



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Otimização de protocolos de micropropagação de  
*Castanea sativa* Mill e estudo da tolerância de  
genótipos de castanheiro à doença da tinta



Elsa Celeste Santos Baltazar

2015





# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Otimização de protocolos de micropropagação de *Castanea sativa* Mill e estudo da tolerância de genótipos de castanheiro à doença da tinta

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Teresa Silva Gonçalves de Serra e Silva (Universidade de Coimbra)

Elsa Celeste Santos Baltazar

---

2015



*Aos meus Pais e ao Rodrigo.  
Em memória do meu avô Eurico.*



## **Agradecimentos**

No final deste percurso, é meu dever agradecer a todos aqueles que me acompanharam e guiaram ao longo destes dois anos, nem sempre foi fácil, mas com esforço e dedicação tudo se consegue, e para isso a vossa força e amizade foi fundamental para o meu sucesso.

Primeiramente quero agradecer aos meus orientadores Prof. Doutor Jorge Canhoto e Prof<sup>a</sup> Doutora Teresa Gonçalves, por tudo o que me ensinaram, pelo apoio científico, incentivo e disponibilidade.

À Doutora Helena Machado por ter disponibilizado os inóculos de *P. cinnamomi*, utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Laranjo por ter disponibilizado material vegetal de castanheiro, suscetível à doença da tinta.

À Eng<sup>a</sup> Sofia Vaz, pela confiança que depositou em mim para integrar a equipa do laboratório da InProPlant, bem como pela orientação inicial no laboratório.

Ao Dr. João Martins por ter tomado conta dos fungos e pelas dicas de estatística.

À Dr. Ana Alves, minha companheira de luta, agradeço-lhe os puxões de orelhas, os conselhos e incentivo, com ela cresci.

À Daniela Colaço pela força e boa disposição contagiante, importante nos dias menos bons.

À Sara Rodrigues, pelo incentivo e carinho.

Aos sócios da Inproplant, pela oportunidade que me deram para desenvolver este trabalho no seio da empresa.

À Ana Couceiro, por ser a irmã que escolhi, e por tudo o que representa para mim.

À Tatiana Martins pelo apoio incondicional e pela ajuda com a passagem dos intermináveis dados para o computador, à Sarah por estar sempre comigo.

Ao Rui pelo que foi para mim.

Em fases importantes da nossa vida, as palavras por vezes não são suficientes para agradecer, mas obrigada a todos que me mantiveram de pé, quando insistia não me levantar, eles sabem quem são, aos meus Amigos.

Muito Obrigada





# ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 1</b>
<b>1.1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO ..... 3</b>
<b>1.2</b>	<b>CASTANEA SATIVA ..... 4</b>
1.2.1	Caracterização da espécie vegetal.....4
1.2.2	Distribuição geográfica.....6
1.2.3	Importância económica.....7
1.2.4	Doença-da-tinta .....10
<b>1.3</b>	<b>PROPAGAÇÃO DA CASTANEA SATIVA ..... 11</b>
1.3.1	Micropropagação em larga escala.....11
1.3.2	Estabelecimento in vitro .....12
1.3.3	Multiplicação .....13
1.3.4	Enraizamento e aclimatização .....14
<b>1.4</b>	<b>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI..... 15</b>
1.4.1	Caraterização da espécie fúngica .....15
1.4.2	Influência dos fatores edafo-climáticos na propagação de <i>P. cinnamomi</i> .....16
1.4.3	Mecanismos de infeção.....17
<b>1.5</b>	<b>OBJECTIVOS..... 18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....19</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL VEGETAL ..... 21</b>
<b>2.2</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DE CASTANEA SATIVA ..... 23</b>
2.2.1	Estabelecimento in vitro de material de castanheiro.....23
2.2.2	Propagação in vitro de castanheiro .....25
2.2.3	Enraizamento .....27
2.2.4	Aclimatização .....31
<b>2.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO CASTANHEIRO À PHYTOPHTHORA CINNAMOMI..... 32</b>
2.3.1	Isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....32
2.3.2	Metodologia.....32
<b>2.4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 34</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....35</b>
<b>3.1</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DE CASTANEA SATIVA ..... 37</b>
3.1.1	Estabelecimento in vitro de material de castanheiro.....37
3.1.2	Propagação in vitro de Castanheiro .....38
3.1.3	Enraizamento .....44
3.1.4	Aclimatização .....47
<b>3.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO CASTANHEIRO À PHYTOPHTHORA CINNAMOMI..... 48</b>
3.2.1	Inoculação em ramo destacado .....48
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....50</b>
<b>4.1</b>	<b>PROPAGAÇÃO IN VITRO DO CASTANHEIRO ..... 52</b>
4.1.1	Efeito da citocinina e do genótipo .....52
4.1.2	Efeito do recipiente .....53
<b>4.2</b>	<b>ENRAIZAMENTO..... 53</b>
<b>4.3</b>	<b>ACLIMATIZAÇÃO ..... 54</b>
<b>4.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO CASTANHEIRO À PHYTOPHTHORA CINNAMOMI ..... 55</b>
4.4.1	Inoculação em ramo destacado .....55

5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## Resumo

A micropropagação *in vitro* pode ser uma mais valia em empresas que se dedicam à produção de plantas, pois é um método inovador que permite a produção de um elevado número de plantas num curto espaço de tempo.

*Castanea sativa* Mill é uma espécie lenhosa de grande importância económica para Portugal, não obstante, as doenças que a afetam e comprometem a sua sanidade e, consequentemente, a sua capacidade produtiva.

Este trabalho foi realizado no âmbito da parceria UC InProPlant e incidiu sobre dois pontos fundamentais, sendo eles a otimização de protocolos de produção de castanheiro *in vitro*, e a avaliação da tolerância de genótipos de castanheiro ao fungo *Phytophthora cinnamomi* que causa a doença da tinta.

No que se refere à propagação de *Castanea sativa* Mill. avaliou-se: i) o efeito do tipo de citocinina e do genótipo, ii) o efeito do recipiente e iii) o enraizamento.

No estudo do efeito da citocinina e do genótipo, a zeatina e o genótipo CX5 apresentaram diferenças significativas no que se refere à altura do maior rebento e ao número de nós. Já no estudo do efeito do recipiente apenas se observaram diferenças significativas entre os tubos de ensaio e os frascos luminarc.

Relativamente ao enraizamento *in vitro* a concentração de 3 mg/l de IBA apresentou diferenças significativas em comparação com a concentração de 5 mg/l, no que diz respeito ao comprimento da maior raiz e do número de raízes.

No ensaio de inoculação em ramo com o fungo *Phytophthora cinnamomi* estudou-se a tolerância de alguns genótipos de castanheiro a este fungo, no entanto os resultados não se revelaram conclusivos.

Palavras-chave: *Castanea sativa* Mill; citocininas; enraizamento; micropropagação, *Phytophthora cinnamomi*

## Abstract

*In vitro* propagation can be an advantage for plant producing companies which because it is an innovative method which allows large-scale production in a short period of time.

*Castanea sativa* Mill. is a woody species of great importance in Portugal. However, the species is threatened by some diseases that affect plant production and reduce fruit production..

This study was carried out in the framework of the Association UC InProPlant, and focused mainly in two fundamental aspects, one of them being the optimization of protocols for *in vitro* propagation of genotypes not yet tested *in vitro*, and the other being the evaluation of the tolerance of these genotypes towards the pathogenic fungus *Phytophthora cinnamomi*, responsible for the ink disease.

Regarding the propagation of *C. sativa* Mill the experiments analyzed: i) the effect of cytokinins and genotype on propagation; ii) the role of the type of containers on propagation and iii) rooting.

From the cytokinins tested the results showed that zeatin showed the best results, in terms of shoot elongation and number of nodes in particular when the CX5 genotype was used. In the case of the recipients of culture, luminarc containers gave better results than test tubs. Rooting, was more effective when the 3 mg/l of IBA were used in comparison with 5 mg/l. With 3 mg/l IBA not only the main root was longer but also the number of roots was higher.

On the inoculation trial with *Phytophthora cinnamomi* was studied the tolerance of some chestnut trees genotypes to this fungus, the results, however, were not conclusive.

Keywords: *Castanea sativa* Mill; cytokinins; micropropagation, *Phytophthora cinnamomi*, rooting,

# 1 Introdução

---





## 1.1 Contextualização do trabalho

O castanheiro Europeu (*Castanea sativa* Mill.) é uma espécie folhosa de uso múltiplo com grande importância económica para Portugal e para a Europa, conciliando a aptidão florestal e frutícola, e mostrando ser uma espécie fundamental para a proteção da paisagem (Costa *et al.*, 2011).

Segundo Costa *et al.* (2011), são produzidos em todo o mundo cerca de 1200000 toneladas de castanha, correspondendo a uma área de produção de 340000 hectares. A China produz cerca de 800000 toneladas enquanto Portugal, Espanha e França representam, no seu conjunto, apenas 22,5% da produção chinesa. O mercado chinês tem evoluído positivamente, ao contrário do mercado europeu que em termos produtivos se encontra, atualmente, estagnado ou com tendência a diminuir.

Não obstante, a procura de árvores de castanheiro na Europa tem vindo a aumentar e os produtores tornaram-se mais exigentes: preferem árvores com elevada qualidade fitossanitária, e que apresentem tolerância a determinadas pragas e doenças que têm causado danos consideráveis nos soutos europeus nos últimos anos.

Perante esta situação, é necessário selecionar, multiplicar e certificar genótipos que apresentem tolerância a determinadas doenças, valorizando-os do ponto de vista económico e da qualidade fitossanitária.

Este trabalho de mestrado realizou-se no âmbito de uma parceria entre a Universidade de Coimbra e a empresa InProPlant (UC InProPlant), e de uma forma geral incidiu sobre dois pontos fundamentais, sendo eles, a otimização de protocolos de produção de castanheiro *in vitro* em larga escala, e a avaliação da tolerância de plantas/genótipos de castanheiro ao fungo *P. cinnamomi* que causa a doença da tinta-do-castanheiro.

## 1.2 *Castanea sativa*

### 1.2.1 Caracterização da espécie vegetal

O castanheiro é uma árvore angiospérmica dicotiledónea, monóica, da família Fagaceae, género *Castanea* e espécie *Castanea sativa* Mill.

