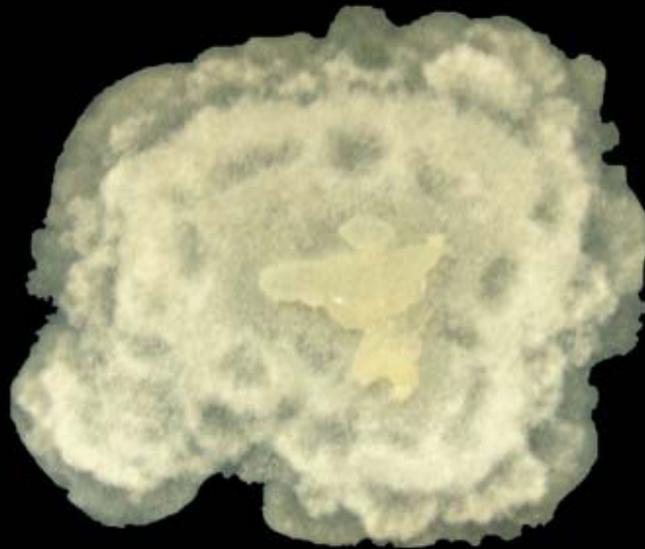




**Análise de parâmetros bioquímicos em clones de castanheiro  
inoculados com *Phytophthora cinnamomi***

**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM  
BIOLOGIA E GEOLOGIA PARA O ENSINO**



**Susana Margarida Ferreira Lopes**

**Vila Real 2007**

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para a obtenção do grau de Mestre em Biologia e Geologia, de acordo com o disposto no Decreto-Lei nº216/92, de 13 de Outubro.

*Ao Miguel*

*À minha Família*

*À memória do meu Padrinho*

*“Um objectivo nada mais é do que um sonho com limite de tempo”*

Joe L. Griffi

## Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de diferentes pessoas às quais quero expressar o meu profundo reconhecimento e gratidão:

À UTAD, pelos meios materiais e humanos que dispôs, indispensáveis à concretização deste trabalho.

Ao Professor Francisco Peixoto, pela oportunidade, orientação e acompanhamento em todas as etapas deste trabalho, pela sua inestimável amizade, confiança, companheirismo e pelo humor constante.

Ao Professor José Gomes-Laranjo, pela co-orientação, amizade e paciência dispensadas durante o trabalho.

Ao Professor Catedrático Carlos Gomes Abreu, pela disponibilidade demonstrada e pela ajuda prestada na optimização da inoculação.

À Professora Maria Manuel Oliveira, pela ajuda e disponibilidade demonstradas no decorrer deste trabalho.

Aos professores da UTAD, pelos ensinamentos transmitidos, que muito contribuíram para a minha formação académica e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Química da UTAD, em especial ao Sr. Duarte, à Paula e ao Carlos, pela amizade, carinho e apoio constantes.

Ao Departamento de Química da UTAD, pelos meios materiais e humanos imprescindíveis à concretização deste projecto.

Ao DEBA, pelos meios materiais que sempre pôs à disposição.

Ao Laboratório de Fitopatologia da UTAD, pela cedência da *Phytophthora cinnamomi*.

Ao Projecto INTERREG IIIA – “Castaña”, pelo suporte financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Ao Centro Nacional de Sementes Florestais e aos Viveiros RibaDouro, pelo fornecimento dos clones híbridos, imprescindíveis para este estudo.

Aos Serviços de Reprografia da UTAD, pela cuidada impressão deste trabalho.

Ao Eng. Nuno Fernandes, pela colaboração e sugestões nas análises estatísticas.

Às amigas e colegas de mestrado: Salete, Alexandrina, Luísa, Vitória, Cristiana pela amizade e bons momentos partilhados.

Ao Dr. João Campos, colega de licenciatura, pela amizade sempre demonstrada.

Aos meus amigos e colegas Dra. Cláudia Teixeira, Dra. Sónia Fanico, Dra. Luísa Moreira e Dr. Jorge Gomes, pela amizade, boa disposição e apoio demonstrados na fase final deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Curto, pela amizade, companheirismo, apoio e agradável convívio, na fase final deste trabalho.

À Dra. Sandrina Delgado, pela amizade e pela cuidada revisão deste trabalho.

Às amigas Helena Lajas e Helena Rodrigues, pelo apoio emotivo e amizade constantes.

À grande amiga Fátima Martins, sempre presente, pela ajuda prestada, pelos conselhos e palavras confortantes nos momentos mais difíceis e, principalmente, pela sincera amizade.

À minha família, que não poupou esforços para a minha formação, especialmente pelo amor, carinho, dedicação e incentivo constantes, pelo exemplo de luta e pelo apoio em mais este passo da minha vida.

Um agradecimento especial ao Miguel, pelo apoio, incentivo, carinho, paciência e dedicação demonstrados em todos os momentos.

A todos os que, directa ou indirectamente me ajudaram na concretização deste projecto

# Alterações bioquímicas em clones de castanheiro inoculados com *Phytophthora cinnamomi*

**Autor:** Susana Margarida Ferreira Lopes

**Orientador:** Professor Doutor Francisco Peixoto

## Resumo

A doença da tinta do castanheiro, causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. É uma das mais importantes doenças do castanheiro. Os danos ocasionados são relevantes, resultando em perdas económicas significativas. Aspectos relacionados com a interacção castanheiro - *Phytophthora cinnamomi* têm sido pouco investigados e, conseqüentemente, são escassas as informações sobre alterações bioquímicas que ocorrem no hospedeiro. O objectivo do presente trabalho foi justamente estudar as alterações bioquímicas que ocorrem em clones de castanheiro resistentes à doença da tinta, infectados com *Phytophthora cinnamomi*.

O presente trabalho inicia-se com uma revisão bibliográfica sobre o castanheiro, incidindo na doença da tinta, causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi* Rands. São abordados os sintomas da doença, bem como características do patogénio. São referidos os mecanismos de resposta das plantas a infecções provocadas por patogénios, bem como métodos preventivos, nomeadamente a indução de resistência em plantas contra fitopatogénios, um método alternativo de controlo de doenças que envolve a activação de mecanismos de resistência latentes na planta.

Na segunda do trabalho foram determinadas as alterações no conteúdo de proteína total, açúcares redutores, açúcares totais, fenóis totais, proantocianidinas e clorofila total em 7 clones de castanheiro experimentalmente inoculados com *Phytophthora cinnamomi*.

# **Alterações bioquímicas em clones de castanheiro inoculados com *Phytophthora cinnamomi***

**Autor:** Susana Margarida Ferreira Lopes

**Orientador:** Professor Doutor Francisco Peixoto

## **Abstract**

Ink disease in chestnut, caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands., is an important disease of chestnut crop. The damages are relevant, resulting in significant economic losses. Aspects related to chestnut-*Phytophthora cinnamomi* interaction has been little investigated and consequently information about biochemical alterations that occur in the host are rare. Thus, the objective of the present work was to study biochemical alterations that occur in chestnut plants resistant to the ink disease, infected by *Phytophthora cinnamomi*.

The first part of this research was a literature review about chestnut trees, focusing the ink disease, caused specially by *Phytophthora cinnamomi* Rands. Are described the symptoms of the disease and some of the pathogen characteristics. The plant responses to pathological infections are mentioned, and a description of the preventive methods used against plant infections caused by *P. cinnamomi* is made. The induction of resistance in plants against pathogens is an alternate method of disease control, which involves the activation of latent mechanisms of resistance in the plant.

Second, using 7 chestnut clones, alterations in the levels of total protein, reducing sugars, total sugars, total phenol, proanthocyanidins and chlorophyll in infected plants were evaluated and describe changes related to the biochemical alterations.

# Índice

<b>1. NOTA INTRODUTÓRIA</b> .....	<b>1</b>
<b>2. O CASTANHEIRO</b> .....	<b>4</b>
2.1 HISTÓRIA, ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	4
2.2 CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE .....	5
2.3 DECLÍNIO DA ESPÉCIE .....	6
<b>3. DOENÇA DA TINTA</b> .....	<b>7</b>
3.1 HISTÓRIA, ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	7
3.2 FACTORES DE PREDISPOSIÇÃO E INDUÇÃO À DOENÇA .....	8
3.3 SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA .....	10
3.4 MEIOS DE LUTA .....	13
<b>4. PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</b> .....	<b>15</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO SUMÁRIA DA ESPÉCIE.....	15
4.2 CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE .....	17
4.3 INFLUÊNCIA DOS FACTORES EDAFO-CLIMÁTICOS.....	18
4.4 MECANISMO DE INFECCÃO .....	19
4.4 CONTROLO BIOLÓGICO DE PHYTOPHTHORA .....	24
<b>5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS</b> .....	<b>26</b>
5.1 RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA.....	28
5.2 RESISTÊNCIA INDUZIDA .....	29
5.2.1 Resistência local .....	31
5.2.2 Resistência sistémica adquirida (SAR) .....	32
5.3 CONTROLO ALTERNATIVO DE DOENÇAS .....	33
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
6.1 MATERIAL VEGETAL.....	35
6.1.1 Inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	35
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	39
6.2.1 Metodologia para o doseamento da proteína total.....	39
6.2.2 Metodologia para o doseamento dos açúcares totais.....	39
6.2.3 Metodologia para o doseamento dos açúcares redutores.....	40
6.2.4 Metodologia para o doseamento dos fenóis totais.....	40
6.2.5 Metodologia para o doseamento das Proantocianidinas.....	41
6.2.6 Metodologia para o doseamento da clorofila total.....	41
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
7.1 CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL.....	43
7.2 CONTEÚDO DE AÇÚCARES REDUTORES .....	46
7.3 CONTEÚDO DE AÇÚCARES TOTAIS .....	48
7.4 CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS .....	51
7.5 CONTEÚDO DE PROANTOCIANIDINAS .....	55
7.6 CONTEÚDO DE CLOROFILAS TOTAIS .....	57
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 – Silhueta das treze espécies de castanheiros existentes no mundo, com a altura média que alcançam cada ano. 1- <i>C. dentata</i> , 2- <i>C. sativa</i> , 3- <i>C. henriz</i> , 4- <i>C. mollissima</i> , 5- <i>C. ozarkensis</i> , 6- <i>C. crenata</i> , 7- <i>C. pumila</i> , 8- <i>C. seguinii</i> , 9- <i>C. floridiana</i> , 10- <i>C. ashei</i> , 11- <i>C. davidii</i> , 12- <i>C. paucispina</i> e 13- <i>C. alnifolia</i> (Adaptado de Vieitez et al., 1996).....	5
Figura 2 – Amarelecimento das folhas em castanheiro, sintoma da doença da tinta (à esquerda) e castanheiro saudável (à direita) (Foto cedida por Gomes-Laranjo).....	10
Figura 3 – Aspecto enegrecido das raízes mais grossas de um castanheiro (Martins, 2004).....	11
Figura 4 – Castanheiros afectados pela doença da tinta. A e B – base do tronco das árvores evidenciando os efeitos da enfermidade da tinta. O avanço do micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , pode ascender até um metro, dependendo da humidade do solo. C – castanheiro morto pela enfermidade da tinta (Adaptado de Vieitez et al., 1996). .....	12
Figura 5 – Esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Vieitez et al., 1999).....	20
Figura 6 – Zoósporo libertado pelo esporângio (Metcalf, 2006).....	20
Figura 7 – Oósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Metcalf, 2006). .....	21
Figura 8 – Ciclo biológico da doença da tinta do castanheiro (Metcalf, 2006).....	23
Figura 9 – Micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Vieitez et al., 1999). .....	23
Figura 10 – Clamidósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . (Metcalf, 2006).....	24
Figura 11 – Micélio do oomiceta <i>Phytophthora cinnamomi</i> . .....	36
Figura 12 – Local onde as plantas se encontravam distribuídas. ....	36
Figura 13 – Etapas realizadas no decorrer da inoculação sólida: A – desinfecção, com álcool etílico, de uma zona do caule livre de ramificações; B - incisão em “T” com o auxílio de um bisturi; C – introdução de um pedaço de micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , entre a casca e o tecido cambial e D - cobertura da zona da ferida com algodão humedecido em água destilada o qual, por sua vez, foi revestido com uma película de parafilme. ....	37
Figura 14 – Etapas realizadas no decorrer da inoculação líquida: A – abertura dos buracos no solo dos vasos; B – introdução, no solo do vaso, da solução com micélio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> . .....	38
Figura 15 – Em a) apresenta-se o conteúdo de proteínas totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de proteínas totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> , decorridos 42 dias do início do ensaio. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes... ..	44
Figura 16 – Em a) apresenta-se o conteúdo de açúcares redutores em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de açúcares redutores observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> , 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes. ....	47
Figura 17 – Em a) apresenta-se o conteúdo de açúcares totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de açúcares totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> , 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes. ....	49
Figura 18 – Em a) apresenta-se o conteúdo de fenóis totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de fenóis totais observada nos tecidos foliares de plantas	

experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes..... 52

**Figura 19** – Compartimentação visível em planta resistente (A) e compartimentação inexistente em planta susceptível (B)..... 54

Figura 20 – Em a) apresenta-se o conteúdo de proantocianidinas em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de proantocianidinas observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, decorridos 42 dias do início do ensaio. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes... 56

Figura 21 – Em a) apresenta-se o conteúdo de clorofilas totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de clorofilas totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes. .... 58

## **1. Nota Introdutória**

O castanheiro faz parte da flora existente na superfície terrestre desde há cerca de 40 milhões de anos, sendo uma árvore que se identifica com a cultura, costumes, economia e, por vezes, com a religião dos povos (Vieitez *et al.*, 1996), tendo marcado profundamente, durante séculos, a vida económica e quotidiana de extensas regiões onde predominava, criando uma verdadeira “civilização” à sua volta (Bourgeois, 1993).

Fala-nos do castanheiro o povo norte-americano, os europeus, os chineses, os coreanos e japoneses, mesmo referindo-se a quatro espécies distintas: *Castanea dentata* ou castanheiro americano, na América; *Castanea sativa* ou castanheiro europeu, na Europa; *Castanea mollissima* ou castanheiro chinês, na China e *Castanea crenata* ou castanheiro japonês no Japão, Coreia e na China. No entanto, todos se referem ao castanheiro como algo comum, muito querido e muito vinculado com a cultura dos seus povos (Vieitez, 1999).

Esta espécie florestal é detentora de enorme tradição em determinadas regiões do nosso país, sendo uma das espécies frutícolas mais importantes em vastas áreas do norte e centro de Portugal, encontrando nas terras altas de Trás-os-Montes as melhores condições ecológicas e climáticas para a sua sobrevivência e desenvolvimento.

Alguns autores, como Giordano (1993) referem que o início do declínio do castanheiro é coincidente com a difusão de patologias, nomeadamente o cancro americano e a doença da tinta. O cancro americano foi responsável pelo quase total desaparecimento do castanheiro americano e a doença da tinta por uma redução progressiva do castanheiro na Europa e Médio Oriente. Foram poupados os castanheiros da China e Japão, por apresentarem considerável resistência a estas enfermidades (Vieitez *et al.*, 1996).

Segundo Fernandes (1966), foi a partir de meados do século XX que Portugal e, em particular Trás-os-Montes, começou a assistir a um acentuado declínio do castanheiro, devido ao ataque de agentes patogénicos, nomeadamente *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora cambívora* Petri (agentes causais

responsáveis pela doença da tinta) e *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, (agente causal responsável pelo cancro americano). No entanto, o declínio que se verificou na área de castanheiro, e que provocou a diminuição da área de cerca de 60 000 hectares para 20 000 hectares, no fim do século XX, ficou também a dever-se, como refere Abreu (1995), ao crescente abandono e substituição dos soutos por outras culturas mais rentáveis, do ponto de vista monetário.

Por ter sido sempre uma árvore muito querida, que gozou da simpatia dos povos da sua área geográfica de dispersão, a sua dramática regressão foi muito sentida, causando preocupação a vários níveis: científico, silvícola e frutícola (Vieitez *et al.*, 1996).

Contra a doença da tinta foi tentada, inicialmente, a luta química, utilizando sais de cobre pouco solúveis (Fernandes, 1952) e, posteriormente, tentaram-se as micorrizações (Grente e Vrot, 1984). Mas, nesta luta contra a doença da tinta, tem-se incidido sobretudo na pesquisa de condições edafoclimáticas supressivas para a doença (Abreu *et al.*, 1993; Fernandes, 1970; Guerreiro, 1957; Oliveira *et al.*, 1999; Portela *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 1999) e na pesquisa de plantas com resistência à doença, quer esta seja adquirida por hibridação (Craddock e Bassi, 1999; Salesses *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1984), ou oriunda de clones de *Castanea sativa* Mill, de que é exemplo o COLUTAD (Gomes *et al.*, 1997).

Na tentativa de salvar o que nos resta e de reconstituir o que já se perdeu, numerosos esforços se têm desenvolvido ao longo de muitas décadas, sendo hoje a procura da resistência ao patogénio um dos atributos mais desejados, senão o mais importante.

A obtenção de castanheiros resistentes a estas enfermidades, utilizando técnicas genéticas, desde logo passou a ser tarefa dos centros de investigação que trabalharam no melhoramento do castanheiro. A fisiologia, a bioquímica e a química orgânica foram ferramentas utilizadas para esclarecer os problemas que dificultavam os programas de melhoramento do castanheiro (Vieitez *et al.*, 1996).

A investigação foi igualmente direccionada para a caracterização dos solos e técnicas culturais com influência na sensibilidade das plantas (Portela *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 1999), caracterização das estirpes de *Phytophthora spp.* e pesquisa

de plantas resistentes à doença (Gomes *et al.*, 1997). Também foi feita a caracterização do compromisso fotossíntese/transpiração em plantas afectadas ou não pela *Phytophthora* (Gomes-Laranjo *et al.*, 2004), tendo-se revelado estes estudos da maior importância, uma vez que foi possível, pela primeira vez, demonstrar alterações ao nível deste compromisso entre estes dois tipos de plantas.

## **2. O Castanheiro**

### **2.1 História, origem e distribuição geográfica**

A antiguidade da cultura do castanheiro, aliada à forte intervenção humana na expansão desta espécie, dificulta a determinação da sua verdadeira origem, surgindo também a dificuldade em saber, nalgumas regiões, quais as populações de castanheiros autóctones e quais as que, possuindo origem cultural, se tornaram selvagens (Paiva, 1990).

Alguns autores consideram a Ásia Menor como local de origem desta espécie, embora existam posições contrárias que apontam o sul da Europa como o centro de origem. Fenaroli (1945), tomando uma posição de equilíbrio, indicou toda a região mediterrânica-euroasiática como o centro originário de distribuição do castanheiro. Terá sido a partir deste local que, no século V a. C., o castanheiro foi trazido por correntes migratórias e difundido pelos Romanos, até atingir o Arquipélago dos Açores, a Madeira e as Canárias (Malato-Beliz, 1987).

Perante esta diversidade de posições, Artaza (1949) e Guerreiro (1957) defendem que a espécie *C. sativa* Miller será indígena de uma vasta zona que abrange o Norte de África, a Itália, o Sul do Danúbio, a França Meridional e a Península Ibérica. Terá sido a partir destas zonas que a espécie se expandiu, por toda a zona temperada da Europa, devido à acção do Homem.

Maia (1988) refere que o castanheiro existe na Europa desde o final da Era Mesozóica ou, mais seguramente, desde a Era Cenozóica, época em que se verificou a sua expansão.

Em Portugal, os primeiros indícios da existência do castanheiro remontam ao Miocénio. A espécie *Castanea sativa* Mill. é cultivada em Portugal desde o tempo dos Romanos, surgindo nas áreas naturais do carvalho negral e do carvalho roble. São conhecidas referências à espécie datadas de 1220 e 1258 que atestam a sua ocorrência em Portugal (Dicionário da História de Portugal, *in* Maia, 1988).

Na actualidade, a zona de distribuição do castanheiro no mundo está cingida a três áreas geográficas distintas: a americana (que se restringe ao sudeste dos

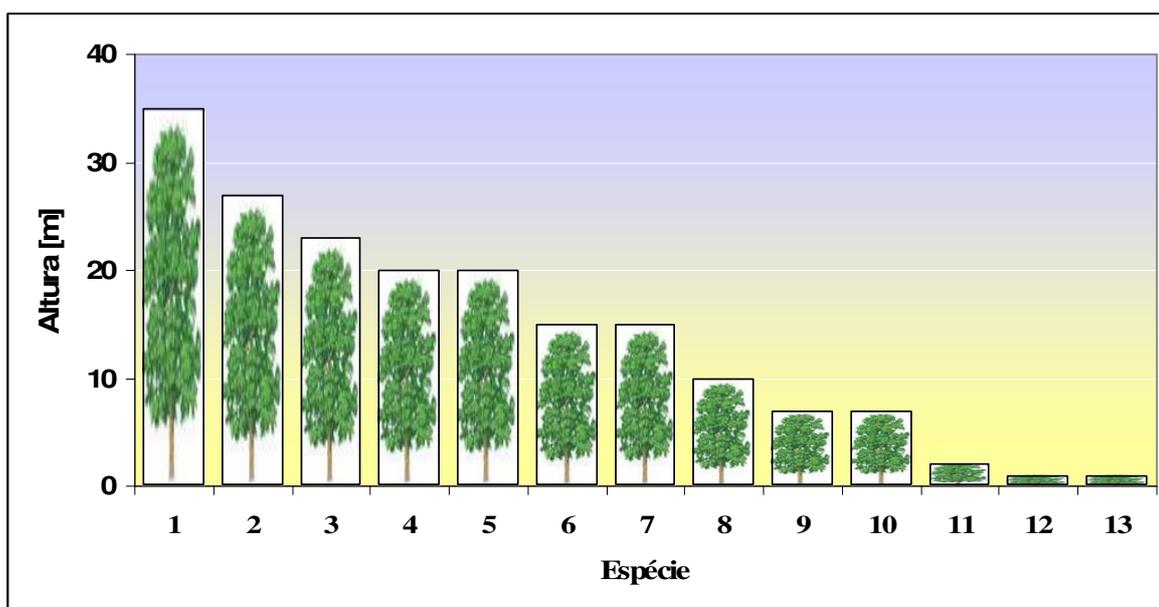
EUA), a Asiática (núcleo do Oriente, englobando o Japão, Coreia e China Oriental) e a Europeia (Abreu, 1996; Gomes-Laranjo, 1988).

