracelular. Apresentam manto e a colonização ocorre tanto intra como intercelularmente. Fazem parte deste grupo as micorrizas monotropoides (que além de apresentarem manto e rede de Hartig, penetram nas células epidérmicas e corticais) e arbutoides (que apenas penetram nas células epidérmicas).

A classificação das micorrizas segundo Smith & Read (2008) é apresentada no Quadro 5.

Quadro 5. Características dos principais tipos de micorrizas. Os caracteres estruturais apresentados são referentes ao estado de maturidade e não de desenvolvimento ou estado senescente (Smith & Read, 2008)

	Ecto ⁽¹⁾	Ectendo	Arbusc	Eric	Arbut	Mono	Orq
Hifas septados cenocíticas	+(²)	+	-	+	+	+	+
Hifas intracelulares	-	+	+	+	+	+	+
Presença de Manto	+	+/-	-	-	+/-	+	-
Rede de Hartig	+	+	-	-	+	+	-
Aclorofilia	-	-	- (+)	-	-	+	+
Taxa Fúngicos⁽³⁾	Basidio	Basidio	Glomer	Asco	Basidio	Basidio	Basidio
	Asco	Asco					
Taxa Hospedeiro⁽⁴⁾	Gimno	Gimno	Brio	<i>Ericales</i>	<i>Ericales</i>	<i>Monotropoideae</i>	<i>Orchidales</i>
	Angio	Angio	Pterido	Briof			
			Gimno				
			Angio				

⁽¹⁾ Micorrizas: Ecto – Ectomicorrizas; Ectendo – Ectendomicorrizas; Arbusc – Arbusculares; Eric – Ericoides; Arbut – Arbutoides; Mono – Monotropoides; Orq – Orquídeas.

⁽²⁾ + presença; - ausência; sinais entre parênteses significam que é raro a sua ocorrência.

⁽³⁾ Taxa Fúngicos: Basidio – Basidiomycota; Asco – Ascomycota; Glomer – Glomeromycota.

⁽⁴⁾ Taxa Hospedeiro: Gimno – *Gymnospermae*; Angio – *Angiospermae*; Pterido – *Pteridophyta*; Brio – *Bryophyta*.

1.3.3. Ectomicorrizas do castanheiro

Em Baptista *et al.* (2010) foi observado que o grupo trófico dominante associado à área do castanheiro eram as ectomicorrizas (83%), aparecendo em menor número espécies saprófitas e parasitas.

Os fungos ectomicorrízicos beneficiam de várias maneiras as plantas hospedeiras. Segundo Martins (1997), citando outros autores, as ectomicorrizas são importantes para as plantas conferindo-lhes:

- Maior capacidade de absorção de nutrientes vegetais, nomeadamente de fósforo, azoto e potássio, sobretudo em solos pobres.
- Aumento da tolerância a metais pesados.
- Aumento da resistência à secura.
- Aumento da resistência a infeções por agentes patogénicos.

Em contrapartida o fungo recebe da planta compostos de carbono (resultantes da transformação do CO₂) e açúcares (glucose, frutose, sacarose, etc.).

Os inventários de macrofungos em castanheiro (*C. sativa*) realizados em Portugal mostraram que a diversidade de fungos associada a esta espécie é abundante, sendo mais frequente encontrar

espécies pertencentes aos géneros *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula*, e *Tricholoma* (Práxis, 2000; Agro 689, 2007; Baptista *et al.*, 2010).

No decurso do projeto Práxis (Ref:2/2.1/BIO/1072/95, 2000) procedeu-se também à micorrização *in vitro* de castanheiros obtidos por via seminal e por micropropagação. Neste ensaio os fungos que obtiveram melhores resultados na associação ectomicorrízica com o castanheiro pertenciam às espécies *Paxillus involutus* e *Hebeloma crustuliniforme*.

Em Branzanti *et al.* (1999) foi demonstrado que as associações ectomicorrízicas promovem o crescimento do castanheiro, tendo-se verificado que em plantas micorrizadas a área foliar e o peso seco da raiz eram significativamente maiores comparativamente às plantas que não tinham sido inoculadas com fungos ectomicorrízicos. Segundo os resultados deste trabalho, além do incremento em biomassa, parece que as raízes micorrizadas previnem a penetração do oomiceta *Phytophthora cinnamomi* e o manto fúngico funciona como uma barreira física, visto que os castanheiros, onde o manto estava totalmente desenvolvido, não foram infetados por *P. cinnamomi*, ao contrário das raízes não micorrizadas que foram infetadas apresentando danos generalizados nas células epidérmicas.

Em Blom *et al.* 2009 inventariou-se a comunidade ectomicorrízica num povoamento de castanheiro saudável e noutro infestado com *P. cambivora*. Os resultados mostraram que o conjunto de espécies diferia nos dois sítios, ou seja, algumas ectomicorrizas que dominavam o povoamento saudável não estavam presentes no povoamento onde o agente patogénico estava presente e vice-versa. Também foi observado que o manto fúngico formado nas ectomicorrizas presentes na parcela infestada era, na generalidade, mais fino que o das ectomicorrizas presentes na parcela saudável. Reitera-se, assim, a hipótese de o manto funcionar como barreira física e se este for mais fino pode aumentar os espaços vazios causando maior exposição do tecido radicular à rizosfera.

1.4. Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como objetivo a investigação de meios de luta alternativos à luta química contra *Phytophthora cinnamomi* em castanheiro.

A procura de alternativas aos meios de luta químicos para controlo da doença da tinta do castanheiro impõe-se por razões epidemiológicas, económicas e ambientais. Tal como já anteriormente referido, o risco de *P. cinnamomi* desenvolver resistência às substâncias ativas utilizadas no seu controlo é elevado à semelhança do já ocorrido na Irlanda e Holanda com a espécie *P. infestans*. Por outro lado a aplicação do produto comercial à base de fosetil de alumínio, homologado em Portugal para castanheiro, é onerosa, dado que em média custa cerca de 38 euros/kg, o que corresponde a um custo de quase 100 euros/ha por aplicação, sem contabilizar os custos de horas-trabalho. Por fim, levantam-se também questões ambientais pelo impacto que o produto pode ter ao nível de águas superficiais e subterrâneas.

A existência comprovada de organismos antagonistas de *P. cinnamomi* ao nível da rizosfera parece assim de extrema importância na medida em que a sua eventual utilização poderá ser preconizada para o controlo deste oomiceta. Estes organismos antagonistas, caso encontrem condições favoráveis para se estabelecerem na rizosfera, podem mesmo ter um efeito protetor das plantas mais duradouro que o conferido por algumas das substâncias ativas atualmente utilizadas.

Desta forma, neste trabalho procedeu-se à avaliação e seleção *in vitro* de fungos antagonistas de *P. cinnamomi*, onde foram testados, em confrontação com um isolado de *Phytophthora cinnamomi*, 26 isolados de 18 espécies de fungos diferentes, entre as quais 9 tinham comportamento saprófita e 9 comportamento micorrízico.

Em seguida, para alguns dos isolados selecionados, realizaram-se testes de antagonismo entre *P. cinnamomi* e o extrato derivado do metabolismo desses fungos. Foi selecionado o extrato de *Omphalotus olearius* com efeito inibidor no crescimento micelial de dois isolados diferentes de *P. cinnamomi*.

Sendo os zoósporos os propágulos mais eficientes no processo de infecção das plantas, decidiu-se testar também o efeito do extrato previamente selecionado na esporulação de *P. cinnamomi* e conseqüente produção de zoósporos.

No sentido de estudar a aplicabilidade do extrato de *Omphalotus olearius* como método de controlo de *P. cinnamomi*, em condições naturais, optou-se por testar o seu efeito na tolerância de castanheiros a este agente patogénico.

Devido ao reconhecido efeito protetor conferido pelas ectomicorrizas contra *P. cinnamomi* em castanheiro e pela diversidade de espécies encontradas, habitualmente, associadas a castanheiro, optou-se também por avaliar, neste trabalho, o efeito de dois fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus* e *Laccaria bicolor*, na tolerância do castanheiro ao agente patogénico *P. cinnamomi*.

2- Material e Métodos

2.1. Testes *in vitro*

A estirpe de *Phytophthora cinnamomi* testada nos ensaios (código PH107) foi isolada em 1990, a partir de castanheiros provenientes dos viveiros de Bornes (nº 107 – UTAD e IMI (internacional) – 340340).

As culturas de *P. cinnamomi* foram mantidas a crescer em meio gelosado de PDA (“Potato Dextrose Agar”, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 24°C.

2.1.1. Testes de antagonismo

À semelhança das culturas de *P. cinnamomi*, os fungos testados provieram de culturas *stock* mantidas em caixas de Petri (em cultura axénica) com PDA. As culturas foram incubadas a 24°C na ausência de luz. As estirpes dos fungos utilizadas neste ensaio e respetivas proveniências estão indicados no Quadro 6.

Foram testados 26 isolados em confrontação com *P. cinnamomi*, dos quais 13 eram micorrízicos e 13 eram saprófitas. A interação *in vitro* entre os fungos e *P. cinnamomi* foi testada por co-cultura de micélio em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 30 mL de PDA.

Optou-se por realizar o ensaio com duas modalidades, desfasada e simultânea, relativas ao tempo de inoculação de *Phytophthora cinnamomi*. A modalidade testada para cada isolado consta no Quadro 6: todos os fungos micorrízicos e ainda *Lepista nuda* foram previamente colocados a crescer e só passado uma semana se inocularam as placas com *P. cinnamomi* (modalidade desfasada). Os restantes fungos saprófitas foram inoculados em simultâneo com *P. cinnamomi* (modalidade simultânea).

As co-culturas foram obtidas por transferência de micélio, retirado da periferia das colónias com um furador com 5 mm de diâmetro, colocando-se *P. cinnamomi* e cada fungo a 30 mm de distância entre si (Figura 4). Na modalidade com desfasamento o micélio do fungo a testar foi transferido e sete dias depois colocou-se *P. cinnamomi* em confrontação.

Realizaram-se co-culturas de controlo de *P. cinnamomi* (*P. cinnamomi* vs *P. cinnamomi*) com inoculação simultânea e do fungo testado (p.e. *Pisolithus tinctorius* vs *P. tinctorius*) com inoculação simultânea ou desfasada.

Foram realizadas três repetições para cada co-cultura. As placas foram incubadas a 24°C, na ausência de luz. Mediu-se o diâmetro das colónias de dois em dois dias até a placa de Petri estar totalmente colonizada ou o fungo testado e *Phytophthora* estarem sobrepostos. Em cada colónia mediu-se dois diâmetros (Figura 4) em sentidos opostos (N-S e E-O) com o objetivo de calcular o diâmetro médio da colónia.

A inibição do crescimento micelial de *P. cinnamomi* pelo fungo foi expressa em percentagem de inibição do crescimento em relação à co-cultura de controlo, usando a fórmula de Vincent (1927), citado em Shashidhara (2007), e que é dada por:

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

onde:

I – Percentagem de inibição do crescimento micelial;

C – Crescimento micelial médio de *P. cinnamomi* nas co-culturas de controlo;

T – Crescimento micelial médio de *P. cinnamomi* na co-cultura teste (fungo vs *Phytophthora*);

A eficácia do fungo na inibição de *P. cinnamomi* foi também analisada através da razão entre o crescimento médio diário em diâmetro interno de *Phytophthora* (sentido E-O, Figura 4), pelo crescimento médio diário em diâmetro interno de *Phytophthora* na direção do fungo:

$$R = \frac{C}{T}$$

onde:

R – Razão entre os crescimentos miceliais diários internos (E-O) de *Phytophthora* no controlo e no teste;

C – Crescimento em diâmetro médio diário de *Phytophthora* na co-cultura de controlo;

T – Crescimento em diâmetro médio diário de *Phytophthora* na co-cultura de teste.

Quadro 6. Isolados utilizados nos testes de antagonismo com referência ao hospedeiro, origem geográfica, ano de obtenção, Grupo trófico (Moreau *et al.*, 2004; Smith & Read, 2008) e modalidade (Mod) em que foram testados

Isolado	Espécie	G.trófico	Mod	Hospedeiro	Origem	Ano
AMR492	<i>Amanita rubescens</i>	M	D	<i>Quercus suber</i>	Grândola	2011
BS124	<i>Boletus aereus</i>	M	D	<i>Quercus suber</i>	Grândola	2010
BeBr5	<i>Boletus edulis</i>	M	D		França	1990
A219	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	M	D	<i>Quercus suber</i>	Grândola	2011
HeSiv	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	M	D		França	1990
LB238	<i>Laccaria bicolor</i>	M	D	<i>Tsuga mertensiana</i>	EUA	1976
PAIANU	<i>Paxillus involutus</i>	M	D		Camberra	1986
PT003	<i>Pisolithus tinctorius</i>	M	D	<i>Eucalyptus globulus</i>	Arouca	1987
PT004	<i>Pisolithus tinctorius</i>	M	D	<i>Eucalyptus globulus</i>	Arouca	1987
PT007	<i>Pisolithus tinctorius</i>	M	D	<i>Eucalyptus/Acacia</i>	Leiria	2006
PT027	<i>Pisolithus tinctorius</i>	M	D	<i>Eucalyptus globulus</i>	Espanha	2003
Sc092	<i>Scleroderma citrinum</i>	M	D	<i>Quercus suber</i>	Alcácer	1992
A103	<i>Xerocomus rubellus</i>	M	D	<i>Quercus suber</i>	Grândola	2011
GR574	<i>Ganoderma lucidum</i>	S	Si		EUA	2007
GR430	<i>Ganoderma resinaceum</i>	S	Si	<i>Populus alba</i>	Escaroupim	1979
LE597	<i>Lentinula edodes</i>	S	Si	<i>Quercus sp.</i>	França	2004
LN2011(JBA)	<i>Lepista nuda</i>	S	D	<i>Quercus suber</i>	Torres Vedras	2011
LN091	<i>Lepista nuda</i>	S	D	<i>Quercus suber</i>	Ermidas do sado	1991
LN2012	<i>Lepista nuda</i>	S	Si		Alenquer	2012
LN2012	<i>Lepista nuda</i>	S	D		Alenquer	2012
MP093	<i>Macrolepiota procera</i>	S	Si	<i>Quercus suber</i>	Montargil	1993
MP234	<i>Macrolepiota procera</i>	S	Si	<i>Pinus pinaster</i>	Coruche	2002
OP598	<i>Omphalotus olearius</i>	S	Si	<i>Olea europaea</i>	Oeiras	2004
PL415	<i>Pleurotus djamor</i>	S	Si		Quadrante Natural	2007
PL407	<i>Pleurotus ostreatus</i>	S	Si	<i>Betula alba</i>	Portugal	1979
SH523	<i>Schizophyllum comune</i>	S	Si	<i>Pinus pinaster</i>	Chamusca	1968
SU257	<i>Lentinula edodes</i>	S	Si	<i>Quercus suber</i>	Infantado	1985

M – Micorrízico; S – Saprófita; D – Modalidade Desfasada; Si – Modalidade simultânea

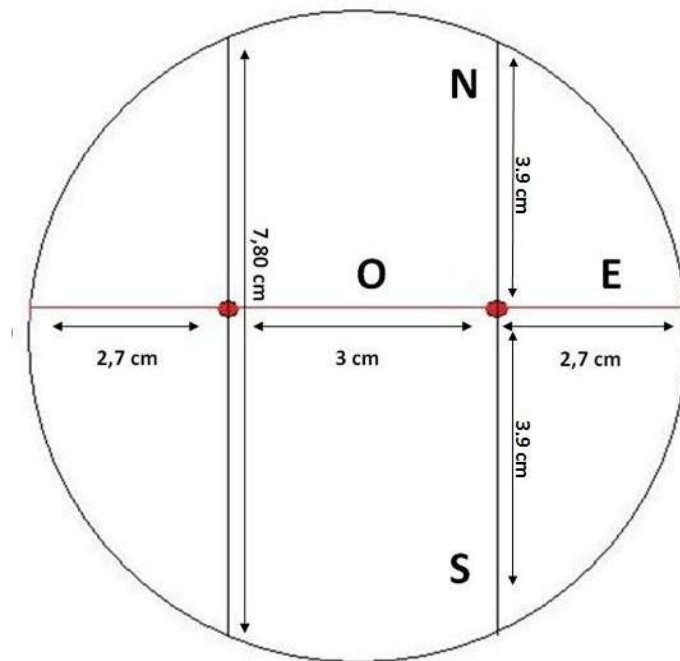


Figura 4. Esquema da base da placa de Petri com as orientações das medições de diâmetro.

2.1.2. Teste de antagonismo com extratos de fungos

Foram testados extratos provenientes de quatro espécies fúngicas, *Lactarius deliciosus*, *Lentinula edodes*, *Lepista nuda* e *Omphalotus olearius*, no total de seis isolados (Quadro 7). O extrato de *L. edodes* foi obtido através do exsudado libertado pelo fungo durante a produção de *spawn* (inóculo comercial para produção de cogumelos) e em cavilhas de madeira (inóculo comercial para produção de cogumelos em toros), que foram fornecidos pela empresa Quadrante Natural. Os restantes extratos provieram de culturas líquidas estabelecidas de forma similar para os três fungos.