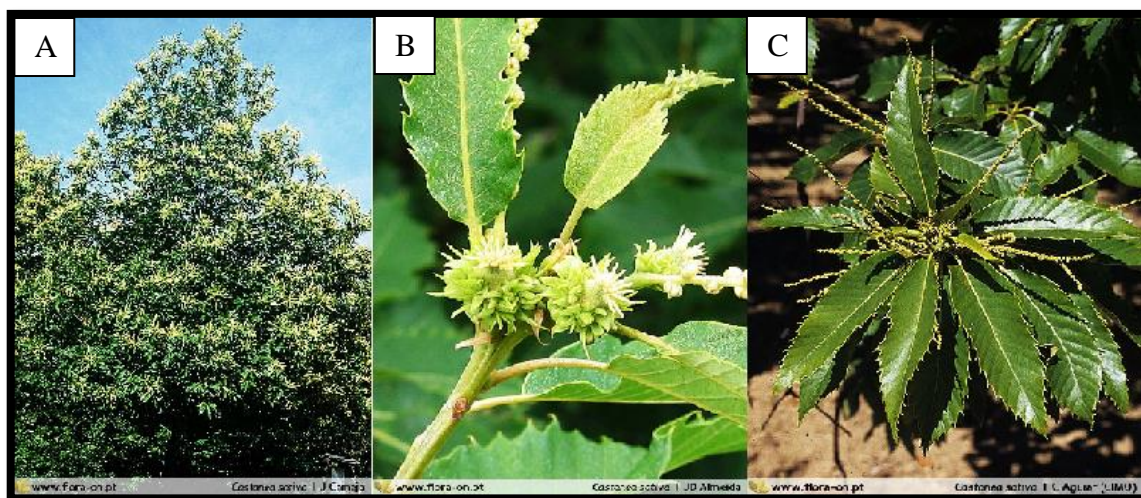
É considerado uma árvore de grande porte (Fig. 1A) que chega a atingir cerca de 30 metros de altura e pode alcançar grande longevidade. Tem folha caduca, e adquire uma copa semiesférica com numerosas e fortes ramificações; o tronco é robusto atingindo grande espessura de ritidoma, que com a idade vai se tornando fendido (Paiva, 2007).

As folhas são alternas, pecioladas estipuladas. As flores masculinas e femininas (Fig. 1 B e C) com perianto sepalóide, estão dispostas em amentilhos mais ou menos eretos, verdes em botão e amarelados na antese. Os amentilhos masculinos são muito numerosos na axila das folhas inferiores dos rebentos terminais. O fruto adquire uma forma cónica relativamente achatada, desenvolvendo-se dentro de um invólucro espinhoso vulgarmente chamado ouriço, onde se podem encontrar uma a três castanhas, que são libertadas no Outono (Paiva, 2007).

Segundo Gonçalves (1991), no que se refere ao sistema radicular é uma árvore que desenvolve raízes muito profundas e robustas, no entanto, quando existe dificuldade de perfuração em profundidade, apresenta uma elevada capacidade de desenvolver raízes com orientação horizontal. Relativamente ao tipo de solo, esta espécie prefere solos frescos e bem drenados à base de areias siliciosas, de saibros graníticos, ou provenientes da decomposição de xistos, gneisses, grés, terras vulcânicas de aluviões profundos e com baixas taxas de argila e sem calcário, onde o pH não atinja os 6-6,5.

O castanheiro é uma espécie de altitude, quando cultivada em regime de talhadia ou alto fuste pode permanecer até aos 1300 metros, não obstante, para produção de fruto pode encontrar-se até aos 800 metros de altitude (Gonçalves, 1991). Prefere climas com influência sub-atlântica, as temperaturas não devem descer abaixo dos 15 °C negativos e apresenta alguma resistência ao stresse hídrico.

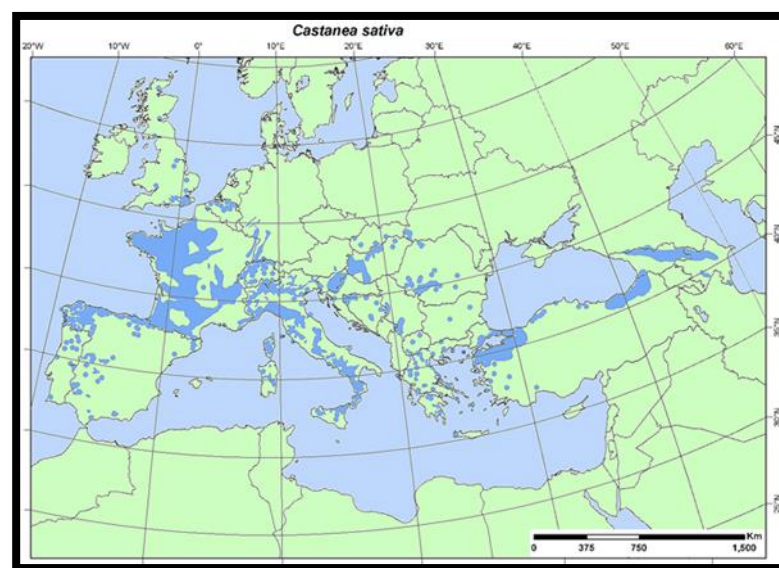




**Figura 1** - Aspectos morfológicos da *Castanea sativa* Mill: A) Porte da árvore (<http://www.flora-on.pt/#/h5Bz>); B) Flores femininas (<http://www.flora-on.pt/#/hje4s>); C) Amentilhos de flores masculinas (<http://www.flora-on.pt/#/hlAOy>)

### 1.2.2 Distribuição geográfica

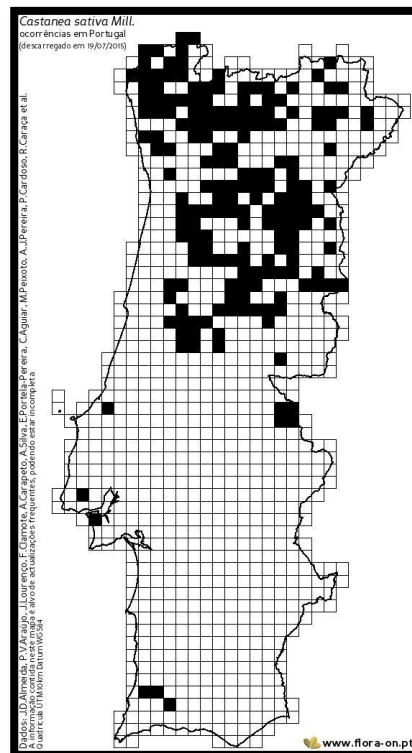
Na Europa (Fig. 2) o castanheiro encontra-se distribuído nas regiões mais a sul, com algumas populações a atingirem latitudes um pouco mais elevadas na Inglaterra. A França é o país com a maior área desta espécie e onde as populações se apresentam menos fragmentadas. Outros países com áreas importantes são a Espanha, Itália, Turquia e Portugal, embora muitos outros países da orla mediterrânica possuem também esta espécie (Capelo e Catry, 2007).



**Figura 2** - Distribuição geográfica do castanheiro na Europa (Fonte: Euforgen)

Os registos fósseis mais antigos encontrados em Portugal identificam a presença do género *Castanea* no Terciário, através de macrorrestos e impressões de folhas (Capelo e Catry, 2007).

A sua área de distribuição em Portugal (Fig. 3) advém da sua adaptação ecológica às condições de cultivo. Em termos climáticos o castanheiro possui viabilidade cultural e vitalidade vegetativa em climas temperados ou mediterrâneos. As maiores manchas de castanheiro no nosso território encontram-se nas serras do centro do país, como serra da Lousã, Açor e Estrela, bem como na Beira Baixa e Alta, Minho, Trás-Os-Montes e Alto Douro, e Serra de São Mamede em Portalegre. Nestes locais o castanheiro cultivava-se perto do fundo dos vales, devido à maior disponibilidade de água (Capelo e Catry, 2007).



**Figura 3** - Distribuição geográfica de *Castanea sativa* em Portugal continental. (<http://www.flora-on.pt/index.php#/wCastanea+sativa>)

### 1.2.3 Importância económica

Na Europa as primeiras arborizações florestais consideráveis com castanheiro datam da idade média, já nessa época esta árvore desempenhou um importante papel na economia dos senhores feudais e na alimentação das populações (Monteiro e Patricio, 2007).

O castanheiro, a nível nacional, é considerado uma árvore de grande interesse, sendo explorado principalmente para a produção de castanha, mas também para a produção de madeira em castiçais a qual é de excelente qualidade. Antes de a batata ter sido introduzida na Europa aquando da expansão marítima, a castanha era uma importante fonte de hidratos de carbono, sendo muito utilizada na alimentação da época, inclusive no fabrico de pão (Capelo e Catry, 2007).

Nos dias de hoje o castanheiro como produtor de fruto ainda representa um papel de relevo na economia rural das regiões do interior do país, a maior percentagem de castanha produzida é para venda (Gonçalves, 1991).

Na tabela 1 é possível visualizar a superfície destinada à produção de castanha, bem como a quantidade de castanha produzida no território nacional, segundo os dados publicados em 2012 pelo Instituto Nacional de Estatística (INE). A área relativa à produção de castanha é cerca de 34000 hectares, produzindo aproximadamente 18000 toneladas de castanha por hectare em todo território continental. O Norte e o Centro do país apresentam a maior superfície de produção e conseqüentemente a maior produção de castanha a nível nacional.

No final no século XX, verificou-se um aumento da procura do castanheiro em toda a Europa incluindo em Portugal, triplicando a área de plantação bem como a recuperação de souts por toda a Europa (Costa *et. al.*, 2011)

**Tabela 1** – Superfície de produção de castanha em hectares e respetiva produção em toneladas.

	<b>Superfície (ha)</b>	<b>Produção (t/ha)</b>
<b>Continente</b>	34656	18926
<b>Norte</b>	30586	15393
<b>Centro</b>	3529	2943
<b>Lisboa</b>	6	6
<b>Alentejo</b>	520	571
<b>Algarve</b>	16	13

(Fonte: INE, 2012)

Na tabela 2 estão representados o número de árvores de castanheiro vendidas por viveiristas em Portugal continental, o norte e o centro lideram este sector, não obstante, em todo o território foram venidas aproximadamente 70000 árvores de castanheiro no ano de 2012.