Em Portugal, a *Castanea sativa* encontra-se distribuída, principalmente, em Trás-os-Montes e Alto Douro e nas Beiras, existindo também manchas isoladas no Alto Alentejo, Minho e Algarve (Oliveira e Alves, 1987; Gomes-Laranjo, 1988).

## 2.2 Classificação da espécie

O castanheiro europeu, *Castanea sativa* Mill., é uma das espécies pertencentes ao género *Castanea* que, juntamente com os géneros *Castagnopsis*, *Fagus* e *Quercus*, formam a família *Fagaceae* (Seabra, 1998).

O género *Castanea* reúne treze espécies de porte variado (Figura 1), podendo ser majestosas árvores capazes de alcançar 20 a 35 metros de altura, como *C. dentata*, *C. henry* e *C. sativa*, árvores de menor tamanho podendo atingir 15 a 20 metros como *C. ozarkensis*, *C. mollissima*, *C. crenata* e *C. pumila*. até 10 metros, o caso de *C. floridiana*, *C. seguinii* e *C. ashei* e podem ser inclusivamente arbustivas como *C. davidii*, *C. alnifolia* e *C. paucispina* (Vieitez et al., 1996).



**Figura 1** – Silhueta das treze espécies de castanheiros existentes no mundo, com a altura média que alcançam cada ano. 1- *C. dentata*, 2- *C. sativa*, 3- *C. henry*, 4- *C. mollissima*, 5- *C. ozarkensis*, 6- *C. crenata*, 7- *C. pumila*, 8- *C. seguinii*, 9- *C. floridiana*, 10- *C. ashei*, 11- *C. davidii*, 12- *C. paucispina* e 13- *C. alnifolia* (Adaptado de Vieitez et al., 1996).

### **2.3 Declínio da Espécie**

Pela relevância que o castanheiro teve e ainda tem junto dos “seus” povos, as doenças que o afectaram e as consequências por elas produzidas tiveram grande impacto. Este fenómeno regressivo produziu-se nos Estados Unidos e na Europa. No primeiro caso foi o castanheiro americano (*Castanea dentata*) que sofreu a regressão devido ao cancro (*Cryphonectria parasitica*) e no segundo o castanheiro europeu (*Castanea sativa*), devido à doença da tinta (*Phytophthora cinnamomi*), entre outros factores (Vieitez, 1999).

### **3. Doença da Tinta**

#### **3.1 História, origem e distribuição geográfica**

A generalidade dos autores considera a doença ou “mal da tinta” como a principal causa do declínio e desaparecimento recente dos soutos em Portugal (Gouveia e Abreu, 1994), tendo sido noticiada pela primeira vez em 1838 nos terrenos das margens do Rio Lima (Fernandes, 1953) na foz dos rios Leça e Ave (Abreu, 1996) e também na Madeira e nos Açores (Guerreiro, 1946).

Elorrieta (1949) menciona a existência, em 1859, de castanheiros com sintomas da doença da tinta no norte de Itália, em França, no centro e norte de Portugal. Em todos os casos, era frequente a existência de castanheiros afectados por uma doença, que se estendia gradualmente, e que os castanheiros que atacava acabavam por morrer.

Não existe consenso no que concerne à origem e dispersão da doença da tinta na Europa. Fenaroli (1945) defende tratar-se de uma doença originária da América do Norte, que foi introduzida na Europa a partir dos Açores. Segundo Fernandes (1953), a “tinta” é oriunda dos Açores e da Ásia. Outros autores, como Elorrieta (1949), acreditam que a doença sempre existiu no Sul da Europa, e que se manifesta de modo mais perceptível apenas na presença de condições ambientais favoráveis.

Nos finais do último terço do século XIX, começou na Europa, a preocupação pelos danos causados por esta enfermidade, que fixou a sua aparição em Portugal, Espanha, França, Itália e nos países Balcânicos e que se expandiu com rapidez, levando à destruição de milhões de castanheiros. A idade não foi obstáculo, pois foram atacadas desde árvores novas até formosos exemplares de castanheiros pluricentenários (Vieitez, 1999).

A doença da tinta do castanheiro surgiu com especial incidência nas áreas de cultura submetidas à influência do clima atlântico nos continentes Americano e Asiático, Oceânia e diversos países da Europa, entre os quais Portugal (Lanier *et al.*, 1976; Phillips e Burdekin, 1989 *cit.* Telhada, 1990).

Os agentes patogénicos causadores da “doença da tinta” no castanheiro são os oomicetas *Phytophthora cinnamomi* Rands. e *Phytophthora cambívora* Petri., nalguns casos. Devido à semelhança morfológica torna-se difícil distinguir estas duas espécies (Abelleira, 1996; Gouveia, 1993). No entanto, a primeira espécie é a mais destrutiva, sendo considerada como a que possui um papel preponderante no desenvolvimento da doença da tinta (Fernandes, 1966). Por esta razão, a *Phytophthora cinnamomi* vai merecer mais atenção da nossa parte, no âmbito deste estudo.

### **3.2 Factores de predisposição e indução à doença**

Segundo Abreu (1992a), existem vários factores responsáveis pelo declínio do castanheiro, que podem ser facilmente diagnosticados. Estes envolvem factores de predisposição e factores de indução, tais como: susceptibilidade a determinados hospedeiros, ausência de irrigação, compactação do solo devido à sua mecanização, que impede o óptimo desenvolvimento das raízes, bem como a actividade de fungos ectomicorrízicos. Este conjunto de factores, aliados à presença de *Phytophthora cinnamomi*, constitui um importante contributo para o estado degradado e débil que os sotos e castinçais actualmente apresentam.

A floresta é um agregado biológico, uma comunidade natural de árvores entre as quais existe solidariedade e luta, de que resulta um determinado equilíbrio dinâmico que é função simultânea de cada um de todos os componentes e onde o solo, os fungos, os musgos, os líquenes, os insectos, a vegetação herbácea e arbustiva, etc., contribuem, da mesma forma, na funcionalidade do arvoredo. A ausência de qualquer dos componentes desfaz o equilíbrio e destrói a comunidade (Guerreiro, 1953).

O castanheiro europeu foi, desde sempre, um elemento constituinte das florestas mistas primitivas de carvalhos de folha caduca. Estes povoamentos caracterizam-se pela sua heterogeneidade, apresentando grande variedade genética, em espécies e em idades e uma distribuição espacial tal que tornava muito difícil a formação de inóculo suficiente para permitir o aparecimento de doenças importantes. Neste contexto, ter-se-ia uma comunidade em equilíbrio de duração

quase ilimitada no tempo, com a capacidade de tolerar e ultrapassar eventuais acidentes sanitários (Abreu, 1994).

Para Abreu (1992 a), a causa da ruptura hospedeiro-parasita foi a passagem do castanheiro a espécie dominante. Na opinião deste autor, esta espécie veio ocupar o lugar dos carvalhos, passando a dispor de mais espaço. Por isso, entrou-se num artificialismo progressivo, com as crescentes mobilizações do solo devido às culturas de sub-coberto nos sotos, tais como várias culturas cerealíferas, que foram substituindo a vegetação natural e que, segundo Abreu (1995), conduziram a uma progressiva diminuição da diversidade florística, bem como a uma diminuição da matéria orgânica necessária ao estímulo da actividade microbiana do solo, contribuindo desta forma para a fragilização do ecossistema florestal. Por outro lado, as culturas cerealíferas contribuíram grandemente para o empobrecimento do solo em nutrientes, tais como cálcio e magnésio, indispensáveis ao óptimo desenvolvimento dos sotos (Abreu, 1992 a). O castanheiro passou assim a vegetar em condições de maior radiação, elevando a produtividade fotossintética e aumentando as exigências em água.

Ainda segundo Abreu (1992 a), a este conjunto de factores que predispõem para o declínio do soto, juntaram-se alterações no sistema de produção, com a entrada da batata e das adubações azotadas pelo sub-coberto. A instalação de fungos benéficos nas raízes das árvores foi desfavorecida devido à aplicação de azoto a esta cultura. Estes fungos, para além de contribuírem para a resistência às doenças, devido a melhorarem o estado nutricional do castanheiro, possuem também a capacidade de criar uma barreira física face à *Phytophthora* (Abreu, 1995). Também a mecanização cada vez mais pesada, que destrói as raízes do castanheiro, tornou-se uma potencial porta de entrada para fungos, encontrando-se assim reunidas as condições para irem surgindo os eventos epidémicos da tinta, uns após os outros.

### 3.3 Sintomatologia da doença

A sintomatologia apresentada pelos castanheiros e outras espécies florestais quando infectadas pela doença da tinta é característica, embora não específica, uma vez que alguns dos sintomas se assemelham aos provocados por outras doenças, nomeadamente ataques de *Armillaria mellea* e *Endothia parasítica* (Fernandes, 1966).

Segundo Gomes (1982), uma vez afectados pela tinta, os castanheiros apresentam, simultaneamente ou em separado, algumas das seguintes características:

- amarelecimento precoce das folhas que se acentua até acabarem por murchar e secar, podendo cair prematuramente, antes do começo do Outono, ou, se o dessecamento for rápido, podem ficar agarradas aos ramos tal como os ouriços, durante o período Outono-Primavera (Figura 2);



**Figura 2** – Amarelecimento das folhas em castanheiro, sintoma da doença da tinta (à esquerda) e castanheiro saudável (à direita) (Foto cedida por Gomes-Laranjo).

- os ramos da copa correspondentes às raízes infectadas, possuem entrenós curtos, epiderme engelhada e secam – “coroamento” – à medida que a doença progride até à morte;

- rebentação junto ao colo ou no tronco e ao longo dos ramos principais, mantendo-se, no entanto, toda a copa seca;

- folhas não completamente desenvolvidas e enroladas, ouriços pequenos e sem frutos, queda prematura das folhas masculinas, frutos deficientemente desenvolvidos;
- raízes enegrecidas com a epiderme mole e em vias de decomposição, revelando exteriormente, as mais grossas, manchas escuras (Figura 3);
- aparecimento, junto ao colo, de um líquido semelhante à tinta de escrever.



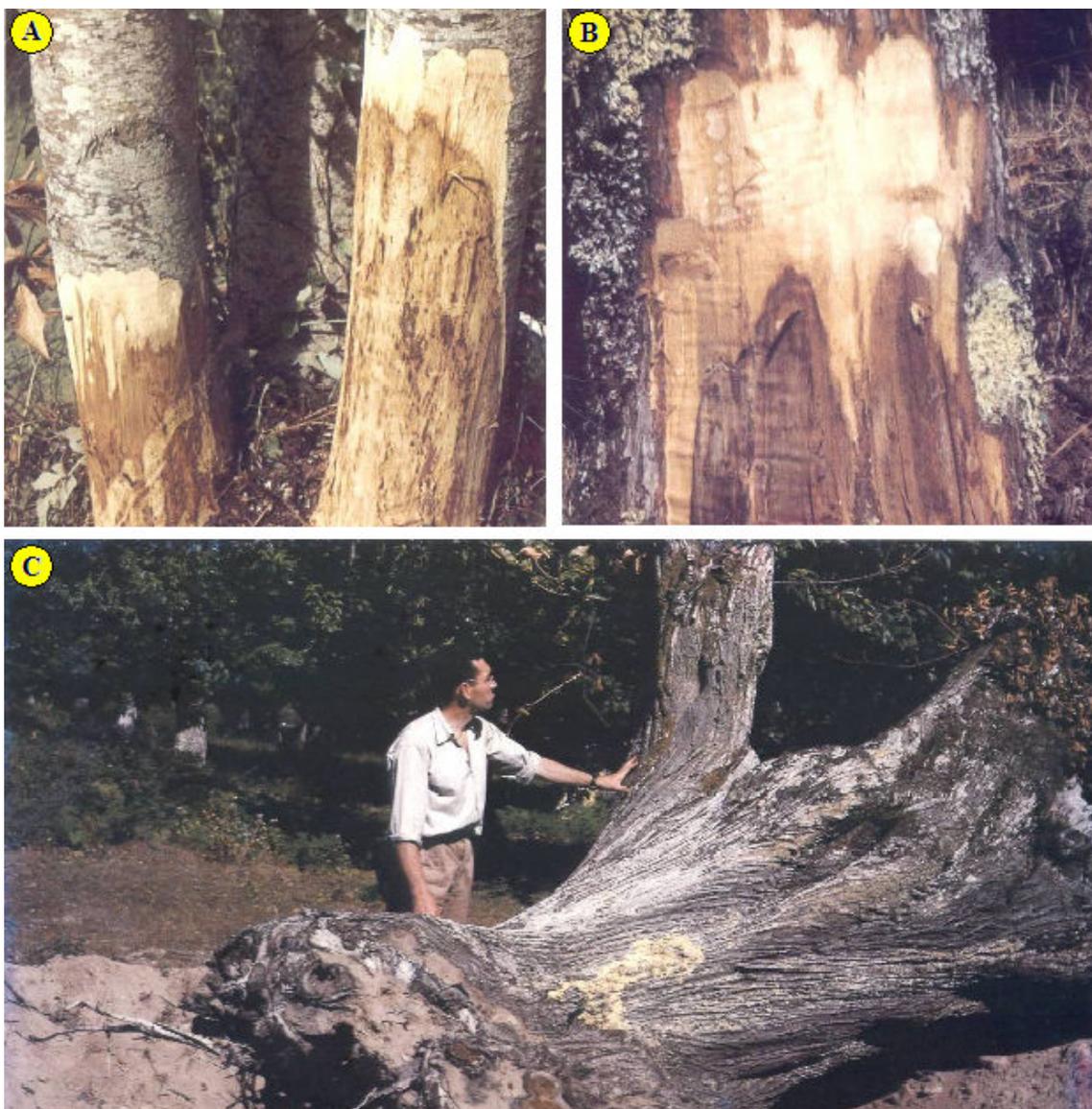
**Figura 3** – Aspecto enegrecido das raízes mais grossas de um castanheiro (Martins, 2004)

Esta sintomatologia prossegue rapidamente provocando a morte (Figura 4), num curto período de tempo, uma vez que, na maioria dos casos, quando os sintomas se manifestam, o processo infeccioso já se encontra num estado avançado de evolução. Este facto dificulta a detecção, por sintomatologia, dos ataques ainda na sua fase inicial, pelo que as estratégias de luta se tornam mais difíceis de aplicar, nomeadamente quando se pretende actuar ao nível dos hospedeiros (Gouveia, 1993).

De salientar que o nome atribuído à doença é devido à exsudação do líquido viscoso, violeta ou azul escuro, resultante da oxidação dos polifenóis libertados pelas células do floema, do córtex e câmbio do castanheiro infectados pela *Phytophthora* e a sua reacção com os sais de ferro contidos no solo adjacente às raízes (Vieitez *et al.*, 1996).

De acordo com Abreu (1992a), esta designação é inadequada, uma vez que os castanheiros são também exibem uma reacção semelhante quando o interior das raízes contacta com o solo, devido a lesões corticais ou profundas. Além

disso, muitas outras árvores são afectadas pelo mesmo agente patogénico, de forma semelhante à descrita para o castanheiro, caso da noqueira, não ocorrendo a formação do exsudado escuro.



**Figura 4** – Castanheiros afectados pela doença da tinta. A e B – base do tronco das árvores evidenciando os efeitos da enfermidade da tinta. O avanço do micélio de *Phytophthora cinnamomi*, pode ascender até um metro, dependendo da humidade do solo. C – castanheiro morto pela enfermidade da tinta (Adaptado de Vieitez *et al.*, 1996).

### **3.4 Meios de luta**

Na adopção de meios de luta capazes de proporcionar condições mais favoráveis ao castanheiro e menos ao patogénio, torna-se necessário o conhecimento das características biológicas e epidemiológicas do agente responsável pela doença.

As características biológicas e epidemiológicas dos agentes patogénicos requerem a utilização de meios de protecção que integrem, adequadamente, os meios de luta culturais, biológicos, genéticos e químicos. Os três primeiros são denominados processos preventivos, uma vez que a sua aplicação tem como objectivo impedir o aparecimento da doença, fazendo parte deste conjunto de processos a selecção de clones de castanheiros resistentes à *Phytophthora cinnamomi*, produção de castanheiros isentos, solarização do solo, uso de técnicas culturais adequadas e utilização de solos supressivos (Campos, 1994).

A luta química (processo curativo) teve início em Espanha, graças aos trabalhos experimentais de Pedro Urquijo Landaluze, a partir de 1934. O tratamento consistia na aplicação de sais de cobre na zona do colo e das raízes, previamente limpas da terra aderente, até uma profundidade de 50 cm. Apesar do parasita iniciar a infecção pelas raízes superficiais, era suficiente o tratamento na zona do colo, uma vez que a emissão de novas raízes compensava as necessidades da árvore (Fernandes, 1952). Este método foi considerado método curativo até 1957. A partir desta data passou a ser considerado, por outros autores, como uma forma de atrasar a doença sem exercer acção curativa (Malato-Beliz, 1987). Em Portugal o método de Urquijo foi amplamente usado, obtendo-se resultados de certo modo positivos mas, em contrapartida, os custos eram elevados e os efeitos ambientais negativos, pelo facto de se tratar de uma doença radicular e o tratamento ter de ser feito no solo, razões que conduziram ao abandono do método.

Alguns dos fungicidas actuais (com base em etazol, fosetil de alumínio ou metalaxil), apresentam elevados custos por unidade de área, sendo por isso a sua aplicação restringida aos viveiros (Salesses *et al.*, 1993). De acordo com Benson (1990), a luta química justifica-se em viveiros, por ser uma forma de garantir a saída de plantas saudáveis e o sucesso da transplantação.

A utilização de fertilizantes enriquecidos em fósforo, cujo ião fosfito induz a planta a produzir substâncias de autodefesa contra fungos do solo como a *Phytophthora sp.* tem dado resultados muito interessantes (informação oral, Abreu, 2007). Com efeito, a possibilidade de ser aplicado via foliar ou ao solo é também um factor favorável à adopção desta estratégia de luta, cuja acção se faz sobre fitoalexinas presentes na parede celular, estimulando a sua produção, e que assim provoca a decomposição da parede celular dos microrganismos ([www.sbg.org.br/PN-Net/texto 5/defesa.htm](http://www.sbg.org.br/PN-Net/texto 5/defesa.htm)).

As formas de luta à doença nem sempre são as mais viáveis, quer do ponto de vista financeiro quer do biológico. Os fungicidas com eficácia comprovada são de difícil aplicação, preços pouco convidativos e os efeitos secundários podem conduzir à biodegradação potenciada ou ao desenvolvimento da resistência por parte da *Phytophthora*. As hibridações de *C. sativa* com *C. crenata* ou *C. mollissima*, produzem plantas resistentes à tinta, contudo apresentam um conjunto de factores limitantes, como o seu custo, má adaptação aos locais mais secos, quando usados como porta-enxerto apresentam incompatibilidades ao fim de alguns anos na zona de enxertia (Vieitez *et al.*, 1984).

Desta forma, as medidas de protecção a implementar no combate a esta doença, não devem ser encaradas como meros processos alternativos de luta, mas sim como processos complementares de defesa, cujo objectivo final é a protecção da cultura durante o prolongado período de tempo que ocupa o solo. Também Bruehl (1989), defende ser necessário direccionar os esforços no sentido de uma filosofia de protecção integrada, nomeadamente com o favorecimento da diversidade biológica, na tentativa de reduzir a dependência do uso de fitofármacos e sistemas curativos, permitindo o equilíbrio estável hospedeiro-parasita e tentar, desta forma, conduzir à solução deste tão grave problema sanitário, que tem vindo a degradar e a dizimar os souts.