Para a obtenção de culturas líquidas utilizou-se o meio Melin e Norkrans Modificado (MMN) líquido, dividido por balões de Erlenmeyer, e esterilizado a 120°C/1 bar durante 20 minutos. De cada fungo retirou-se, da periferia das colónias, seis discos com 5 mm de diâmetro com que se inocularam os balões com meio nutritivo. Os balões foram a incubar a 24°C, no escuro, durante 15 dias. O extrato foi obtido por filtração das culturas aproveitando-se apenas o líquido resultante.

De seguida, em placas de Petri de 90 mm, com meio PDA, fizeram-se quatro “poços” com 9 mm de diâmetro distanciados a 1 cm da margem da placa (Figura 5). Dois dos poços opostos serviram de controlo e foram preenchidos com água destilada esterilizada. Os outros dois poços foram preenchidos com o extrato do fungo a testar, consoante o caso. O preenchimento realizou-se com recurso a uma micropipeta com ponta esterilizada. Inocularam-se as placas, ao centro, com um disco de micélio de *P. cinnamomi* (5 mm de diâmetro). Este procedimento efetuou-se em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar. Fizeram-se três repetições para cada extrato testado e ainda uma placa inoculada apenas com *P. cinnamomi* da mesma colónia utilizada no ensaio. Todas as placas foram incubadas a 24°C, no escuro, durante quatro dias no caso de *L. edodes* e sete dias para *L. deliciosus*, *O. olearius* e *L. nuda*. Uma vez decorrida a incubação, mediu-se o diâmetro das colónias de *P. cinnamomi* na direção dos poços-controlo e dos poços-extrato.

A eficácia do extrato dos fungos na inibição de *P. cinnamomi* foi expresso em percentagem de inibição do crescimento micelial em relação ao crescimento diametral na direção da água destilada e na direção do extrato. Utilizou-se uma fórmula adaptada da fórmula de Vincent (1927), citado em Shashidhara (2007), que é dada por:

$$I = \frac{C_{H_2O} - C_E}{C_{H_2O}} \times 100$$

onde:

I – Percentagem de inibição micelial de *P. cinnamomi*;

C_{H_2O} – Crescimento micelial de *P. cinnamomi* na direção da água destilada (testemunha);

C_E – Crescimento micelial de *P. cinnamomi* na direção do extrato.

Quadro 7. Fungos utilizados para obtenção de culturas líquidas

G.trófico	Espécie	Código	Ano	Hospedeiro	Origem
Micorrízico	<i>Lactarius deliciosus</i>	A257	2011	<i>Quercus suber</i>	Grândola
Saprófita	<i>Lentinula edodes</i>	Koshin	2013	Spawn	Quadrante natural
Saprófita	<i>Lentinula edodes</i>	LEBC	2013	Cavilhas	Quadrante natural
Saprófita	<i>Lepista nuda</i>	LN 2011 (JBA)	2011	<i>Quercus suber</i>	Torres Vedras
Saprófita	<i>Lepista nuda</i>	LN091	2002	<i>Quercus suber</i>	Ermidas do Sado
Saprófita	<i>Omphalotus olearius</i>	OP598	2004	<i>Olea europaea</i>	Oeiras

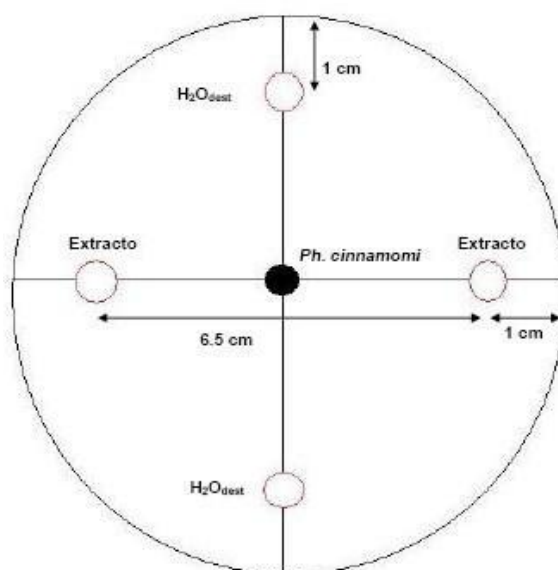


Figura 5. Esquema da base da placa de Petri para o ensaio de confronto indireto, com extrato de fungo.

2.1.3. Avaliação da ação do extrato de *Omphalotus olearius* no crescimento micelial de *Phytophthora*

Neste ensaio, para além da estirpe PH107 de *P. cinnamomi* foi ensaiada uma outra estirpe isolada em 2011 a partir de solo contaminado, adiante designada como PH1160. O isolado OP598 de *O. olearius* foi cultivado em meio líquido MMN segundo o procedimento já descrito (2.1.2.) sendo posteriormente separado o meio da biomassa fúngica por filtração.

O meio de cultura para testar o crescimento micelial das duas estirpes de *P. cinnamomi* em confronto com extrato de *Omphalotus olearius* (OP598) foi PDA preparado na concentração final de 3,9%, utilizando quantidades variáveis de extrato de *Omphalotus* (resultante da filtração). Escolheram-se oito modalidades para este ensaio, correspondendo a oito percentagens de extrato de *Omphalotus*. Para cada modalidade prepararam-se 150 mL de meio de cultura tal como é apresentado no Quadro 8.

Quadro 8. Modalidades do ensaio consoante a percentagem de extrato *Omphalotus* utilizado (para um total de 150 mL)

Modalidade	Percentagem de extrato <i>Omphalotus</i> (%)	H ₂ O destilada (mL)	Extrato de <i>Omphalotus</i> (mL)	PDA (g)
1 (Controlo)	0	150	0	5,85
2	2,5	146,25	3,75	5,85
3	5	142,50	7,50	5,85
4	7,5	138,75	11,25	5,85
5	10	135	15	5,85
6	20	120	30	5,85
7	50	75	75	5,85
8	100	0	150	5,85

Os balões foram esterilizados a 120°C/1 bar durante 20 minutos. O meio de cultura previamente esterilizado e arrefecido até 60°C foi de seguida transferido para placas de Petri estéreis à razão de 15 mL por placa. As placas foram inoculadas no centro com um disco de micélio de *P. cinnamomi* com 5 mm de diâmetro retirado da periferia de colónias com 7 dias de incubação. Para cada modalidade “concentração X estirpe de *P. cinnamomi*” efetuaram-se quatro repetições. As placas foram incubadas a 24°C, na ausência de luz, durante cinco dias.

Após o período inicial de incubação de cinco dias, o diâmetro das colónias foi medido nas duas direções (N-S e E-O), em três dias consecutivos, afim de calcular o crescimento médio diário da colónia para cada modalidade. Efetuou-se uma comparação entre o diâmetro médio e entre a percentagem de inibição, no terceiro e último dia de medição, da modalidade controlo (0% de extrato) e das culturas correspondentes às restantes modalidades. À semelhança dos outros ensaios, a percentagem de inibição foi calculada recorrendo à fórmula já indicada em 2.1.1.

2.1.4. Avaliação da ação do extrato de *Omphalotus olearius* na esporulação de *Phytophthora cinnamomi*

A amostra de terra contaminada (7 C03/13) proveio do concelho de Mora e foi colhida perto das raízes, a um metro do tronco, de um sobreiro adulto (*Quercus suber*) e a um palmo de profundidade (± 20 cm).

A presença de *P. cinnamomi* na amostra foi confirmada através da observação de frutificações (esporângios) presentes em “armadilhas” constituídas por discos de folhas. Para induzir a formação dos esporângios, diluiu-se uma pequena parte da amostra em água destilada e colocou-se a flutuar discos de folhas novas de azinheira (*Quercus ilex*) (“armadilhas”). As placas assim preparadas foram a incubar numa sala com luz ambiente a 24 \pm 2°C durante três dias. O rebordo dos discos foliares foi observado à lupa confirmando a presença/ausência de frutificações.

Confirmada a contaminação da terra com *P. cinnamomi*, esta foi distribuída por placas de Petri (cerca de 50g em cada placa) e adicionou-se 50mL de solução de água destilada com diferentes percentagens de extrato de *Omphalotus* (Quadro 9). O extrato *Omphalotus* foi obtido de modo semelhante ao descrito anteriormente (2.1.2).

Quadro 9. Modalidade do ensaio consoante a percentagem de extrato *Omphalotus*, em relação à água destilada, utilizada para saturar a terra contaminada

Modalidade	Percentagem de extrato <i>Omphalotus</i> (%)	Água destilada (mL)	Extrato <i>Omphalotus</i> (mL)	Tratamento (mL) /50g terra
I (Controlo)	0	50	0	50
II	5	47,5	2,5	50
III	15	42,5	7,5	50
IV	25	37,5	12,5	50
V	50	25	25	50
VI	75	12,5	37,5	50
VI	100	0	50	50

Realizaram-se três repetições por modalidade. Após a diluição foram colocados a flutuar, em cada placa de Petri, cinco discos foliares retirados de folhas novas de azinheira (*Quercus ilex*) com o auxílio de um furador de 9 mm. Da mesma forma, as placas foram deixadas numa sala à temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, com luz ambiente, durante três dias. Retiraram-se depois os discos foliares de cada modalidade, e observaram-se à lupa binocular na ampliação máxima. Procedeu-se à contagem das frutificações (esporângios).

Após a contagem das frutificações os discos foliares foram substituídos por novos, devido à degradação do material biológico. Também foram adicionados 40 mL de água destilada a cada placa de Petri para compensar a evaporação (água destilada + extrato *Omphalotus*). Assim se procedeu em cada contagem de frutificações, de três em três dias.

Para verificar a presença de *P. cinnamomi* nas armadilhas, colocaram-se as folhas em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 5 minutos, lavaram-se em água destilada esterilizada e, em seguida, transferiram-se para meio seletivo para *Phytophthora* PARPNH (meio contendo quatro antibióticos e um fungicida) composto por: sumo multivitamínico 100 mL/L, agar 20g/L, CaCO_3 3 g/L, pimaricina 10mg/L, ampicilina 200mg/L, rifampicina 10mg/L, pentacloronitrobenzeno (PCNB) 25mg/L, nistatina 50mg/L, hymexazol 50mg/L.

As placas incubaram a 24°C em estufa durante 48 horas. Após incubação as colónias desenvolvidas no meio seletivo foram observadas ao microscópio e identificadas.

2.2. Estudo do efeito do extrato *Omphalotus* em plantas inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*

O extrato de *Omphalotus* foi obtido de culturas líquidas de *Omphalotus olearius* tal como descrito em 2.1.2.

As plantas utilizadas neste ensaio foram micropropagadas e provieram da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC).

2.2.1. Preparação de inóculo de *Phytophthora cinnamomi*

O inóculo de *P. cinnamomi* (isolado PH107) foi adaptado de Jung et al. (1996). Para 1,5 L de mistura utilizou-se 1 380 mL de vermiculite e 120 mL de millet (*Panicum mileaceum*) colocado em água durante uma hora e escorrido. A mistura foi regada com V8 líquido (por litro: 200 mL de sumo V8, 3g de CaCO₃, 800 mL de água destilada), distribuída por frascos de vidro roscados e autoclavada duas vezes durante 20 minutos a 120°C/1 bar.

Cada frasco foi inoculado com discos de micélio de *P. cinnamomi*, com 5 mm de diâmetro, retirados da periferia de colónias com 6 dias. Colocaram-se os frascos a incubar numa estufa a 24°C durante duas semanas.

2.2.2. Estudo em clones de híbridos de *Castanea sativa*

O efeito do extrato *Omphalotus* na capacidade de *Phytophthora cinnamomi* infetar a planta foi testado em clones de diferentes híbridos de *C. sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. mollissima*. A lista de clones e o número de plantas inoculadas encontram-se no Quadro 10.

Quadro 10. Lista dos híbridos e clones utilizados no ensaio do efeito do extrato *Omphalotus* em clones híbridos de *Castanea sativa* inoculados com *Phytophthora cinnamomi*

Castanheiros em vasos de 600 mL				
Clone	Testemunhas (sem <i>Phytophthora cinnamomi</i>)	Inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> + extrato <i>Omphalotus</i>	Total
SC36	3	2	2	7
SC43	0	1	0	1
SC51	2	2	2	6
SC914	0	1	0	1
SC919	2	2	2	6
SM904	2	1	2	5
SM919	2	0	1	3
Total	11	9	9	29

SC – Híbrido de *C. sativa* x *C. crenata*; SM – Híbrido de *C. sativa* x *C. mollissima*.

Os castanheiros, em vasos de 600 mL, foram inoculados com 20 mL (≈3% do volume do vaso) de mistura vermiculite + millet, colonizada por *P. cinnamomi*; fizeram-se dois orifícios em pontos opostos do substrato no vaso onde se colocou o inóculo tapando-o em seguida.

A modalidade de tratamento com extrato de *Omphalotus* foi aplicada uma semana após a inoculação. As plantas foram regadas com 40 mL de extrato *Omphalotus* uma semana após a inoculação com *P. cinnamomi* e foram mantidas em estufa de campo em tabuleiros. A rega foi semanal, com 100 mL de água/vaso.

Sempre que ocorreu a morte de uma planta registou-se a data e mediu-se altura, o diâmetro, as lesões externa, interna e ao nível do colo causadas por *P. cinnamomi*, e a notação da raiz. A notação dada à raiz corresponde ao número de raízes principais lesionadas e atribuiu-se valores de 0 a 5 consoante a percentagem de raízes principais lesionadas (Quadro 11).

Quadro 11. Notação radicular em função da percentagem de raízes principais lesionadas

Notação Radicular	Percentagem de raízes lesionadas
0	0
1	1% – 20%
2	21% – 40%
3	41% – 60%
4	61% – 80%
5	81% – 100%

2.2.3. Estudo em plantas micropropagadas do híbrido SC32

Vinte plantas pertencentes ao clone SC32, híbrido de *C. sativa* x *C. crenata*, foram escolhidas e separadas em quatro grupos de cinco de acordo com as seguintes modalidades:

T – Plantas não inoculadas com *P. cinnamomi* e não tratadas com *Omphalotus*

P – Plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e não tratadas com *Omphalotus*

P0 – Plantas inoculadas com *P. cinnamomi* com e com tratamento de *Omphalotus*

P1 – Plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e com aplicação de tratamento *Omphalotus* uma semana após a inoculação.

As plantas foram inoculadas com 20 mL ($\approx 3\%$ do volume do vaso) de mistura de vermiculite + millet, colonizada por *P. cinnamomi*; fizeram-se dois orifícios em pontos opostos do substrato no vaso onde se colocou o inóculo tapando-o em seguida. Logo após a inoculação as plantas pertencentes aos grupos T, P e P1 foram regadas com 200 mL de água ($\frac{1}{3}$ do volume do vaso).

Diluiu-se 40 mL de extrato *Omphalotus* em 160 mL de água (correspondendo uma percentagem de 20% de extrato *Omphalotus*) e aplicou-se nas plantas pertencentes ao grupo P0, onde o tratamento foi aplicado simultaneamente à inoculação.

No grupo P1, uma semana após a inoculação das plantas, aplicou-se o tratamento regando as plantas com 40 mL de extrato bruto de *Omphalotus* (não diluído).

As plantas foram mantidas em estufa de campo; os vasos foram colocados em tabuleiros e regaram-se todas as plantas (dos grupos T, P, P0 e P1) semanalmente com 100 mL de água. Sempre que ocorreu a morte de uma planta registou-se a data e mediu-se a altura, o diâmetro, as lesões externa, interna e ao nível do colo causadas por *P. cinnamomi*, e atribuiu-se uma notação à raiz (como em 2.2.2).

2.2.4. Estudo em plantas micropropagadas do clone SM919

Foram testadas oito plantas pertencentes ao clone SM919, híbrido de *C. sativa* x *C. mollissima*.

A terra utilizada como inóculo foi sujeita a confirmação da presença de *P. cinnamomi* através da técnica de armadilhagem anteriormente descrita (2.1.4.). Após confirmação da contaminação inocularam-se oito vasos com 100 mL de terra distribuindo-a pela superfície do substrato. Quatro plantas serviram de controlo (apenas foram inoculadas com terra contaminada com *Phytophthora cinnamomi*) e as outras quatro foram inoculadas e regadas com 100 mL de extrato *Omphalotus*.

As plantas foram mantidas em condições idênticas às plantas utilizadas no ensaio anterior. Manteve-se sempre água nos tabuleiros que continham os vasos.

2.3. Estudo do efeito das ectomicorrizas na tolerância do castanheiro a *Phytophthora cinnamomi*

Os castanheiros utilizados neste ensaio foram obtidos por micropropagação e provieram da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC). Foram micropropagados um híbrido de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* (SC912) e outro de *C. sativa* x *C. mollissima* (SM919). A suscetibilidade dos dois híbridos foi previamente testada sendo que os resultados demonstraram elevada suscetibilidade a *P. cinnamomi* (Costa *et al.*, 2013).