**Tabela 2** - Número de árvores vendidas por viveiristas.

	<b>Nº Árvores</b>
<b>Continente</b>	70352
<b>Norte</b>	50307
<b>Centro</b>	17432
<b>Lisboa</b>	798
<b>Alentejo</b>	1786
<b>Algarve</b>	38
<b>Árvores Importadas</b>	1010

(Fonte: INE, 2012)

As maiores ameaças ao castanheiro em Portugal e na Europa são oriundas de stresses bióticos, nomeadamente a doença-da-tinta provocada por *Phytophthora* spp, tendo os primeiros sintomas desta doença sido detetados em 1726 (Biraghi, 1946). O cancro provocado por *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr. introduzido na Europa a partir dos Estados Unidos, em 1938 (Biraghi, 1946), é também uma doença que causa danos consideráveis.

#### 1.2.4 Doença-da-tinta

A doença-da-tinta é considerada uma das doenças mais destrutivas do castanheiro (Vettraino, 2001).

É causada pelos fungos *P. cinnamomi* e *Phytophthora cambivora* (Petri, 1917; Milburn & Gravatt, 1932; Day, 1938; Crandall *et al.*, 1945, citados por Vettraino, *et al.*, 2001).

Quando uma árvore está infetada com esta doença, apresenta diversos tipos de sintomas nomeadamente cloroses nas folhas, enrolamento e senescência foliar, exsudações de cor negra no tronco, (tonalidade característica que dá o nome à doença) que é consequência da oxidação dos polifenóis libertados pelas células corticais, do floema ou do câmbio (Carvalho, 2014), causando a podridão do colo e das raízes. A consequência nos casos mais graves é a morte da planta (Vannini e Vettraino 2001).

A doença da tinta tem causado avultados prejuízos em toda a Europa, sobretudo em Portugal, sendo responsável pela drástica redução da área de cultura do castanheiro (Fernandes, 1966b, citado por Gonçalves, 1991).

Segundo Gonçalves (1991), fungo do solo e inicia o ataque ao sistema radicular, penetrando nas extremidades das raízes e progredindo em direção ao colo, acabando por atingir o tronco, causando lesões como a destruição do câmbio vascular que se refletem na paragem do crescimento lateral. Como resultado surge o fendilhamento da casca e consequente perda dos translocados floémicos, dificultando assim o fornecimento de nutrientes à parte aérea da planta causando a morte das extremidades da copa.

De acordo com Cortizo *et al.* (1999), *P. cinnamomi* interrompe a circulação dos solutos entre a parte aérea e o sistema radicular da planta, causando primeiramente o stress hídrico, que por consequência provoca o murchar parcial das folhas, seguidamente ocorre uma perda gradual de clorofila, que dá lugar a cloroses bastante acentuadas que ditam a morte das folhas.

Neste contexto, e dada a dificuldade em combater esta doença, torna-se urgente encontrar génotipos de interesse que possam apresentar tolerância à doença-da-tinta. Estes génotipos permitirão não apenas um aumento da produção, mas também estudar de maneira mais objetiva os mecanismos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que permitem a determinadas plantas combater a doença de maneira mais eficaz do que outras.

### **1.3 Propagação da *Castanea sativa***

#### **1.3.1 Micropropagação em larga escala**

De acordo com Canhoto (2010), a micropropagação é um método cada vez mais utilizado para produção de plantas em larga escala, revelando-se vantajoso quando estamos perante uma plantas difíceis de propagar quando utilizados os métodos de propagação convencionais.

Uma das técnicas de micropropagação baseia-se na proliferação de meristemas caulinares. Neste processo são cultivados ápices caulinares ou segmentos nodais *in vitro*, em condições de cultura apropriadas com o objetivo de estimular o desenvolvimento dos referidos meristemas. Cada meristema pode assim formar um ou vários rebentos caulinares, cada um deles com vários fitómeros que podem voltar a ser usados em novos ciclos de multiplicação obtendo-se uma taxa de multiplicação exponencial (Chawla, 2009).

As potencialidades da cultura de meristemas são inúmeras, nomeadamente quando se pretende obter um grande número de plantas num curto espaço de tempo (Chawla, 2009) e com qualidade fitossanitária garantida, livre de agentes patogénicos (Dodds e Roberts, 1985), esta técnica, permite também a produção de novas variedades, e representa um papel fundamental para o estabelecimento de bancos de germoplasma (Canhoto, 2010).

De acordo com o proposto por Murashige (1974), o processo de obtenção de plantas por proliferação de meristemas pode ser dividido em 3 fases: 1) estabelecimento *in vitro* dos explantes, 2) multiplicação e 3) ulterior enraizamento.

### 1.3.2 Estabelecimento *in vitro*

Nesta fase são selecionadas as plantas que irão ser propagadas, ou seja, são escolhidas árvores com características de interesse (Canhoto, 2010).

Esta etapa envolve todo o processo desde a recolha do material até ao estabelecimento *in vitro*. São aplicados pré-tratamentos ao material tal como sistemas de desinfeção, avaliação de fatores como a idade e estado fisiológico da planta mãe (Gonçalves, 1991).

A planta mãe deverá encontrar-se em estufa sob condições de crescimento controladas, favoráveis ao seu desenvolvimento, sendo mais fácil o controlo fitossanitário da mesma, evitando por outro lado a forte possibilidade de contaminação existente quando a árvore está estabelecida no campo. Existem espécies impossíveis de manter em estufa, nestas situações removem-se estacas da planta mãe, e estas são mantidas em condições controladas na estufa promovendo o abrolhamento das gemas axilares que darão origem a novos rebentos de onde serão obtidos os segmentos nodais para estabelecimento das culturas (Canhoto, 2010).

A fase do estabelecimento inclui o isolamento do explante e a sua colocação no meio de cultura em condições de assepsia (Carvalho e Vidal, 2003).

O sucesso desta fase consiste na obtenção do maior número possível de explantes não contaminados em condições de iniciarem a fase seguinte, designada por multiplicação (Canhoto, 2010).

No que se refere ao material com maior potencial para estabelecer *in vitro*, os explantes retirados do ápice encontram-se num estado de desenvolvimento mais jovem comparativamente aos explantes obtidos a partir da base da planta, pois o ápice apresenta maior capacidade de regeneração (Dodd e Roberts, 1985; Canhoto, 2010).

Nesta fase as citocininas são componentes fundamentais dos meios de cultura, mesmo que em quantidades reduzidas (Dodd e Roberts, 1985). Estas têm a função de quebrar a dominância apical, promovem o desenvolvimento merismático e diminuem a senescência dos tecidos evitando a necrose (Taiz e Zeiger, 2010).



### 1.3.3 Multiplicação

O principal objetivo desta fase é conseguir propagar o material vegetal sem que ocorram perdas da estabilidade genética, tendo como fatores mais importantes para o seu sucesso a formulação dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de crescimento (Gonçalves, 1991; Beltrame, 2013).

A multiplicação está muito dependente do sucesso da fase do estabelecimento. Quando o ápice ou os segmentos nodais são colocados *in vitro*, ao fim de algum tempo estes irão originar rebentos caulinares que possuirão vários fitómeros, que posteriormente serão isolados e colocados em novo meio de cultura, e este processo é repetido indefinidamente.

Os reguladores de crescimento, nomeadamente as citocininas desempenham um papel fulcral nesta fase, embora algumas espécies dispensem a sua presença. O tipo de citocinina bem como as quantidades a serem utilizadas são determinadas para cada espécie (Canhoto, 2010).

A utilização de diferentes tipos de citocininas revela-se uma mais-valia em empresas de micropropagação bem como em universidades onde existem estudos dedicados a cultura de tecidos, estas estimulam a divisão celular e por conseguinte o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Na fase referente à multiplicação, as hormonas convencionalmente utilizadas nos meios de cultura são citocininas, designadamente: benziladenina, cinetina, zeatina e 2ip (isopentil adenina) (Dodd e Roberts, 1985).

A síntese das citocininas ocorre nos ápices radiculares das plantas e são transportados pelo xilema até outros locais da planta, estes reguladores de crescimento são compostos promotores da divisão celular. Controlam genes envolvidos na regulação e funcionamento dos meristemas (Saad e Elshahed, 2012).

De acordo com Taiz e Zeiger (2010), as citocininas desempenham um papel fundamental nesta etapa da micropropagação, pois são responsáveis por diversos processos, nomeadamente a regulação do ciclo celular, regulação do meristema apical do caule, retardamento da senescência foliar, e promovem o desenvolvimento dos cloroplastos.

### 1.3.4 Enraizamento e aclimatização

O objetivo desta fase é enraizar os rebentos caulinares produzidos na fase anterior de modo a obter plantas prontas a ser transferidas para um substrato e, depois, para condições de campo. É normalmente nesta fase que se verificam grandes perdas o que causa limitações importantes no sucesso da micropropagação (Canhoto, 2010). Algumas espécies, nomeadamente as herbáceas enraízam com relativa facilidade. Mesmo algumas espécies lenhosas, como o choupo, forma raízes facilmente. No entanto, em muitas espécies arbóreas ou arbustivas o enraizamento é difícil, sendo necessário a utilização de tratamentos ou auxínicos. O enraizamento pode ocorrer *in vitro* ou *ex vitro* dependendo do procedimento experimental aplicado. No primeiro caso, os rebentos são submetidos a um tratamento com uma auxina (normalmente o IBA, ácido-3-indol butírico), a baixas concentrações e por períodos de tempo relativamente longos (2-4 semanas) seguido da passagem dos rebentos para meios sem auxina de forma a permitir o desenvolvimento radicular induzido na fase anterior. O enraizamento *ex vitro* consiste na remoção dos rebentos caulinares e aplicação de um choque auxínico (concentrações elevadas) com passagem direta para um substrato.

A transplantação e aclimatação revelam-se fases críticas, devido ao fraco desenvolvimento da cutícula das plantas ligado ao deficiente funcionamento dos estomas, tornando-se na principal causa de desidratação nas primeiras horas da aclimatação. Para além disso, as folhas formadas *in vitro* são muito finas e pouco eficientes fotossinteticamente. O mésofilo tem poucas e pequenas células a constituir os parênquimas e existem grandes espaços intercelulares, reduzindo as conexões vasculares entre o sistema radicular e o sistema caulinar, dificultando assim o transporte dos translocados floémicos e xilémicos. (McClelland *et al.*, 1990, citado por Gonçalves, 1991).