## 4. *Phytophthora cinnamomi*

### 4.1 Caracterização sumária da espécie

No ano de 1917, o italiano Lionello Petri isolou e identificou, como agente causador da doença, um fungo ao qual atribui a designação de *Blepharospora cambivora*, que Buissmam incluiu posteriormente no género *Phytophthora*, família das *Pythiaceae*, dentro dos fungos oomicetas. Em 1922 ter-se-á confirmado a proximidade desta espécie com um patogénio de mais largo espectro, capaz de destruir desde plantas herbáceas até arbóreas, passando também pelas arbustivas: *Phytophthora cinnamomi* Rands. A *Phytophthora cinnamomi* foi descrita, pela primeira vez em 1922, por Rands na ilha da Sumatra após ter sido detectada na árvore da canela (*Cinnamomi burmamii* Blume), árvore cuja designação botânica auxiliou a sua classificação taxonómica. Desde essa data, esta espécie foi citada em mais de uma centena de países como agente responsável por um elevado número de doenças, produzidas em mais de um milhar de plantas hospedeiras (Zentmyer, 1980).

A dispersão de *Phytophthora cinnamomi* é notável, estando presente em todo o mundo, desde as regiões temperadas às tropicais. Este facto é devido, em grande parte, à vastíssima diversidade de hospedeiros. Zentmyer (1980) enumerou mais de 950 plantas hospedeiras, das quais muitas são australianas, no entanto, actualmente estão registadas mais de 1000 espécies (Hardy e Sivasithamparam, 1988).

É atribuída a *Phytophthora cinnamomi* a responsabilidade pela morte de diversas plantas tropicais, destacando-se a japoneira, a canforeira, o abacateiro, o ananás, sobretudo na Sumatra, EUA, Antilhas, África do Sul e Malásia (Roger, 1951 *cit.* Telhada, 1988).

Muito embora com carácter epidémico ataque essencialmente o castanheiro e a nogueira (Gomes, 1982), em Portugal esta espécie foi assinalada como parasita de *Fagus sylvatica* L., *Betula alba*, *Junglans regia* L., *Quercus spp.*, *Pseudotsuga menziessi* (Mirbel) e *Erica spp.* (Fernandes, 1952; Martins, 1994).

Em termos fitopatológicos, o género *Phytophthora* é um taxa de remarcáveis características, sendo todas as espécies deste género parasitas de plantas, encontrando-se amplamente representadas as espécies dicotiledóneas. Possui também espécies que, no seu conjunto, têm a capacidade de infectar e colonizar todos os órgãos das plantas, além de englobar outras com capacidade de parasitar um elevado número de espécies vegetais e outras que, graças à sua especificidade, se aproximam dos organismos biotróficos (Gouveia, 2004).

A existência de dois organismos distintos capazes de provocar a mesma doença, no mesmo hospedeiro, levou a que a dúvida que envolvia o género *Phytophthora* passasse a reunir as duas espécies numa só – *Phytophthora cambívora*. De acordo com Grente (1961b) e Vieitez (1960), apesar do comportamento de *P. cinnamomi* e *P. cambívora* ser diferente, era mais provável tratar-se de duas subespécies, do que de duas espécies distintas.

Apesar das características idênticas, que tornam os critérios de separação dificilmente observáveis (Gouveia, 1993), reconhece-se que as espécies são distintas morfológica e biologicamente, sendo possível a hibridação entre elas. No entanto, devido à sua maior agressividade e representatividade, considera-se a *Phytophthora cinnamomi* como o organismo preponderante no desenvolvimento da doença da tinta (Salesses *et al.*, 1993).

Esta espécie é considerada como um dos patogénios mais destrutivos e versáteis, sendo o que possui maior distribuição geográfica e maior número de hospedeiros susceptíveis à sua acção. É também notável a sua variedade à quimiotaxia, saprofitismo, patogeneidade, genética, resposta a fungicidas, resistência, esporulação e relações com o meio em que vive. Tudo isto contribuiu para que seja a espécie com maior capacidade destrutiva e das que mais atenção mereceu por parte dos fitopatologistas (Vieitez *et al.*, 1999).

Gravatt (1954) considera ainda que poucos fungos procedentes do exterior causaram tanta destruição como *P. cinnamomi*, responsável pela podridão das raízes de inúmeras plantas que lhe serviram de hospedeiros.

## **4.2 Classificação da espécie**

O género *Phytophthora* foi tradicionalmente classificado no reino *Fungi*, por se tratar de organismos heterotróficos, possuírem crescimento por polarização das hifas, esporos vegetativos adaptados à dispersão pelas correntes de ar ou pela água e utilizarem estratégias de infecção das plantas semelhantes às dos Fungos. Todavia, em *Phytophthora*, sempre foram reconhecidas características biológicas e fisiológicas que lhe conferiam singularidade no contexto do reino onde estava inserida, e que foram sucessivamente ampliadas com estudos posteriores (Gouveia, 2004).

Zentmyer (1987) refere as seguintes características do género *Phytophthora*, que não são usuais em organismos classificados como fungos: possui zoósporos que produzem a parede celular no decorrer do processo de enquistamento, necessário para que possam germinar e causar infecção; os zoósporos possuem dois flagelos com morfologia diferente; em cada oogónio é formado apenas um oósporo; a parede celular é constituída por  $\beta$ -glucano e alguma celulose, contrariamente aos fungos em que a quitina é o principal constituinte; durante a fase vegetativa são organismos diplóides, contrariamente aos fungos que são haplóides; acumulam micolaminarinas ( $\beta$  e 1-3-glucanas e manitol) como substâncias de reserva, enquanto os fungos acumulam o manitol e não sintetizam esteróis, razão pela qual não são sensíveis aos fungicidas que interferem com a sua biossíntese.

A classificação taxonómica do género *Phytophthora* é baseada essencialmente em características morfológicas. Estas, apresentam elevada plasticidade e são em número reduzido face ao elevado número de espécies descritas, tornando a classificação e identificação um processo difícil, laborioso e muito moroso (Gouveia, 2004).

Actualmente o género *Phytophthora* foi incluído num novo reino que Cavalier-Smith (1986) designou *Chromista* e Dick (1995) *Stramonopila*, atribuindo, desta forma, significado às singularidades biológicas, fisiológicas, bioquímicas e de ultra-estrutura celular em *Phytophthora*.

Neste trabalho adoptou-se a classificação de Alexopoulos e Mins (1979), e de Hawksworth *et al.*, que Abreu (1992c), considera como a que reúne maior consenso. Assim, o género *Phytophthora* pertence à família *Phytiacea*, ordem *Peronosporales*, série *Biflagellatae*, classe *Phycomyceta*. Actualmente esta classe já não é reconhecida e deu origem a outras, encontrando-se este parasita inserido na classe *Oomyceta*. O estudo de genes conservados como o 18S rRNA,  $\alpha$  e  $\beta$  – tubulina evidenciam que os fungos e os *Oomicetas* são filogeneticamente distintos (Sogin e Silberman, 2001).

A dificuldade na definição de critérios objectivos de identificação morfológica das espécies do género *Phytophthora*, a necessidade de aplicação de técnicas, meios de cultura e procedimentos muito definidos para a obtenção das estruturas morfológicas diferenciadoras determinou que as novas metodologias no domínio da bioquímica, da serologia e, mais recentemente, os métodos moleculares fossem aplicados na sistemática, classificação e filogenia do género *Phytophthora* (Gouveia, 2004).

### **4.3 Influência dos factores edafo-climáticos**

Os factores temperatura e humidade (solo e atmosfera), aliados à compacidade do solo, são os que exercem maior influência no desenvolvimento da *Phytophthora*.

De acordo com Gouveia (1993), a *Phytophthora cinnamomi* é directamente influenciada pela temperatura, estando o crescimento do micélio e a produção de esporângios fortemente relacionados com a temperatura e com o desenvolvimento da doença. As temperaturas máxima e mínima propícias à infecção podem variar consoante o hospedeiro (Zentmyer, 1981). No que concerne à temperatura do ar, esta é particularmente importante quando o seu valor está compreendido entre 20 °C e 30 °C. Apenas para valores acima ou abaixo destes limites é que as condições se mostram menos favoráveis, paralisando o seu desenvolvimento abaixo dos 5 °C e acima dos 35 °C, variando entre 23 °C e 27 °C o seu óptimo (Fernandes, 1966).

Gomes (1982) defende que existe um período em que se verificam valores apropriados à sua evolução, nomeadamente de Abril a Agosto, embora durante grande parte do ano as condições sejam desfavoráveis, enquanto que Fernandes (1966) refere que, geralmente, a acção destes parasitas é mais intensa em situações em que a temperatura do ar ultrapassa os 15 °C e as chuvas surgem com frequência, elevando a percentagem de humidade no solo e na atmosfera.

O excesso de água no solo é tido como o principal factor no desenvolvimento das doenças provocadas por *Phytophthora cinnamomi*, sendo referenciado em praticamente todas as situações epidémicas originadas por este parasita (Gouveia, 1993).

Relativamente à altitude, a doença causa mais estragos em regiões situadas abaixo dos 700 metros. Além dos 800 metros as infecções são raras e, quando surgem, apresentam um progresso lento (Fernandes, 1966). Este autor admite que este facto se verifica em virtude das características extremas do clima das terras altas, onde os Invernos são mais frios e os verões mais quentes, existindo longos períodos cujas temperaturas são pouco favoráveis ao seu desenvolvimento.

#### **4.4 Mecanismo de infecção**

Para ocorrer a infecção, é fundamental a reunião de condições adequadas de humidade e temperatura, o que usualmente sucede no início da Primavera (Böckmann, 1986). Os zoósporos, esporos providos de flagelos, são libertados pelos esporângios (Figura 6), que podem resultar da germinação de estruturas de resistência. Este processo de libertação dos zoósporos ocorre quando se encontram reunidas as condições adequadas de temperatura e humidade para o desenvolvimento da *Phytophthora*, o que usualmente ocorre na Primavera.

Abreu (1992c), refere que a *Phytophthora cinnamomi* parece formar esporângios (Figura 5) apenas em meios líquidos e Halssal e Williams (1984); Malajczuk (1979) apontam como temperatura favorável o intervalo entre os 18 °C e os 26 °C. Uma vez que a formação de esporângios é uma etapa essencial na infecção, Ko e

Ho (1983) desenvolveram um método para avaliar a possibilidade de existirem infecções, baseada na percentagem de germinação de esporângios de *Phytophthora cinnamomi*.



**Figura 5** – Esporângios de *Phytophthora cinnamomi* (Vieitez et al., 1999).



**Figura 6** – Zoósporo libertado pelo esporângio (Metcalf, 2006).

O processo infeccioso tem início com a atracção dos zoósporos para as raízes do hospedeiro (Zentmyer, 1970). O ataque do patógeno ao castanheiro é produzido pelas raízes, ou aproveitando uma via mecânica de entrada, produzida por uma lesão ou pela acção directa da própria *Phytophthora*, mediante enzimas capazes de provocar a destruição das paredes das células do tecido cortical das raízes. Deste modo, produz-se uma via de penetração das hifas que invadem a cavidade celular e acabam por consumir os componentes citoplasmáticos (Vieitez et al., 1999). A *Phytophthora cinnamomi* começa por invadir as raízes mais finas, preferencialmente a partir das extremidades ainda não lenhificadas, provocando a lise celular, passando seguidamente a colonizar as raízes mais interiores e mais grossas, em expansão centrípeta, até atingir o colo da raiz (Abreu, 1992c).

O avanço do patógeno dentro das raízes é produzido através dos tecidos vivos, em especial do câmbio, passando pelo mesmo das raízes ao tronco, pelo que continua a ascender até perto de um metro. A altura alcançada pelo patógeno no tronco do castanheiro depende das condições climatológicas. Se o ataque coincidir com a abundância de chuvas ou se é produzido num solo com muita água, a *Phytophthora* pode alcançar alturas mais elevadas, mas normalmente não supera um metro (Vieitez *et al.*, 1999).

De acordo com Davison *et al.*, (1994), as infecções geralmente começam no floema mas a *Phytophthora*, de forma rápida, morre ou torna-se dormente. Seguidamente, invade radialmente o xilema, no qual persiste durante muito mais tempo, motivo pelo qual os isolamentos têm mais sucesso neste tecido.

A atracção dos zoósporos para as raízes do hospedeiro é devida a um estímulo químico denominado quimiotaxia, que ocorre devido à exsudação, por parte das raízes, de várias substâncias químicas como aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e auxinas (Zentmyer, 1970). Este autor, defende ainda que a idade da planta, humidade do solo, temperatura e intensidade luminosa são considerados como factores determinantes da quantidade destes compostos excretados pelas raízes.

A água constitui um dos factores edafológicos que maior influência tem na sua difusão mediante os zoósporos e os oósporos (Figura 7) (Vieitez *et al.*, 1999). A evolução da doença, desde o foco inicial, normalmente segue o percurso da água no solo (Salesses *et al.*, 1993). A formação de estruturas de resistência e de esporângios são também afectados pela humidade do solo (Gisi *et al.*, 1980).

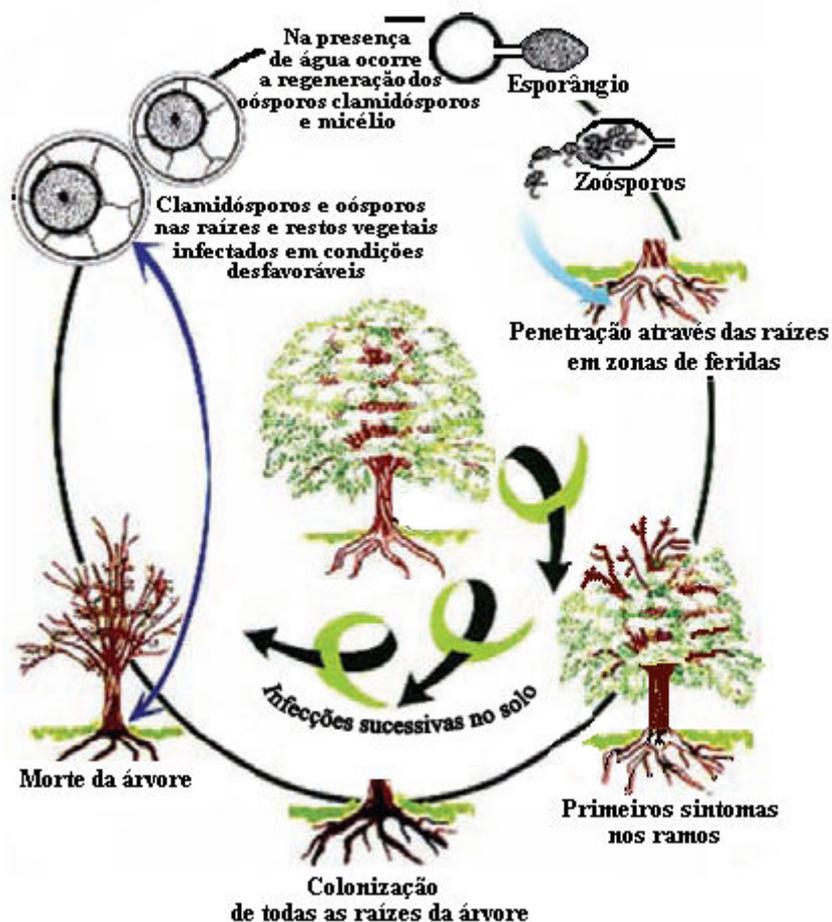


**Figura 7** – Oósporos de *Phytophthora cinnamomi* (Metcalf, 2006).

Potenciais da ordem de -2 a -3,5 MPa suprimem o crescimento das hifas e a produção de esporângios é limitada a potenciais entre -0,2 e -0,5 MPa, ocorrendo a produção ótima a potenciais mátricos entre -0,0015 MPa e -0,0025 MPa (Benson, 1984) ou mesmo em água livre. Desta forma, a doença não é comum em solos arenosos bem drenados e com baixo pH. A pH 3,3 a produção de zoósporos e esporângios é inibida. Contudo, a pH 4,0 a produção de esporângios é inibida enquanto a de zoósporos não o é. Assim, em propagação vegetativa por estaca a utilização de água de rega com pH 3,5 a 4,0 controla a produção de esporângios, prevenindo a produção de zoósporos e a doença. A produção de clamidósporos ocorre a potenciais muito mais negativos.

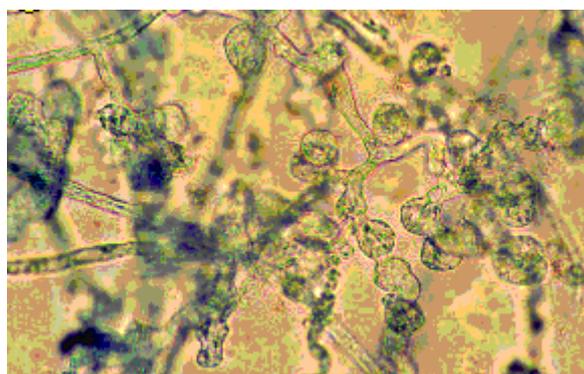
A *Phytophthora cinnamomi*, por possuir a capacidade de produzir um elevado número de zoósporos num curto período de tempo, por ser capaz de produzir vários tipos de esporos assexuados no decorrer do seu ciclo de vida e ainda por apresentar a capacidade de alterar a evolução do processo germinativo em função das condições ambientais, designadamente em viveiro, é capaz de, perante condições ambientais favoráveis, aumentar rapidamente o número de propágulos no solo (Gouveia, 1993).

Segundo Goidànich *et al.*, (1964), a *Phytophthora cinnamomi* ocorre frequentemente livre no solo, sobre a forma de hifas e zoósporos, esporos hialinos de 18-20 µm de diâmetro, durante os períodos de maior humidade e a temperaturas amenas (acima de 10 °C). Todavia, perante condições adversas do meio, estas estruturas sobrevivem mal, mantendo-se apenas por períodos de um a dois meses, na ausência de hospedeiros (Reeves, 1975; Malajczuk *et al.*, 1977; Erwin e Ribeiro, 1996). Pode também surgir à superfície das raízes, em zoósporos enquistados, micélio e clamidósporos. De acordo com Zentmyer (1970), estas últimas estruturas desempenham um papel preponderante na sobrevivência do patogénio.



**Figura 8** – Ciclo biológico da doença da tinta do castanheiro (Metcalf, 2006).

Nas estações mais adversas (Verão e Inverno), a *Phytophthora* sobrevive através do micélio (Figura 9) presente nas raízes infectadas e na matéria orgânica, mas principalmente sob a forma de oósporos e clamidósporos (Weste e Vithanage, 1978), que podem resistir por um período de um a seis anos, respectivamente, infectando o hospedeiro perante situações favoráveis (Böckmann, 1986; Erwin e Ribeiro, 1996).



**Figura 9** – Micélio de *Phytophthora cinnamomi* (Vieitez et al., 1999).

Zentmyer e Mircetich (1966) admitem que os clamidósporos (Figura 10), na ausência de substrato, podem manter-se viáveis, com teores de água no solo de apenas 3%, possuindo elevada resistência às condições adversas de temperatura. Este facto, possibilita a sobrevivência do patógeno onde os antagonistas muitas vezes se extinguem e facilitam a futura invasão do hospedeiro.



**Figura 10** – Clamidósporos de *Phytophthora cinnamomi* (Metcalf, 2006).

#### **4.4 Controlo biológico de *Phytophthora***

No controlo do crescimento e do desenvolvimento de *Phytophthora cinnamomi* intervém a manipulação, na medida do possível, dos microrganismos do solo, ou seja, a sua microfauna e microflora. Neles actuam factores complexos de tipo ambiental, físico e químico. Neste controlo também intervêm relações hospedeiro-patógeno, nem sempre conhecidas. Tudo isto nos mostra as dificuldades que enfrenta o controlo biológico da enfermidade da tinta. O interesse pelo controlo biológico da doença da tinta do castanheiro centra-se nas micorrizas, em especial nas ectomicorrizas, consideradas como protectoras das raízes, impedindo a penetração de *Phytophthora cinnamomi* (Vieitez *et al.*, 1999).

As micorrizas são uma associação simbiótica entre fungos e as raízes de uma planta, constituindo esta associação uma nova entidade morfológica de fisiologia própria, de que ambos os organismos beneficiam. Este benefício é concretizado para a planta na forma de uma capacidade nutritiva superior e numa maior protecção contra doenças (Abreu, 1992 a).

O mecanismo de resistência das micorrizas às enfermidades das raízes não é claro. O fungo micorrízico pode actuar utilizando os açúcares e os hidratos de carbono da raiz, reduzindo assim a quantidade de nutrientes estimuladores do patogénio, formando uma barreira mecânica com as suas hifas, que se oporia à sua penetração, e mantendo uma população microbiana protectora, ou excretando antibióticos capazes de o inibir. Outra possibilidade seria que a simbiose com o fungo modificasse o metabolismo do castanheiro, favorecendo a síntese de compostos fungicidas, tal como se demonstrou no caso dos pinheiros micorrizados por fungos do género *Leucopaxillus*, que determina a formação de nitrito de diatricina, composto que tem acção fungicida (Vieitez, 1999).

Segundo Vieitez *et al.*, (1996), não parece existir dúvida de que a micorrização das raízes do castanheiro com certas espécies de fungos está associada a uma maior resistência desta árvore à doença da tinta, enquanto que uma pobre micorrização está relacionada com uma mais fácil propensão à doença.

Em 1950 P. Veriot comprovou que os castanheiros, cujas raízes possuíam filamentos brancos ou rosáceos das ectomicorrizas, raramente sofriam o ataque de *Phytophthora cinnamomi*.