Os fungos micorrízicos utilizados para inocular as plantas foram *Laccaria bicolor* (LB238) e *Paxillus involutus* (PAIANU). Para produção do inóculo os fungos em causa foram cultivados em placas de Petri com quatro meios de cultura: PDA, MMN, ODDOUX (Oddoux, 1957) (Anexo 7.8) e BAF (Moser, 1960) (Anexo 6.1), e incubadas em estufa a 24°C.

O inóculo de *P. cinnamomi* foi produzido segundo o protocolo apresentado anteriormente em 2.2.1.

2.3.1. Micorrização de plantas pré-estabelecidas

Para produção do inóculo de *P. involutus* e de *L. bicolor* preparou-se 1 800 mL de mistura de vermiculite e turfa na proporção de 3:1 e esterilizou-se duas vezes a 120°C/1 bar durante 20 minutos. Distribuiu-se a mistura igualmente por oito frascos de vidro roscados, humidificou-se com meio MMN líquido e esterilizou-se novamente. Após arrefecimento, cada frasco foi inoculado, sob fluxo laminar, com ¼ da cultura desenvolvida em cada meio de cultura. A incubação realizou-se a 24°C, durante 30 dias.

O ensaio dispôs de dezasseis castanheiros híbridos, de cada um dos clones referidos, com dois anos de idade (Figura 6). As plantas, mantidas em estufa de campo, foram medidas em altura e transplantadas de vasos de 0,5 L para vasos de 1,5 L. Na altura do transplante as plantas foram inoculadas com 75 mL (5% do volume do vaso) de mistura vermiculite + turfa colonizada por *P. involutus* ou *L. bicolor* e colocada perto das raízes das plantas transplantadas. O remanescente do substrato utilizado para preencher os vasos de 1,5 L (assim como para transplantar as testemunhas) consistiu em mistura de vermiculite e turfa na proporção de 3:1. As plantas inoculadas foram mantidas em condições de estufa de campo durante 8 meses.

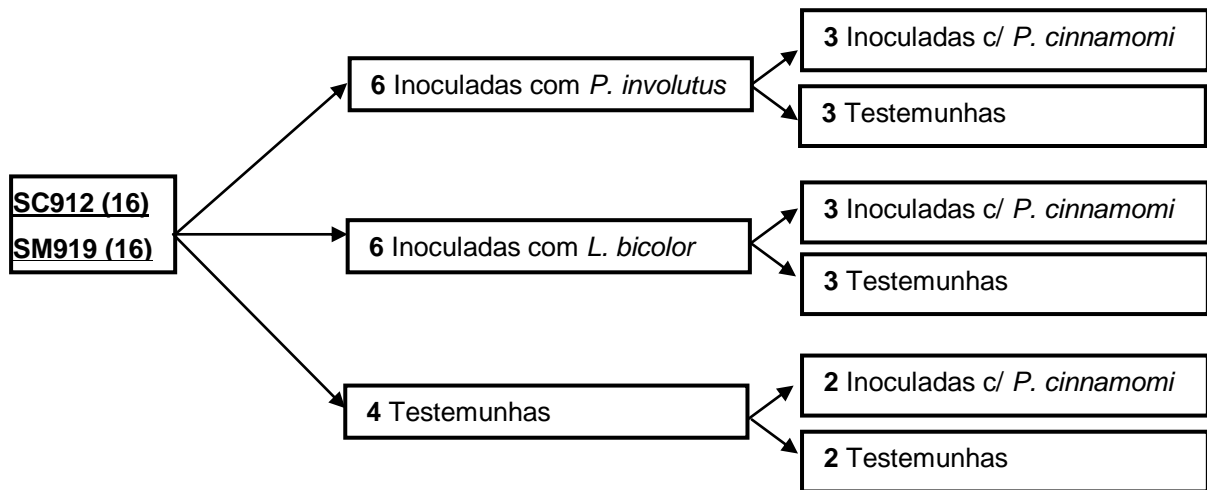


Figura 6. Distribuição das 16 plantas de cada híbrido pelas modalidades do ensaio.

2.3.2. Inoculação das plantas com *Phytophthora cinnamomi*

As plantas foram inoculadas com *P. cinnamomi* segundo o esquema da Figura 6. Inocularam-se oito castanheiros de cada híbrido com 50 mL (≈3% do volume do vaso) de mistura colonizada por *P. cinnamomi*. Todos os vasos foram colocados em tabuleiros, mantendo-se sempre estes com água. Testemunhas (sem *P. cinnamomi*) e plantas inoculadas foram regadas de igual forma.

Registou-se o tempo decorrido até à morte da planta e mediu-se posteriormente a altura, o diâmetro, as lesões externa, interna e ao nível do colo causadas por *P. cinnamomi*, e atribuiu-se uma notação à raiz (como em 2.2.2).

Observou-se e quantificou-se a presença de micorrizas no sistema radicular com auxílio de lupa binocular. As raízes foram lavadas em água corrente para a remoção da terra. Após a observação de todo o sistema radicular utilizou-se uma notação com base na percentagem dos principais tipos de micorrizas em relação ao sistema radicular da planta. Para acertar a notação cortou-se a raiz em pedaços de cerca de 5 cm de comprimento e contaram-se as raízes micorrizadas e não micorrizadas em 100 pedaços retirados ao acaso.

2.4. Estudo do efeito do fungo *Lepista nuda* na tolerância do sobreiro (*Quercus suber*) a *Phytophthora cinnamomi*

Os sobreiros utilizados no ensaio foram obtidos por via seminal e mantidos em tabuleiros de sementeira com cuvetes de 6x6x15 cm. As plantas (32) foram separadas em oito grupos consoante a percentagem de micorrização estimada a partir da observação das quatro faces do torrão (Quadro 12). Os quatro sobreiros, pertencentes a cada grupo, foram distribuídos pelas quatro modalidades do ensaio:

- TT – 8 sobreiros sem inoculação com *Phytophthora cinnamomi* e *Lepista nuda*
- TL – 8 sobreiros sem *Phytophthora cinnamomi* e inoculados com *Lepista nuda*
- PT – 8 sobreiros inoculados com *Phytophthora cinnamomi* sem *Lepista nuda*
- PL – 8 sobreiros inoculados com *Phytophthora cinnamomi* e *Lepista nuda*

O inóculo de *P. cinnamomi* foi obtido de forma semelhante ao descrito anteriormente (2.2.1.). O inóculo de *L. nuda* foi preparado da mesma maneira que para *P. cinnamomi*, mas regado com meio MMN líquido em vez de V8 líquido. As culturas foram incubadas em estufa a 24°C durante duas semanas.

A inoculação dos sobreiros, segundo as modalidades, foi realizada na altura do seu transplante para vasos de 3 L. O substrato dos vasos consistiu numa mistura de composto vegetal e terra (1:1). As plantas foram inoculadas com 50 mL de millet previamente inoculado com *P. cinnamomi* e 50 mL de millet inoculado com *L. nuda*.

Os sobreiros foram mantidos em estufa de campo e os vasos foram colocados em tabuleiros, mantendo-se sempre estes com água.

Quadro 12. Grupos consoante a percentagem de micorrização estimada a partir da observação das quatro faces do torrão.

Grupos	Percentagem de Micorrizas
1	Até 5%
2	Até 10%
3	Até 20%
4	Até 30%
5	Até 40%
6	Até 50%
7	Até 60%
8	Até 80%

2.5. Análise de dados

Os resultados são apresentados como a média das repetições realizadas em cada teste.

As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa STATISTICA, versão 10.0, e calculadas pelo teste de Fisher ou Tukey, para probabilidades inferiores a 5%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Testes *in vitro*

3.1.1. Testes de antagonismo

Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados e realizada uma análise de variância (ANOVA) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *P. cinnamomi* entre as dezoito espécies de fungos testadas (Anexo 6.2.). As percentagens de inibição de *P. cinnamomi* por cada espécie foram comparadas pelo teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), para $P < 0,05$ (Quadro 13).

Quadro 13. Valores médios da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* por isolado testado e valores médios da percentagem de inibição por espécie (letras diferentes representam diferenças significativas para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))

Espécie	Isolado	Inibição / isolado (%)	Inibição média / espécie (%)
<i>Boletus edulis</i>	BeBr5	-27,1	-27,1a
<i>Schizophyllum commune</i>	SH523	-15,6	-15,6ab
<i>Lentinula edodes</i>	SU257	-14,6	-10,3abc
	LE597	-6,0	
<i>Boletus aereus</i>	BS124	-8,3	-8,3abcd
<i>Ganoderma resinaceum</i>	GR430	-8,2	-8,2abcd
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PL407	-7,5	-7,5abcd
<i>Pleurotus djamor</i>	PL415	-4,3	-4,3abcd
<i>Scleroderma citrinum</i>	Scc092	-0,8	-0,8bcd
<i>Pisolithus tinctorius</i>	PT007	11,0	1,0bcd
	PT027	0,75	
	PT004	-2,7	
	PT003	-4,9	
<i>Omphalotus olearius</i>	OP598	2,9	2,9bcde
<i>Paxillus involutus</i>	PAIANU	5,2	5,2bcde
<i>Laccaria bicolor</i>	LB238	8,9	8,9cdeg
<i>Macrolepiota procera</i>	MP093	12,0	10,2deg
	MP234	8,5	
<i>Amanita rubescens</i>	AMR492	11,1	11,1defg
<i>Xerocomus rubellus</i>	A103	14,0	14,0defg
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	HeSiv	12,2	20,2efg
	A219	28,2	
<i>Lepista nuda</i>	LN2012_DES	-1,3	28,5f
	LN2012_SIM	5,1	
	LN091	53,4	
	LN2011(JBA)	56,6	
<i>Ganoderma lucidum</i>	GR574	30,3	30,3fg

Das dezoito espécies testadas a espécie *Boletus edulis* foi a que teve menos efeito na inibição do oomiceta *Phytophthora cinnamomi* (-27,1%), tendo-se mesmo registado valores superiores de crescimento micelial quando em confronto. As percentagens mais altas de inibição foram observadas na confrontação com isolados de *Lepista nuda* (LN2011(JBA), 56,6% e LN-091, 53,4%) onde o crescimento em diâmetro de *P. cinnamomi* registado na co-cultura de teste (em confrontação com o fungo) foi menos de metade do que na co-cultura de controlo. A inibição percentual devida ao fungo *Lepista nuda* foi considerada significativamente diferente da inibição induzida pelas outras espécies. De notar que no confronto entre *P. cinnamomi* e *Ganoderma lucidum* houve uma inibição de cerca de 30%; este basidiomiceta é bastante comum na Península Ibérica, encontrando-se associado sobretudo a raízes de folhosas, em árvores já mortas ou muito degradadas (Passola, 2011).

A razão (R) entre o crescimento diário de *Phytophthora* nas co-culturas de controlo (C) e nas co-culturas de teste (T) foi analisada de forma semelhante à percentagem de inibição do crescimento micelial. A análise de variância (ANOVA) mostrou diferenças significativas entre as espécies testadas para o valor da razão C/T (Quadro 14).

Quadro 14. Valores médios da razão C/T por isolado e por espécie. Letras diferentes para a Razão C/T de cada espécie representam diferenças significativas entre as espécies para o teste de Fisher LSD (p <0,05)

Espécie	Isolado	Razão C/T por isolado	Razão C/T por espécie
<i>Boletus edulis</i>	BeBr5	0,700	0,700a
<i>Lentinula edodes</i>	SU257	0,778	0,868a
	LE597	0,959	
<i>Boletus aereus</i>	BS124	0,890	0,890ab
<i>Schizophyllum commune</i>	SH523	0,891	0,891ab
<i>Ganoderma resinaceum</i>	GR430	0,921	0,921ab
<i>Pleurotus djamor</i>	PL415	0,931	0,931ab
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PL407	0,935	0,935ab
<i>Pisolithus tinctorius</i>	PT007	1,245	1,085ab
	PT027	1,031	
	PT004	1,071	
	PT003	0,994	
<i>Omphalotus olearius</i>	OP598	1,094	1,094ab
<i>Scleroderma citrinum</i>	Sc092	1,099	1,099ab
<i>Amanita rubescens</i>	AMR492	1,109	1,109ab
<i>Paxillus involutus</i>	PAIANU	1,144	1,144ab
<i>Laccaria bicolor</i>	LB238	1,222	1,222ab
<i>Xerocomus rubellus</i>	A103*	1,225	1,225ab
<i>Macrolepiota procera</i>	MP093	1,381	1,258ab
	MP234	1,136	
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	HeSiv	1,378	1,404ab
	A219*	1,430	
<i>Ganoderma lucidum</i>	GR574	1,770	1,770bc
<i>Lepista nuda</i>	LN2012_DES	0,980	2,313c
	LN2012_SIM	1,206	
	LN091	3,067	
	LN2011(JBA)	3,998	

C - Crescimento em diâmetro médio de *Phytophthora* na co-cultura de controlo; T - Crescimento em diâmetro médio de *Phytophthora* na co-cultura de teste.

* Este ensaio dispôs de duas modalidades, uma desfasada e outra simultânea, devido ao facto de *P. cinnamomi* ter apresentado uma elevada taxa de crescimento no meio de PDA, ocupando uma placa de 90 mm de diâmetro em poucos dias. Os fungos que apresentavam baixas taxas de crescimento (muito inferiores à de *P. cinnamomi*), foram testados na modalidade de desfasamento de uma semana, em alguns casos mais, com o objetivo de terem algum avanço sobre a espécie *P. cinnamomi*. Dois isolados tiveram mais de uma semana de desfasamento devido à taxa de crescimento ser muito baixa. No teste com o isolado A103 (*Xerocomus rubellus*), apenas foi possível realizar a confrontação com *Phytophthora* com 45 dias de desfasamento. No teste com o isolado A219 (*Hebeloma crustuliniforme*) o desfasamento foi de 18 dias. Como foi referido em Material e Métodos (2.1.1.), os fungos saprófitas, à exceção da espécie *Lepista nuda*, foram testados na modalidade simultânea por apresentarem taxas de crescimento semelhantes a *P. cinnamomi*.

Apesar de existirem diferenças em relação à percentagem de inibição, os resultados da razão entre o crescimento diário de *Phytophthora* nas co-culturas de controlo e nas co-culturas de teste mostram que, neste ensaio, *Lepista nuda* e *Ganoderma lucidum* foram os fungos que exibiram maior antagonismo em relação a *P. cinnamomi*. Em confronto com o isolado LN2011(JBA), o oomiceta *P. cinnamomi* cresceu, num dia, quatro vezes menos, na direção da espécie *Lepista nuda*, comparativamente ao constatado na co-cultura de controlo (Figura 7a).

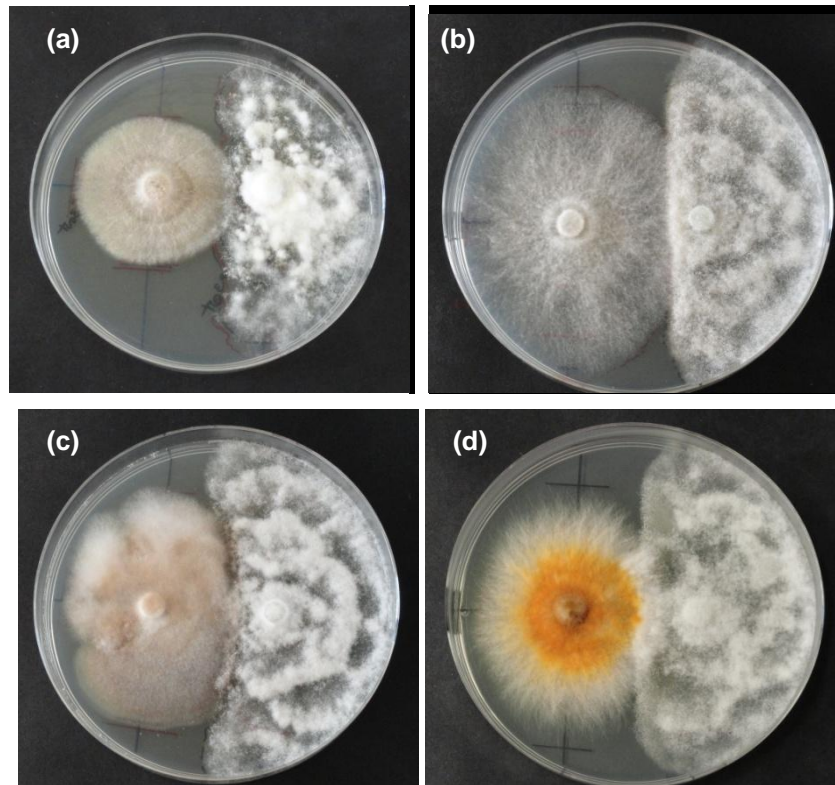


Figura 7. Confrontação entre *Phytophthora cinnamomi* e: (a) *Lepista nuda*, isolado LN2011(JBA); (b) *Ganoderma lucidum*, isolado GR574; (c) *Macrolepiota procera*, isolado MP093; e (d) *Omphalotus olearius*, isolado OP598.