Para o sucesso desta etapa é necessário efetuar determinados procedimentos, nomeadamente retirar todos os vestígios de agar da planta e tratá-la com fungicida. É igualmente aconselhável a utilização de um substrato previamente esterilizado. Após a transplantação é importante proteger as plantas da intensidade luminosa excessiva e da desidratação através de rega por nebulização. Após as plantas estarem estabelecidas no novo ambiente, estas deverão ser gradualmente sujeitas à redução da taxa de humidade e ao acréscimo da intensidade luminosa até que se encontrem preparadas para permanecer em ambiente natural (Gonçalves, 1991).

---

## 1.4 *Phytophthora cinamomi*

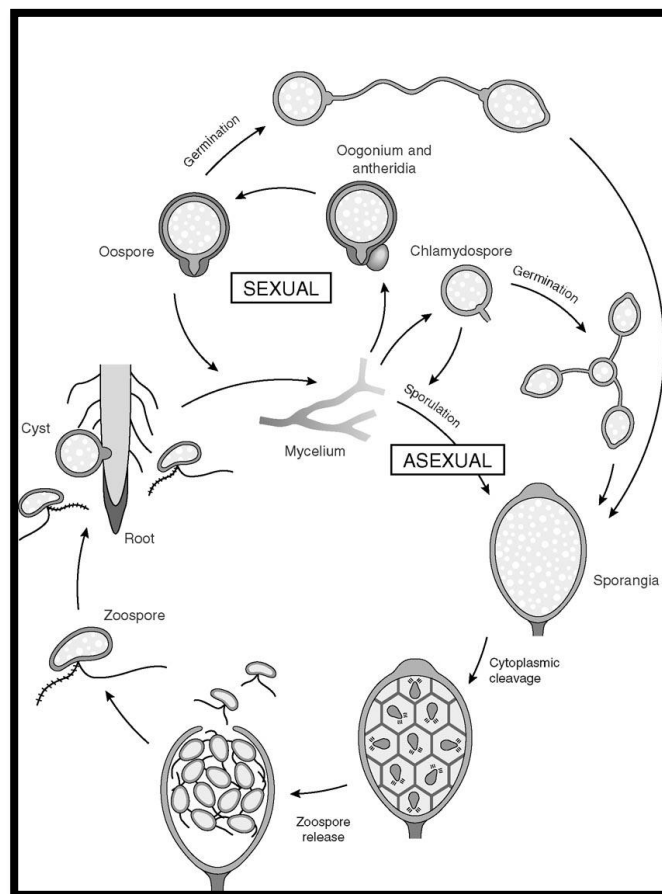
### 1.4.1 Caracterização da espécie fúngica

*P. cinamomi* Rands pertence ao reino Chromista, filo Oomycota, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae e género *Phytophthora*, tendo sido isolada pela primeira vez em árvores-da-canela, em Sumatra. Há indícios que este patógeno seja oriundo da Papua, na Nova Guiné, mas atualmente apresenta uma distribuição mundial (Hardham, 2005). Trata-se de uma espécie saprófita que cresce e persiste no solo ou em material vegetal infetado, na forma de clamidospóros e, em menor quantidade, de oósporos (Weste, 1983; Zentmyer and Mircetich, 1966, citados por Hardham, 2005). Quando as condições favorecem o crescimento do patógeno este entra no ciclo de esporulação assexuada como se pode verificar na figura 4. A esporulação assexuada requer um ambiente líquido, tanto para a formação dos esporângios como para desenvolver a sua atividade e libertar os zoósporos móveis (Hardham, 2005).

Segundo Hardham (2005), as hifas somáticas formam esporângios multinucleados que libertam entre 20 a 30 zoósporos biflagelados uninucleados. No espaço de 2 a 3 dias, num hospedeiro que seja suscetível, é formado o esporângio na superfície da planta. O ciclo assexuado pode ser repetido durante muitas vezes em rápida sucessão ampliando o potencial do inóculo na área infetada.

A rápida disseminação de *P. cinamomi* por todo o mundo, durante o último século, tem tido um impacto considerável quer em florestas nativas quer em plantas exploradas do ponto de vista económico (Hardham, 2005).

A *P. cinamomi*, consegue sobreviver até 6 anos em solo húmido (Zentmyer and Mircetich, 1966, citado por Hardham, 2005) sendo a humidade um fator relevante para a sua propagação e longevidade. O desenvolvimento da doença é reforçado após chuvas fortes, que causam o encharcamento dos solos.



**Figura 4** - Ciclo de vida de *Phytophthora cinamomi* (diagrama de A.Hardham, 2005, Australian National University, Canberra, A.C.T.)

#### 1.4.2 Influência dos fatores edafo-climáticos na propagação de *P. cinnamomi*

A temperatura e a humidade do solo e da atmosfera, são os fatores mais influentes para o desenvolvimento de *P. cinnamomi* (Lopes, 2007).

As temperaturas adequadas à infeção podem variar consoante o hospedeiro (Zentmyer, 1981) sendo os valores mais comuns entre os 20 °C e 30 °C (Lopes, 2007).

No que se refere à altitude, a doença causa mais prejuízos em regiões abaixo dos 700 metros, pois acima dos 800 metros de altitude as infeções são raras e quando surgem apresentam um desenvolvimento lento (Lopes, 2007)

### 1.4.3 Mecanismos de infecção

Para que ocorra a infecção, é importante que se verifiquem condições adequadas de temperatura e humidade pelo que a primavera é a altura do ano mais crítica em termos de propagação da doença (Böckmann, 1986, citado por Lopes, 2007).

Os zoósporos flagelados são libertados pelos esporângios, e atraídos para o sistema radicular do hospedeiro (Zentmyer, 1970, citado por Lopes, 2007). O ataque do patógeno é feito a partir das raízes através de uma lesão ou por ação direta da própria *Phytophthora* utilizando enzimas capazes de destruir a parede celular do das células corticais das raízes (Lopes, 2007).

A infecção tem início a partir da atração dos zoósporos para o sistema radicular do hospedeiro (Zentmyer, 1970, citado por Lopes, 2007). O ataque do patógeno é feito a partir das raízes através de uma lesão ou por ação direta da própria *Phytophthora* (Lopes, 2007).

Assim sendo, forma-se uma via de penetração das hifas que invadem as células e acabam por consumir os componentes citoplasmáticos (Cortizo *et al.*, 1999)

*P. cinnamomi* inicia a invasão nas radículas mais finas, preferencialmente a partir das extremidades não lenhosas, causando a lise celular rumo ao colo da planta (Abreu, 1992, Lopes, 2007).

## 1.5 Objectivos

Como referido anteriormente, existe um aumento da procura de árvores de castanheiro a nível nacional, surge desta forma a necessidade de empresas que se dedicam exclusivamente à produção de árvores de fruto, satisfazer a procura do mercado.

Técnicas como a micropropagação *in vitro* revelam-se uma mais valia para estas empresas, pois apesar do grande investimento inicial a nível de equipamento, futuramente existe a garantia da produção de um grande número de plantas com elevada qualidade produtiva e fitossanitária num curto espaço de tempo.

A parceria entre a UC InProPlant, vem conciliar o conhecimento científico com o conhecimento dos produtores, assim, é necessário seleccionar no campo as árvores com interesse comercial, e no laboratório desenvolver os protocolos inerentes à produção das plantas de uma forma eficaz, com vista a larga escala.

Este trabalho de mestrado debruçou-se, numa componente mais prática, na optimização de protocolos de micropropagação, desde o estabelecimento passando pela multiplicação até ao enraizamento e posterior aclimatização de clones de castanheiro.

Neste sentido, foi estudado o efeito de diversos fatores no desenvolvimento das plantas *in vitro*, nomeadamente o efeito do tipo citocinina benziladenina (BA) e zeatina utilizadas na fase da multiplicação, foi também estudado o efeito de três diferentes tipos de recipientes nesta fase. No enraizamento, fizeram-se ensaios de modo a estudar o enraizamento por dipping *ex vitro* e indução e alongamento *in vitro*, no último foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol butírico (IBA) para a indução de raízes.

Á semelhança do que já foi dito acerca das doenças de afetam o castanheiro, e sendo a doença-da-tinta uma das mais destrutivas, surge a necessidade de encontrar e estudar genótipos de castanheiro que apresentem alguma tolerância a esta doença. Assim, o ultimo objetivo deste trabalho passa por realizar ensaios que permitirão avaliar a tolerância de diversos genótipos de castanheiro ao fungo *P. cinnamomi* que provoca a doença-da-tinta do castanheiro.

## **2 Materiais e Métodos**

---

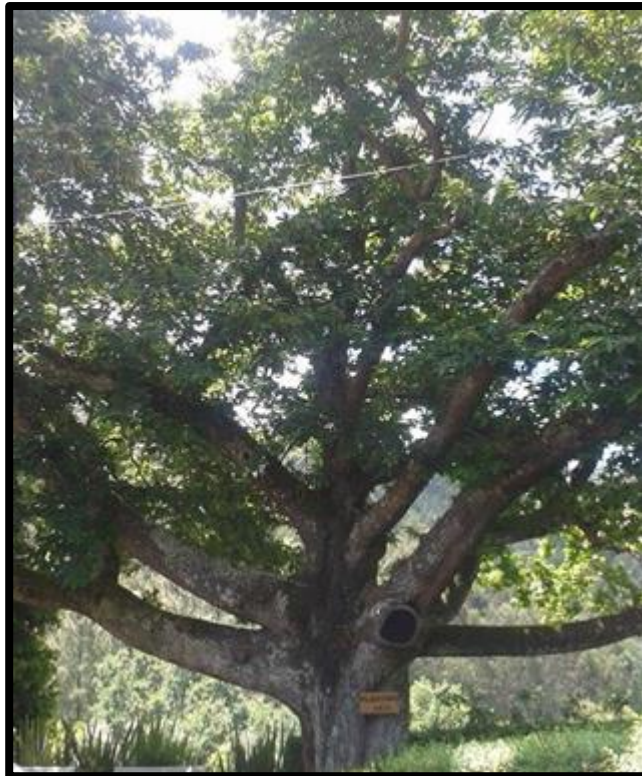






## 2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado nos ensaios que se seguem é de origem seminal proveniente da planta-mãe (CCP), que se encontra representada na figura 5 e que está localizada na propriedade dos Viveiros José Sampaio na freguesia de Paraíso, concelho de Castelo de Paiva.



**Figura 5** - Árvore de castanheiro localizada em Castelo de Paiva (CCP)

Os genótipos CX1, CX5 e 6333 encontram-se mantidos *in vitro* como está indicado na tabela 3, bem como a sua localização, ano de estabelecimento e ensaios em que foram utilizados.