## 5. Mecanismos de resistência das plantas

A falta de mobilidade das plantas impede-as de se protegerem das condições ambientais adversas e do ataque de numerosos predadores e agentes patogénicos. Assim, no decorrer do processo evolutivo, em particular pela acção das mutações e da selecção natural, as plantas superiores desenvolveram vários mecanismos que, através de vias metabólicas específicas, lhes permitem sintetizar, acumular e secretar grande variedade de metabolitos secundários utilizados na formação de barreiras de natureza física e química e cujas principais funções parecem ser de dispersão, protecção e/ou autodefesa (Taiz e Zeiger, 1998).

A capacidade de defesa das plantas face aos agentes patogénicos encontra-se dependente dos mecanismos de percepção que estas possuem, que lhes permitem o reconhecimento dos agentes invasores bem como a activação de respostas de defesa (Innes, 1998). Assim, as plantas recebem sinais que as estimulam na produção de respostas face a esses agentes. Estes sinais denominam-se eliciadores e consistem em moléculas de origem biótica ou abiótica, capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas (Smith, 1996). Deste modo, Rodrigues Jr. (1980) considera que as plantas devem possuir mecanismos gerais de resistência que lhes permitem manter-se sãs em presença de um grande número de potenciais agentes patogénicos e pragas, bem como mecanismos mais específicos responsáveis por uma maior especificidade das relações hospedeiro-parasita. Uma vez que os mecanismos de defesa só são activados após o processo infeccioso ter iniciado, Keen (1990) considera que as plantas utilizam estratégias de defesa, em relação aos agentes patogénicos, muito similares aos vertebrados.

Simultaneamente, alguns patogénios co-evoluíram com os seus hospedeiros de forma a superarem essas barreiras, causando doenças nos mesmos (Ouchi, 1983). No entanto, a ocorrência de doenças nas plantas não é uma regra, mas sim uma excepção, uma vez que grande parte das associações entre plantas e microrganismos resulta numa interacção incompatível, não ocorrendo o desenvolvimento da doença (Sbalcheiro, 2006).

Segundo Agrios (1997), para que se verifique a ocorrência da doença é necessário: uma planta susceptível, um patogénio virulento e um ambiente favorável. O primeiro evento a ocorrer, no contacto planta-microrganismo, é o reconhecimento do possível patogénio pela planta e subsequente activação de mecanismos de defesa contra o invasor.

A resposta à acção do patogénio é um processo geneticamente determinado, altamente dinâmico e coordenado cuja manifestação e efectividade dependem da existência de mecanismos constitutivos e/ou da activação dos genes responsáveis pela indução de sistemas de defesa pós-formados no momento, local e magnitude adequados, após o reconhecimento do patogénio pelo hospedeiro. Forma-se, portanto, num sistema de múltiplos mecanismos onde o seu nível de expressão resulta do somatório das contribuições individuais de cada um e da influência do meio ambiente (Innes, 1998).

Os mecanismos de resistência são activados perto da área infectada para tentar prevenir a difusão do patogénio. O tempo de resposta à invasão é determinado pela velocidade com que a planta faz o reconhecimento da presença do agressor, desencadeando uma ou mais reacções de defesa. Se a resposta for mais rápida que o processo de infecção, a planta pode controlar a expansão do agente (resistência). A interacção entre um patogénio e uma planta é dita “compatível” quando conduz à doença, mas se a planta resiste à agressão a interacção é dita “incompatível” (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

A resistência natural das plantas aos microrganismos patogénicos, baseada numa grande variedade de barreiras químicas e físicas, defendida por (Taiz e Zeiger 1998), capazes de promover os mecanismos de defesa pré-existentes, é designada por Kiraly *et al.*, (1997) de constitutiva. Além destes, as plantas possuem mecanismos de defesa eficientes que permanecem inactivos ou latentes, que podem ser accionados após a célula vegetal contactar com agentes de indução. Neste caso, a resistência é dita dinâmica, pós-infeccional ou induzida (Agrios, 1997; Colson e Devernal, 1996).

A combinação das características estruturais e as reacções bioquímicas, envolvidas na defesa das plantas, é variável para diferentes relações hospedeiro-

patogénio. Dentro do mesmo patogénio ou hospedeiro, essa combinação varia também com a idade, tecido e tipo de órgão afectado da planta, com a condição nutritiva da mesma, bem como com as condições climáticas (Agrios, 1988).

A presença de compostos inibitórios pode intervir na resistência da planta, surgindo uma nova categoria denominada de compostos semi-constitutivos, ou seja, compostos que já existem nas células do hospedeiro, mas que aumentam a sua concentração após a infecção pelo parasita (Ingham, 1973).

Na maioria das vezes, os mecanismos de defesa das plantas são mais eficientes que os mecanismos bioquímicos de ataque dos patogénios, de modo que, nos ecossistemas naturais a resistência é mais frequente que a susceptibilidade (Vidhyasekaram, 1988).

### **5.1 Resistência Constitutiva**

Segundo Agrios (1988), é à superfície que se encontra a primeira linha de defesa das plantas contra os agentes patogénicos, a qual o patogénio vai ter de penetrar para provocar a infecção. A resistência natural das plantas a microrganismos patogénicos é baseada, em parte, numa variedade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes, denominados constitutivos (Kiraly *et al.*, 1997).

Na resistência constitutiva incluem-se as barreiras estruturais ou físicas das plantas, tais como: a presença de pêlos e ceras à superfície do órgão, a espessura da cutícula e das paredes das células epidérmicas, a estrutura e funcionamento dos estomas e a presença de esclerênquima (Gaspar, 1997).

Embora as características estruturais possibilitem à planta vários graus de defesa contra um possível ataque de patogénios, esta defesa não depende somente dessas barreiras mas também de substâncias produzidas nas células antes ou depois da infecção, resultando num sistema de defesa de múltiplos mecanismos, já anteriormente referido.

## **5.2 Resistência induzida**

A planta possui, além das barreiras estruturais ou físicas, mecanismos de defesa pós-infeccional, mais eficientes, accionados quando são expostas a agentes de indução (Kiraly *et al.*, 1997).

A resistência induzida (HR e SAR) acontece somente quando a planta sente a presença do agente agressor, transmitindo os sinais que activam os mecanismos de defesa. A percepção ocorre quando as moléculas indutoras das respostas se ligam a moléculas receptoras, provavelmente localizadas na membrana celular. Os indutores podem ser endógenos (fragmentos da própria planta, libertados pelo ataque de enzimas) ou exógenos (fragmentos do patogénio). Estes dois tipos podem actuar conjuntamente, tendo grande diversidade, uma vez que são substâncias derivadas de componentes estruturais da planta ou dos agressores. Este facto sugere que as células vegetais possuem diferentes receptores, associados a substâncias específicas, capazes de accionar os sinais que activam, no núcleo das células os genes ligados à defesa (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

A interacção planta-patogénio envolve mecanismos bioquímicos, onde são activados genes de alerta (Innes, 1998), resultando na síntese de novos compostos, além do aumento da actividade enzimática, importante para a defesa da planta. A formação de barreiras estruturais e a produção de compostos tóxicos intervêm no atraso da infecção (Sbalcheiro, 2006).

Assim, juntamente com os genes específicos de resistência, as plantas possuem genes que codificam proteínas que estão envolvidas na resposta da planta contra os patogénios. Destas, algumas são enzimas que fazem parte das respostas de defesa natural da planta e algumas acompanham a resposta de hipersensibilidade (Innes, 1998; Margis-Pinheiro *et al.*, 1999; Sbalcheiro, 2006).

Após a ocorrência da infecção, a planta desencadeia mecanismos de resistência morfológica induzidos, como a formação de estruturas ou tecidos que não podem ser penetradas, ou pelo menos extensivamente colonizadas pelo parasita, tais como a formação de tiloses, nas doenças que envolvem o sistema vascular, alterações nas paredes celulares devido à deposição de celulose, calose, lenhina ou sílica, e formação de barreiras suberosas (Gaspar, 1997).

Vários autores defendem que a resistência a um dado patógeno pode estar condicionada pela presença de determinados compostos químicos, quando presentes nos tecidos epidérmicos em quantidades significativas, tais como: terpenos, fenóis, esteróis, alcalóides, quinonas, poliamidas alifáticas, etc. (Farkas e Kiraly (1962); Mace e Herbert (1963)). Walker e Stahmann (1955), admitem que estes compostos, considerados inibidores, podem afectar o crescimento das hifas do patógeno, por se acumularem nas células mortas da periderme.

Agrios (1988), defende que muitos compostos fenólicos e taninos, que surgem em concentrações elevadas nas células de frutos ou folhas jovens, são apontados como responsáveis pela resistência a microrganismos patogénicos. Este autor defende ainda que determinados compostos fenólicos envolvidos na resistência à doença ocorrem com frequência nas plantas, sendo encontrados quer nas saudáveis quer nas doentes. No entanto, a sua síntese ou acumulação parece aumentar após a infecção.

Com base nos seus trabalhos, Mansfield (1982); Davies (1987); Matern e Kneusel (1988); Bell (1990), propuseram uma divisão em dois estádios para a estratégia defensiva das plantas. O primeiro relaciona-se com a rápida acumulação de compostos fenólicos no local da infecção, cuja função é impedir o crescimento do patógeno enquanto permite a activação de defesas específicas, como a síntese de fitoalexinas ou outras substâncias que se relacionam com o *stress*.

Agrios (1988), admite que as enzimas envolvidas na oxidação de fenóis desempenham um papel muito importante na resistência à doença, nomeadamente, a polifenoloxidase cuja actividade é devida, provavelmente, à sua capacidade de oxidar os compostos fenólicos em quinonas (compostos mais tóxicos para os microrganismos que os fenóis originais), e a peroxidase que, além de oxidar os fenóis também aumenta a taxa de polimerização desses mesmos compostos em substâncias com propriedades semelhantes à lenhina, que são depositadas nas paredes das células e papilas intervindo, posteriormente, com o desenvolvimento do patógeno.

Os taninos são poderosos inibidores da acção dos patógenos, graças à capacidade de se complexarem com as proteínas. Este facto poderá explicar o

papel desempenhado pelos taninos como protectores das plantas contra ataques de insectos, fungos e outros agentes patogénicos, cuja acção destrutiva depende da funcionalidade das suas enzimas. Pelas mesmas razões, a presença dos taninos contraria a degradação microbiana dos detritos orgânicos de origem vegetal, contribuindo para a formação do húmus ácido no solo (Castro e Fernandes, 1995).

A adaptação e a resistência são traduzidas por alterações profundas no metabolismo da célula vegetal, das quais se destaca a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos, activados por mecanismos complexos. Estas proteínas exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, de forma directa (combatendo o agente agressor) ou indirecta (mantendo a estrutura e as funções celulares) (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

### **5.2.1 Resistência local**

A determinação dos mecanismos de protecção desenvolvidos pelas plantas é essencial para a obtenção de variedades mais resistentes. As plantas podem ter resistência local, também conhecida por resposta de hipersensibilidade (HR), que é uma manifestação comum de resistência de plantas a doenças, caracterizada pela rápida morte de células ao redor do ponto de infecção, restringindo o sistema de ataque do patógeno. Desta forma, a planta consegue impedir o acesso do agente patogénico às células vizinhas, limitando assim a infecção (Mittler e Rizhsky, 2000; Yalpani *et al.*, 1991; Holub *et al.*, 1994).

A resposta de hipersensibilidade (HR) é considerada uma forma de resistência, sendo determinada por um único gene dominante no genótipo vegetal (Dawson e Hilf, 1992), manifestando-se como pequenas lesões necróticas em resposta da planta ao ataque de patógenos, ocorrendo poucas horas após o ataque (Agrios, 1998). Esta reacção já foi identificada há quase 100 anos, mas não é claro se a sua característica primária (morte celular) desempenha uma função directa na resistência ou é consequência de mecanismos de sinalização que conduziriam aos eventos capazes de inibir a acção do patógeno (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

Os aspectos fisiológicos da HR, comuns a todas as plantas e a diferentes patógenos, englobam o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de iões potássio ( $K^+$ ) e o ganho de iões hidrogénio ( $H^+$ ) pelas células, a destruição de compartimentos e espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de toxinas (fitoalexinas) e proteínas relacionadas com a defesa (conhecidas como proteínas PR, de “pathogenesis related”) (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

### **5.2.2 Resistência sistémica adquirida (SAR)**

A resistência sistémica adquirida – SAR (Systemic Acquired Resistance), designa o processo através do qual as plantas, após exposição a um agente indutor, activam os seus mecanismos de defesa, tanto no local da indução como em locais mais distantes, de forma mais ou menos generalizada (Sticher *et al.*, 1997).

A SAR protege a planta, juntamente com a resistência local, contra novos ataques de um mesmo patógeno. Após uma primeira infecção e induzida por diferentes agentes, a SAR torna a planta resistente, por várias semanas, a posteriores infecções. A protecção é eficaz contra um grupo de patógenos, mas não todos, variando consoante a espécie vegetal (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

A resistência sistémica adquirida envolve a acumulação de proteínas relacionadas com a patogénese (PR) como mecanismos induzidos de defesa da planta, podendo a indução resultar em alterações visuais (necroses) (Moraes, 1998), sendo geralmente induzida por patógenos ou activadores químicos (Van Loon *et al.*, 1998) e é caracterizada por apresentar um mecanismo de controlo não específico, isto é, a capacidade de controlar diversas doenças de origens diferentes (Van Loon *et al.*, 1998; Sticher *et al.*, 1997).

### **5.3 Controlo alternativo de doenças**

O método mais utilizado na protecção de plantas contra os seus patogénios é o uso da resistência genética (Lyon *et al.*, 1995). No entanto, nem todas as plantas são resistentes aos patogénios, e nem todo o material resistente consegue adaptar-se a diferentes regiões. Assim, tem sido cada vez mais frequente na agricultura, a utilização de pesticidas no controlo de doenças.

De acordo com Ghini e Kimati (2000), a adopção contínua do controlo químico pode acarretar o aparecimento de patogénios resistentes aos produtos utilizados, podendo, simultaneamente, contaminar alimentos e o meio ambiente, provocar a intoxicação de seres vivos, bem como o ressurgimento de algumas pragas e outras, anteriormente consideradas secundárias, podem assumir maiores proporções (Burg e Mayer, 1998). Consequentemente, estes efeitos têm estimulado a procura de métodos alternativos de controlo de doenças de plantas (Nakasone *et al.*, 1999).

Segundo Stangarlin *et al.*, (1999), o controlo alternativo de doenças pode realizar-se através do controlo biológico, da indução de resistência em plantas e da utilização de produtos alternativos ao controlo químico, como óleos essenciais e extractos vegetais.

O controlo biológico é efectuado pela manipulação de microrganismos antagónicos e/ou hiperparasitas (Bettioli e Ghini, 1995), enquanto que a indução de resistência envolve a activação de mecanismos de defesa latentes presentes nas plantas, tais como as fitoalexinas (Hammerschmidt e Dann, 1997).

As fitoalexinas são compostos anti-microbianos, relacionados com a resistência induzida da planta e sintetizados por ela em resposta à infecção bacteriana, que se acumulam nas células vegetais, limitando a propagação da infecção (Paschoalati e Leite, 1995). A acumulação de fitoalexinas nos tecidos das plantas indica uma resposta regulada de defesa às infecções do patogénio e também a eliciadores bióticos e abióticos (Degousée *et al.*, 1994).

Tem sido observada, em várias plantas, a indução de resistência como resposta ao tratamento prévio do hospedeiro com agentes bióticos ou abióticos,

designados eliciadores ou indutores de resistência (Kuc, 2000; Manandhar *et al.*, 1999). É activado, pelas plantas, um conjunto de respostas após o reconhecimento de um patógeno ou da aplicação exógena de um indutor, que as capacita para responderem rapidamente à infecção, promovendo uma resposta de resistência.

O reconhecimento planta-microrganismo ocorre devido à interacção entre uma molécula eliciadora do patógeno ou da própria planta, libertada pela acção do agente patogénico, e de um receptor proteico presente na membrana celular da planta (Hahn, 1996). As moléculas eliciadoras são de natureza variável sendo mais comum a ocorrência de hidratos de carbono, lípidos, proteínas e glicoproteínas. Também a origem pode ser variável, por exemplo, os lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogénicos e leveduras e hidratos de carbono da parede celular de fungos não patogénicos são alguns dos eliciadores capazes de activar mecanismos de defesa de plantas (Coventry e Dubery, 2001; Wulff e Paschoalati, 1999; Koch *et al.*, 1998).

As plantas tratadas com moléculas eliciadoras, além de poderem ter uma resposta de resistência, podem ter uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com a indução de resistência. Este fenómeno caracteriza-se pela transformação de uma relação compatível entre a planta e o patógeno, em que ocorre a doença, numa relação incompatível. Os compostos produzidos pelas plantas, no decorrer do processo de infecção, são fundamentais na resistência ao organismo invasor e à sobrevivência da planta (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999).

De acordo com Taíz e Zeiger (2002), estas defesas protegem as plantas de tal forma que podem levar à morte as células próximas do local onde ocorreu a infecção ou até conduzir à auto-destruição de toda a planta.

## 6. Material e Métodos

### 6.1 Material vegetal

Neste estudo foram usadas plantas com 2 anos de castanheiros híbridos (*C. crenata* x *C. sativa*), pertencentes a uma colecção de clones resistentes à doença da tinta, do Centro Nacional de Sementes Florestais de Amarante (CENSEF), bem como plantas de castanheiro europeu (*C. sativa*), a cultivar Judia e o clone com resistência COLUTAD, provenientes dos viveiros da UTAD. Os híbridos FBRO eram oriundos de Bromela e os híbridos FSRD de Serradela, daí as designações atribuídas. As plantas foram previamente envasadas em vasos de 15 litros contendo uma mistura de turfa e casca de pinheiro (2:1), tendo havido o cuidado de assegurar as regas em volume e frequência adequadas, a fim de garantir que as plantas não sofressem quaisquer sintomas de stress hídrico.

Foram comparados os clones híbridos: FBRO 057, FBRO 224, FSRD 079, provenientes do CENSEF; Ca90 produzido no INRA, conhecido pelo seu elevado grau de resistência à *Phytophthora cinnamomi*; COLUTAD, que é um clone com elevado grau de dominância em *C. sativa*; S12 (*C. sativa*) e plantas da variedade Judia (*C. sativa*) enxertadas em porta-enxertos produzidos a partir de sementes de *C. sativa*.

Cada lote era constituído por 6 plantas, tendo-se separado um grupo de 4 plantas para inoculação, ficando as restantes a funcionar como controlo.

Antes de se proceder à inoculação, retiraram-se cerca de 4 folhas de cada uma das plantas pertencentes aos diferentes lotes, as quais foram guardadas à temperatura de -20 °C, para mais tarde serem utilizadas nos diferentes ensaios.

#### 6.1.1 Inoculação com *Phytophthora cinnamomi*

A inoculação por ferida em plantas intactas foi a metodologia adoptada na primeira parte do trabalho experimental. Como inóculo foi utilizado o micélio do oomiceta *Phytophthora cinnamomi* (Figura 11) obtido por crescimento em PDA (Potato Dextrose Agar), durante cinco dias na micoteca da Protecção de Plantas

da UTAD. O isolamento UTAD nº 107 foi identificado como *Phytophthora cinnamomi* pelo IMI (International Mycological Institute – Surrey, RU) recebendo o número de código 340340.



**Figura 11** – Micélio do oomiceta *Phytophthora cinnamomi*.

A inoculação sólida com *Phytophthora cinnamomi* foi realizada ao fim da tarde, em Junho de 2005, no local onde as plantas se encontravam distribuídas (Figura 12), em 4 plantas de cada uma das populações em estudo. Nas plantas controlo foi utilizada a mesma metodologia, à excepção da administração de PDA contendo micélio de *Phytophthora cinnamomi*.