Apesar da percentagem de inibição de *P. cinnamomi* e da razão C/T não terem sido elevadas no confronto com *Omphalotus olearius*, foi notória uma zona de interação distinta da observada nos confrontos com os outros fungos testados, nomeadamente os micorrízicos. Ao contrário do que se observou com a maioria dos outros fungos, quando as duas colónias entraram em contacto o micélio de *Omphalotus olearius* sobrepôs-se ao do oomiceta, crescendo mesmo por cima deste. A Figura 8a ilustra esta interface, sendo evidente que o fungo inibidor continua a crescer sobre a colónia do oomiceta inibido, ao contrário do que aconteceu na confrontação com os fungos *Pisolithus tinctorius* (Fig. 8b), *Laccaria bicolor* (Fig. 8c) e *Paxillus involutus* (Fig. 8d). Foi possível observar que o micélio de *P. cinnamomi* continuou a crescer, ocupando a zona da placa em volta das colónias dos três fungos micorrízicos, ao passo que no caso do fungo *Omphalotus olearius* ocorreu o inverso.

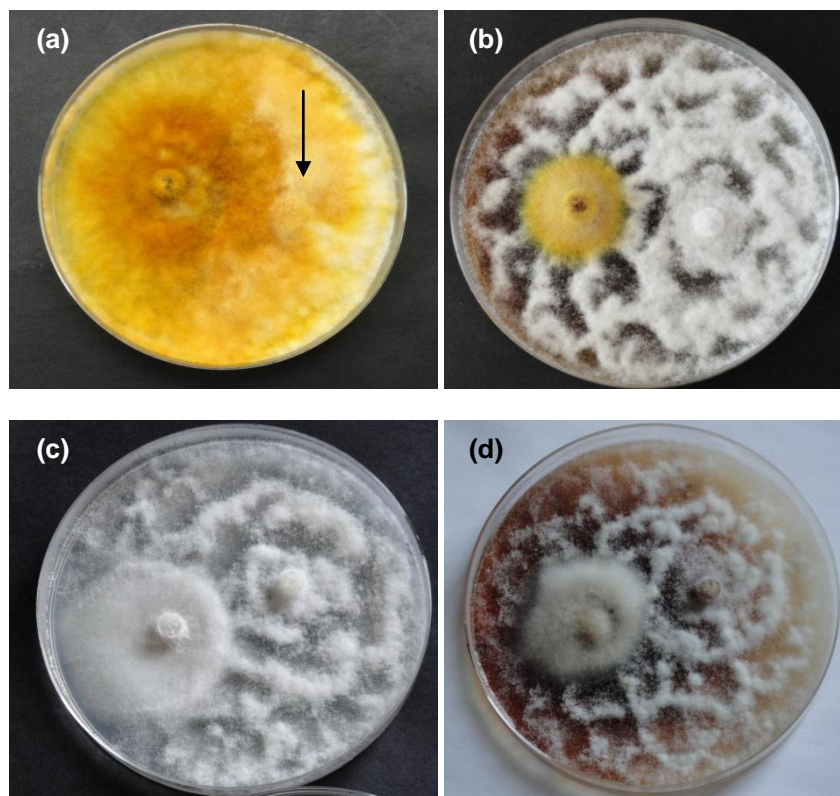


Figura 8. Confrontação entre *Phytophthora cinnamomi* e: (a) *Omphalotus olearius* (OP598); (b) *Pisolithus tinctorius* (PT027); (c) *Laccaria bicolor* (LB238); e (d) *Paxillus involutus* (PAIANU). A seta aponta para o local onde micélio de *Omphalotus olearius* se sobrepõe ao de *Phytophthora cinnamomi*.

Os resultados mostram que a espécie *Boletus edulis* foi a menos eficaz ($I=-27,1\%$, $R=0,7$) na inibição do crescimento de *P. cinnamomi*. O valor negativo na percentagem de inibição (confirmado pelo $R < 1$) é indicativo que a espécie *P. cinnamomi* cresceu mais em confrontação com este fungo do que na co-cultura de controlo. Este fenómeno ocorreu em mais 6 espécies testadas que apresentaram percentagens negativas de inibição ($R < 1$). É possível colocar a hipótese de o crescimento de *P. cinnamomi* ser estimulado pela presença de certos fungos.

Dois isolados do fungo saprófita *Lepista nuda*, inibiram de modo eficaz o crescimento de *P. cinnamomi* e foram testados, como já referido, segundo a modalidade desfasada (sete dias). O isolado LN2012 foi testado em simultâneo (LN2012_SIM) e desfasado uma semana (LN2012_DES) e não se mostrou eficaz na inibição do crescimento de *P. cinnamomi*. Na altura da confrontação este fungo (LN2012) tinha sido isolado há pouco tempo o que pode justificar a menor agressividade no crescimento em placa, devido ao facto de ainda se encontrar em fase de adaptação à cultura em meio nutritivo artificial.

O ensaio foi limitado pelo rápido crescimento de *P. cinnamomi*. A sobreposição de crescimentos (de fungo e *Phytophthora*) ocorreu rapidamente pelo que não foi possível efetuar medições para além do terceiro dia de confrontação. Assim, as medições utilizadas para calcular a percentagem de inibição são respeitantes, no máximo, ao terceiro dia de crescimento de *P. cinnamomi*. Este fator foi limitante em alguns casos onde as interações fungo vs. *P. cinnamomi* continuaram depois dos três dias, ou seja, o fungo testado ou *P. cinnamomi* não cessaram o crescimento ao terceiro dia.

3.1.2. Teste de antagonismo com extratos de fungos

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) das percentagens de inibição de *P. cinnamomi* quando em confrontação com seis extratos de isolados de quatro espécies (Anexo 6.3.). As diferenças significativas na percentagem de inibição entre os isolados foram calculadas pelo teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), $P < 0,05$ (Quadro 15).

Quadro 15. Valores médios da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* consoante o isolado de cada fungo. Letras diferentes para a inibição (%) de cada isolado representam diferenças significativas entre os isolados para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$)

Espécie	Isolado	Inibição de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (%)
<i>Lentinula edodes</i>	L.edodes (spawn)	-2,7a
<i>Lentinula edodes</i>	L.edodes (cavilhas)	-2,0a
<i>Lepista nuda</i>	LN-091	-0,5a
<i>Lactarius deliciosus</i>	A257	0,6a
<i>Lepista nuda</i>	LN2011(JBA)	2,1a
<i>Omphalotus olearius</i>	OP598	27,8b

Apesar do fungo *Lentinula edodes* não ter gerado resultados positivos nos testes de antagonismo decidiu-se testar o poder inibidor do seu extrato. O extrato obtido através do exsudado libertado pelo fungo no *spawn* e o obtido nas cavilhas de madeira tem características diferentes pelo que se optou por testar os dois. Os resultados mostraram que o crescimento de *P. cinnamomi* não é afetado por qualquer um dos extratos.

O fungo micorrízico *Lactarius deliciosus* não foi testado em confrontação com *Phytophthora*, porém, o facto de existirem, na altura, culturas líquidas já estabelecidas permitiu introduzir neste ensaio, embora sem resultado positivo, o extrato de um fungo micorrízico.

Os resultados obtidos com os fungos *Omphalotus olearius* e *Lepista nuda* nos testes de confrontação *in vitro* com *P. cinnamomi* (3.1.1), suscitaram a verificação da origem do antagonismo destes fungos face ao oomiceta. O teste de antagonismo entre *Lepista nuda* e *P. cinnamomi* foi desfasado (o fungo *Lepista nuda* cresceu com sete dias de avanço em relação ao oomiceta *P. cinnamomi*) pelo que se colocou a hipótese de esgotamento de nutrientes no meio para o crescimento da *Phytophthora* o que geraria uma diminuição na sua taxa de crescimento. O fungo *Omphalotus olearius* produziu, em confrontação com *P. cinnamomi*, exsudado que pode ser responsável pelo antagonismo observado.

Dos seis extratos testados, provenientes de quatro espécies diferentes, o extrato de *Omphalotus olearius* foi o que mais inibiu o crescimento de *P. cinnamomi* e o valor percentual de inibição de 27,8% foi significativamente diferente dos valores de inibição registados para os outros extratos. Na Figura 9 é possível observar que o crescimento diametral de *P. cinnamomi* foi diferente na presença do extrato *Omphalotus*, mesmo na direção do controlo (água destilada), em comparação com os restantes testes de extratos.

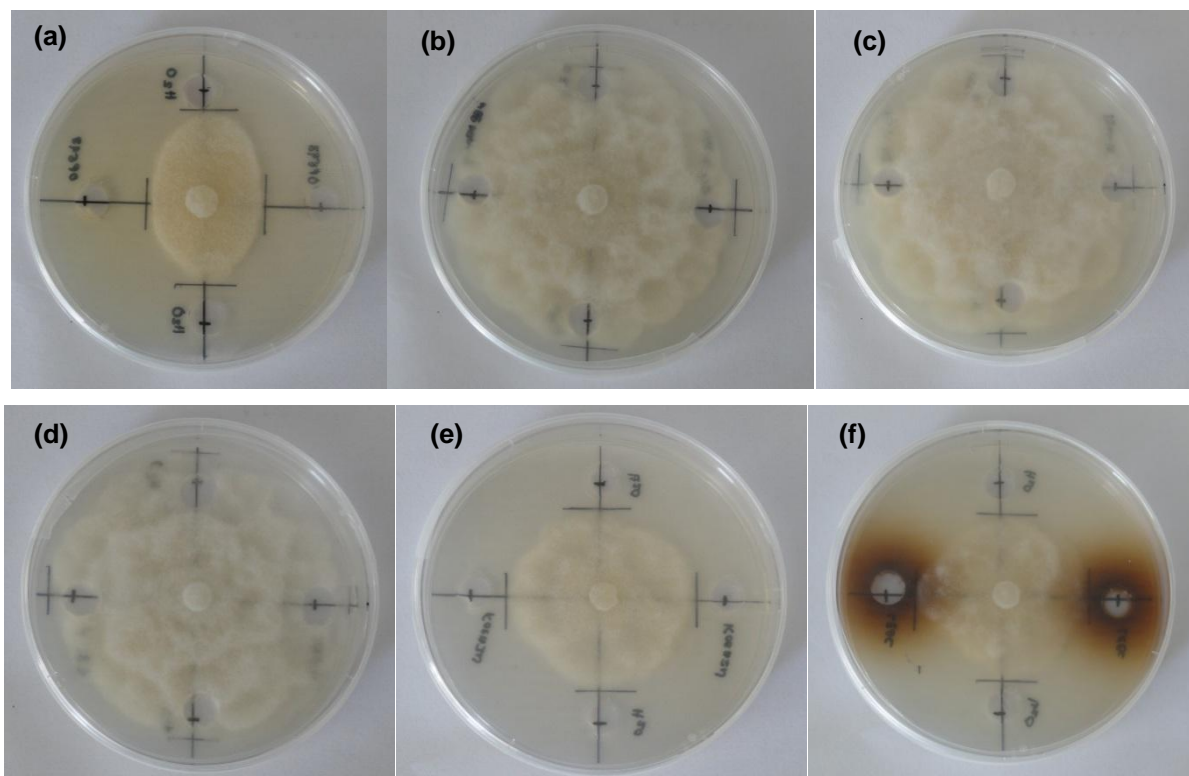


Figura 9. Crescimento de *Phytophthora cinnamomi* na direcção da água destilada (Norte-Sul) e na direcção (E-O) do extrato proveniente do fungo (a) *Omphalotus olearius*; (b) *Lepista Nuda*, isolado LN2011(JBA); (c) *Lepista Nuda*, isolado LN-091; (d) *Lactarius deliciosus*; (e) *Lentinula edodes*, em spawn e (f) *Lentinula edodes*, em cavilhas de madeira. O crescimento de *Phytophthora cinnamomi* apresentado corresponde a sete dias em (a), (b), (c) e (d) e quatro dias em (e) e (f) após a inoculação das placas.

Os extratos provenientes das culturas líquidas dos dois isolados de *Lepista nuda* não geraram resultados positivos. Assim os resultados obtidos nos testes de antagonismo com este fungo podem estar relacionados com o consumo de nutrientes do meio PDA, durante a fase de desfasamento, necessários ao crescimento do oomiceta.

Por outro lado, o extrato de *Omphalotus olearius* é inibidor do crescimento de *P. cinnamomi* já que a colónia mostrou alterações claras em relação às restantes, mesmo no sentido da testemunha. Este fenómeno pode ser explicado pela difusão do extrato no meio de cultura, a partir dos dois "poços" onde previamente fora colocado. Ainda assim, o crescimento diametral de *Phytophthora* foi maior no sentido da água destilada do que no sentido do extrato, correspondendo a uma inibição de cerca de 28%.

3.1.3. Avaliação da ação do extrato de *Omphalotus olearius* no crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi*

Tendo em conta que aquando da obtenção do extrato de *Omphalotus olearius* se observou a produção de um abundante exsudado por parte do fungo em meio líquido (Figura 10) e após constatação do efeito antagonista face a *P. cinnamomi* (3.1.2.) decidiu-se testar o efeito de diferentes concentrações do extrato de *Omphalotus*, em meio PDA, na inibição no crescimento de *P. cinnamomi*.



Figura 10. Cultura líquida de *Omphalotus olearius* ao fim de 15 dias de incubação.

Efetuuou-se a análise de variância (ANOVA) dos valores de crescimento diametral e da percentagem de inibição de *P. cinnamomi*, com dois fatores (Anexo 6.4.): percentagem de extrato (0% a 100%) e isolado de *P. cinnamomi* (PH107 e PH1160). Os resultados da análise demonstraram diferenças significativas no crescimento entre isolados, entre diferentes percentagens de extrato e entre os isolados para uma determinada percentagem de extrato (interação Isolado*%extrato). Para cada isolado, as diferenças significativas no crescimento em diâmetro e percentagem de inibição, entre diferentes percentagens de extrato, foram calculadas pelo teste de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*), $P < 0,05$ (Quadro 16).

Quadro 16. Valores médios do crescimento diametral de *Phytophthora cinnamomi* (isolados PH107 e PH1160) ao sétimo dia seguidos dos respetivos desvios padrão e valores em percentagem de inibição (letras diferentes para o Diâmetro (cm) e Inibição (%) representam diferenças significativas entre a percentagem de extrato para o teste de Tukey HSD ($p < 0,05$))

Isolado	% Extrato <i>Omphalotus</i>	Diâmetro (cm)	Inibição (%)
PH107	0 (Controlo)	7,90±0,08a	0a
	2,5	6,20±0,10b	21,5b
	5	3,74±0,55c	52,6c
	7,5	3,23±0,41c	59,1c
	10	1,51±0,72d	80,9d
	20	0,88±0,13d	88,8e
	50	0,00±0,00e	100f
	100	0,00±0,00e	100f
PH1160	0 (Controlo)	6,29±0,15a	0a
	2,5	4,74±0,38b	24,6b
	5	3,63±0,24c	42,3c
	7,5	3,10±0,33d	50,8d
	10	2,10±0,07e	66,6e
	20	0,00±0,00f	100f
	50	0,00±0,00f	100f
	100	0,00±0,00f	100f

Diferenças significativas entre o crescimento micelial dos dois isolados PH107 e PH1106 podem ser observadas na modalidade controlo (0% de extrato *Omphalotus*) onde, sete dias após a inoculação, o isolado PH107 apresenta um diâmetro médio de 7,90 cm, enquanto o isolado PH1160

tem 6,29 cm. O crescimento do isolado PH107 foi totalmente inibido para concentrações de 50 e 100% de extrato de *Omphalotus*. Para o isolado PH1160 a inibição foi total a partir da concentração 20% de extrato. Para se considerar que houve inibição total do crescimento de *P. cinnamomi*, todas as repetições numa modalidade tiveram de apresentar crescimento micelial nulo (por exemplo: na modalidade 20%, para o isolado PH107, houve uma das quatro repetições que apresentou crescimento micelial nulo, como se registou crescimento nas outras repetições, esta repetição foi excluída e não entrou nos resultados). A utilização de dois isolados neste ensaio confirmou que existem diferenças de comportamento entre isolados *P. cinnamomi*. O isolado PH107 demonstrou maior resistência ao apresentar uma taxa de crescimento mais elevada no controlo e pela cessação do crescimento ocorrer apenas para uma concentração de 50% de extrato *Omphalotus*. Este isolado foi obtido a partir de solo contaminado proveniente de um viveiro produtor de castanheiros (*Castanea sativa*). Já o isolado PH1160 foi obtido a partir de solo contaminado proveniente de um montado de sobre (*Quercus suber*).

É também possível observar que, para ambos os isolados, há um efeito inibidor do crescimento a partir de uma concentração de 2,5% de extrato *Omphalotus* (3,75 mL em 150mL de solução). Existe um decréscimo no diâmetro da colónia de *P. cinnamomi*, ou acréscimo da percentagem de inibição, à medida que a concentração de extrato de *Omphalotus* foi aumentada (Figura 11).