Os restantes genótipos utilizados encontram-se no campo. A planta-mãe (CCP), já referida e presumivelmente tolerante à tinta-do-castanheiro é proveniente de Castelo de Paiva enquanto os clones P1, P2, P4, P5 e P7 encontram-se na Quinta da Valada, Moita, Lousã (N 40° 116837' W - 8° 270115'). Material proveniente destes genótipos foi utilizado nos ensaios em que se analisou a tolerância à tinta-do-castanheiro, como indicado na tabela 3.

A planta-mãe é uma árvore com cerca de 80 anos e encontra-se numa zona fortemente afetada pela doença da tinta-do-castanheiro. Observações ao longo dos anos mostraram que a

referida árvore permanece sem sintomas da doença, o que parece indicar um grau de tolerância à doença elevado e superior às árvores dos povoamentos vizinhos. Deste modo, testou-se o comportamento de estacas desta árvore e outras das árvores a que deu origem por via seminal na presença fungo causador da doença.

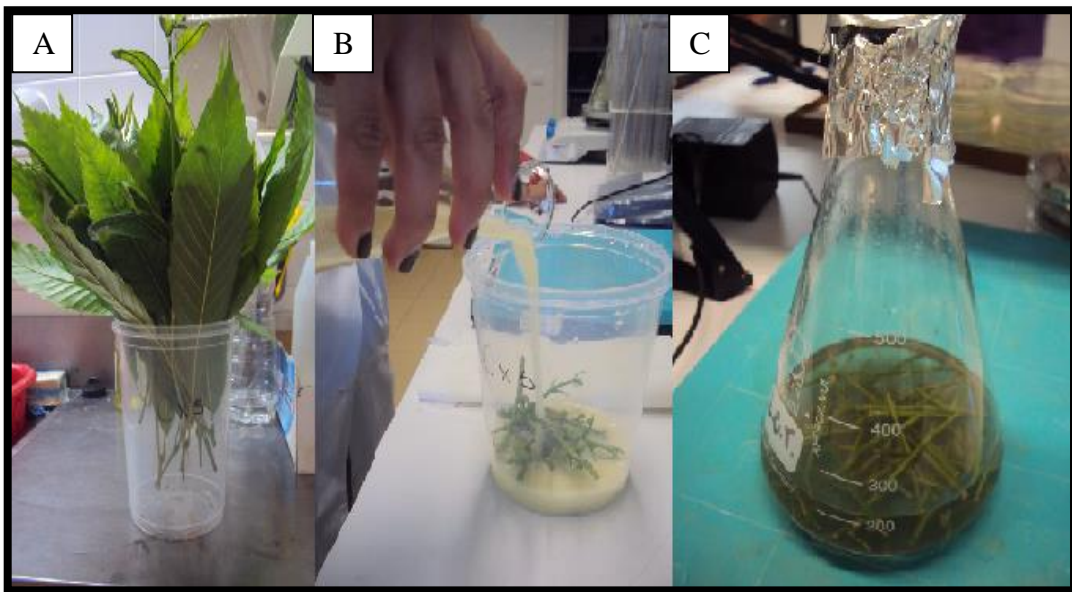
**Tabela 3** – Caracterização dos clones utilizados nos ensaios

Clone	Origem	Localização		Ano da Plantação	Ano estabelecimento <i>in vitro</i>	Ensaio
		Campo	Estufa			
CX1	Seminal	-	DCV	2007	2013	Multiplicação; Enraizamento
CX5					2013	Multiplicação; Enraizamento
6333					2013	Multiplicação; Enraizamento
P1		Lousã		2007	-	Inoculação em Ramo destacado
P2						
P4						
P5						
P7		Castelo de Paiva		1931		
CCP						
UTAD	Vila Real		2007			

## 2.2 Otimização dos protocolos de micropropagação de *Castanea sativa*

### 2.2.1 Estabelecimento *in vitro* de material de castanheiro

O material vegetal foi recolhido na estufa do DCV (Departamento de Ciências da Vida) pela manhã de modo a evitar a desidratação tendo sido obtidas estacas com cerca de 20 cm de comprimento que foram transferidas para o laboratório. Procedeu-se de seguida à remoção das folhas e as estacas originais foram segmentadas em estacas mais pequenas (cerca de 5 cm) e colocadas numa solução do fungicida Mancozebe (1 g/l) durante 5 minutos. Depois de lavadas com água corrente procedeu-se à sua desinfeção numa solução de hipoclorito cálcio a 5%, durante 7 minutos, com agitação permanente (Fig. 6). As estacas foram novamente lavadas, com água esterilizada, numa câmara de fluxo laminar, e de seguida colocadas numa solução esterilizada do agente antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) a 0,05%.



**Figura 6** -- Processo de esterilização dos rebentos de castanheiro para o estabelecimento *in vitro*. A) Rebentos pertencentes ao clone CX5 após recolha na estufa; B) aplicação de fungicida; C) esterilização dos rebentos com hipoclorito cálcio.

A partir destas estacas foram obtidos os segmentos nodais que se transferiram para tubos de ensaio contendo 15 ml de meio WPM (McCown, 1981), com a adição de 0.5 mg/l da citocinina benziladenina (BA), com pH de 5,8 sujeito a uma autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. O material vegetal depois de estabelecido *in vitro* foi mantido numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro, com temperatura de 21 °C. Após 4

semanas de cultura, os explantes que sobreviveram foram transferidos para meio fresco de igual composição. Na figura 7 podem observar-se algumas estacas de castanheiro que foram recolhidas no campo e posteriormente trazidas para o laboratório para abrolhar em condições controladas.



**Figura 7** - Estacas de castanheiro para abrolhamento em condições controladas

## 2.2.2 Propagação *in vitro* de castanheiro

### 2.2.2.1 Multiplicação

A multiplicação e manutenção das culturas *in vitro* de castanheiro foram realizadas com intervalos de 4 semanas no meio base WPM (McCown, 1981). O meio de cultura depois de preparado e com o pH ajustado para 5,8 com soluções diluídas de NaOH ou HCl, foi distribuído para os respectivos recipientes, tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura, frascos luminarc 125 ml e frascos altos de 100 ml. Posteriormente o meio de cultura foi esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro, com temperatura de 21 °C.

No ensaio de multiplicação, foi testado o efeito de 2 tipos de reguladores de crescimento com a mesma concentração (0,5 mg/ l) pertencentes ao grupo das citocininas, sendo eles, o BA e a zeatina, estes tratamentos foram testados em 3 genótipos diferentes, o CX1, CX5 e 6333.

Foram utilizados três tipos de recipientes: tubos de ensaio; frascos luminarc e frascos altos (Fig. 8).

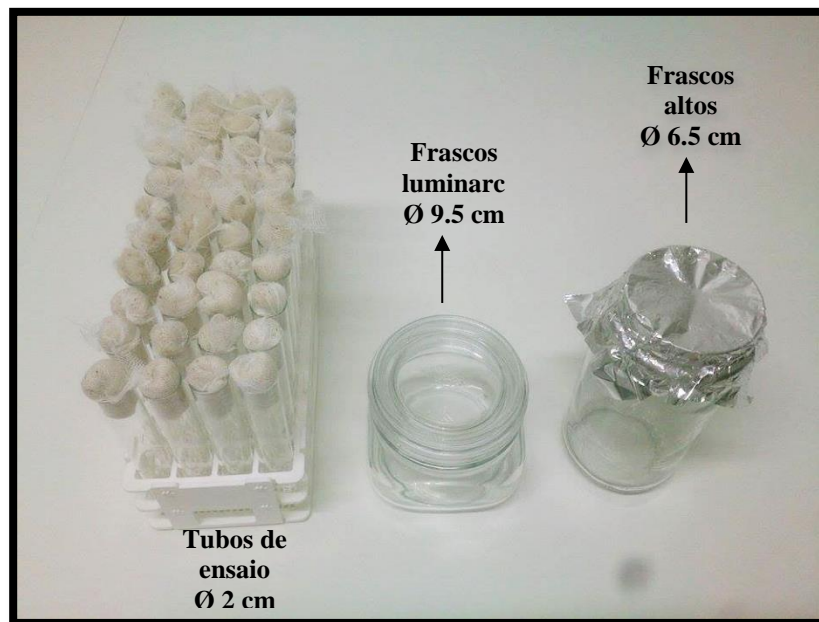


Figura 8 - Recipientes utilizados no ensaio de multiplicação.

O objetivo deste ensaio foi estudar o efeito das duas citocininas, bem como a avaliação do comportamento as plantas quando sujeitas a diferentes tipos de recipientes. Por cada tratamento foram realizadas duas réplicas e os parâmetros avaliados foram 1) a altura do maior rebento, 2) o número de nós e 3) o número de rebentos.

A tabela 4 resume os parâmetros testados no ensaio de multiplicação.

**Tabela 4** - Descrição dos ensaios de multiplicação.

Ensaio de multiplicação								
Genótipos	Regulador de Crescimento Vegetal	Tipos Tratamento	Tipo de recipiente	Nº plantas \ recipiente	Nº total de plantas	Parâmetros avaliados	Nº Réplicas	Intervalo de Avaliação
6333; CX1; CX5	Benziladenina (BA) (0,5mg/l)	WPMB	Tubos	1	30	Altura > rebento; Nº nós; Nº rebentos	2	4 Semanas
			Frascos luminarc	5	75			
			Frascos altos	5	75			
			Tubos	1	30			
6333; CX1; CX5	Zeatina (0,5 mg/l)	WPMZ	Frascos luminarc	5	75			
			Frascos altos	5	75			

### 2.2.3 Enraizamento

No que diz respeito aos ensaios de enraizamento foram utilizadas, plantas provenientes de proliferação de meristemas em meio sólido WPMB e WPMZ.

Foram utilizados dois processos diferentes para o enraizamento, estes encontram-se descritos de forma sucinta na tabela 5.

**Tabela 5** - Descrição dos ensaios de enraizamento.

	<b>Dipping <i>ex vitro</i></b>	<b>Indução <i>in vitro</i></b>
<b>Genótipos</b>	CX1; CX5; 6333	CX5
<b>Método Enraizamento</b>	Dipping <i>ex vitro</i> (1g/l IBA)	Indução e alongamento <i>In vitro</i>
<b>Meio Indução</b>	-	WPM + ( 3; 5 mg/l IBA)
<b>Meio Alongamento</b>	-	WPM + 5% carvão ativado
<b>Substrato</b>	Perlite	Perlite
<b>Substrato final</b>	Substrato convencional	Substrato convencional

### 2.2.3.1 Enraizamento - dipping *ex vitro* e indução *in vitro*

Neste ensaio foram utilizadas as plantas resultantes do ensaio de multiplicação. Deste modo, o tamanho dos rebentos utilizados neste ensaio foi variável, consoante o meio de cultura de onde eram provenientes.