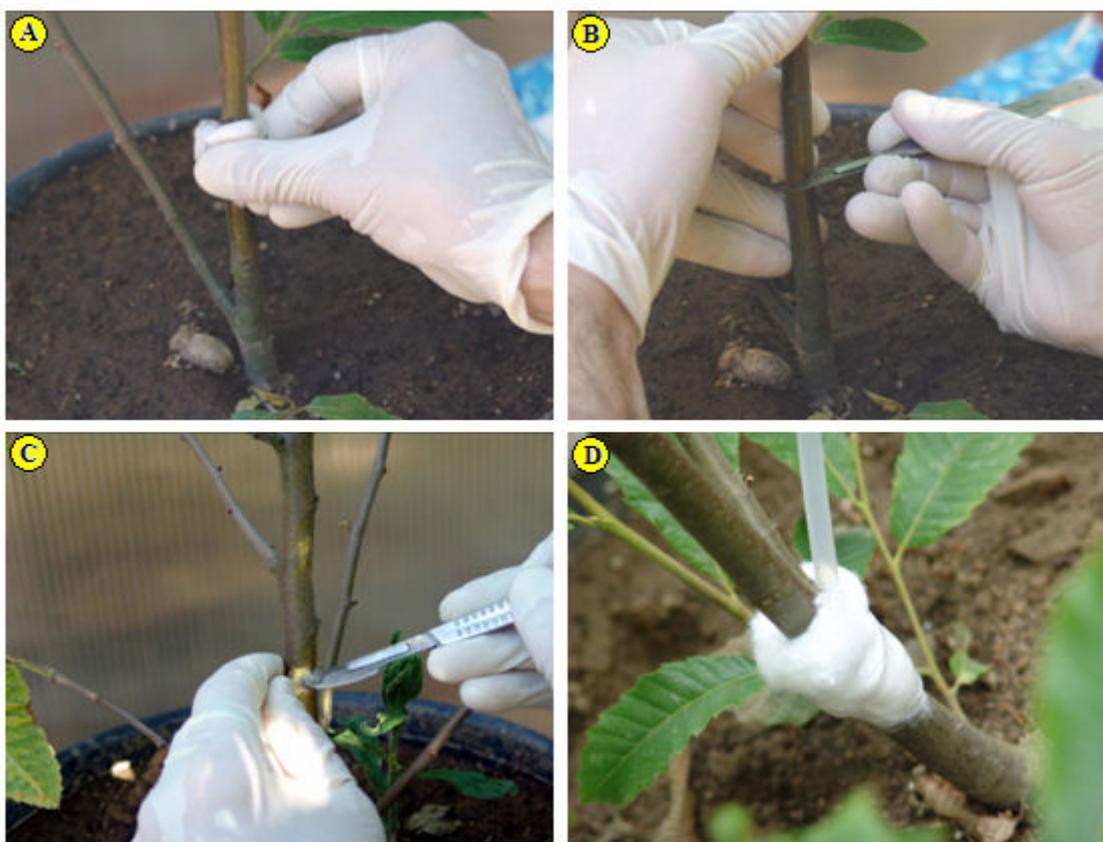


**Figura 12** – Local onde as plantas se encontravam distribuídas.

Antes de se proceder à inoculação sólida, seleccionou-se uma zona do caule, livre de ramificações, que foi desinfectada com álcool etílico para, posteriormente,

ser sujeita à incisão (Figura 13-A). A incisão em “T” realizou-se com o auxílio de um *bisturi* (Figura 13-B) e, posteriormente, com a ajuda de uma pinça, colocou-se um pedaço de micélio de *Phytophthora cinnamomi*, entre a casca e o tecido cambial (Figura 13-C), sendo idêntica a quantidade de micélio administrada a cada planta.

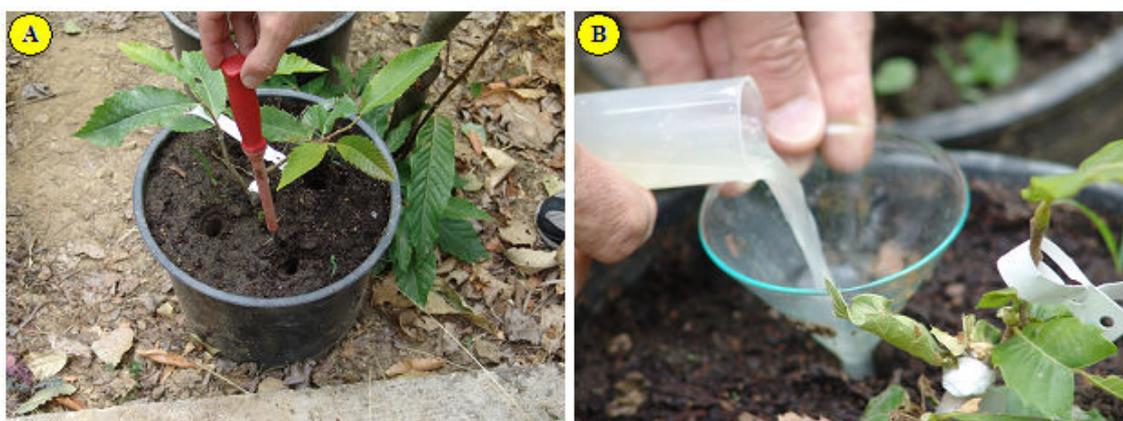
Finalmente, e de forma a proporcionar um ambiente húmido favorável ao desenvolvimento da *Phytophthora cinnamomi*, a zona da ferida foi coberta com algodão humedecido em água destilada o qual, por sua vez, foi revestido com uma película de *parafilme* (Figura 13-D), tendo ficado uma zona a descoberto, de forma a facilitar o humedecimento da zona de inoculação, no decurso do período de incubação.



**Figura 13** – Etapas realizadas no decorrer da inoculação sólida: A – desinfecção, com álcool etílico, de uma zona do caule livre de ramificações; B - incisão em “T” com o auxílio de um bisturi; C – introdução de um pedaço de micélio de *Phytophthora cinnamomi*, entre a casca e o tecido cambial e D - cobertura da zona da ferida com algodão humedecido em água destilada o qual, por sua vez, foi revestido com uma película de parafilme.

Decorridos 7 dias, e de forma a garantir a infecção por *Phytophthora cinnamomi*, procedeu-se a uma nova inoculação, desta vez no estado líquido, proporcionando um mecanismo mais semelhante ao que ocorre na natureza.

No que concerne à inoculação líquida, esta realizou-se em diferentes zonas do solo do vaso onde se encontravam as diferentes plantas. Procedeu-se à abertura de quatro buracos no solo (Figura 14-A) onde foi introduzida, com o auxílio de um funil, uma solução com micélio de *Phytophthora cinnamomi* (Figura 14-B). Seguidamente, os buracos onde foi introduzida a solução foram cobertos com solo e, por último, procedeu-se à rega dos vasos, de forma a facilitar a difusão da *Phytophthora cinnamomi*.



**Figura 14** – Etapas realizadas no decorrer da inoculação líquida: A – abertura dos buracos no solo dos vasos; B – introdução, no solo do vaso, da solução com micélio de *Phytophthora cinnamomi*.

Decorridos 42 dias após a inoculação, procedeu-se a uma nova recolha de tecidos foliares, um número médio de 4 folhas de cada planta, as quais foram guardadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras obtidas nesta recolha, juntamente com as recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação foram utilizadas nos seguintes ensaios: doseamento da proteína total, doseamento dos açúcares totais, doseamento dos açúcares redutores, doseamento dos fenóis totais, doseamento das proantocianidinas e doseamento da clorofila total. Em todos os ensaios foram utilizados duplicados e, nalguns casos, trabalhou-se com triplicados.

## **6.2 Análises Bioquímicas**

### **6.2.1 Metodologia para o doseamento da proteína total**

Num almofariz foram macerados 0,2 g de amostras de folhas (tecido fresco) com azoto líquido, até à obtenção de um pó muito fino, ao qual foram adicionados 5 ml de tampão fosfato 10 mM (pH 6). Estas suspensões foram transferidas para tubos de centrífuga e foram centrifugadas (12000 rpm, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C). Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, com o auxílio de pipetas de “Pasteur”.

Foram transferidos 50 µl de cada uma das amostras para um tubo de ensaio, aos quais se adicionaram 150 µl de água. Seguidamente, foram adicionados 800 µl de reagente de Bradford concentrado e agitou-se vigorosamente em vórtice. Aguardaram-se 5 minutos e procedeu-se à leitura da absorvância a 595 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca Spectronic. Os resultados obtidos foram expressos mg proteína/g peso fresco, tendo a albumina de soro bovino como proteína padrão (Bradford, 1976).

### **6.2.2 Metodologia para o doseamento dos açúcares totais**

Num almofariz foram macerados 0,2 g de amostras de folhas (tecido fresco) com azoto líquido, até à obtenção de um pó muito fino, ao qual foram adicionados 5 ml de tampão fosfato 10 mM (pH 6). Estas suspensões foram transferidas para tubos de centrífuga, onde foram centrifugadas (12000 rpm, durante 30 minutos à temperatura de 4°C). O sobrenadante foi transferido para outro tubo, com o auxílio de uma pipeta de “Pasteur”.

Posteriormente, foram transferidos para um tubo de ensaio: 25 µl de amostra; 200 µl de fenol e 1000 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Aguardaram-se 10 minutos e, de seguida, levaram-se as amostras ao vórtex para homogeneizar. Aguardaram-se mais 10 minutos e procedeu-se à leitura da absorvância das amostras, a 540 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca Spectronic.

Os resultados obtidos foram expressos em mg açúcar/g peso fresco, tendo sido realizada uma curva padrão com glicose (Dubois *et al.*, 1956).

### **6.2.3 Metodologia para o doseamento dos açúcares redutores**

Num almofariz foram macerados 0,2 g de amostras de folhas (tecido fresco) com azoto líquido até à obtenção de um pó muito fino, ao qual foram adicionados 10 ml de tampão fosfato 10 mM (pH 6). Estas suspensões foram transferidas para tubos de centrífuga, onde foram centrifugadas (12000 rpm, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C). Com uma pipeta de “Pasteur”, o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Seguidamente, transferiram-se 400 µl de amostra para um tubo de ensaio contendo 500 µl de reagente de DNS (preparado com 5g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 10 ml de NaOH 2N e 250 ml de água destilada, aos quais se adicionaram 150 g de sal de la Rochelle, per fez-se o volume de 500 ml com água destilada e guardou-se num frasco escuro).

Os tubos foram aquecidos em banho-maria (100 °C), durante 5 minutos. Depois de arrefecidos até à temperatura ambiente, foram-lhe adicionados 5 ml de água destilada.

A absorvância foi lida a 540 nm, num espectofotómetro UV/VIS da marca Spectronic, e os resultados expressos em mg de glucose/g de peso fresco, tendo sido realizada uma curva padrão com glicose (Dubois *et al.*, 1956).

### **6.2.4 Metodologia para o doseamento dos fenóis totais**

O método utilizado para a extracção dos fenóis totais foi o descrito por Swain e Hills (1959), com algumas alterações. Num almofariz foram macerados 0,2 g de amostras de folhas (tecido fresco) com azoto líquido até à obtenção de um pó muito fino, ao qual foram adicionados 10 ml de solução MeOH/H<sub>2</sub>O. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio rolhados e levadas ao digestor à temperatura de 80°C, durante 45 minutos, para extrair os fenóis.

Seguidamente, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm, durante 30 minutos e guardaram-se os respectivos sobrenadantes.

Na determinação da concentração de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (Marigo, 1973; Slinkard e Singleton, 1977; Scalbert *et al.*, 1989). O reagente de Folin-Ciocalteu após reacção com os fenóis forma um complexo de cor azul em meio básico.

Foram preparadas soluções padrão de ácido gálico com concentrações compreendidas entre 0 e 150 mg/L.

Em cada tubo de ensaio, a 500 µl de amostra foram adicionados 6 ml de água e 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 30 minutos (às escuras) adicionaram-se 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% (m/v), para estabilização da cor. Esta solução repousou 30 minutos, a 20°C, seguindo-se a determinação da absorvância a 750 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca Spectronic. Os resultados foram expressos em mg de fenóis totais/g peso fresco.

#### **6.2.5 Metodologia para o doseamento das Proantocianidinas**

Pesaram-se 0,2 g de folhas (tecido fresco), que foram colocadas em tubos de ensaio. Posteriormente, adicionaram-se 500 µl de acetona a 70%, 3 ml de butanol/HCl e 100 µl de solução de Fe III. Os tubos foram rolhados e colocados no digestor, durante 60 minutos, à temperatura de 95°C.

Foi realizada uma curva padrão como uma amostra de cloreto de cianidina. A absorvância foi lida a 550 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca Spectronic e os resultados foram expressos em mg de proantocianidina/g peso fresco (Porter *et al.*, 1986).

#### **6.2.6 Metodologia para o doseamento da clorofila total**

Num almofariz foram macerados 0,2 g de amostras de folhas (tecido fresco) com azoto líquido até à obtenção de um pó muito fino, ao qual foram adicionados 10 ml de acetona 80% (4°C). Durante todo o procedimento as amostras foram protegidas da acção da luz.

As amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman n.º1, sendo o volume completado para 15 ml com acetona (80%). Determinou-se a absorvância das amostras a 663 e 645 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca Spectronic, sendo o conteúdo de clorofila total de cada amostra expresso em mg de clorofila/g de peso fresco (Arnon, 1949; Hammerschmidt e Nicholson, 1977).

## 7. Resultados e discussão

### 7.1 Conteúdo de proteína total

A análise do conteúdo em proteína existente em folhas de castanheiro, recolhidas em diferentes clones, no dia em que se procedeu à inoculação, evidenciou algumas diferenças entre estes. Em todos os clones, à excepção do S12, a variabilidade é grande, chegando mesmo a ser significativa. No entanto, estes clones não apresentaram respostas semelhantes à inoculação decorridos 42 dias do início do ensaio (Figura 15).

O COLUTAD apresentou um elevado incremento no conteúdo em proteína (Figura 15 b), tanto nas plantas inoculadas (36%) como nas não inoculadas (65%), não nos permitindo, por isso, atribuir este aumento de síntese proteica a uma resposta à *P. cinnamomi*.

No caso do clone Ca90, ao fim dos 42 dias, apenas as plantas não inoculadas apresentaram valores médios de proteína significativamente elevados (98%), quando comparados com os valores obtidos para as plantas no dia zero, pelo que os resultados não poderão ser justificados pela infecção provocada por *P. cinnamomi*.

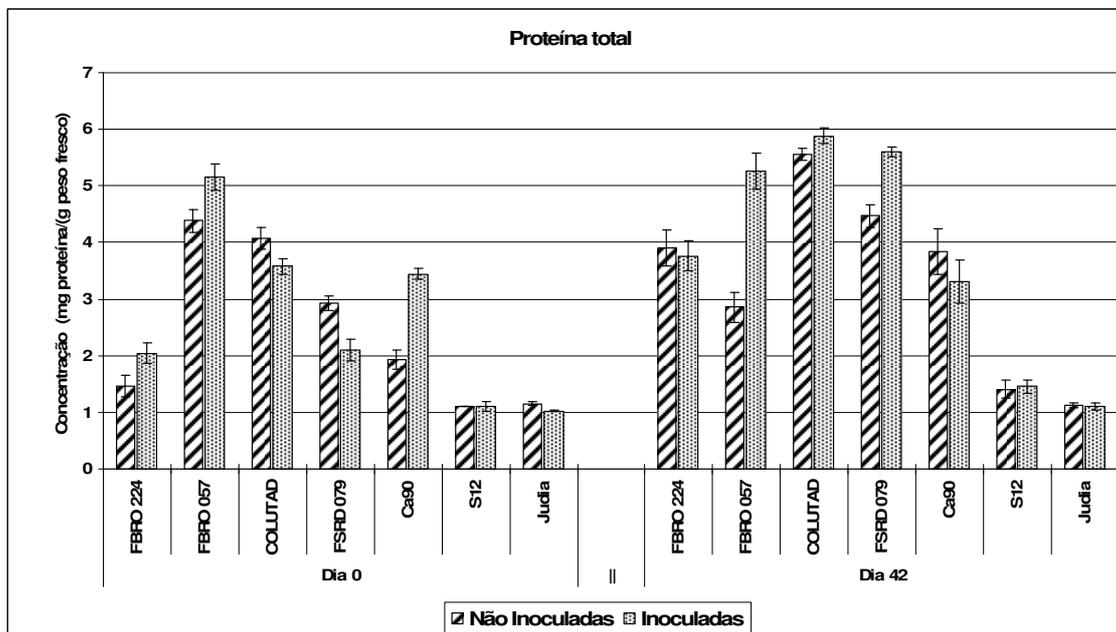
O padrão e a variação observada para o clone FSRD 079 foi semelhante ao obtido para o COLUTAD, tendo-se verificado um aumento para as plantas inoculadas (168%) e não inoculadas (52%) ao fim dos 42 dias de ensaio, comparativamente com o dia zero. Neste caso, como a planta inoculada apresenta um aumento muito significativo, este poderá ser atribuído à presença de *P. cinnamomi*.

O clone FBRO 224 também apresentou um aumento significativo no conteúdo de proteína total para as plantas não inoculadas (166%) e inoculadas (84%), decorridos os 42 dias do ensaio. Porém, não se registaram diferenças significativas resultantes da inoculação.

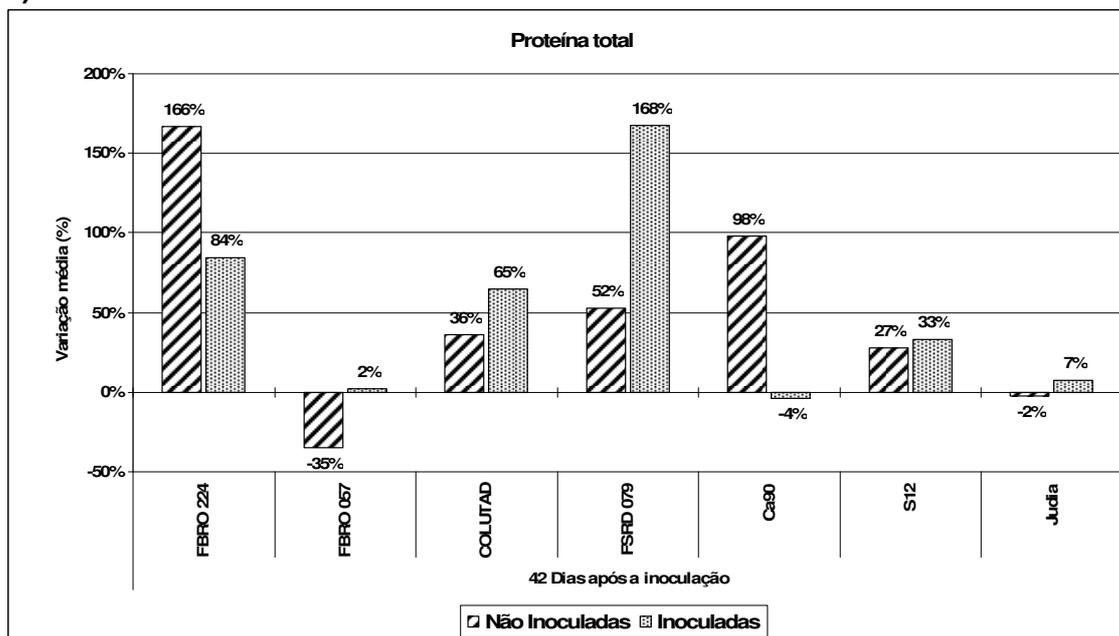
O clone S12 apresentou, ao fim dos 42 dias, um aumento significativo no conteúdo em proteína para as plantas inoculadas (27%) e não inoculadas (33%). No entanto, entre os dois grupos de plantas (inoculadas e não inoculadas) não

houve diferenças significativas, pelo que não podemos atribuir estes resultados à presença de *P. cinnamomi*.

a)



b)



**Figura 15** – Em a) apresenta-se o conteúdo de proteínas totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de proteínas totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, decorridos 42 dias do início do ensaio. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

Decorridos 42 dias do início do ensaio, as plantas não inoculadas pertencentes ao clone FBRO 057 evidenciaram uma diminuição significativa de 35% nos teores de proteína, enquanto que as plantas inoculadas mostraram um pequeno aumento, comparativamente com os valores inicialmente registados. No fim do ensaio, analisando ambas as plantas (inoculadas e não inoculadas), verificamos diferenças bastante significativas, facto que poderá ser atribuído a uma eventual resposta à infecção por *P. cinnamomi*.

Relativamente ao clone Judia, que funcionou como controlo visto ser susceptível à *P. cinnamomi*, 42 dias após o início do ensaio, não foram notadas diferenças significativas no conteúdo proteico de ambas as plantas. Assim, será admissível que o mecanismo de resistência à *P. cinnamomi* possa estar associado a uma resposta ao nível proteico, pois este clone foi o único cujo conteúdo em proteína total não apresentou qualquer alteração significativa pela inoculação.

Alguns dos mecanismos de defesa das plantas envolvem a produção de algumas proteínas como sejam as peroxidases, quitinases entre outras. De acordo com Bach (1997), a enzima  $\beta$ -1,3 glucanase é uma das proteínas PR (proteínas relacionadas com a resistência) consideradas como parte integrante do mecanismo de indução de resistência em diferentes espécies de plantas e patogénios. Isto deve-se ao facto de a  $\beta$ -1,3 glucanase ser uma enzima capaz de hidrolisar as glucanas presentes na parede celular dos fungos, sendo libertada das células do hospedeiro para os espaços intercelulares durante a patogénese, impedindo, desta forma, o desenvolvimento dos fungos.

Com base nos resultados obtidos, não nos parece que o mecanismo pelo qual alguns destes clones apresentam resistência à doença da tinta esteja dependente de um estímulo significativo na síntese de uma qualquer proteína. No entanto, não poderemos excluir a possibilidade de as diferenças de susceptibilidade à doença estarem relacionadas com a presença de alguma via metabólica já existente e que, por isso, não necessitará de ser estimulada para conferir resistência contra a *P. cinnamomi*.

Relativamente ao conteúdo em proteína, não podemos também esquecer que uma qualquer alteração no conteúdo proteico não poderia ser de imediato

atribuída a uma resposta da planta, devendo ser analisada a possibilidade desse aumento ser o resultado da proliferação da *P. cinnamomi*, conduzindo ao aumento de proteína. Análises mais detalhadas, como a análise qualitativa de aminoácidos, poderiam realizadas para a compreensão do significado desse aumento.