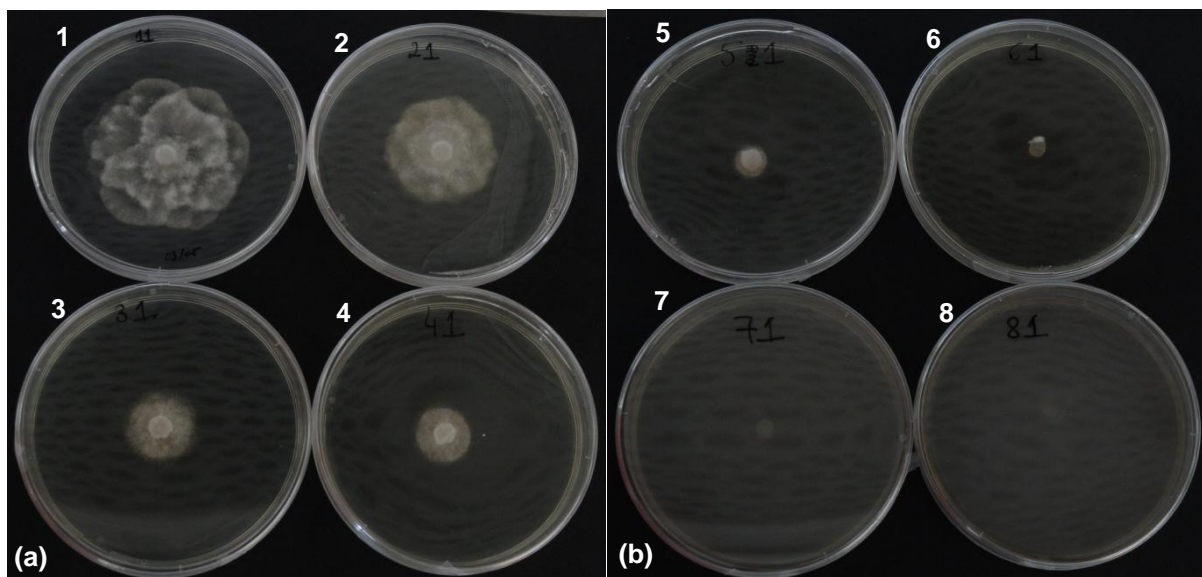


Figura 11. Crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* (isolado PH107), ao quinto dia de incubação nas oito modalidades do ensaio. (a) Modalidades 1 (0% de extrato – Controlo), 2 (2,5% de extrato), 3 (5%) e 4 (7,5%); (b) Modalidades 5 (10%), 6 (20%), 7 (50%) e 8 (100%). Nas modalidades 7 e 8 não houve desenvolvimento de micélio.

Com o objetivo de perceber de que modo o extrato inibe o crescimento micelial de *P. cinnamomi*, procedeu-se à observação das características microscópicas das hifas no caso do isolado PH107 nas modalidades contendo 0% e 20% de extrato *Omphalotus* (Figura 12). Na Figura 12a podem observar-se estruturas dilatadas na extremidade das hifas, vulgarmente designadas de *swellings*. Estas estruturas são comuns em *P. cinnamomi*, porém apareceram em maior número nas

colónias que cresceram em meio contendo extrato de *Omphalotus* do que nas testemunhas, o que poderá ser indicativo de que o oomiceta se encontrava em *stress*.

Em Harland (2007) foi estudado o efeito da desregulação da actina filamentosa (proteína essencial no crescimento direcional de *P. cinnamomi* na extremidade da hifa) no crescimento do oomiceta *P. cinnamomi*. Foi observado que quando era aplicado o tratamento, neste caso a latrunculina B (inibidor da formação da actina filamentosa), o crescimento cessava rapidamente seguindo-se a formação abundante de *swellings* na região sub-apical. O mesmo se verificou quando se aplicou o extrato *Omphalotus* como pode ser confirmado pela Figura 12a, o que sugere que o extrato exerce um efeito direto no crescimento direcional da *P. cinnamomi* na extremidade da hifa.

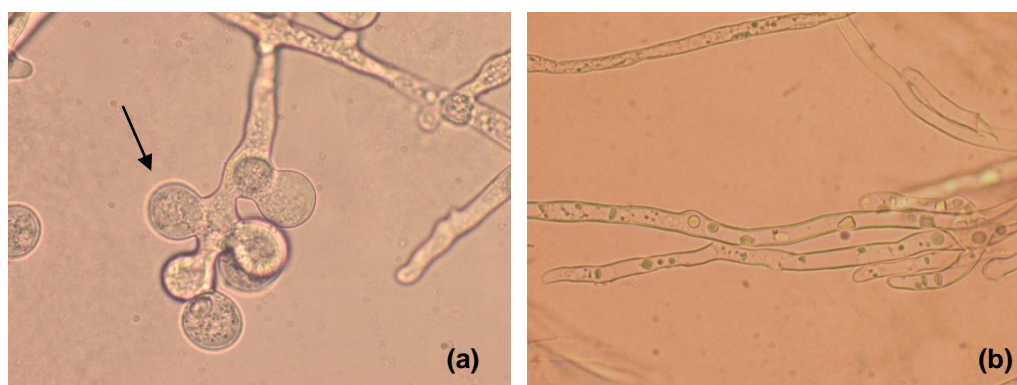


Figura 12. Aspectos microscópicos das hifas de *Phytophthora cinnamomi* (isolado PH107) (a) na modalidade 20% de extrato de *Omphalotus olearius* e (b) na modalidade testemunha (0% de extrato).

3.1.4. Avaliação da ação do extrato de *Omphalotus olearius* na esporulação de *Phytophthora cinnamomi*

A análise de variância (ANOVA) do número de esporângios (também designados zoosporângios) em cada modalidade testada (percentagem extrato) demonstrou que o número de esporângios variou significativamente com a percentagem de extrato (Anexo 6.5.), nomeadamente entre a testemunha (0% de extrato) e as restantes modalidades. As diferenças significativas foram calculadas pelo teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), $P < 0,05$ (Quadro 17).

Quadro 17. Número médio de esporângios de *Phytophthora cinnamomi* em cada modalidade (percentagem de extrato de *Omphalotus*) correspondente à primeira contagem (letras diferentes representam diferenças significativas entre os extratos para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))

Modalidade	Percentagem de extrato <i>Omphalotus</i> (%)	Nº médio de esporângios (1ª Contagem)
I (Controlo)	0	65,5b
III	25	0a
IV	50	0a
V	75	0a
VI	100	0a
I(Controlo)	0	115,1b
I	5	0a
II	15	0a

A contagem dos esporângios permitiu avaliar a eficácia do extrato de *Omphalotus* na inibição da diferenciação de esporângios de *Phytophthora cinnamomi*.

O ensaio começou por englobar as modalidades contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de extrato *Omphalotus*. Como não foram observadas frutificações nas concentrações testadas (com exceção do controlo) decidiu-se baixar a concentração de extrato *Omphalotus* e foi necessário fazer um novo controlo para as modalidades contendo 5% e 10% de extrato.

A partir de uma percentagem de 15% de extrato *Omphalotus* a produção de esporângios é totalmente inibida, ou seja, mesmo após as diluições do meio *Omphalotus*, não foram observados esporângios de *P. cinnamomi* em nenhuma das contagens. Cada repetição (placa) conteve 5 “armadilhas”, isto quer dizer que nas 15 “armadilhas” observadas para cada modalidade não foram encontrados esporângios. Na primeira contagem apenas o controlo para as modalidades III, IV, V e VI e o controlo para a modalidades I e II apresentaram frutificações cujo número médio foi cerca de 66 e 115, respetivamente.

Como foi referido em Material e Métodos (2.1.4) após a contagem das frutificações, além da substituição dos discos, foram também adicionados 40 mL de água destilada a cada placa de Petri devido à evaporação do tratamento (água destilada + extrato *Omphalotus*). Para as modalidades III a VI (25%, 50%, 75%, 100%) acrescentou-se por duas vezes 40 mL de água destilada. Para as modalidades I e II foi necessário adicionar por três vezes 40 mL de água destilada (para quatro contagens de frutificações).

As “armadilhas” pertencentes à modalidade que continha 5% de extrato *Omphalotus* (VI) não apresentaram frutificações (esporângios) nas primeiras duas contagens. Na terceira contagem (correspondente à segunda diluição) apareceram esporângios em 7 dos 15 discos foliares, em média correspondendo a 24 esporângios, e na 4ª contagem 14 dos 15 discos foliares apresentavam frutificações, com uma média de 57 esporângios/disco. O aparecimento de esporângios na terceira contagem, confirmado pela quarta contagem, deveu-se à diluição do extrato *Omphalotus*. A concentração de 5% significa que, em 50 mL de solução (água destilada + extrato *Omphalotus*), 2,5 mL correspondia ao extrato *Omphalotus*. Nos discos foliares pertencentes às modalidades onde não houve produção de esporângios foi possível observar na periferia a formação de um “anel” de tecido necrosado de cor castanho enquanto que a parte interior da folha (disco) se manteve verde (Figura 13c). As folhas correspondentes ao controlo, onde se registou produção de esporângios, ficaram totalmente necrosadas ao fim de três dias (Figura 13b).

Foi ainda possível observar à lupa a formação de uma rede de hifas no rebordo dos discos foliares que não continham esporângios (Figura 13e). Contudo não foi possível confirmar que este micélio pertencia a *Phytophthora* sp.

A tentativa de isolar *P. cinnamomi* em meio seletivo PARPNH a partir das “armadilhas” teve como objetivo a verificação da presença de micélio desta espécie nos discos. Não foi observado qualquer crescimento micelial de *P. cinnamomi* a partir das armadilhas que não continham esporângios. Este método de isolamento nem sempre é bem sucedido pois, apesar de o meio conter quatro antibióticos e um fungicida, existem espécies no solo que têm capacidade para se desenvolver

neste meio competindo com a *P. cinnamomi* (por exemplo espécies do género *Pythium*) (Jeffers & Martin, 1986).

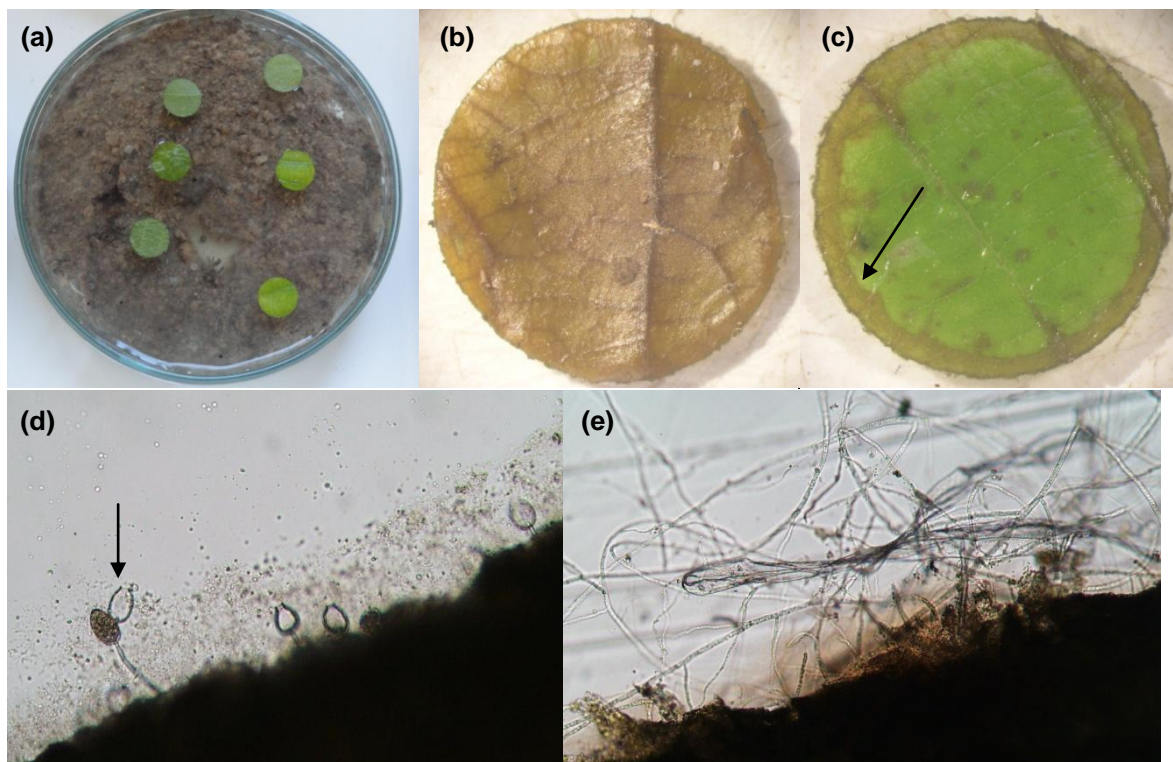


Figura 13. Efeito do extrato *Omphalotus* na esporulação de *Phytophthora cinnamomi* (a) Caixa de Petri com os discos foliares a flutuar. (b) Disco foliar com três dias e observada à lupa, onde se registou formação de esporângios (nesta armadilha foram contados 276 esporângios de *Phytophthora cinnamomi*). (c) Disco foliar com três dias, observado à lupa, onde não ocorreu produção de esporângios e na periferia do qual é possível observar a necrose dos tecidos (seta). (d) Pormenor da periferia do disco (b) com formação de esporângios. (e) Rede de micélio formada no disco foliar (c) onde ocorreu inibição da formação de esporângios.

3.2. Estudo do efeito do extrato de *Omphalotus* em plantas inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*

3.2.1. Estudo em clones de híbridos de *Castanea sativa*

Neste ensaio foram inoculadas 9 plantas com *P. cinnamomi* e sem tratamento (P) e 9 plantas com tratamento de extrato puro de *Omphalotus* uma semana após a inoculação (P1). Entre as 18 plantas inoculadas constavam dois híbridos diferentes, 9 plantas provieram de cruzamentos *C. sativa* x *C. crenata* (SC) e 4 plantas do cruzamento *C. sativa* x *C. mollissima* (SM). No total testaram-se 13 clones geneticamente diferentes. Os valores das lesões, notação e sobrevivência de cada clone foram analisados em conjunto.

Realizou-se uma análise de variância da extensão da lesão externa e interna, da percentagem de lesão do colo, da notação da raiz e dos dias de sobrevivência, entre as duas modalidades (Anexo 6.6.): plantas inoculadas com *P. cinnamomi* (P) e plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e regadas, passada uma semana, com extrato puro de *Omphalotus* (*one-way* ANOVA). As diferenças significativas nos valores das lesões, da notação radicular e da sobrevivência, entre as

duas modalidades, foram calculadas pelo teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), $P < 0,05$ (Quadro 18).

Quadro 18. Valores médios da extensão das lesões externa, interna e do colo, da notação radicular e dos dias de sobrevivência das plantas (letras diferentes para cada tipo de medição representam diferenças significativas, entre as modalidades, da extensão das lesões, da notação da raiz ou dos dias de sobrevivência para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))

Modalidade	Lesão Externa (cm)	Lesão Interna (cm)	Lesão do Colo (%)	Nota da Raiz (0-5)	Sobrevivência (dias)
P	2,01a	3,31a	68,89a	3,06a	91,6a
P1	1,64a	6,74a	84,44a	3,67a	106,3a

A lesão externa foi ligeiramente maior nas plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e sem tratamento (P), com uma diferença de cerca de 0,4 cm entre as modalidades (diferença não significativa). As plantas com tratamento de extrato *Omphalotus* (P1) sobreviveram mais 15 dias comparativamente às plantas sem tratamento. A lesão interna e do colo foi maior nas plantas pertencentes à modalidade P1. Neste ensaio a notação das raízes foi ligeiramente superior na modalidade P1.

3.2.2. Efeito em plantas micropropagadas do mesmo clone (SC32)

Foi feita uma análise de variância, da extensão da lesão externa e interna, da percentagem de lesão do colo, da notação da raiz e dos dias de sobrevivência, entre as diferentes modalidades (Anexo 6.7.): plantas inoculadas com *P. cinnamomi* (P), plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e regadas simultaneamente com extrato *Omphalotus* diluído (P0) e plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e regadas, passada uma semana, com extrato *Omphalotus* puro (*one-way ANOVA*). Para cada parâmetro analisado as diferenças significativas entre as três modalidades foram calculadas pelo teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), $P < 0,05$ (Quadro 19).

Quadro 19. Valores médios da extensão das lesões externa, interna e do colo, da notação radicular e dos dias de sobrevivência das plantas do clone SC32 (letras diferentes para cada tipo de medição representam diferenças significativas, entre as modalidades, da extensão das lesões, da notação da raiz ou dos dias de sobrevivência para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$))

Modalidade*	Lesão Externa (cm)	Lesão Interna (cm)	Lesão do Colo (%)	Nota da Raiz (0-5)	Sobrevivência (dias)
P	7,54a	7,74a	100	5a	79,4a
P0	4,68a	6,38a	100	5a	80,4a
P1	5,80a	19,20b	100	2,25b	98,5a

* Modalidades: P = plantas inoculadas com *P. cinnamomi*; P0 = plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e regadas simultaneamente com extrato *Omphalotus* diluído; P1 = plantas inoculadas com *P. cinnamomi* e regadas, passada uma semana, com extrato *Omphalotus* puro.