No dipping *ex vitro*, a parte basal dos rebentos caulinares foi mergulhada numa solução muito concentrada de IBA (1 g/l) durante dois minutos em seguida os rebentos foram colocados num tabuleiro com perlite, devidamente acondicionado com película aderente, e por fim, este foi levado para o fitoclima, sujeito a um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro à temperatura de 25 °C

Na indução e alongamento *in vitro*, os rebentos caulinares foram colocados primeiramente no meio de indução, composto pelo meio de cultura WPM adicionado de (3 mg/l) de IBA. Os rebentos permaneceram neste tratamento durante sete dias, no escuro. Posteriormente estes foram colocados no meio de alongamento, composto pelo meio WPM com 5% de carvão ativado, e sem adição de reguladores de crescimento, permanecendo durante duas semanas neste tratamento, sujeitos à presença de luz.

Os meios de cultura depois de preparados e com o pH ajustado para 5,8 com soluções diluídas de NaOH ou HCl, foram distribuídos para os respetivos recipientes, tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura, frascos luminarc 125 ml e frascos altos 100 ml. Em cada frasco foram colocadas 5 plantas. Após três semanas de cultura, em ambos os métodos de enraizamento, foi avaliada a presença de raiz.

Na tabela 6 encontra-se descrito o ensaio de enraizamento relativo ao dipping *ex vitro* e indução e alongamento *in vitro*.



**Tabela 6** – Descrição Ensaio de enraizamento referente ao dipping *ex vitro* e indução *in vitro*

Enraizamento (Dipping <i>ex vitro</i> e Indução <i>in vitro</i> )									
Genótipos	Tratamento Aterior	Meio de cultura	Regulador de Crescimento Vegetal	Tipo de recipiente	Nº total de plantas	Nº plantas Dipping (1g/l IBA) <sub>1</sub>	Nº Plantas indução e alongamento <i>in vitro</i> (3 mg/l IBA) <sub>2</sub>	Parâmetros avaliados	Intervalo de avaliação
6333; CX1; CX5	WPMB			Tubos	30	15	15	Presença de Raiz; Comprimento > raiz; Nº raízes	3 Semanas
				Frascos luminarc	70	35	35		
	WPM	Acido-indol-butirico (IBA)	Frascos altos	70	35	35			
		Tubos	30	15	15				
6333; CX1; CX5	WPMZ			Frascos luminarc	70	35	35		
				Frascos altos	70	35	35		

1 - A parte basal das plantas foi mergulhada em 1g/l de (IBA) durante 2 minutos, posteriormente foram colocadas em perlite 100% durante 3 semanas;

2- As plantas foram sujeitas ao meio de indução durante 7 dias, e posteriormente colocadas em meio de alongamento durante 2 semanas

2.2.3.2 Enraizamento – indução e alongamento *in vitro*

No ensaio de enraizamento descrito na tabela 7, apenas foi utilizado o genótipo (CX5), proveniente do meio de multiplicação (WPMZ), propagado nos frascos luminarc. Foram testadas duas concentrações diferentes de IBA, (3 mg/l) e (5 mg/l) respectivamente, de modo a serem estudadas 150 plantas em cada tipo de tratamento e por cada réplica, onde os parâmetros avaliados foram o comprimento da maior raiz e o número de raízes.

Na indução e alongamento *in vitro*, foram utilizados rebentos caulinares com comprimento entre 5-6 cm, estes foram colocados primeiramente no meio de indução, composto pelo meio de cultura WPM adicionado de (3 e 5 mg/l) de IBA. Os rebentos permaneceram neste tratamento durante sete dias no escuro. Posteriormente estes foram colocados no meio de alongamento, composto pelo meio WPM com 5% de carvão ativado, e sem adição de reguladores de crescimento, permanecendo durante duas semanas neste tratamento, sujeitos à presença de luz.

Os meios de cultura depois de preparados e com o pH ajustado para 5.8 com soluções diluídas de NaOH ou HCl, foram distribuídos para os frascos luminarc, em que cada frasco continha 125 ml de meio de cultura, por cada frasco foram colocadas 5 plantas.

Ao fim de três semanas foram avaliados os parâmetros relativos ao comprimento da maior raiz e ao número de raízes por explante.

**Tabela 7** - Descrição do ensaio de enraizamento com indução e alongamento *in vitro*.

Enraizamento (Indução <i>in vitro</i> )										
Genótipo	Tratamento Anterior	Meio de Indução	Meio de Alongamento	Tipo de recipiente	Nº Plantas/ Recipiente	Nº total plantas indução e alongamento - <i>in vitro</i> <sup>1</sup>	Parâmetros avaliados	Intervalo de avaliação	Substrato	Nº Réplicas
CX5	WPMZ	WPM + 3 mg/l (IBA) WPM + 5 mg/l (IBA)	WPM + 5% Carvão ativado	Frascos luminarc	15	150	Presença de Raiz; Comprimento > raiz; Nº raízes	3 Semanas	Perlite 50% +Areia 50 %	2

1 - As plantas foram sujeitas ao meio de indução com as concentrações presentes na tabela durante 7 dias, e posteriormente foram colocadas em meio de alongamento durante 2 semanas.

#### 2.2.4 Aclimatização

No que diz respeito às plantas oriundas do dipping *ex vitro*, estas depois de três semanas em perlite 100%, foram transplantadas para um substrato contendo casca de pinho compostada, turfa e perlite. Estas plantas foram mantidas no fitoclima com temperatura de 25°C e humidade de 60%.

Relativamente à indução e alongamento *in vitro*, passadas 2 semanas no meio de alongamento radicular, as plantas foram transferidas para um substrato com 100% de perlite, onde permaneceram durante 4 semanas, por fim estas foram transplantadas para um substrato composto por casca de pinho compostada, turfa e perlite. Durante todo este processo as plantas foram mantidas no fitoclima com temperatura de 25° C e humidade de 60%.

## 2.3 Avaliação da tolerância do castanheiro à *Phytophthora cinnamomi*

### 2.3.1 Isolamentos de *Phytophthora cinnamomi*

O inóculo utilizado neste ensaio, foi obtido através do isolamento numa plantação de Castanheiro com 5 anos de idade, em Oliveira do Hospital, no ano de 2004, sendo-lhe atribuído o código PH064, este foi isolado pela Doutora Helena Machado do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).

### 2.3.2 Metodologia

#### 2.3.2.1 Inoculação em ramo destacado

O ensaio de inoculação com *P. cinnamomi* foi realizado com recurso a material vegetal proveniente de plantas já estabelecidas no campo.

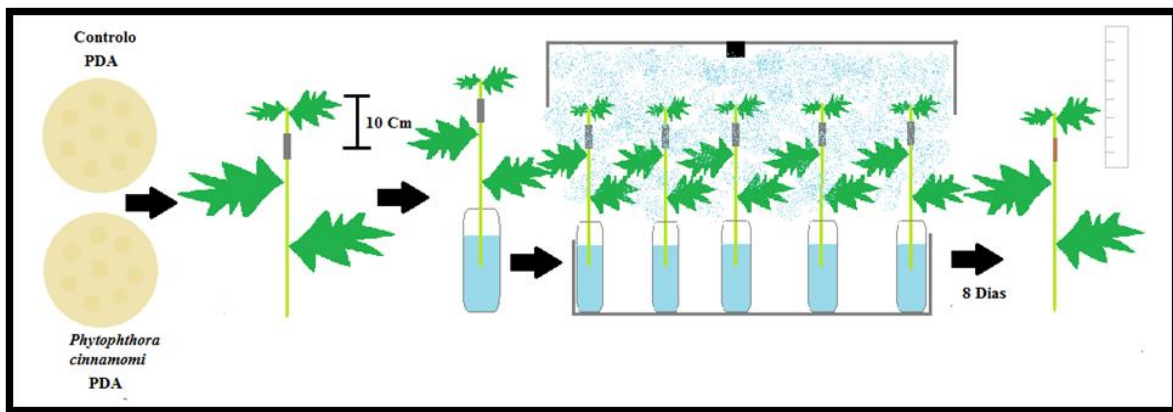
Os ramos foram recolhidos nas árvores indicadas tendo sido obtidos dez ramos por cada genótipo com aproximadamente 30 cm de comprimento, que apresentassem um diâmetro homogêneo de acordo com o procedimento adotado por Gouveia (1993), os ramos foram retirados da ramagem do ano, apresentando-se verdes e com aspeto não lenhificado.

Por cada genótipo prepararam-se 10 ramos, 5 ramos foram inoculados com o disco de micélio, com fungo com 10 dias de cultura, e como controlo os restantes 5 ramos foram inoculados apenas com o meio de cultura, ou seja, foram necessários 10 ramos por cada genótipo avaliado, estudou-se 7 genótipos diferentes, logo manipularam-se 70 ramos na totalidade.

Em cada ramo foi efetuada uma incisão longitudinal com cerca de 3 cm e a 10 cm do ápice do ramo. A incisão destacou uma porção da casca, entre a casca e o respetivo ramo aplicou-se um “plug” da cultura miceliana de *P. cinnamomi* com 10 dias. Para o controlo, os ramos foram inoculados com meio PDA agarizado. O local da inoculação foi protegido com papel de alumínio e fita adesiva para manter a humidade no local. Imediatamente depois de inoculados, cada ramo foi colocado num recipiente com a parte basal mergulhada em água esterilizada. Os recipientes com os ramos foram dispostos em tabuleiros que foram levados para tuneis dentro da estufa, e sujeitos a rega automática, de modo a manter a humidade superficial do material vegetal. A avaliação do comprimento da lesão foi realizada no 8º dia; o

papel de alumínio foi removido e foi feito um corte transversal do segmento inoculado, para melhor visualização e medição da eventual necrose. Na avaliação da lesão importa referir que apenas se fez a medição nos ramos que apresentavam necrose para além do local da incisão como se verifica na figura 9, onde o procedimento é descrito esquematicamente.