## **7.2 Conteúdo de açúcares redutores**

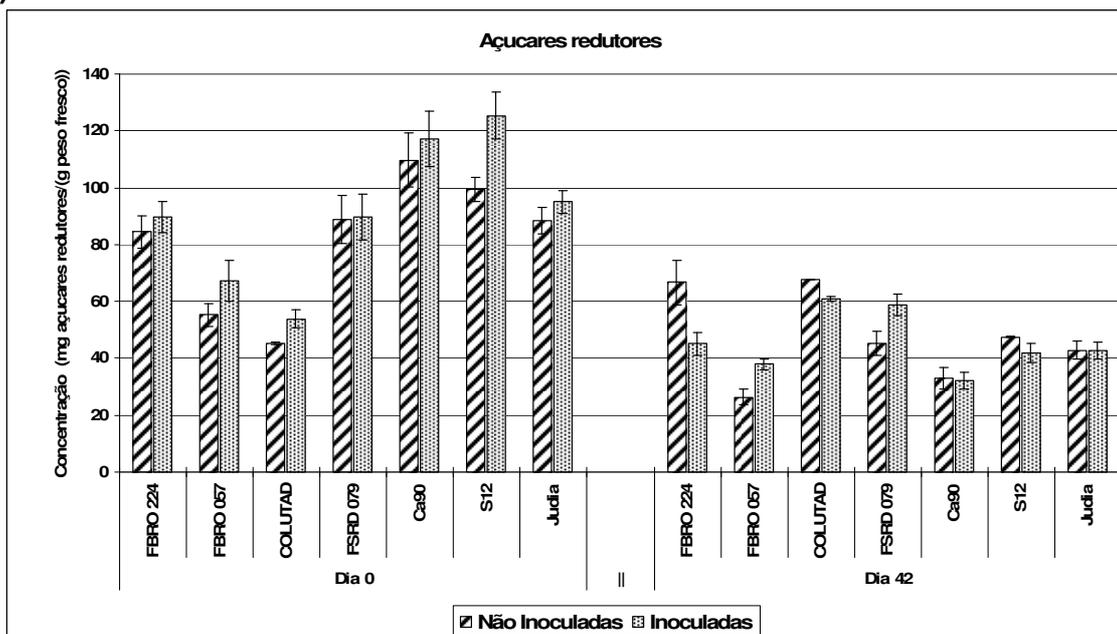
A análise do conteúdo de açúcares redutores existentes em folhas de castanheiro, no dia zero, evidenciou que as plantas pertencentes ao lote “inoculadas” de todos os clones apresentaram maior conteúdo em açúcares redutores que as plantas pertencentes ao lote “não inoculadas”, no entanto, esta diferença apenas é estatisticamente significativa para o clone S12 e COLUTAD (Figura 16).

Decorridos 42 dias após a inoculação, podemos observar um padrão de variação semelhante para todos os clones, isto é, uma diminuição, à exceção do clone COLUTAD que evidenciou um aumento neste conteúdo.

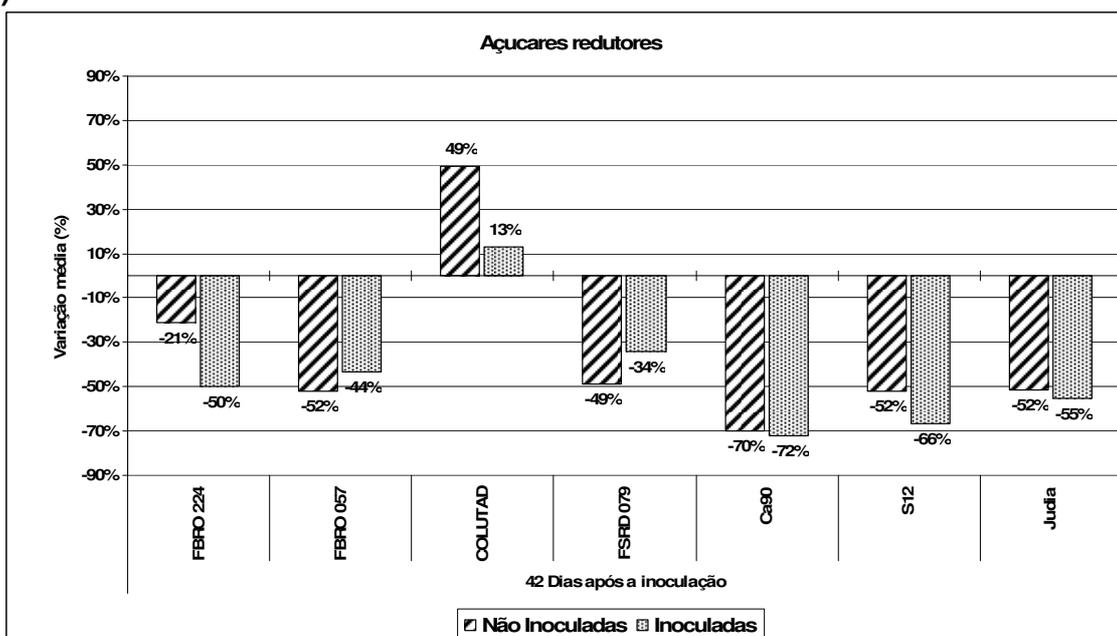
Ao fim dos 42 dias, verificou-se uma diminuição significativa no conteúdo de açúcares redutores nas plantas inoculadas pertencentes aos clones FBRO 224 (50%), FBRO 057 (44%), FSRD 079 (34%), Ca90 (72%), S12 (66%) e Judia (55%). As plantas não inoculadas pertencentes aos mesmos clones também apresentaram o mesmo padrão de variação, ou seja, uma diminuição de 21%, 52%, 49%, 70%, 52% e 52% para os clones FBRO 224, FBRO 057, FSRD 079, Ca90, S12 e Judia, respectivamente. As plantas não inoculadas pertencentes ao clone FBRO 224 também evidenciaram uma diminuição de 21% no conteúdo de açúcares redutores, no entanto esta diminuição não foi estatisticamente significativa.

Contrariamente, o clone COLUTAD, 42 dias após a inoculação, apresentou um incremento no conteúdo de açúcares redutores, quer nas plantas inoculadas (13%) quer nas não inoculadas (49%).

a)



b)



**Figura 16** – Em a) apresenta-se o conteúdo de açúcares redutores em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de açúcares redutores observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

### **7.3 Conteúdo de açúcares totais**

A análise do conteúdo de açúcares totais presentes em folhas de castanheiro, no dia zero, evidenciou algumas diferenças entre os clones, no entanto, estas revelaram-se estatisticamente significativas apenas para as plantas pertencentes aos clones FBRO 224 e S12 (Figura 17).

O clone FBRO 224, 42 dias após a inoculação, apresentou um aumento significativo no conteúdo de açúcares totais tanto nas plantas inoculadas (41%) como nas não inoculadas (39%), pelo que não podemos atribuir este aumento à presença de *P. cinnamomi*.

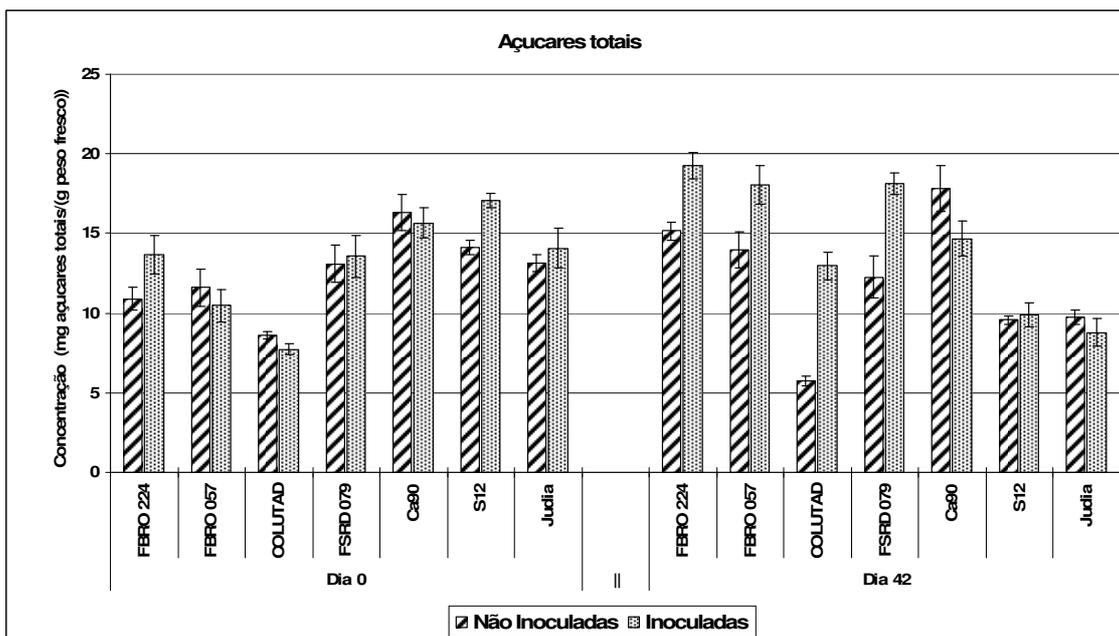
O clone FBRO 057 também revelou um aumento no teor de açúcares para ambas as plantas ao fim dos 42 dias. No entanto, apenas para a planta inoculada esse aumento foi estatisticamente significativo (72%), facto que poderá ser atribuído à presença de *P. cinnamomi*.

A presença do patógeno terá também influenciado o metabolismo do clone COLUTAD uma vez que, 42 dias após a infecção, este também mostrou um aumento significativo destes compostos para as plantas inoculadas (68%), enquanto que as plantas não inoculadas evidenciaram uma significativa diminuição (34%) no teor de açúcares totais.

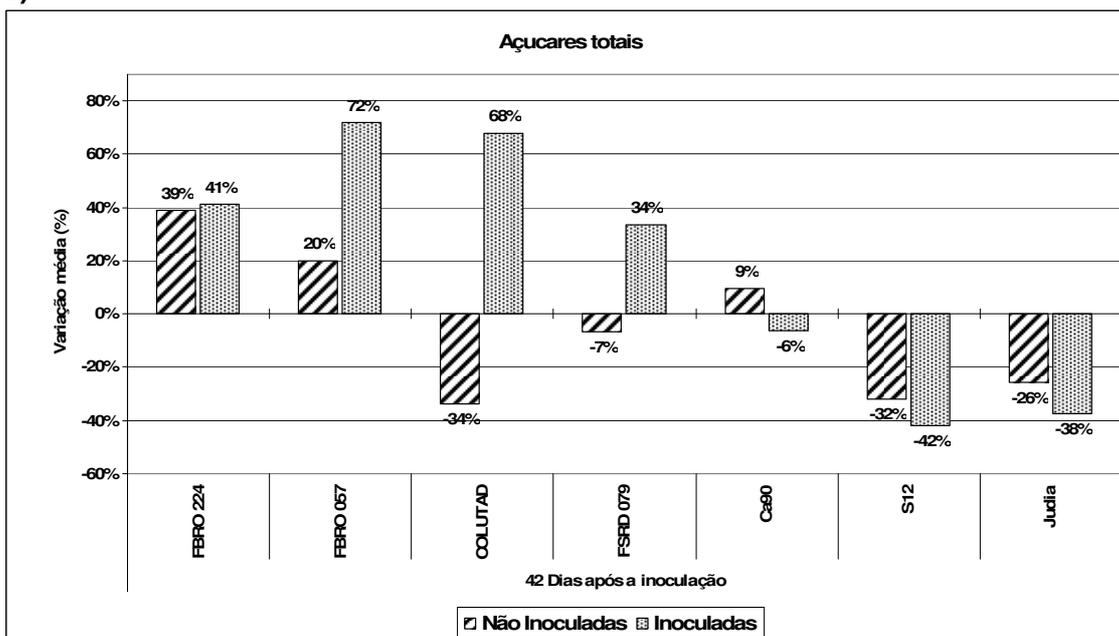
O padrão e variação observados para o clone FSRD 079 foi semelhante ao observado para o COLUTAD, ou seja, as plantas inoculadas evidenciaram um aumento significativo (34%) no conteúdo de açúcares totais, enquanto que as plantas não inoculadas apresentaram uma diminuição neste conteúdo que, no entanto, não foi significativa. Assim, podemos afirmar que os resultados terão sido influenciados pela presença de *P. cinnamomi*.

Relativamente ao clone Ca90, ao fim dos 42 dias, foi registado um aumento de 9% no teor de açúcares totais para as plantas não inoculadas e uma diminuição de 6% no mesmo conteúdo, para as plantas inoculadas. No entanto, a diferença não é estatisticamente significativa.

a)



b)



**Figura 17** – Em a) apresenta-se o conteúdo de açúcares totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de açúcares totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

Os resultados obtidos para os clones S12 e Judia foram distintos dos observados para os restantes. Relativamente ao S12, no dia zero, as plantas apresentavam

diferença significativa no conteúdo de açúcares totais e, 42 dias após a inoculação, verificou-se uma diminuição de 32% para as plantas inoculadas e uma diminuição de 42% para as não inoculadas, sendo ambas as variações no conteúdo de açúcares totais bastante significativas. Uma diminuição significativa também se verificou ao fim dos 42 dias para o clone Judia, apresentando as plantas inoculadas uma diminuição de 38% e as não inoculadas uma diminuição de 26% no conteúdo de açúcares totais, tendo como comparação os teores obtidos no dia zero. No entanto, o decréscimo no conteúdo de açúcares totais, evidenciado pelas plantas pertencentes ao clones S12 e Judia, não poderá ser atribuído à presença do patógeno, uma vez que ambas as plantas (inoculadas e não inoculadas) não apresentaram variação significativa entre elas, no final do ensaio.

Os resultados obtidos nos açúcares totais e açúcares redutores estarão certamente relacionados com a acção da *P. cinnamomi* na bioenergética da planta (capacidade fotossintética), visto que a fixação de carbono e a síntese de açúcares estão relacionados com a fotossíntese. Dos resultados que temos disponíveis para o efeito da infecção pela *P. cinnamomi* na eficiência fotossintética não nos é, no entanto, possível compreender o padrão relacional entre o efeito da inoculação na fotossíntese e na síntese de açúcares.

Estudos realizados com as mesmas plantas demonstram que os clones COLUTAD, FBRO 057, FBRO 224, FSRD 079 e o S12 apresentaram um estímulo (respectivamente 11, 18, 35, 13 e 11 %) na fotossíntese, como resultado da inoculação. Para o clone Ca90 foi observada uma diminuição de 1% na taxa fotossintética e a Judia (planta susceptível) apresentou um decréscimo (19%) significativo resultante da inoculação com a *P. cinnamomi* (Dinis, 2006).

Os clones COLUTAD, FBRO 057, e FSRD 079 apresentam uma relação positiva entre o estímulo da fotossíntese e o aumento no conteúdo em açúcares totais. O clone Ca90 que, como referimos, evidenciou uma diminuição de 1% na taxa fotossintética apresentou também um ligeiro decréscimo no conteúdo de açúcares totais. No caso do clone Judia, a diminuição observada na fotossíntese reflectiu-se também no conteúdo em açúcares totais. No caso dos clones FBRO 224 e S12, apesar de se ter observado um aumento na fotossíntese como resultado da

inoculação, o conteúdo em açúcares sofreu uma inibição maior devido à inoculação. Para o clone S12 verificou-se uma diminuição no teor de açúcares totais, enquanto que para o FBRO 224 o aumento observado não foi de modo algum proporcional ao aumento da fotossíntese.

#### **7.4 Conteúdo de fenóis totais**

A análise do conteúdo em fenóis totais existente em folhas de castanheiro, no dia zero, evidenciou variações significativas para todos os clones, à exceção dos clones COLUTAD e Judia (Figura 18 a)).

Decorridos 42 dias após a inoculação com *P. cinnamomi*, verificou-se um aumento do conteúdo fenólico em todas as plantas, à exceção das plantas não inoculadas pertencentes ao clone S12, que não sofreram qualquer variação. No entanto, os aumentos verificados não foram significativos para todas as plantas.

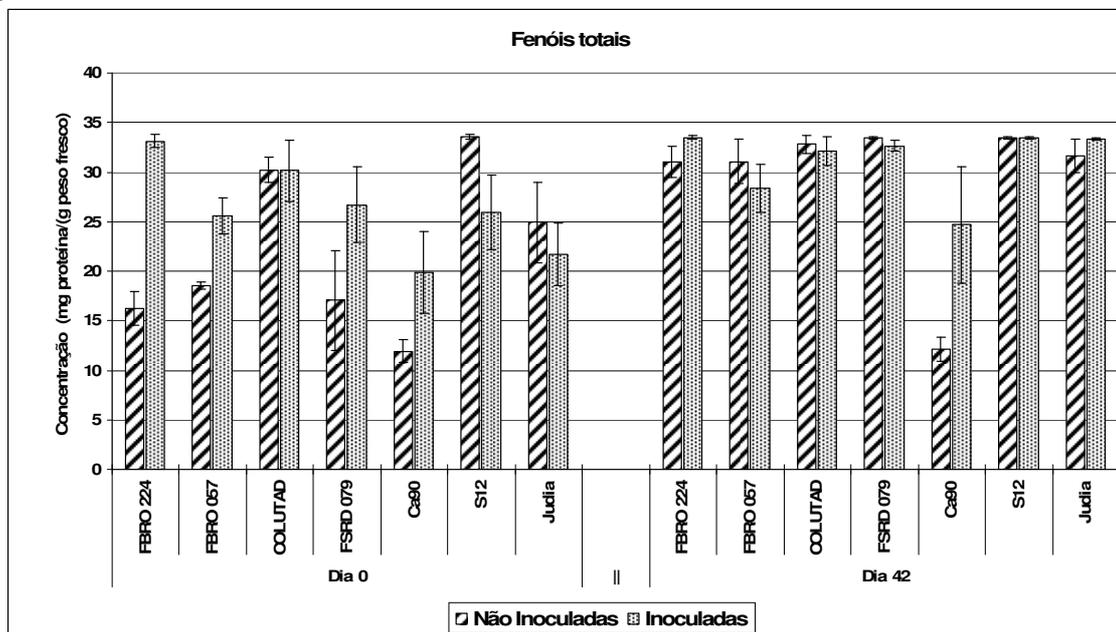
As plantas pertencentes aos clones FBRO 224 e FBRO 057 evidenciaram um padrão de variação semelhante, ou seja, nas plantas não inoculadas registou-se um aumento significativo no teor de fenóis totais (91% para o clone FBRO 224 e 67% para o clone FBRO 057) enquanto que nas plantas inoculadas as variações não foram significativas (Figura 18 b)). Assim, no caso dos referidos clones, as variações ocorridas não poderão ser atribuídas à presença de *P. cinnamomi*.

As plantas pertencentes aos clones COLUTAD e Ca90 apresentaram uma variação semelhante entre elas, 42 dias após a inoculação. Apesar do conteúdo em fenóis ter aumentado tanto nas plantas não inoculadas como nas inoculadas, pertencentes a ambos os clones, este aumento não se revelou significativo para nenhuma das plantas, pelo que não poderá ser atribuída à presença de *P. cinnamomi* a variação ocorrida.

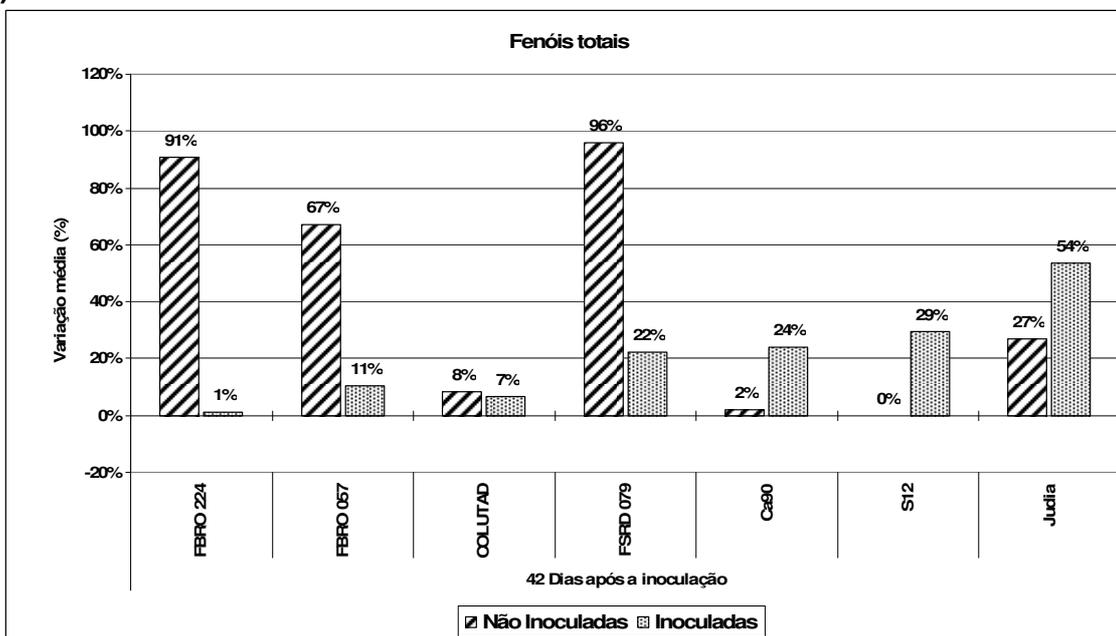
As plantas pertencentes ao clone FSRD 079, 42 dias após a inoculação, evidenciaram um aumento significativo no teor de fenóis. No entanto, este aumento foi mais elevado no caso das plantas não inoculadas (96%) do que nas plantas inoculadas (22%). Pelo exposto, não podemos atribuir este aumento à

presença de *P. cinnamomi*, uma vez que as plantas não inoculadas evidenciaram uma maior síntese de fenóis.

a)



b)



**Figura 18** – Em a) apresenta-se o conteúdo de fenóis totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de fenóis totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

As plantas pertencentes aos clones S12 e Judia apresentaram variações diferentes, que poderão ser atribuídas à presença da *P. cinnamomi*. Assim, as plantas inoculadas pertencentes ao clone S12 aumentaram significativamente o teor em fenóis totais (29%) enquanto que as plantas não inoculadas não sofreram qualquer variação. Relativamente ao clone Judia, as plantas inoculadas também mostraram um aumento significativo de 54%.