Apesar de as diferenças não serem significativas entre as modalidades, a extensão da lesão externa nas modalidades onde se aplicou o extrato *Omphalotus* (P0 e P1) foi em média menor relativamente à registada nas plantas inoculadas com *P. cinnamomi* sem tratamento (P). As plantas que foram tratadas uma semana após a inoculação com o extrato puro de *Omphalotus* (P1) sobreviveram mais 20 dias, aproximadamente, do que as inoculadas com *P. cinnamomi* e que não tiveram tratamento (P). Das cinco plantas inseridas na modalidade P1, quatro morreram apresentando lesões claras de *P. cinnamomi* havendo uma planta que sobreviveu à infeção. Esta

planta não foi processada até à data e não entrou para os resultados acima apresentados (Quadro 19). É possível observar que para lesões externas menos extensas a sobrevivência em dias aumentou, ainda que sem diferenças significativas entre modalidades.

O valor da lesão interna foi significativamente maior nas plantas inseridas na modalidade P1, o que parece estar relacionado com o facto de nas plantas desta modalidade a lesão externa não ter sido tão expressiva e a planta ter sobrevivido um maior número de dias. Na altura do processamento, todas as plantas mortas apresentaram lesões em 100% do colo não havendo variabilidade entre as modalidades.

A notação radicular foi significativamente menor (2,25, numa escala de 0 a 5) nas plantas tratadas com o extrato *Omphalotus* puro (P1). A aplicação simultânea do extrato *Omphalotus* na concentração 20% não surtiu efeito ao nível das raízes dado que estas foram infetadas de modo semelhante ao ocorrido nas plantas testemunha (P). Quando as plantas da modalidade P1 foram processadas, observou-se que as raízes estavam em bom estado, ou seja, apresentavam-se castanhas e bem desenvolvidas em vez de enegrecidas e com os tecidos moles como acontece quando infetadas por *P. cinnamomi* (sintoma característico). A penetração do oomiceta *P. cinnamomi* nestas plantas parece ter ocorrido ao nível das raízes de menor diâmetro, junto ao colo, existindo plantas que apesar de terem sintomas de *P. cinnamomi* localizados em apenas uma raiz fina, acabaram por morrer.

A Figura 14 mostra a lesão externa, interna e do colo observadas nas plantas infetadas com *Phytophthora cinnamomi*.

A maior percentagem de sobrevivência detetada nas plantas da modalidade P1 poderá estar relacionada com a menor notação radicular. A aplicação do extrato puro de *Omphalotus* pode ter retardado o processo de infeção através da inibição da formação de esporângios e consequentemente de zoósporos. O facto de as plantas terem sido regadas todas as semanas com 100 mL de água, levando a uma consequente diluição do tratamento, pode ter permitido a produção de propágulos de infeção. Esses propágulos terão sido produzidos em menor número pelo que se registou também um menor número de raízes infetadas.

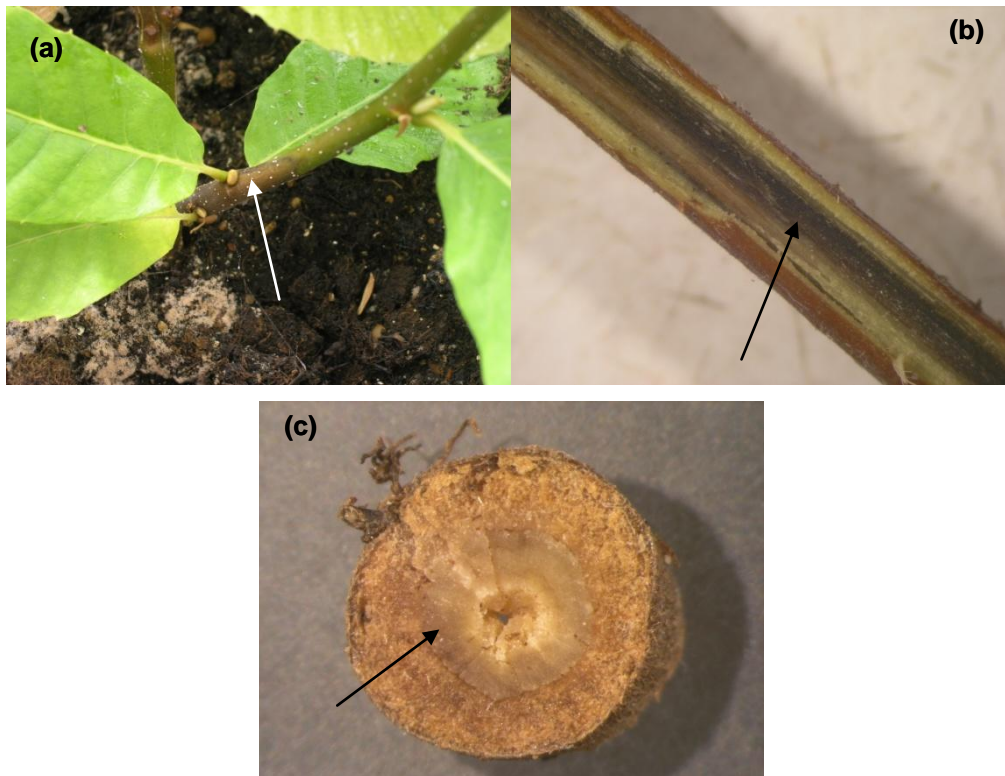


Figura 14. (a) Planta do clone SC32, 40 dias após inoculação com *Phytophthora cinnamomi* onde é visível a lesão necrótica externa do caule (seta). (b) Aspeto da lesão interna caracterizada pelo enegrecimento dos tecidos condutores (seta). (c) Lesão ao nível do colo, caracterizada pelo escurecimento do cilindro central (seta).

3.2.3. Efeito do extrato *Omphalotus* em plantas inoculadas com terra contaminada com *Phytophthora cinnamomi*

As plantas foram observadas 120 dias após a inoculação com terra contaminada com *P. cinnamomi*. Em nenhuma das plantas foram observadas lesões características de *P. cinnamomi*. Não se observou o enegrecimento do caule (lesão externa = 0 cm), não se observou qualquer necrose interna dos tecidos (lesão interna = 0 cm), o colo apresentava-se intacto sem lesão no cilindro central ou em torno deste (lesão do colo=0%) e por fim as raízes apresentavam-se bem desenvolvidas e com cor normal sem sinais de infecção do agente patogénico.

As plantas foram mantidas em condições favoráveis à ocorrência de infecção de *P. cinnamomi*, nomeadamente de encharcamento, durante tempo suficiente para que ocorresse infecção. Dado que nenhuma planta, incluindo as testemunhas, apresentou lesões de *P. cinnamomi* pode-se concluir que o inóculo não foi eficaz. Apesar de ter havido confirmação de contaminação do solo, através da técnica de armadilha descrita em Material e Métodos (2.1.4), aparentemente o isolado de *P. cinnamomi* utilizado não se revelou patogénico nas plantas em causa. Uma vez que o solo utilizado como inóculo era proveniente de um montado de *Quercus suber* poder-se-á estar na presença de uma situação de especificidade ao nível do isolado de *P. cinnamomi* para o hospedeiro.

Nos outros ensaios os castanheiros foram sempre inoculados com quantidades significativas de micélio (em millet) de *P. cinnamomi* do isolado PH107. Este isolado tinha sido selecionado pela sua elevada agressividade em *C. sativa* (Dinis *et al.* 2011).

3.3. Estudo do efeito das ectomicorrizas na tolerância do Castanheiro a *Phytophthora cinnamomi*

A inoculação dos castanheiros com *Paxillus involutus* não foi eficaz. Oito meses após a inoculação, entre os 6 castanheiros (dos dois híbridos) inoculados com *P. involutus*, apenas se observou um grupo de ectomicorrizas de *Paxillus involutus* num castanheiro do clone SM919. A inoculação com *Laccaria bicolor* teve maior sucesso, tendo sido observadas ectomicorrizas deste fungo em cinco castanheiros dos seis que foram inoculados. Porém, é de considerar a hipótese de que as plantas já estavam micorrizadas com *Laccaria bicolor* anteriormente, devido ao facto de este fungo estar presente no viveiro onde os ensaios foram conduzidos. Todos os sistemas radiculares observados à lupa apresentaram elevadas percentagens de *Thelephora terrestris* e alguns tinham também micorrizas de *Cenococcum geophilum* (Figura 15). Estes fungos estão presentes naturalmente na natureza, e competem com outros fungos micorrízicos podendo ser esta a razão de a inoculação dos castanheiros com *Paxillus involutus* não ter sido bem sucedida.

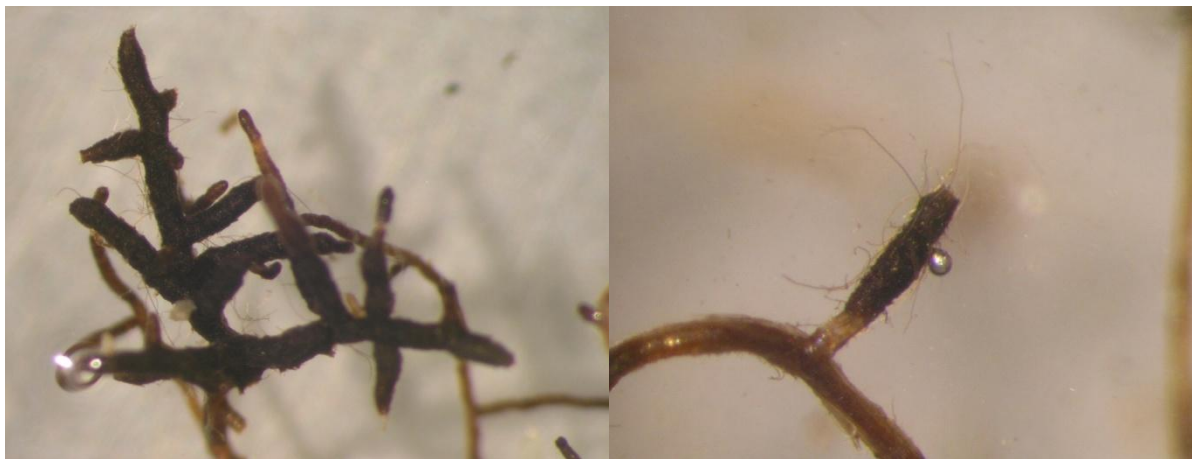


Figura 15. Micorrizas de *Cenococcum geophilum* em castanheiro.

O Quadro 20 apresenta a sobrevivência dos dois híbridos consoante a inoculação. O teste de Fisher LSD (*Least Significant Difference*), $P < 0,05$ utilizado para calcular as diferenças entre as inoculações mostrou que a sobrevivência não foi significativamente diferente entre os castanheiros não inoculados e inoculados com *P. involutus* e *L. bicolor* (Anexo 6.8.).

Quadro 20. Valores médios dos dias de sobrevivência consoante a inoculação nos dois híbridos

Clone	Fungo micorrízico inoculado	Sobrevivência (dias)*
SC912	<i>Laccaria bicolor</i>	56,0a
SC912	Testemunha	84,0a
SC912	<i>Paxillus involutus</i>	92,7a
SM919	<i>Laccaria bicolor</i>	105,7a
SM919	Testemunha	111,0a
SM919	<i>Paxillus involutus</i>	118,3a

* Letras diferentes representam diferenças significativas, entre as modalidades, para o teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

Considera-se assim que as testemunhas, ou seja, as plantas que não foram inoculadas com *P. involutus* nem com *L. bicolor*, não representaram verdadeiras testemunhas pois estavam micorrizadas com os fungos encontrados nos outros castanheiros (*Thelephora terrestris* e *Cenococcum geophilum*).

Além da sobrevivência, os valores da lesão externa e interna, da lesão do colo e da notação radicular não mostraram diferenças significativas entre as inoculações.

Como não ocorreu micorrização dos castanheiros, possivelmente devido à presença de contaminantes como o fungo *T. terrestris*, não foi possível avaliar a eficácia das ectomicorrizas na proteção ao nível das raízes dos castanheiros contra a podridão radicular causada por *P. cinnamomi*. Apenas se verificou que apesar de estar presente, o fungo *T. terrestris* não conferiu proteção às plantas contra a entrada deste oomiceta.

3.4. Efeito do fungo *Lepista nuda* na tolerância do sobreiro (*Quercus suber*) a *Phytophthora cinnamomi*

Os sobreiros foram analisados 11 meses após a inoculação. Os sobreiros apresentavam sintomas de *stress* devido às condições de encharcamento. Dos oito sobreiros inoculados com *P. cinnamomi* sem *Lepista nuda* (PT) apenas um morreu e apresentou sintomas característicos de infecção por *P. cinnamomi*; nos restantes sobreiros da modalidade PT não se observou qualquer lesão externa, interna ou nas raízes. Na modalidade com inoculação de *P. cinnamomi* e *Lepista nuda* (PL) houve apenas um sobreiro que morreu e apresentava lesões de infecção por *P. cinnamomi*. Assim, passado quase um ano, dos dezasseis sobreiros inoculados com *P. cinnamomi* apenas dois morreram não havendo quaisquer lesões nas outras plantas.

As condições mantidas foram, mais uma vez, ideais à ocorrência de infecção. Os sobreiros apresentaram-se debilitados, com fraco desenvolvimento ao nível da raiz e ao nível aéreo, devido ao encharcamento, condição que supostamente os tornaria mais suscetíveis à doença causada por *P. cinnamomi*. Nos sobreiros, como nos castanheiros, a resistência a um agente patogénico é um fator genético. Pelo facto de serem de origem seminal a variabilidade genética era grande entre as plantas utilizadas neste ensaio. O sobreiro mostrou-se, em geral, mais resistente que o castanheiro. O efeito competidor do fungo saprófita *Lepista nuda* com *P. cinnamomi* foi inconclusivo pelo facto de a maioria dos sobreiros não terem sido afetados por *P. cinnamomi*.

Os resultados deste ensaio reforçam a ideia da possível existência de especificidade para o hospedeiro no seio das populações de *P. cinnamomi*, visto que neste caso, o inóculo utilizado (millet inoculado com o isolado PH107) é originário de *Castanea sativa*.

4. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivos a avaliação e seleção *in vitro* de fungos antagonistas de *Phytophthora cinnamomi*; compreender a(s) causa(s) do antagonismo dos fungos selecionados; avaliar o efeito destes fungos e a sua aplicabilidade no combate a *P. cinnamomi* em condições naturais; e avaliar o efeito das ectomicorrizas na proteção das plantas ao nível das raízes.

O comportamento dos fungos *in vitro* é diferente em relação ao habitat natural. Nos testes de antagonismo realizados apenas duas espécies de fungos foram selecionadas, ainda que não se possa descartar a hipótese de que, em condições naturais, as outras espécies testadas sejam antagonistas de *P. cinnamomi*.

O extrato de *Lepista nuda* não teve efeito antagonista em relação a *P. cinnamomi*, ainda que o estudo do efeito do micélio de *Lepista nuda* na tolerância do sobreiro ao agente patogénico tenha sido inconclusivo (uma vez que não ocorreu infeção). Será interessante, num futuro próximo, testar esta espécie em castanheiros utilizando um isolado agressivo de *P. cinnamomi*.

O extrato de *Omphalotus olearius*, espécie selecionada nos testes de antagonismo, mostrou-se eficaz, através do seu extrato, na inibição do crescimento micelial de *P. cinnamomi* assim como na inibição da formação de zoosporângios. Porém, o seu efeito está dependente da concentração em que se encontra no solo, pelo que, na natureza, a diluição será um fator preponderante a ter em conta o que, previsivelmente, dificulta a sua aplicabilidade. No futuro poderá ser interessante investigar qual a substância ativa no extrato deste fungo que é responsável pelo antagonismo com *P. cinnamomi*, com o objetivo de facilitar a sua aplicação no solo como controlo da podridão radicular.

Apesar de o efeito das ectomicorrizas não ter ficado demonstrado neste trabalho, em ambiente natural e em locais onde estas já se encontram instaladas, na altura do aparecimento do oomiceta, segundo Branzanti *et al.*, 1999, há um efeito barreira (através do manto que envolve as raízes) à entrada do oomiceta *P. cinnamomi*. Este trabalho demonstrou, porém, que fungos como *Thelephora terrestris* não exercem influência antagonística nem de proteção contra *P. cinnamomi*.

Enquanto não haja um produto, organismo ou prática, que permitam eliminar ou reduzir significativamente o inóculo de *P. cinnamomi* num solo, a única solução disponível será usar todos os meios ao alcance que evitem a sua dispersão. Práticas culturais que protejam as raízes das plantas, promovam a atividade microbiana no solo (aumentando a presença de organismos antagonistas) e que facilitem a drenagem da água, poderão ser fundamentais para conter a dispersão do oomiceta nos solos do nosso país.