Depois de recolhidos os resultados, o material foi destruído por autoclavagem a 121°C durante 30 minutos.



**Figura 9** - Esquema representativo do ensaio de inoculação por ramo destacado.

## 2.4 Análise estatística

Para proceder ao tratamento estatístico dos dados obtidos, recorreu-se ao programa STATISTICA 7. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA), os parâmetros avaliados onde ocorreram diferenças significativas (  $p < 0.05$  ) foram sujeitos ao teste de comparação múltipla de médias, teste de Tukey, de modo a observar onde é que estas diferenças ocorreram. Para a comparação de duas médias foi utilizado o teste  $t$  de Student.

### **3 Resultados**

---







### 3.1 Otimização dos protocolos de micropropagação de *Castanea sativa*

#### 3.1.1 Estabelecimento *in vitro* de material de castanheiro

Nesta fase inicial do trabalho o objetivo principal foi estabelecer *in vitro* o maior número possível de clones das plantas de castanheiro que se encontravam na estufa do DCV, assim sendo, foram estabelecidos 2 clones de um total de 5.

A obtenção de explantes livres de contaminações nesta fase do processo foi crucial para o sucesso do estudo das etapas posteriores. As plantas de castanheiro encontravam-se na estufa em condições controladas e para o sucesso do estabelecimento foi necessário proceder a uma esterilização eficaz com objetivo de obter o menor número de contaminações possível.

Foram realizadas várias tentativas de estabelecimento *in vitro*, estas decorreram entre os meses de Maio e Junho de 2013, onde foram utilizados os rebentos do ano, pois estes eram mais jovens e apresentavam uma textura mais herbácea.

Foram estabelecidos *in vitro* os clones CX1 e CX5 (Fig. 10), os maiores problemas encontrados foram o considerável número de contaminações e a elevada exsudação de fenóis por parte dos explantes, provocando a oxidação e potenciando assim a necrose dos tecidos.

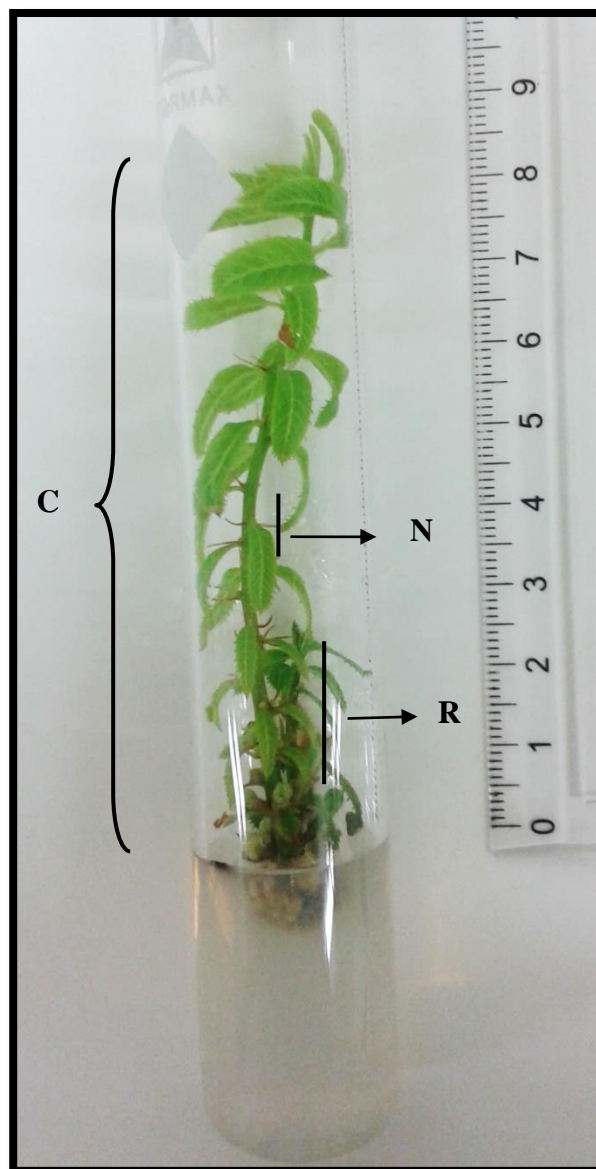


**Figura 10** - Segmentos nodais de CX5 estabelecidos *in vitro* após 4 semanas de cultura.

### 3.1.2 Propagação *in vitro* de Castanheiro

#### 3.1.2.1 Multiplicação

No ensaio de multiplicação, foi estudado inicialmente o efeito do tipo de regulador de crescimento e o genótipo, tendo sido analisados três genótipos diferentes: CX1, CX5 e 6333. Os parâmetros avaliados foram o comprimento do maior rebento, o número de rebentos e o número de segmentos nodais (Fig. 11).



**Figura 11** – Proliferação de meristemas em meio sólido e representação dos parâmetros em estudo: C) comprimento N) nós e R) rebentos.

#### 3.1.2.1.1 Efeito da citocinina e do genótipo

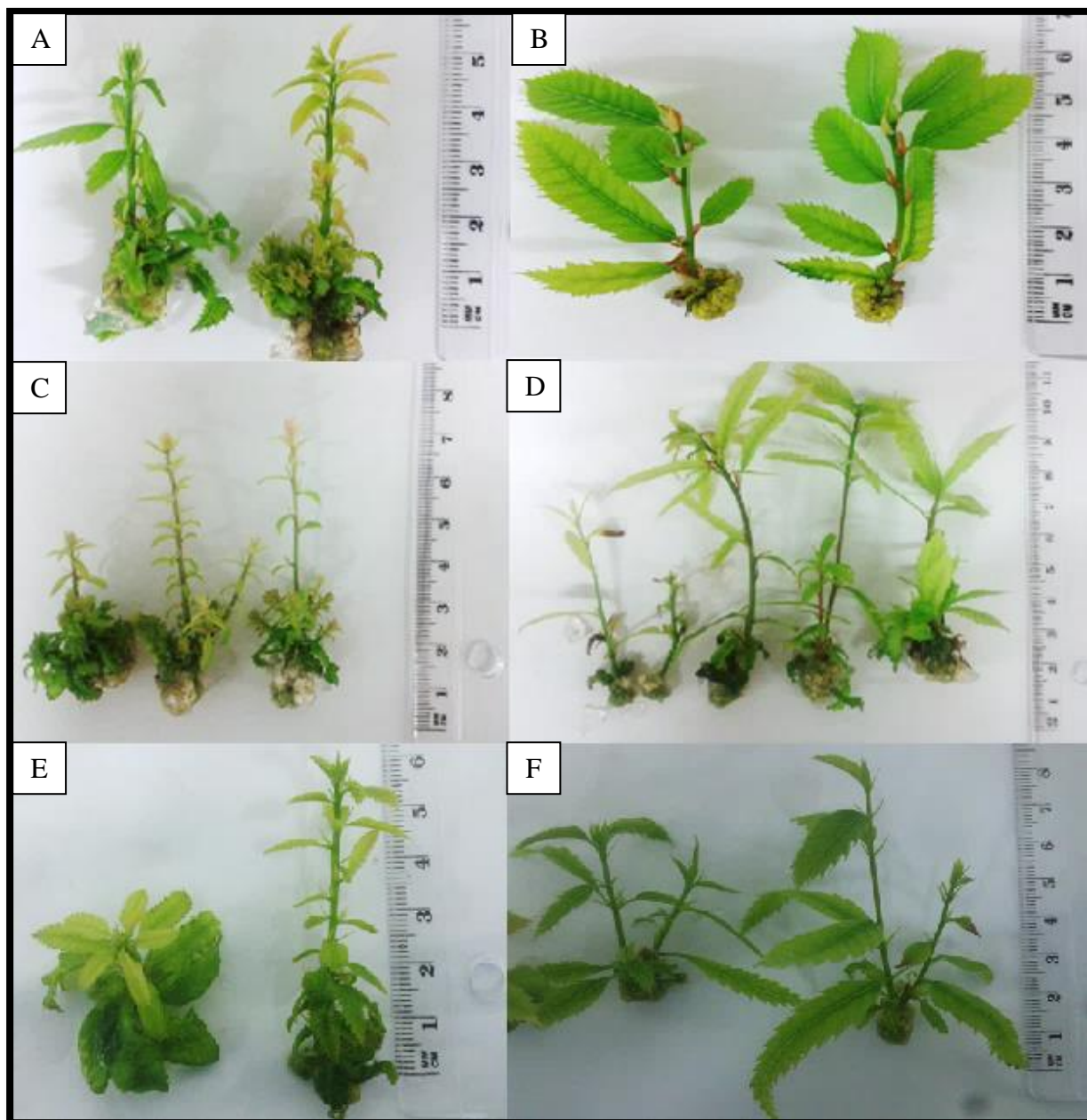
Verificaram-se diferenças significativas no que diz respeito aos parâmetros avaliados, nomeadamente, na altura do maior rebento (Fig. 13A), número de nós presentes no maior rebento (Fig. 13B), e número de rebentos (Fig. 13C).

No que se refere à altura do maior rebento, o genótipo CX5 sujeito ao tratamento com zeatina (Fig. 12D) foi o que apresentou melhores resultados, registando em média um comprimento de cerca de 4 cm, comparativamente com os restantes genótipos e tratamentos analisados (Fig. 13A). É importante salientar que em todos os genótipos sujeitos ao tratamento WPMZ os explantes apresentaram na generalidade maior crescimento em altura comparativamente com os restantes (Fig. 13 A).