Os compostos fenólicos, sintetizados em vias metabólicas secundárias de plantas, possuem uma importância fundamental no metabolismo vegetal (Strack, 1997). Harborne (1997) refere que os compostos fenólicos parecem exercer importância na protecção das plantas contra infecções microbianas. No entanto, esta evidência poderá ser circunstancial, pelo que se justifica a verificação experimental.

Cahill *et al.*, (1993) defendem que, tanto a lenhina como os compostos fenólicos contribuem para a resistência, justificando-se pelo aumento dos níveis destes, em plantas resistentes relativamente às plantas susceptíveis, após inoculação.

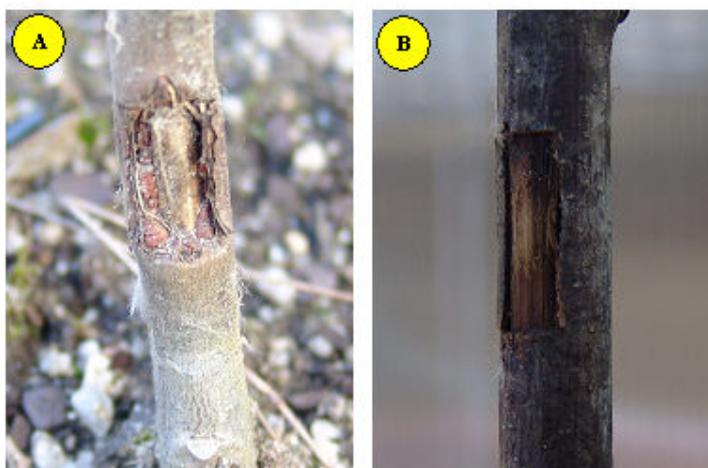
Em estudos realizados em *Quercus robur*, verificou-se que a concentração em fenóis totais foi mais elevada nas folhas das árvores resistentes à *P. cinnamomi* do que nas susceptíveis (Scutareanu e Lingeman, 1994). Os mesmos autores referem ainda que o conteúdo de fenóis totais das folhas está directamente relacionado com o conteúdo de taninos, ácidos orgânicos, frutose e sacarose, e com os níveis de potássio, cálcio e magnésio existentes nos solos.

Estudos realizados em castanheiro revelam que o conteúdo em fenóis totais assume o valor máximo em árvores resistentes e o valor mínimo nas árvores susceptíveis, o que leva a supor que o conteúdo de fenóis totais confere à planta uma maior resistência ao ataque de *P. cinnamomi* (Anjos, 2004).

Os compostos de produção induzida pela acção dos agentes patogénicos, por ferida ou devido a condições ambientais desfavoráveis, são designadas de fitoalexinas (Grayer e Harborne, 1994). Muitas das fitoalexinas que foram isoladas e caracterizadas são fenóis (Ricardo, 1993). Existem evidências de que as fitoalexinas, os antibióticos e os produtos de mecanismos de biossíntese

secundários estão envolvidos na resistência de muitas espécies ao género *Phytophthora spp* (Keen e Yoshikawa, 1983; Erwin e Ribeiro, 1996).

O aumento de alguns metabolitos secundários que apresentam uma acção directa nos fitopatogénios ou promovem alterações estruturais nos tecidos adjacentes ao local de infecção, podem impedir a propagação e proliferação desse agente. Este último, foi observado em alguns dos castanheiros inoculados com *P. cinnamomi*, verificando-se uma lenhificação resultante de um aporte intenso de compostos fenólicos e respectiva deposição nessa região (Figura 19).



**Figura 19** – Compartimentação visível em planta resistente (A) e compartimentação inexistente em planta susceptível (B).

Os resultados obtidos neste estudo não vão directamente de encontro com os referenciados na bibliografia, uma vez que o maior incremento no teor de fenóis totais foi observado na planta susceptível (Judia). No entanto, há a referir que os resultados foram obtidos em folhas, o que não invalida que possa ter existido um aporte destas substâncias até à zona de infecção.

De salientar ainda que, no presente estudo, foram analisadas apenas alterações quantitativas de fenóis. Para uma melhor compreensão do comportamento destas substâncias em plantas infectadas por *P. cinnamomi* seria necessária uma avaliação qualitativa destes compostos, quer por cromatografia em camada fina (TLC) ou cromatografia líquida (HPLC).

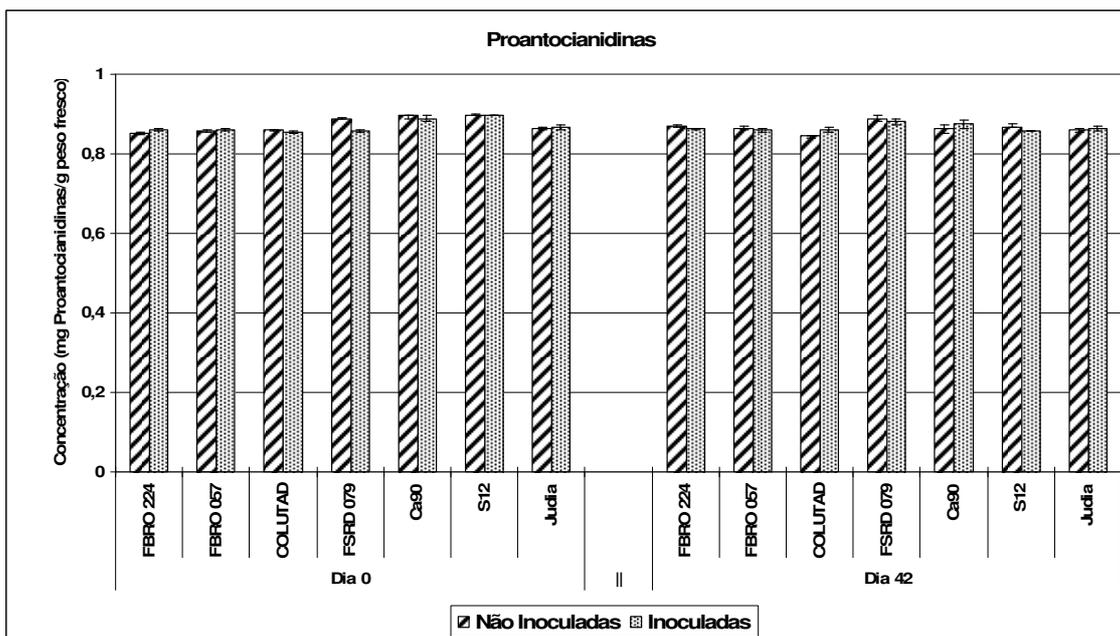
## **7.5 Conteúdo de proantocianidinas**

Os taninos são compostos fenólicos que ocorrem numa ampla variedade de plantas, sendo este composto secundário considerado um dos meios de defesa da planta contra fungos patogénicos, bactérias e vírus (Takechi *et al.*, 1985). Os taninos podem ser classificados em taninos hidrolisáveis que, após hidrólise, produzem hidratos de carbono e ácidos fenólicos, e em taninos condensados ou não hidrolisáveis (Salunkhe *et al.*, 1990). Estes últimos, são também designados de proantocianidinas e são constituídos por unidades flavanol: flavan -3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianidina), estando presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (Deshpande *et al.*, 1996; Salunkhe *et al.*, 1990). As proantocianidinas podem conter entre 2 a 50 unidades flavonóides, possuem estrutura complexa, são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis, em solventes orgânicos ou aquosos, dependendo da sua estrutura.

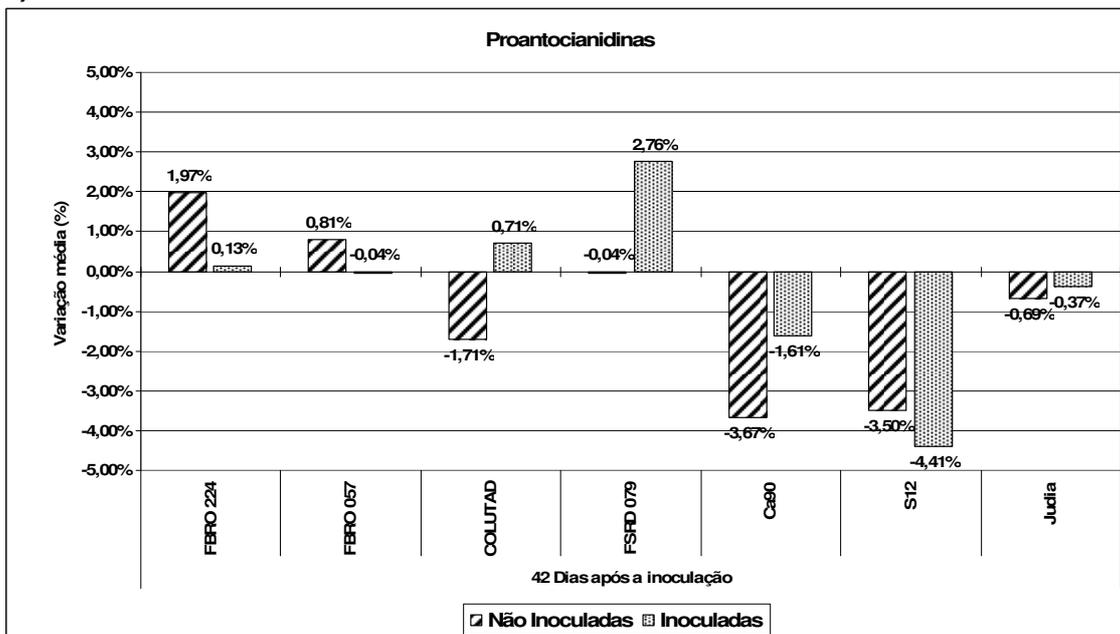
Pela análise dos conteúdos em proantocianidinas ao fim dos 42 dias, verificamos que a inoculação não provocou uma alteração evidente em qualquer um dos clones estudados. Porém, as plantas susceptíveis foram as que apresentaram a menor variabilidade quer em função da inoculação quer em função do tempo de inoculação (Figura 20 a)).

Relativamente ao conteúdo em proantocianidinas, podemos verificar uma pequena diminuição nas plantas não inoculadas, decorridos 42 dias do início do ensaio (Figura 20 b)), nos clones Ca90 (3,67%) COLUTAD (1,71%), FSRD 079 (0,04%), S12 (3,5%) e Judia (0,69%). Um padrão de variação semelhante foi verificado para as plantas inoculadas pertencentes aos clones S12 (4,41%), Ca90 (1,61%), Judia (0,37%) e FBRO 057 (0,04%). Já as plantas inoculadas pertencentes aos clones COLUTAD e FBRO 224 apresentaram um aumento de 0,71% e 0,13%, respectivamente. Um aumento pouco significativo também foi verificado nas plantas não inoculadas pertencentes aos clones FBRO 224 (1,97%) e FBRO 057 (0,8%).

a)



b)



**Figura 20** – Em a) apresenta-se o conteúdo de proantocianidinas em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de proantocianidinas observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, decorridos 42 dias do início do ensaio. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

## **7.6 Conteúdo de clorofilas totais**

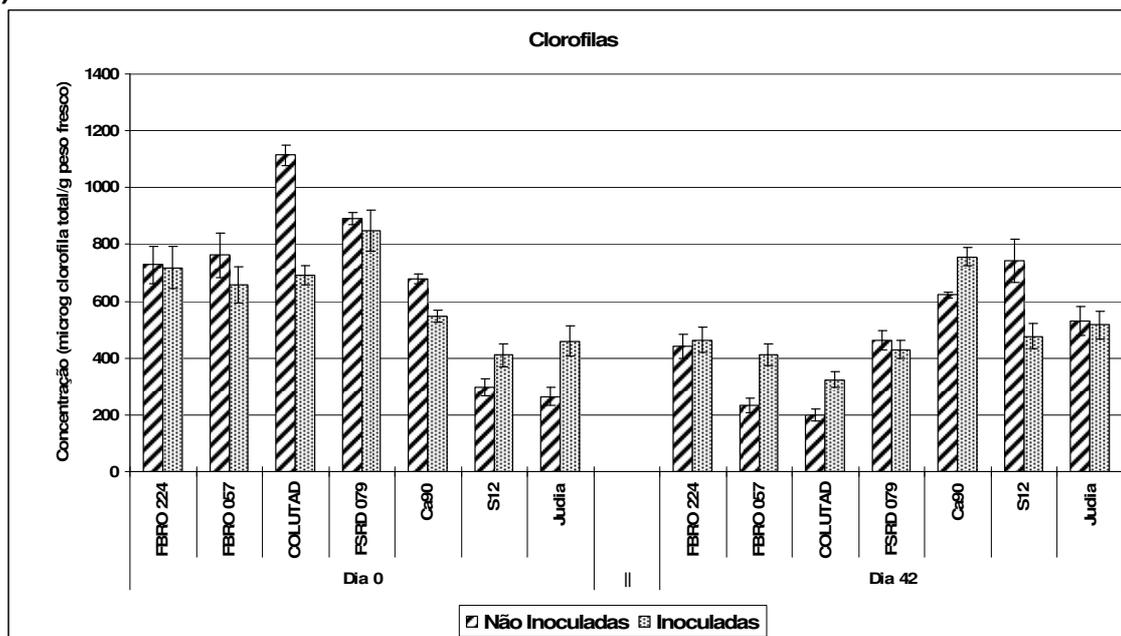
A análise do teor em clorofilas existentes em folhas de castanheiro, no dia zero, evidenciou, mais uma vez, que as plantas inoculadas e não inoculadas de ambos os clones apresentam algumas diferenças entre si, chegando estas diferenças a ser significativas para os clones COLUTAD, Ca90 e Judia (Figura 21).

Observou-se, nos tecidos foliares das plantas inoculadas e não inoculadas pertencentes aos clones FBRO 224, FBRO 057, COLUTAD e FSRD 079, uma redução significativa na quantidade de clorofila total, decorridos 42 dias após a inoculação. Assim, obtiveram-se valores de 53%, 49% 38% e 35%, para as plantas inoculadas pertencentes aos clones COLUTAD, FSRD 079, FBRO 057 e FBRO 224, respectivamente. Para plantas não inoculadas obtiveram-se valores de diminuição de 82%, 70%, 48% e 39% nos clones COLUTAD, FBRO 057, FSRD 079 e FBRO 224, respectivamente.

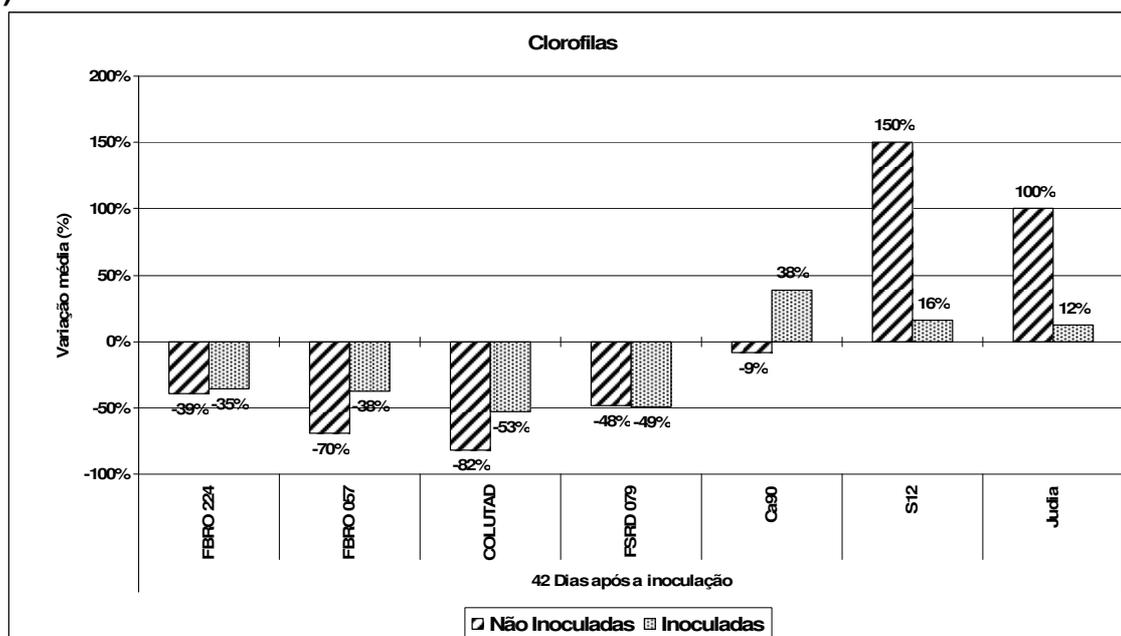
Os clones S12 e Judia apresentaram um padrão de variação semelhante entre eles, ao fim dos 42 dias, podendo observar-se um aumento significativo no teor de clorofilas no caso das plantas não inoculadas (150% para o clone S12 e 100% para o clone Judia). As plantas inoculadas pertencentes a estes clones também evidenciaram um aumento no referido teor, no entanto este não foi estatisticamente significativo para ambas. Relativamente às plantas não inoculadas pertencentes ao clone Ca90, evidenciaram uma diminuição ligeira ao fim de 42 dias, enquanto que as inoculadas sofreram um aumento significativo de 38%.

Embora as alterações na taxa fotossintética não tenham sido alvo deste estudo, a redução observada nos níveis de clorofila total poderá interferir no processo fotossintético. Como já foi referido, a inoculação com *P. cinnamomi* pode induzir um acréscimo suplementar na taxa fotossintética das plantas tidas como resistentes e uma diminuição nas plantas menos resistentes (Dinis *et al.*, 2007).

a)



b)



**Figura 21** – Em a) apresenta-se o conteúdo de clorofilas totais em clones de castanheiro inoculados experimentalmente com *Phytophthora cinnamomi*. As amostras foliares para a análise foram recolhidas no dia em que se procedeu à inoculação e 42 dias após a mesma. Em b) expressa-se a variação média percentual no conteúdo de clorofilas totais observada nos tecidos foliares de plantas experimentalmente inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, 42 dias após a inoculação. Os valores apresentados são a média de três ensaios independentes.

Este aumento observado na taxa fotossintética poderá, aparentemente, parecer contraditório com a diminuição dos teores de clorofila observados. Na realidade, a diminuição das clorofilas acontece como parte de uma estratégia de adaptação

das plantas a condições de maior radiação, tornando as plantas mais eficientes em condições de sol, isto é, transformando-as em plantas de sol. Nestas, observa-se um incremento da razão  $cl_a/cl_b$  (Dinis, 2006), e um aumento do potencial fotossintético para situações de maior irradiância fotónica.

Contudo, outra interpretação pode ser dada aos resultados, ou seja, se a diminuição do teor de clorofila total for muito elevada poderá provocar fortes limitações na taxa fotossintética, como os resultados aqui apresentados sugerem.

## 8. Conclusões

A análise de diversos parâmetros bioquímicos permitiu perceber que os diferentes clones de castanheiro apresentam, logo à partida, uma variabilidade significativa em alguns dos metabolitos primários e secundários, resultado das próprias diferenças genéticas das referidas plantas, que poderá ser explicada pela elevada probabilidade dos híbridos terem sido obtidos a partir de progenitores diferentes.

Algumas das alterações observadas nas plantas são resultado de modificações no seu metabolismo, pela variação na concentração de alguns metabolitos celulares ou pela produção de outros que estejam relacionados com a indução de resistência, como por exemplo proteínas PR (proteínas relacionadas com a patogénese), fenóis, fitoalexinas, entre outros (Fry, 1996; Kuc, 1993 e 2001; Benhamou, 1996).

Com base nos resultados obtidos não nos é possível apontar uma diferença metabólica que permita justificar as diferenças de resistência dos diferentes clones à *P. cinnamomi*. Como já foi referido, nalguns casos a variabilidade dos resultados foi elevada o que justificaria a realização de um ensaio com uma amostragem de plantas superior.

O facto da inoculação ter sido realizada no caule e nas raízes poderá também justificar que, embora as folhas sejam órgãos metabolicamente muito activos, não se registem grandes diferenças, uma vez que qualquer composto mesmo que sintetizado na folha pode ser rapidamente transportado para a região onde ocorreu a infecção. Assim, seria interessante a realização de um estudo semelhante em que as análises fossem realizadas nos locais de infecção da planta.