5. Referências bibliográficas

- Abreu, C. (1992). A hipovirulência como forma de luta natural contra o cancro do castanheiro. *Revista das Ciências Agrárias*, 15: 167-171.
- Abreu, C.G., Carvalho, L., Gaspar, M.J., Gomes, A.L., Colaço, J., Cardoso, A.O. (1999). Assessment of resistance to chestnut ink disease. *Acta Horticulturae*, 494: 363–367 (in Rodrigues & Martins, 2005).
- AFN (2010). *5º Inventário Florestal Nacional*. SEFD.
- Agro 689 (2007). *Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agronómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano*. Projecto Agro 689: <http://esa.ipb.pt/agro689> (obtido em 25/03/2014).
- Anuário Agrícola (2012). *Anuário Agrícola, Informações de Mercados*. Gabinete de Planeamento e Políticas. Ministério da Agricultura e do Mar, Lisboa, 456.
- Baptista, P., Martins, A., Tavares, R.M., Lino-Neto, T. (2010). Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecology*, 3: 9-19.
- Baptista, P.C.S. (2007). *Macrofungos associados à cultura de castanheiro: aspectos da sua biodiversidade e da interação de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare* com raízes de *Castanea sativa* Mill.* Dissertação para a obtenção de Grau de Doutor em Ciências. Escola de Ciências, Departamento de Biologia da Universidade do Minho.
- Barakat, A., DiLoreto, D.S., Zhang, Y., Smith, C., Baier, K., Powell, W. A., Wheeler, N., Sederoff, R., Carlson, J.E. (2009). Comparison of the transcriptomes of American chestnut (*Castanea dentata*) and Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) in response to the chestnut blight infection. *BMC Plant Biology*, 9: 51.
- Barbercheck, M.E., Von Broembsen, S.L. (1986). Effects of soil solarization on plant-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Plant Disease*, 70: 945-950.
- Barea, J.M., Pozo M.J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778 (in Baptista, 2007).
- Bergougnot, F.; Verlhac, A. (1978). *Le Chataignier, Production et Culture*. Paris: Institut de Vulgarisation pour les Fruits, Légumes et Champignons (INVUFLEC) (in Martins, 1997).
- Bloom, J.M., Vannini, A., Vettriano, A.M., Hale, M.D., Godbold, D.L. (2009). Ectomycorrhizal community structure in a healthy and a *Phytophthora*-infected chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand in central Italy. *Mycorrhiza*, 20: 25-38.
- Bowen, G.D., Rovira, A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66: 1-102 (in Baptista, 2007).
- Bragança, H., Simões, S., Capelo, M., Marcelino, J., & Santo, N. (2007). Survey and geographic distribution of chestnut blight in Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, 31, n.2: 148-158.
- Branzanti, M.B., Rocca, E., Pisi, A. (1999). Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza*, 9: 103-109.
- Bruck, R.I. & Kenerley, C.M. (1983). Effects of metalaxyl on *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Abies fraseri*. *Plant Disease*, 67: 688-690.

- Coffey, D. M. (1987). *Phytophthora* root rot of avocado. An integrated approach to control in California. *California Avocado Society. Yearbook*: 71: 121-137.
- Connors, B.J., Miller, M., Maynard, C.A., Powell, W.A. (2002). Cloning and characterization of promoters from American chestnut capable of directing reporter gene expression in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science*, 163: 771-781.
- Corredoira, E., Montenegro, D., San-José M. C., Vieitez A. M., Ballester A. (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Reports*, 23: 311-318.
- Corredoira, E., San-José M. C., Vieitez A. M., Ballester A. (2007). Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 91: 281-288.
- Costa R, Santos C, Machado H, Correia, I, Gomes-Laranjo J, Gomes F, Sebastiana M, Serrazina S, Nelson C. Dana (2013). Identifying resistance mechanisms to *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea* species. *IUFRO Tree Biotechnology Conference Forest Biotechnology: Meeting the Needs of a Changing World*". Asheville, EUA.
- Costa, R., Bragança, H., & Machado, H. (2011). Os últimos 75 anos de investigação para o melhoramento do castanheiro em Portugal. *Agrorrural - Contributos Científicos*, 915-926.
- Dantas, J.S., Souza, A.P., Farias, M.F., Nogueira, V.F.B. (2009). Interactions among groups of microorganisms with rhizosphere. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, 2: 219-224.
- DGAV (2014). *Guia dos produtos fitofarmacêuticos. Lista dos produtos com venda autorizada*. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.
- Dighton, J. (2003). *Fungi in Ecosystem Processes* (Vol. XVII). EUA: Marcel Dekker, Inc.
- Dinis L-T, Peixoto F, Zhang C, Martins L, Costa R, Gomes-Laranjo J, 2011. Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75: 146-156.
- DRATM (2003). *Doença da tinta do castanheiro*. Viveiros Ermida:
<http://www.viveiroermida.com/castanheiro203.pdf> (obtido em 20/03/2014).
- Erwin, C.D., Ribeiro, K.O. (1996). *Phytophthora - Diseases Worldwide*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.
- Fageria, N.K., Stone L.F. (2006) Physical, Chemical, and Biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1327-1356 (in Baptista, 2007).
- FAO (2013). FAOSTAT, © FAO Statistics Division. FAO: <http://faostat.fao.org/> (obtido em 20/08/2013).
- Fernandes, C.T. (1966) A "Doença da Tinta" dos castanheiros. *Parasitas do género Phytophthora de Bary*. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça (in Gouveia, 1993).
- Geissler, A.E., Katekar, G.F. (1983). Effect of fungicides on stages of the life cycle of *Phytophthora cinnamomi*. *Pest Management Science*, 14: 501-507 (in Erwin & Ribeiro, 1996).
- Gerrettson-Cornell, L., Humphreys, F.R., Townsend, S.R. (1976). Results of a preliminary investigation on the use of *Pinus radiata* Bark against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Phyton. Argentina*, 34: 3-6. (in Shashidhara, 2007).

- Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., Ferreira-Cardoso, J. (2009). *Castanheiros, Técnicas e Práticas*. Pulido Consulting – Industria Criativa & Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Gouveia, M.E. (1993). *Doença da Tinta do Castanheiro. Avaliação da resistência à Phytophthora cinnamomi Rands*. Dissertação do Curso de Mestrado em Protecção Integrada. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Gouveia, M.E. (2004). *Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de Phytophthora cambivora (Petri) Buisman e Phytophthora cinnamomi Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro*. Dissertação para a obtenção de Grau de Doutor em Ciências Agronómicas/Protecção de Plantas. Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro.
- Grente, J. (1961). La maladie de l'encre du chataignier. I – Etiologie et biologie. *Ann. Epiphyties*, 12: 5-24.
- Guerreiro, M. G. (1957). *Castanheiros. Alguns estudos sobre a sua ecologia e o seu melhoramento genético*. Dissertação para Provas de Agregação. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Harland, C. S. (2007). *F-actin and integrin like proteins in Phytophthora cinnamomi*. Thesis for the degree of Master of Science in Biochemistry. University of Canterbury
- Hebard, F. (2014). *An Update on the Progress of the TACF Breeding Program*. The American Chestnut Foundation: <http://acf.org/newsletter1.30.14breedingprogram.php> (obtido em 20/1/2014).
- Hwang SC, Ko WH (1978) Quantitative studies of *Phytophthora cinnamomi* in decline and healthy ohia forests. *Transactions of the British Mycological Society*, 70: 312-315 (in Erwin & Ribeiro, 1996).
- INE (2012). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Portal Instituto Nacional de Estatística: <http://www.ine.pt> (obtido em 15/08/2013)
- Jeffers, S. N., Martin S. B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70: 1038-1043.
- Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P. (1996). Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*, 26: 253–272.
- Kennedy, A.C. (1998) The rhizosphere and spermosphere. In *Principles and Applications of Soil Microbiology*. (D.M., Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, D.A. Zuberer, eds.) Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 389-407 (in Baptista, 2007)
- Klein, D.A., Paschke, M.W. (2004) Filamentous Fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. *Microbial Ecology*, 47: 224–235 (in Baptista, 2007).
- Malajczuk N., Lapeyrie F., Garbaye J. (1990). Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on the roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. *New Phytologist*, 114: 627–631.
- Malajczuk, N. (1983). *Microbial antagonism to Phytophthora*. In *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. (Eds D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao): 197-218 (in Erwin & Ribeiro, 1996).
- Martins A., Baptista P., Rodrigues P.C., Pais M. S. (2005). Estudos e perspectivas futuras das micorrizas e da indução de micorrização in vitro e ex vitro de *Castanea sativa* Mill. *A Pantorra - A floresta e os cogumelos*, 5: 59-78.
- Martins, A. (2008). In vitro Mycorrhization of micropropagated plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. In *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*: 319-334.

- Martins, A. (1997). *Micorrização in vitro de plantas micropropagadas de castanheiro (Castanea sativa Mill)*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Martins, A., Barroso, J., Pais, M. S. (1996). Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza*, 6: 265-270.
- Massicotte H.B., Peterson R.L., Ackerley C.A., Melville L.H. (1990). Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*. 68: 579–593 (in Smith & Read, 2008).
- Mircetich, S. M. & Zentmyer, G. A. (1970). Germination of chlamydospores of *Phytophthora*. In: *Root Diseases and Soil- Borne Pathogens*. Tousson, T. A., Bega, R. V., Nelson, P. A. (Eds.). Univ. Calif. Press, Berkeley: 112- 115 (in Gouveia, 1993).
- Molina R., Massicotte H., Trappe, J.M. (1992). *Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis:community ecological consequences and practical application*. In *Mycorrhizal Functioning*. Ed. M.F. Allen: 357–423. Nova Iorque, EUA (in Smith & Read, 2008).
- Moser, M. (1960). *Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas*. Bad Heilbrunn: Klinkhardt.
- Nylund, J.E. (1980) Symplastic continuity during Hartig net formation in Norway Spruce ectomycorrhizae. *New Phytol*. 86: 373-378 (in Martins, 1997).
- Oddoux, L. (ed.). (1957). *Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure*. Lyon : Imprimerie de Trevoix.
- Passola, G. (2011). *Hongos Xilófagos que Viven en los Árboles*. España: Editorial Círculo Rojo, Colección Investigación.
- Práxis (2000). *Conservação e Melhoramento dos Recursos Genéticos de Castanheiro Europeu*. Lisboa: INRB – Estação Florestal Nacional.
- Richard, F., Moreau, P. A., Selosse, M. A., Gardes, M. (2004). Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1711-1729.
- Robin, C. (2013). *Institut Européen de la Forêt Cultivée (IEFC)*. Common Forest Pests and Diseases in Europe: <http://www.iefc.net> (obtido em 18/11/2013).
- Rodrigues, P.C., Martins, A. (2005). Interacção in vitro entre macrofungos micorrízicos de *Castanea sativa* e o patógeno *Phytophthora cinnamomi*. *CIMO - Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária de Bragança*. Portugal.
- Rogers, K. (Ed.) (2011). *Fungi, Algae and Protists - Biochemistry, cells, and life*. Nova Iorque: Britannica Educational Publishing.
- Seabra, R.C., Pais, M.S. (1998). Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Reports*, 17: 177-182.
- Serrazina, S.M.T. (2004). *Isolamento e caracterização de genes de resistência à doença a tinta em Castanea sativa Mill*. Dissertação para a obtenção de Grau de Doutor em Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Shashidhara, S. (2007). *Studies on foot rot of black pepper caused by Phytophthora capsici Leonian, emend, Alizedeh and Tsao*. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias. Universidade de Ciências Agrárias, Dharwad.

- Silva, J.S. (Ed.). (2007). *Árvores e Florestas de Portugal. Do castanheiro ao teixo. As outras espécies florestais* (Vol. 5). Lisboa: Publico, Comunicação Social, S.A.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Nova Iorque: Elsevier.
- Stamets, P. (1993). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Berkeley, CA: Tem Speed Press.
- Van Der Brink, L.M.; Janssen C.R. (1985). The effect of human activities during cultural phases on the development of montane vegetation in the Serra da Estrela. Portugal. *Paleobot. Palyn*, 44: 193-215 (in Silva, 2007).
- Vettrano, M.; Natili, G.; Anselmi, N.; Vannini, A. (2001). Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology*, 50: 90-96.
- Vieitez, A. L., Vieitez, M. L., Vieitez, E. (1986). Chestnut (*Castanea spp.*). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y.P.S., Bajaj, Ed., Springer Verlag, Berlin, 1: 393-414.
- Vieitez, E.C., Madriñán, M. L. V., Madriñán, F. J. V. (1996). *El Castaño (1ª Ed)*. Léon: Edición Edilesa.
- Vincent, J.M., 1927, Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. *Nature*, 159: 850 (in Shashidhara, 2007)
- Webster, J. & Weber, R.W.S. (2007). *Introduction to Fungi (3ªed.)*. Nova Iorque: Cambridge University Press.
- Whitefield, F.B., Shea, S.R. and Gilien, K.J., Shaw, K.J. (1981) Volatile components from the roots of *Acacia pulchella* R. Br. and their effect on *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Australian J. Bot.*, 29: 195-208. (in Shashidhara, 2007).
- Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi and Diseases it causes*. St Paul, Minnesota: The American Phytopatological Society (in Erwin & Ribeiro, 1996).
- Zentmyer, G. A. (1981). The effects of temperature on growth and pathogenesis of *Phytophthora cinnamomi* and growth of its avocado host. *Phytopathology*, 71: 925-928.
- Zentmyer, G. A. (1987). The World of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki - Garcia, P. H. Tsao (Eds.) In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. APS Press: 167-172 (in Gouveia, 2004).

6. ANEXOS

6.1. Meios de cultura

6.1.1. Meio de BAF modificado:

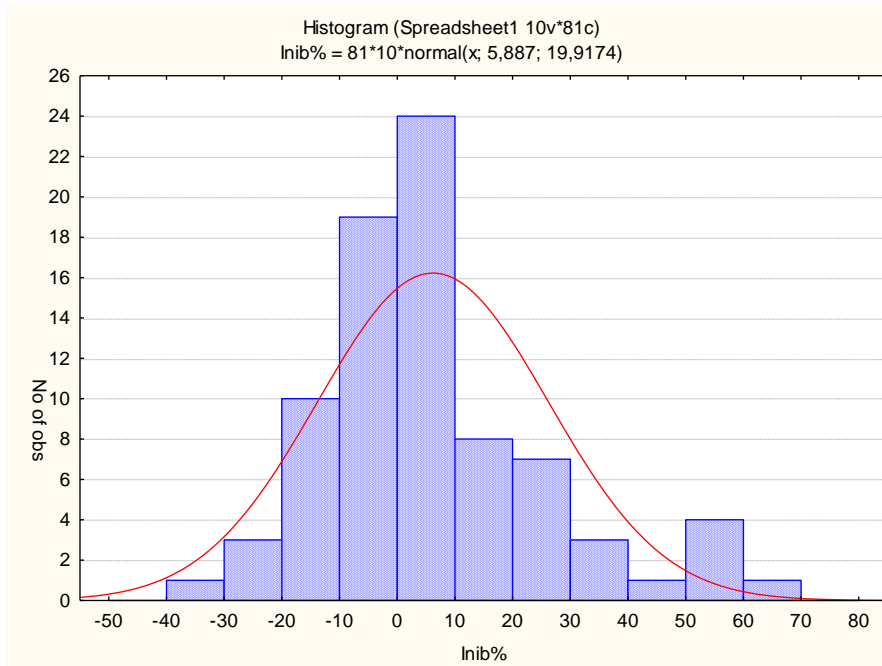
Maltose – 20g
D-glucose – 10g
Bacto-peptona – 2g
KH₂PO₄ – 0,5g
MgSO₄.7H₂O – 0,5g
Extrato de levedura – 0,2g
FeCl₃ – 12mg
ZnSO₄ – 1mg
CaCl₂ – 50mg
MnSO₄ – 5mg
Tiamina HCl – 50µg
Biotina – 1µg
Inositol – 50mg
Ác. Fólico – 100µg
H₂O destilada – 1000ml
Agar – 15g

6.1.2. Meio de Oddoux modificado:

Asparagina – 0,5 g
Hidrolisado de caseína – 1 g
Extrato de malte – 1g
Glucose – 7g
MgSO₄.7H₂O 0,5g, KH₂PO₄ – 0,5g
Tiamina – 0,5mg
Riboflavina – 0,5mg
Nicotinamida – 0,5 mg
Piridoxina – 0,5mg
Pantotenato de cálcio – 0,5mg
Agar – 13g
Água destilada – 1L.

6.2. Testes de Antagonismo

6.2.1. Gráfico com a distribuição dos resultados da percentagem de inibição



6.2.2. Teste de significância, da percentagem de inibição, entre espécies

Univariate Tests of Significance for Inibição (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	507,21	1	507,215	2,372146	0,128525
Espécies	18265,45	17	1074,438	5,024940	0,000001
Error	13470,73	63	213,821		

6.2.3. Teste de Fisher para a percentagem de inibição entre espécies

LSD test; variable Inibição (%) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 213,82, df = 63,000									
	Espécies	Inibição(%) - Mean	a	b	c	d	e	f	g
4	Boletus edulis	-27,0833	****						
18	Schyzophillum commune	-15,6028	****	****					
13	Lentinula edodes	-10,2971	****	****	****				
6	Boletus aereus	-8,3056	****	****	****	****			
10	Ganoderma resinaceum	-8,1967	****	****	****	****			
16	Pleurotus ostreatus	-7,4681	****	****	****	****			
17	Pleurotus djamor	-4,2553	****	****	****	****			
9	Scleroderma citrinum	-0,7833		****	****	****			
5	Pisolithus tinctorius	1,0175		****	****	****			
15	Omphalotus olearius	2,8784		****	****	****	****		
8	Paxillus involutus	5,2219		****	****	****	****		
7	Laccaria bicolor	8,8773			****	****	****		****
14	Macrolepiota procera	10,2433				****	****		****
3	Amanita rubescens	11,1111				****	****	****	****
1	Xerocomus rubellus	14,0000				****	****	****	****
2	Hebeloma crustuliniforme	20,2131					****	****	****
12	Lepista nuda	28,4589						****	
11	Ganoderma lucidum	30,3303						****	****

6.2.4. Teste de Fisher para a razão entre os crescimentos diários de *Phytophthora* na co-cultura de controlo e na co-cultura teste (razão C/T) entre espécies

LSD test; variable Razão C/T Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = ,36841, df = 63,000

	Espécies	Razão C/T - Mean	a	b	c
4	Boletus edulis	0,700000	****		
13	Lentinula edodes	0,868164	****		
6	Boletus aereus	0,889760	****	****	
18	Schizophyllum commune	0,891053	****	****	
10	Ganoderma resinaceum	0,921386	****	****	
17	Pleurotus djamor	0,931018	****	****	
16	Pleurotus ostreatus	0,934564	****	****	
5	Pisolithus tinctorius	1,085159	****	****	
15	Omphalotus olearius	1,093787	****	****	
9	Scleroderma citrinum	1,098814	****	****	
3	Amanita rubescens	1,108978	****	****	
8	Paxillus involutus	1,143567	****	****	
7	Laccaria bicolor	1,222373	****	****	
1	Xerocomus rubellus	1,224823	****	****	
14	Macrolepiota procera	1,258287	****	****	
2	Hebeloma crustuliniforme	1,403716	****	****	
11	Ganoderma lucidum	1,770115		****	****
12	Lepista nuda	2,312712			****

6.3. Teste de antagonismo com extratos de fungos

6.3.1. Teste de significância da percentagem de inibição entre isolados

Univariate Tests of Significance for Inibição (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	319,042	1	319,0420	17,17526	0,001360
Isolados	2046,988	5	409,3975	22,03945	0,000012
Error	222,908	12	18,5757		

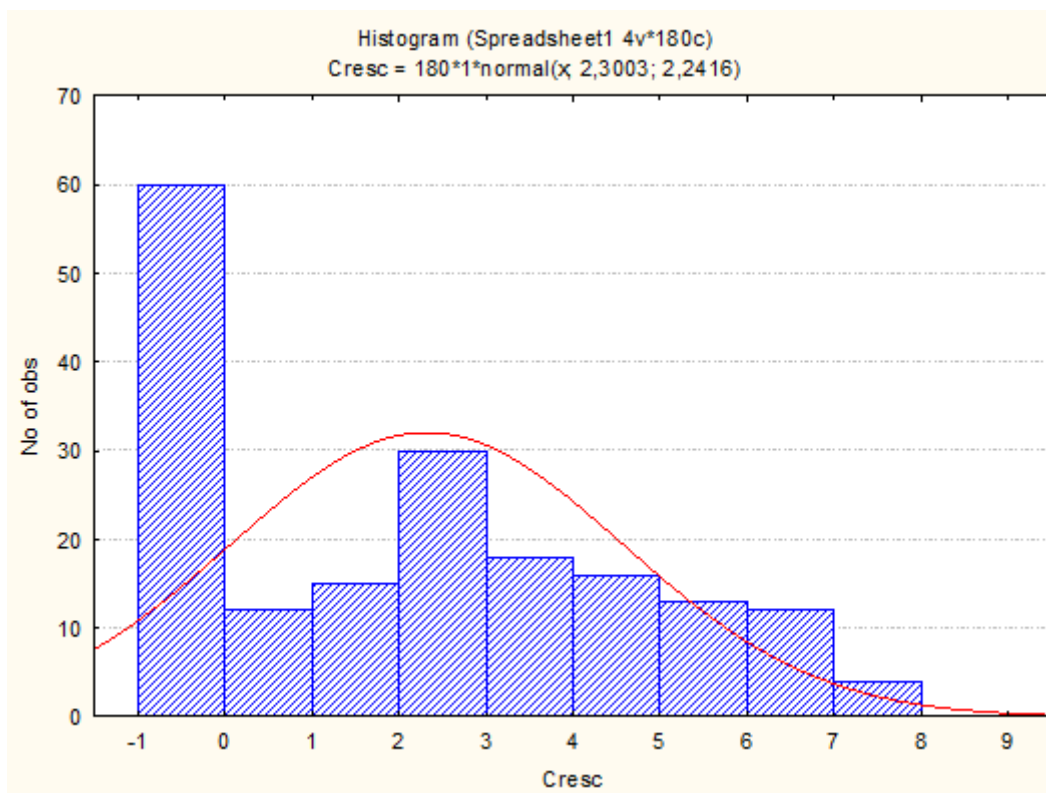
6.3.2. Teste de Fisher para a percentagem de inibição entre isolados

LSD test; variable Inibição (%) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 18,576, df = 12,000

	Isolados	Inibição (%)	a	b
5	L.edodes spw	-2,69936	****	
6	L.edodes cav	-1,99735	****	
3	LN091	-0,48421	****	
2	A257	0,57174	****	
4	LN2011(JBA)	2,07502	****	
1	OP598	27,79449		****

6.4. Ação do extrato de *Omphalotus olearius* no crescimento micelial de *Phytophthora*

6.4.1. Gráfico com a distribuição dos resultados do crescimento de *Phytophthora cinnamomi*



6.4.2. Teste de significância para o crescimento entre os dois isolados de *Phytophthora cinnamomi* (PH107 e PH1160), entre as diferentes percentagens de extrato *Omphalotus* e entre isolados de *Phytophthora cinnamomi* para uma determinada percentagem de extrato *Omphalotus*

Univariate Tests of Significance for Crescimento Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	901,6670	1	901,6670	2846,032	0,000000
Isolados	6,8090	1	6,8090	21,492	0,000007
% extrato	817,1694	7	116,7385	368,475	0,000000
Isolado * % extrato	16,2558	7	2,3223	7,330	0,000000
Error	51,9577	164	0,3168		

6.4.3. Teste de Tukey para o crescimento do isolado PH107 entre as diferentes percentagens de extrato *Omphalotus*

Tukey HSD test; variable Crescimento Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,04409, df = 23,000							
	% extrato	Crescimento - Mean	a	b	c	d	e
8	100	7,900000	****				
7	50	6,200000		****			
6	20	3,743750			****		
5	10	3,233333			****		
4	7,5	1,508333				****	
3	5	0,883333				****	
2	2,5	0,000000					****
1	0	0,000000					****

6.4.4. Teste de significância e teste de Tukey para a percentagem de inibição do isolado PH107 entre as diferentes percentagens de extrato *Omphalotus*

Univariate Tests of Significance for Inibição (%). Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	112415,9	1	112415,9	6281,619	0,00
% extrato	37083,5	7	5297,6	296,024	0,00
Error	375,8	21	17,9		

Tukey HSD test; variable Inibição (%) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 17,896, df = 21,000								
	% extrato	Inibição (%) - Mean	a	b	c	d	e	f
1	0	0,0000	****					
2	2,5	21,5190		****				
3	5	52,6108			****			
4	7,5	59,0717			****			
5	10	80,9072				****		
6	20	88,8186					****	
8	50	100,0000						****
7	100	100,0000						****

6.4.5. Teste de Tukey para o crescimento do isolado PH1160 entre as diferentes percentagens de extrato *Omphalotus*

Tukey HSD test; variable Crescimento Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,04409, df = 23,000								
	% extrato	Crescimento - Mean	a	b	c	d	e	f
8	100	6,287500	****					
7	50	4,743750		****				
6	20	3,625000			****			
5	10	3,093750				****		
4	7,5	2,100000					****	
3	5	0,000000						****
2	2,5	0,000000						****
1	0	0,000000						****

6.4.6. Teste de significância e teste de Tukey para a percentagem de inibição do isolado PH1160 entre as diferentes percentagens de extrato *Omphalotus*

Univariate Tests of Significance for Inibição (%) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. Of - Freedom	MS	F	p
Intercept	112579,6	1	112579,6	10821,34	0,00
% extrato	40338,7	7	5762,7	553,92	0,00
Error	239,3	23	10,4		

Tukey HSD test; variable Inibição (%) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 10,403, df = 23,000								
	% extrato	Inibição (%) - Mean	a	b	c	d	e	f
1	0	0,0000	****					
2	2,5	24,5527		****				
3	5	42,3459			****			
4	7,5	50,7952				****		
5	10	66,6004					****	
6	20	100,0000						****
7	50	100,0000						****
8	100	100,0000						****

6.5. Ação do extrato de *Omphalotus olearius* na inibição da esporulação de *Phytophthora*

6.5.1. Teste de significância e teste de Fisher para o número de esporângios contados pela primeira vez entre as percentagens 0, 25, 50, 75 e 100% de extrato *Omphalotus*

Univariate Tests of Significance for Esporângios Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	28630,79	1	28630,79	342,4221	0,00
% extrato	59751,20	4	14937,80	178,6550	0,00
Error	16889,73	202	83,61		

LSD test; variable Esporângios Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 83,613, df = 202,00				
	% extrato	Esporângios - Mean	a	b
1	0	65,53333		****
2	25	0,00000	****	
3	50	0,00000	****	
4	75	0,00000	****	
5	100	0,00000	****	

6.5.2. Teste de significância e teste de Fisher para o número de esporângios contados pela primeira vez entre as percentagens 0, 5 e 15% de extrato *Omphalotus*

Univariate Tests of Significance for Esporângios Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	66278,4	1	66278,42	20,62030	0,000047
%extrato	132556,8	2	66278,42	20,62030	0,000001
Error	134997,7	42	3214,23		

LSD test; variable Esporângios Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3214,2, df = 42,000				
	% extrato	Esporângios - Mean	a	b
1	5	0	****	
2	15	0	****	
3	0	115,1333		****

6.5.3. Número de esporângios na modalidade VI, correspondente a 5% de extrato *Omphalotus*, na 3ª e 4ª contagem.

Repetição Discos	3ª Contagem de esporângios			4ª Contagem de esporângios		
	1	2	3	1	2	3
1	0	0	0	7	18	162
2	0	0	89	1	25	155
3	0	63	14	3	27	126
4	0	90	80	4	90	97
5	0	13	17	0	34	104

6.6. Estudo do efeito do extrato *Omphalotus* em clone de híbridos de *Castanea sativa* com *Phytophthora cinnamomi*

6.6.1. Teste de significância e teste de Fisher para a Lesão Externa entre as diferentes modalidades P e P1

Univariate Tests of Significance for Lesão Externa Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	60,1339	1	60,13389	5,473213	0,032606
Modalidade	0,6050	1	0,60500	0,055065	0,817449
Error	175,7911	16	10,98694		

LSD test; variable Lesão Externa Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 10,987, df = 16,000			
	Modalidade	Lesão Externa - Mean	a
2	P1	1,644444	****
1	P	2,011111	****

6.6.2. Teste de significância e teste de Fisher para a Lesão Interna entre as diferentes modalidades P e P1

Univariate Tests of Significance for Lesão Interna Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	455,0139	1	455,0139	12,37394	0,002855
Modalidade	53,0450	1	53,0450	1,44254	0,247208
Error	588,3511	16	36,7719		

LSD test; variable Lesão Interna Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 36,772, df = 16,000			
	Modalidade	Lesão Interna - Mean	a
1	P	3,311111	****
2	P1	6,744444	****

6.6.3. Teste de significância e teste de Fisher para a Lesão do Colo entre as diferentes modalidades P e P1

Univariate Tests of Significance for Lesão do Colo Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	105800,0	1	105800,0	89,51351	0,000000
Modalidade	1088,9	1	1088,9	0,92127	0,351423
Error	18911,1	16	1181,9		

LSD test; variable Lesão do Colo Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1181,9, df = 16,000			
	Modalidade	Lesão do Colo - Mean	a
1	P	68,88889	****
2	P1	84,44444	****

6.6.4. Teste de significância e teste de Fisher para a Notação Radicular entre as diferentes modalidades P e P1

Univariate Tests of Significance for Nota da Raiz Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	203,3472	1	203,3472	65,43464	0,000000
Modalidade	1,6806	1	1,6806	0,54078	0,472752
Error	49,7222	16	3,1076		

LSD test; variable Nota da Raiz (Spreadsheet19) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3,1076, df = 16,000			
	Modalidade	Nota da Raiz - Mean	a
1	P	3,055556	****
2	P1	3,666667	****

6.6.5. Teste de significância e teste de Fisher para a Sobrevivência entre as diferentes modalidades P e P1

Univariate Tests of Significance for Sobrevivência Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	176220,1	1	176220,1	45,50975	0,000005
Modalidade	982,7	1	982,7	0,25379	0,621282
Error	61954,2	16	3872,1		

LSD test; variable Sobrev (Spreadsheet19) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3872,1, df = 16,000			
	Mod	Sobrev - Mean	a
1	P	91,5556	****
2	P1	106,3333	****

6.7. Efeito do extrato *Omphalotus* em clone SC32 inoculados com *Phytophthora cinnamomi*

6.7.1. Teste de significância e teste de Fisher para a Lesão Externa entre as diferentes modalidades (P,P0 e P1)

Univariate Tests of Significance for Lesão Externa Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	499,5698	1	499,5698	23,78080	0,000490
Modalidade	20,7236	2	10,3618	0,49325	0,623523
Error	231,0800	11	21,0073		

LSD test; variable Lesão Externa Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 21,007, df = 11,000			
	Modalidade	Lesão Externa - Mean	a
2	P0	4,680000	****
3	P1	5,800000	****
1	P	7,540000	****

6.7.2. Teste de significância e teste de Fisher para a Lesão Interna entre as diferentes modalidades (P,P0 e P1)

Univariate Tests of Significance for Lesão Interna Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1708,034	1	1708,034	49,15850	0,000022
Modalidade	425,709	2	212,854	6,12610	0,016297
Error	382,200	11	34,745		

LSD test; variable Lesão Interna Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 34,745, df = 11,000				
	Mod	Lesão Interna - Mean	a	b
2	P0	6,38000	****	
1	P	7,74000	****	
3	P1	19,20000		****

6.7.3. Teste de significância e teste de Fisher para a Notação Radicular entre as diferentes modalidades (P,P0 e P1)

Univariate Tests of Significance for Nota da Raiz (Spreadsheet7) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	230,8654	1	230,8654	247,7580	0,000000
Modalidade	21,6071	2	10,8036	11,5941	0,001956
Error	10,2500	11	0,9318		

LSD test; variable Nota da Raiz Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,93182, df = 11,000				
	Mod	N.Raiz - Mean	a	b
3	P1	2,250000		****
2	P0	5,000000	****	
1	P	5,000000	****	

6.7.4. Teste de significância e teste de Fisher para a Sobrevivência entre as diferentes modalidades (P,P0 e P1)

Univariate Tests of Significance for Sobrevivência Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	102644,4	1	102644,4	472,1456	0,000000
Mod	991,0	2	495,5	2,2791	0,148553
Error	2391,4	11	217,4		

LSD test; variable Sobrevivência Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 217,40, df = 11,000			
	Mod	Sobrev - Mean	a
1	P	79,40000	****
2	P0	80,40000	****
3	P1	98,50000	****

6.8. Efeito das ectomicorrizas na tolerância do castanheiro a *Phytophthora cinnamomi*

6.8.1. Teste de significância e teste de Fisher para a sobrevivência entre os dois híbridos, SM919 e SC912 e entre as diferentes inoculações

Univariate Tests of Significance for Sobrevivência Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	138105,2	1	138105,2	116,6035	0,000001
Clone	4488,0	1	4488,0	3,7893	0,080197
Inoculação	1881,7	2	940,8	0,7944	0,478437
Clone*Inoculação	517,3	2	258,7	0,2184	0,807543
Error	11844,0	10	1184,4		

LSD test; variable Sobrevivência Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1184,4, df = 10,000				
	Clone	Inoc	Sobrev - Mean	a
5	SC912	<i>L. bicolor</i>	56,0000	****
4	SC912	Testemunha	84,0000	****
6	SC912	<i>P. involutus</i>	92,6667	****
2	SM919	<i>L. bicolor</i>	105,6667	****
1	SM919	Testemunha	111,0000	****
3	SM919	<i>P. involutus</i>	118,3333	****