## 9. Referências Bibliográficas

- Abelleira, A. (1996). Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. MAPA. Madrid.
- Abreu, C. G. (1992 a). Castanheiros: uma saudade no futuro? *Finisterra* 27 (53-54): 1-14.
- Abreu, C. G. (1992 b). A hipovirulência como forma natural de luta biológica contra o cancro do castanheiro. Simpósio Auxiliares e Produtos Fitofarmacêuticos. Sociedade Portuguesa de Fitatria e Fitafarmacologia. Estação Agronómica Nacional. Oeiras. *Revista de Ciências Agrárias*, vol XV (1,2): 167-171 p.
- Abreu, C. G. (1992c). Chestnut ink disease: management practices and resistance. *In: World Chestnut Industry Conference*, Wallace, R. D. and L. G. Spinella (Eds.), July 8-10, Morgantown, West Virginia, pp. 153-157.
- Abreu, C. G., J. F. Coutinho, A. O. Cardoso e E. M. Gouveia. (1993). Solos supressivos e doença da tinta do castanheiro. *Anais da UTAD* (1): 71-75.
- Abreu, C. A.; Pires, A. L. ; Pinto, H. G. (1995). Chestnut ink disease. An integrated approach to its control and release of quality improved material. *In: NATO/SFF/Po-Chestnut*, Report nº 5 (May 1 to October 31, 1995).
- Abreu, C. G. (1996). Doença da tinta: causa e consequência do declínio do castanhal. *Estudos Transmontanos* 6: 269-289.
- Agrios, G. N. (1988). *Plant pathology*. San Diego: Academic Press.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology*. 4ª ed. San Diego: Academic Press.
- Agrios, G. N. (1998). *Plant pathology*. Academic Press. London.
- Anjos, M. R. (2004). Caracterização de populações de castanheiro (*Castanea spp.*) resistentes e susceptíveis à doença da tinta: uma abordagem polifásica. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v. 24, p. 1-15.
- Artaza, J. E. 1949. El castaño en España. Instituto Florestal de Investigaciones y Experiências, Ministério da Agricultura. Madrid.

- Bach, E. E. (1997). Distinção morfológica e isoenzimática de *Bipolaris spp.* e *Drechslera tritici-repentis* do trigo: aspectos bioquímicos nas interações e indução de resistência. Dissertação de Doutorado. ESALQ, USP. 150p.
- Bell, A. A. (1990). The time sequence of defense. *In: Plant disease*. Horsfall, J. G. e Cowling. (Eds.). Academic, New York, 5: 53-73.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 1, p. 233-240.
- Benson, D. M. (1990). Landscape survival of fungicide - treated azaleas inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease* 74: 635-637.
- Benson, M. L., B. J. Myers, I. E. Graig, C. L. Gabriel and A. G. Swan. (1984). A camera mointervalometer for small format aerial photography. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing* 50 (11): 1571-1580.
- Bettiol, W.; Ghini, R. (1995). Controle Biológico. *In: Bergamin Filho, A. et al.* (Ed.). Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 717-718.
- Böckmann, V. T. (1986). Probleme der australischen Forstwirtschaft mit dem Schadpilz *Phytophthora cinnamomi*. *A. F. Z.* 25: 123-137.
- Bourgeois, C. (1993). Aspectos Técnico-Econômicos do Castanheiro Florestal. *Revista Sociedade e Território*, 19, Dossier Política Florestal. Editora Edições Afrontamento.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-253.
- Bruehl, G. W. 1989. Integrated controlo of soilborn plant pathogens: An overview, *Can. J. Plant. Pathol.* 11 :153-157
- Burg, I. C.; Mayer, P. H. Introdução. *In: Burg, I. C.; Mayer, P.H.* (1998). *Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças*. Francisco Beltrão: Grafit, 1998. p.13.

- Cahill, D. M.; I. J. Bennett e J. A. McComb. (1993). Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathol.* 42:865-872.
- Campos, J. M. A. (1994). Solos supressivos e a doença da tinta do castanheiro. Relatório Final de Estágio. Licenciatura em Engenharia Florestal. Vila Real.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom chromista. Origin and systematics. *In*: Chapman, D. J. Progress in *Phycological Research*. Biopress. Bristol. England.
- Colson, E. ; Deverall, B. (1996). Helping plants fight their own disease battles. *Australian Cottongrower*, v. 17, p. 76-80.
- Coventry, H. S.; Dubery, I. A. (2001). Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 58, p. 149-158.
- Craddock, J. H.; Bassi, G., (1999): Effect of clonally propagated interspecific hybrid chestnut rootstocks on short-term graft incompatibility with four cultivars of Italian Marrone. *Acta Hort.* 494, 207–212.
- Crandall, B. S. (1950). The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthora*, *P. cinnamomi* e *P. cambívora*. *Plant. Dis. Rep.* 34 :194-196.
- Davies, E. (1987). Actions potenciales as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ* 10: 623-310.
- Davison, E. M.; Stukeley M. J. C.; Crane, C. E.; Tay, F.C.S. (1994). Invasion of phloem and xylem of woods stems and roots of *Eucalyptus marginata* and *Pinus radiata* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*.
- Dawson, W. O.; Hilf, M. E. (1992). Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43: 527-555.
- Degousée, N.; Triantaphylidés, C.; Montillet, J. L. (1994). Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology*. Rockville, v. 104, n. 3, p. 945-952.

- Deshpande, S. S.; Cheryan, M.; Salunke, D. K. (1986). Tannin analysis of food products. CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition, v. 24, p. 401-449.
- Dick, M. W. (1995). The Straminipilous Fungi. A New Classification for the *Biflagellate Fungi* and Their Uniflagellate Relatives with Particular Reference to *Lagenidiaceous Fungi*. C. A. B. *Internat. Mycol.* Nº 168.
- Dinis, L-T. (2006). Fotossíntese em castanheiro: Estudo das alterações induzidas pela doença da tinta. Dissertação de Mestrado em Biologia e Geologia para o Ensino. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Dinis, L-T., Coutinho, J.P., Peixoto F., Ferreira-Cardoso, J., Silva, C., Costa, R., Gomes-Laranjo, J. (2007). Photosynthetic characterization of chestnut plants. Comparison between *C. sativa* (cv. Judia) and hybrid clones. *Journal of Plant Physiol.* (submetido).
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356.
- Elorrieta, J. (1949). El castaño en España. MAPA. Madrid. p. 303
- Erwin, C. D. e Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. *American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota.
- Farkas, G. L. e Z. Kiraly. (1962). Role of phenolics compounds in the physiology of plants diseases and disease resistance. *Phytopath.* 2, 44: 105-150.
- Fenaroli, L. (1945). Il castagno. Trattati di Agricoltura – Vol. I. Ramo Editoriale Degli Agricoltoti, Roma.
- Fernandes, C. T. (1970). Defesa e melhoramento do castanheiro - Aspectos fitopatológicos. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. *Estudos e Informação*, p. 253-231.
- Fernandes, C.T. (1952). Doenças do castanheiro – Parasitas do género *Phytophthora* de Bary. Ministério da Economia, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Estação de Experimentação do Sobreiro e Eucalipto, p. 23.

- Fernandes, C.T. (1953). Ensaio Experimentais tendo em vista o repovoamento pelo castanheiro de regiões muito afectadas pela “doença da tinta”, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, 20 (1): 59-67.
- Fernandes, C.T. (1966). A doença da tinta dos castanheiros. Dissertação de Concurso para Investigador em Patologia Florestal, Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Alcobaça, p. 97.
- Fiori, A. C. G. *et al.*; (2000) Actividade de lectinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Fitopatol. Brás.*, Brasília, v. 25 p. 373.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Annual Review of Plant Pathology*, v. 37, p. 165-186.
- Ghini, R.; Kimati, H. (2000). Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Gisi, U., G. A. Zentmyer and L. J. Klure. (1980). Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* and *P. palmivora* in soil at different matric potencial. *Phytopathology* 70: 301-306.
- Goidànich, G., B. Casarini, G. L. Ergolani, S. Foschi, G. Govi, A. Kovács i G. C. Pratella. (1964). Manuale di patologia vegetale. Edizioni Agricole Bologna, Vol. II, Bologna.
- Gomes, A. L. (1982). Revisão crítica sobre a cultura do castanheiro em Portugal. Tese de Doutoramento. UTAD, Vila Real.
- Gomes, A. L. (1987). Programa para o melhoramento genético do castanheiro para produção. *Anais da UTAD* 1: 141-147.
- Gomes, A. L.; Abreu, C. G.; Castro, L. T. (1997). COLUTAD – Um clone de castanheiro com resistência à doença da tinta. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Gomes-Laranjo, J. C. E. (1988). Aspectos da Produtividade Fotossintética em *Castanea sativa* Mill. Diferenciação de Cultivares. Relatório Final de Estágio. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.

- Gomes-Laranjo, J. C. E. (2001). A Fotossíntese em castanheiro, Estudo integrado a diferentes níveis de organização biológica. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Gomes-Laranjo, J. C. E.; Araújo-Alves, J. P. L.; Ferreira-Cardoso, J. V.; Pimentel-Pereira, M. J.; Abreu, C. G.; Torres-Pereira, J. M. G. (2004). Effect of chestnut ink disease on photosynthetic performance. *J. Phytopathology*. 152: 1-7.
- Goodman, R. N.; Király, Z.; Wood, K. R. (1986). The biochemical and physiology of plant disease. Columbia: University of Missouri Press. 433 pp.
- Gouveia, M. E. M. (1993). Doença da tinta do castanheiro – Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. Dissertação de Mestrado em Protecção Integrada, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, 117 pp.
- Gouveia, E. M. e C. G. Abreu. (1994). Avaliação da resistência do castanheiro (*Castanea sativa*) a *Phytophthora cinnamomi*. *Revista Florestal* 7: 3-17.
- Gouveia, M. E. M. (2004). Métodos moleculares na identificação, caracterização e detecção de *Phytophthora cambívora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands associadas com a doença da tinta do castanheiro. Tese de Doutoramento, UTAD, Vila Real.
- Grayer, R. J. e J. B. Harborne. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 37(1) : 19-42.
- Gravatt, G. F. (1954). Blight on chestnut and oaks in europe in 1951. *Plant Disease Rep.*, 36, pp. 111-115.
- Grente, J. (1961 a). La maladie de l'encre du chataignier. I – Etiologie et biologie. *Ann. Epiphyties* 12 (1) : 5-24.
- Grente, J. (1961 b). La maladie de l'encre du chataignier. II – Les agents pathogènes : *Phytophthora cambívora* et *Phytophthora cinnamomi*. *Ann. Epiphyties* 12 (1) : 25-58.
- Grente, J. ; Vrot, F. (1984). Reserche d'un moyen de lutte biologique contre la maladie de l'encre par utilization de la symbiose mycorhizienne. Congresso International sobre o castaño. Lourizán (Pontevedra), pp. 185-189.

- Guerreiro, M. G. (1953). O valor da conservação do solo no cultivo do castanheiro. Publ. *Direcção. Geral Serviços Florestais e Aquícolas* 8. Lisboa.
- Guerreiro, M. G. (1946). Melhoramento do castanheiro. Directrizes e finalidades. Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Lisboa. 13: 19-43.
- 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.
- Hanh, M. G. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 387-412.
- Halsall, D. M. and J. D. Williams. (1984). Effect of root temperature on the development of *Phytophthora cinnamomi* root rot in *Eucalyptus seedlings*. *Australian Journal of Botany* 32: 521-528.
- Hammerschmidt, D.; Dann, E. K. (1997). Induced resistance to disease. In: Rechcigl, N. A.; Rechcigl, J. E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease Control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p. 177-199.
- Hammerschmidt, R.; Nicholson, R. L. (1977). Resistance of maize to anthracnose-effect of light intensity on lesion development. *Phytopathology*, v. 67, n.2, p. 247-250.
- Hammond-Kosac, K.; Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. *Biochemistry e molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. p. 1102-1156.
- Hardy, G. E. and K. Sivasithamparam. (1988). *Phytophthora* spp. associated with container-grown plants in nurseries in Western Australia. *Plant Dis.* **72**: 435-437.
- Holub, E. B.; Beyon, J. L.; Crute, I. R. (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accession of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 7: 223-239.
- Ingham, J. L. (1973). Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. *Phytopath.* 78: 314-335.
- Innes, R. W. (1998). Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. *Curr. OpinPlant. Biol.* 1: 229-304.

- Keen, N. T. e M. Yoshikawa. (1983). Physiology of disease and the nature of resistance to *Phytophthora*. In: *Phytophthora its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. (Eds.). APS Press. St. Paul, MN. pp. 279-287.
- Keen, N. T. (1990). Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Genetics*. 24: 447-463.
- Ko, W. H. and W. C. Ho. (1983). Reassessment of apparent sterol requirement for sexual reproduction in *Phytophthora*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 49: 316 - 321.
- Koch, W.; Wagner, C.; Seitz, U. (1998). Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta*, v. 206, p. 523-532.
- Kuc, J. (1993). Non pesticide control of plant disease by immunization. In: Lry, H. and Potther, C. (ed). Proceeding of the 10 International Symposium on systemic Fungicides and Antifungal compounds. *Ullmer Publication*. Stuttgart, p. 225-237.
- Kuc, J. (2000). Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Prot.*, v.19, p.859-861.
- Lyon, G. D. et al. (1995). Novel disease control compounds : the potencial to “immunize” plants against infection. *Plant Pathol.*, Oxford, v. 44, p. 407-427.
- Mace, M. C. e T. T. Hebert. (1963). Naturally occurring quinones in wheat and barley their toxicity to loose smut fungi. *Phytopath*. 53: 692-700.
- Malajczuk, N. (1979). Biological supression of *Phytophthora cinnamomi* in *Eucalyptus* and avocados in Australia. In: *Soil - Borne Plant Pathogens*, Shippers and W. Gams (Eds.). Academic Press, London, pp. 635-652.
- Malajczuk, N., A. J. McComb and C. A. Parker. (1977). Infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands of roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm. *Aust. J. Bot.* 25: 483-500.
- Malato-Béliz, J. (1987). O castanheiro na economia e na paisagem. Câmara Municipal de Castelo de Vide. Castelo de Vide.
- Manandhar, H. K.; Mathur, S. B.; Smedegaard-Petersen, V.; Thordal-Hristensen, H. (1999). Accumulation of transcripts for pathogenesis-related proteins and peroxidase in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and u.v. light. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v.55, p. 289-295.

- Margis-Pinheiro, M.; Sandroni, M.; Lummerzheim, M.; Oliveira, D. E. (1999). A defesa das plantas contra as doenças. Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Departamento de Genética. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Marigo, G. (1973). Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis*, 2 :106.
- Martins, L. M. (1994). Influência dos solos supressivos na doença da tinta do castanheiro. *In: III Congresso Florestal Nacional*, Figueira da Foz, pp. 118-129.
- Martins, L. M. (2004). Monitorização da doença do castanheiro com fotografia aérea de pequeno formato. Dissertação da Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Metcalf, D. (2006). What is *Phytophthora cinnamomi*? Department of Primary Industries, Water e Environment of Australia. (Acesso: [www.Dpiwe.tas.gov.au/inter.nsf/WebPages/EGIL-53Y7MW?open](http://www.Dpiwe.tas.gov.au/inter.nsf/WebPages/EGIL-53Y7MW?open)).
- Matern, U. e E. R. Kneusel. (1998). Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* 16: 153-700.
- Moraes, M. G. 1998. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. *In: LUZ, W. C. et al. (Orgs.). Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v. 6, p. 261-284.
- Nakasone, A. K. *et al.* (1999). Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatogénos. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v. 25, n.4, p. 331.
- Oliveira, A. C. M.; Alves, A. A. M. (1987). Quadro ecológico-cultural da silvicultura do castanheiro. Encontro sobre soutos e castinçais. Castelo de Vide.
- Oliveira, M. T., L. M. Martins and C. G. Abreu. (1999). A method for evaluating the degree of defoliation on chestnut trees affected by the ink disease. *Acta Horticulturae* 494: 443-446.
- Paiva, J. (1990). O castanheiro em Portugal. *Cadernos Quercus – Série A – nº4*, Coimbra, 25 pp.

- Pascholati, S. F. ; Leite, B. (1995). Hospedeiro : mecanismos de resistência. *In*: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos. V.1. São Paulo: Ed. Ceres. p. 417-453.
- Portela, E. e C. Abreu (1994). Utilização de correctivos orgânicos na limitação de doenças radiculares. *Anais UTAD* 5 (1): 77-89.
- Portela, E.; Martins, A. and Pires, A. L. (1998). Práticas culturais de limitação da tinta do castanheiro. NATO/SFS PROGRAMME III PO-CHESTNUT, DRATM – PDRITM - PIDDAC. UTAD. Vila Real.
- Portela, E.; Aranha, J.; Martins, A.. e Pires, A. L. (1999). Soils factors, farmer's practices and chestnut ink disease: some interactions. *Acta Horticulturae*. 494: 433-441.
- Porter, L. J. ; Hrstich, L. N. e Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Pytochemistry*, 25, 223-230.
- Reeves, R. J. (1975). Behavior of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soils and water regimes. *Soil Biol. Biochem.* 7: 19-24.
- Rodrigues Jr., C. J. (1980). Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogénicos. Junta de Investigação Científica do Ultramar. Centro de Investigação das Ferrugens do cafeeiro. Lisboa. 67 p.
- Salesses, G., L. Ronco, J. E. Chauvin and J. Chapa. (1993). Amélioration génétique du chataignier. Mise au point de tests d'evaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. *L' Arboriculture Fruitiere* 458: 23-31.
- Salunkhe, D. K.; Chavan, J. K.; Kadam, S. S. (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton: CRC Press.
- Sbalcheiro, C. C. (2006). Acção do biocontrolador com actividade de indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade de Passo Fundo.
- Scalbert, A.; Monties, B.; Janin, G. (1989). Tannins in wood: comparisons of different estimation methods. *J. Agric Food Chem.*, 37: 1324-1329.

- Scutareanu, P.; Lingueman, R. (1994). Natural content of phenols and tannin in *Quercus robur* leaves related to development of *Euproctis chrysorrhoea* caterpillars. *Acta Horticulturae*, 381: 738-741.
- Seabra, R. M. L. C. (1998). “Transformação genética em *Castanea* Mill e caracterização molecular do género *Castanea*”. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Slinkard, K. W.; Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28: 49.
- Smith, C. J. (1996). Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*. 132: 1-45
- Stangarlin, J. R. *et al* (1999). Plantas medicinais. *Biotechnol. ; Cienc. Desenvolv.*, Brasília, n. 11, p. 16-21.
- Sticher, L.; Mauch Mani, B.; Metraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 35, p. 235-270.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism, In: Dey, P. M. Harborne, J. B. (Ed.) *Plant Biochemistry*. London: Academic Press. Cap. 10, p. 387-416.
- Swain, T.; Hills, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science of Food and Agriculture*. London, v. 10, n. 4, p. 63-68.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (1998). Plant defenses: surface protectants and secondary metabolites. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates. Cap. 13, p. 347-376.
- Takecki, M.; Tanaka, T.; Takettara, M.; Nonaka, G. I; Nishioka, I. (1985). Structure and antileishmanic activity among the tannin. *Phyto-chemistry*, 24: 2245-2250.
- Telhada, J. A. B. M. (1990). A tinta do castanheiro. Aspectos principais e perspectivas de luta. *Vida Rural*. 36-39.
- Ricardo, C. P.; Teixeira, A. N. (1993). Moléculas biológicas – estrutura e propriedades. 4ª Ed. Didáctica Editora.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by *Rhizosphere bacteria*. *Ann. Rev. Phytopathol*. 36: 453-483.

- Vidhyasekaran, P. (1988). Physiology of disease resistance in plants. Vol I. CRC Press. Boca Roton, Florida, 149 p.
- Vieitez Cortizo, E.; Madriñán, M. L. V.; Madriñán, F. J. V. (1996). El Castaño. 1ª Edición. Edición Edilesa. León.
- Vieitez Cortizo, E., M. L. Vieitez Madriñán e F. J. Vieitez Madriñán. (1999). O castiñeiro. Consello da Cultura Galega, Santiago de Compostela, 274 pp.
- Vieitez, E. (1960). Obtencion de castañas resistentes a la enfermedad de la "tinta". Centro Regional de Enseñanzas, Investigaciones y Experiencias Florestales de Lourizan. Pontevedra.
- Vieitez, J.; Ballester, A.; Mantilla, J. L. G.; Viritez, E. (1984). Sobre la resitencia del castaño a *Phytophthora cinnamomi* e *P. cambívora*. In *Comunicaciones Congreso Internacional sobre el Castaño*. Pontevedra. 217-226.
- Wulff, N. A.; Pascholati, S. F. (1999). Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, nº 3, p. 428 -435.
- Zentmyer, G. A. (1970). Tactic responses of zoospores of *Phytophthora*. In: *Root Diseases and Soil-Borne Pathogens*. Univ. Calif. Press, London, 109-111.
- Zentmyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and Diseases it causes. Monograph nº 10. The American Phytopatological Society. St Paul, Minnesota, USA.
- Zentmyer, G. A. (1981). The effects of temperature on growth and pathogenese of *Phytophthora cinnamomi* and growth of its avocato 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.
- Zentmyer, G. A. and S. M. Mircetich. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 56: 710-712.