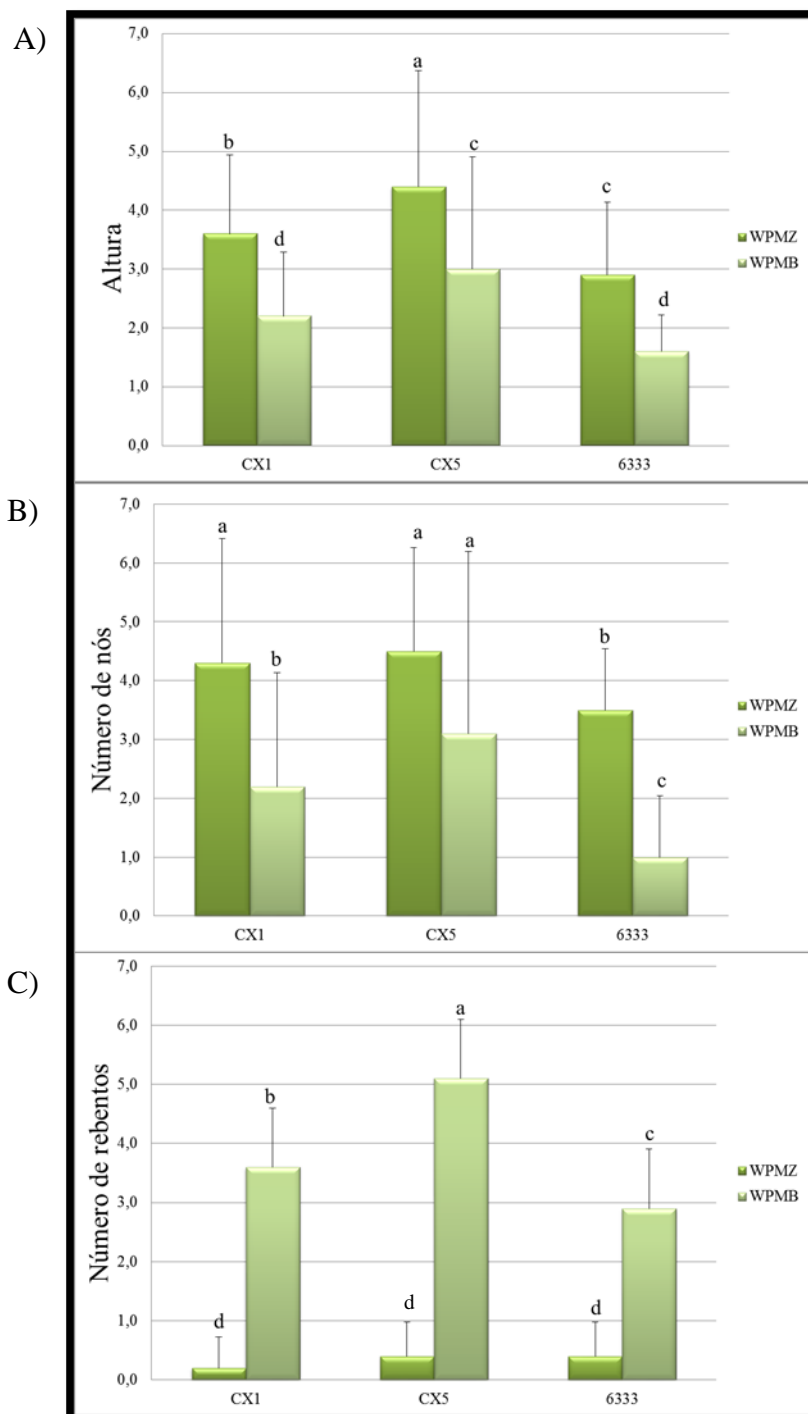
Relativamente ao número de nós presentes no maior rebento, o genótipo CX5 em ambos os tratamentos e o genótipo CX1 no tratamento com WPMZ, foram os que forneceram os melhores resultados (Fig. 13 B).

No que diz respeito ao número de rebentos em todos os genótipos cultivados em meio WPMB apresentaram um maior número de rebentos por explante (Figs. 12 A, C e E), sendo notório que mais uma vez o genótipo CX5 foi o que apresentou a melhor resposta (Fig. 13C)

Os dados mostram que, no tratamento com BA os explantes apresentaram um maior número de rebentos, já no tratamento com zeatina verificou-se um maior crescimento dos entrenós.



**Figura 12** - Aspeto dos explantes referentes ao ensaio de multiplicação. A) Genótipo CX1 em meio WPMB. B) Genótipo CX1 em meio WPMZ. C) Genótipo CX5 em meio WPMB. D) Genótipo CX5 em meio WPMZ. E) Genótipo 6333 em meio WPMB. F) Genótipo 6333 em WPMZ.

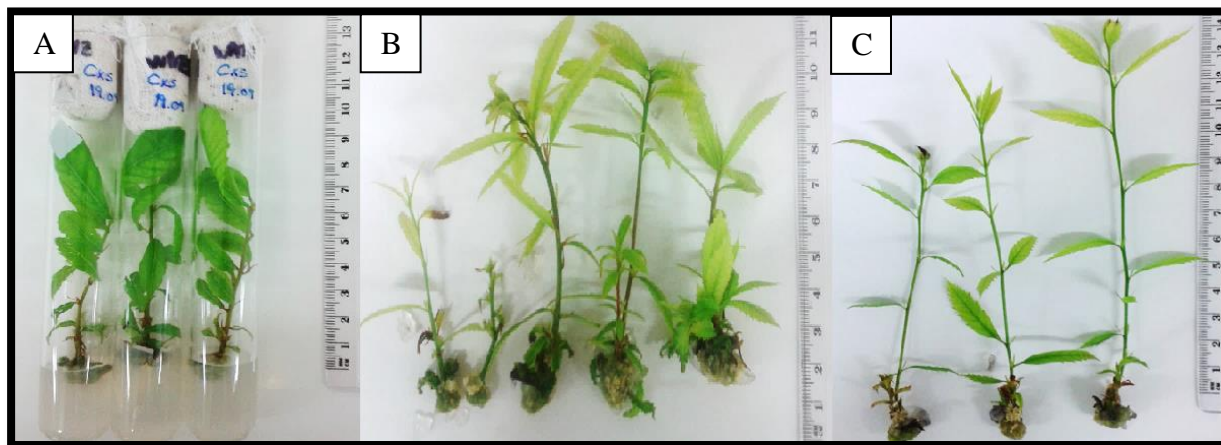


**Figura 13** - Efeito do tipo de citocinina (BA e zeatina) e do genótipo CX1, CX5 e 6333. A) altura do maior rebento; B) número de nós do maior rebento; C) número de rebentos por explante. Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão entre as réplicas. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) segundo o teste de Tukey.

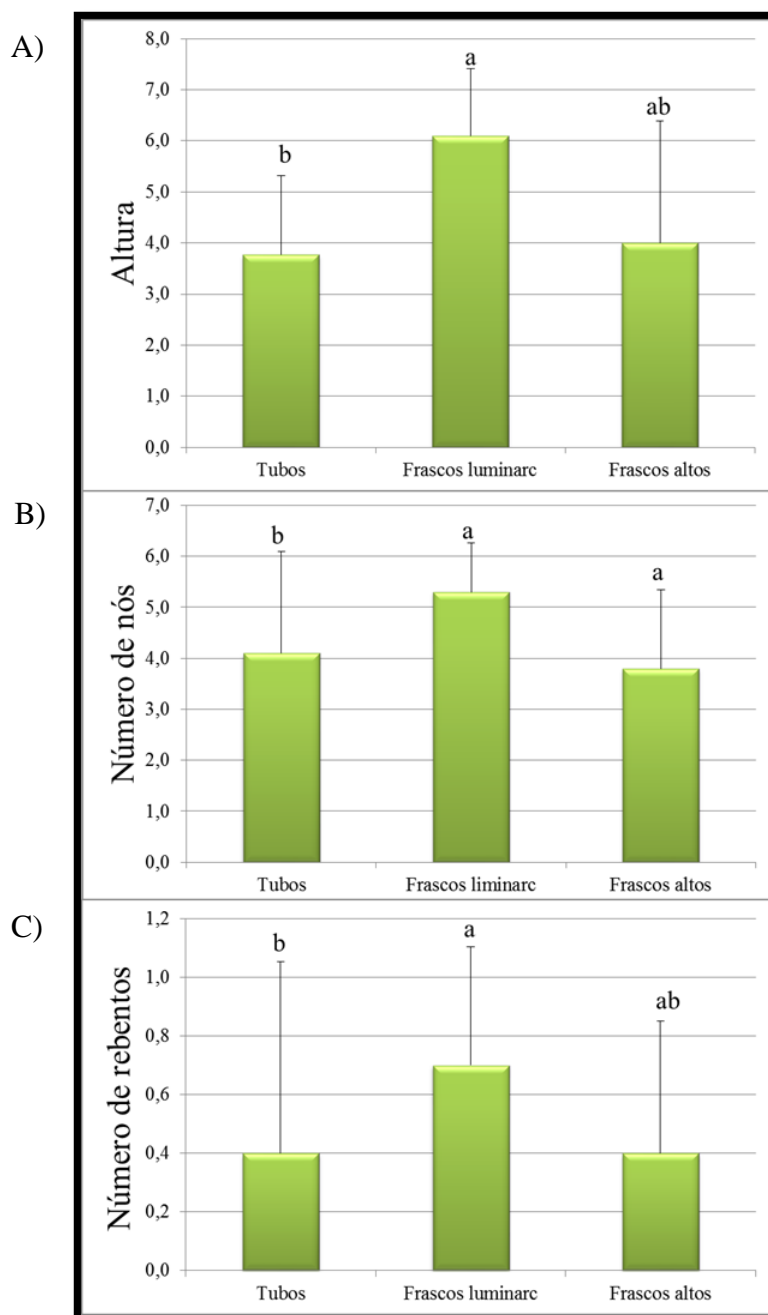
### 3.1.2.1.2 Efeito do recipiente de cultura

Para o estudo do efeito do recipiente nos parâmetros em avaliação, foi utilizado o genótipo e o tratamento com melhor resposta no ensaio anterior, ou seja, o genótipo CX5 e o tratamento WPMZ.

Neste ensaio verificaram-se diferenças quer nos parâmetros analisados quer na morfologia dos rebentos caulinares formados (Fig. 14). Nos tubos de ensaio, as folhas apresentam-se mais expandidas (Fig. 14A) enquanto nos frascos as folhas têm uma morfologia mais parecida com a que se verifica em condições naturais (Figs. 13A-B). No que se refere aos parâmetros quantitativos analisados verifica-se na (Figs. 15 A, B e C) foi nos frascos luminarc que se obtiveram os melhores resultados, existindo diferenças significativas entre eles. No que se refere à altura do maior rebento (Fig. 15A) onde em média os rebentos caulinares apresentaram cerca de 6 cm, no que diz respeito ao número de nós, nestes recipientes, foi onde se obteve o maior número por explante (Fig. 15B), já relativamente ao número de rebentos (Fig. 15C) foi nos frascos luminarc foi onde se conseguiu obter um maior número de rebentos.



**Figura 14** – Aspeto dos explantes referentes ao genótipo CX5 em meio WPMZ. A) explantes de CX5 em tubos; B) explantes de CX5 em frascos luminarc; C) explantes de CX5 em frascos altos.

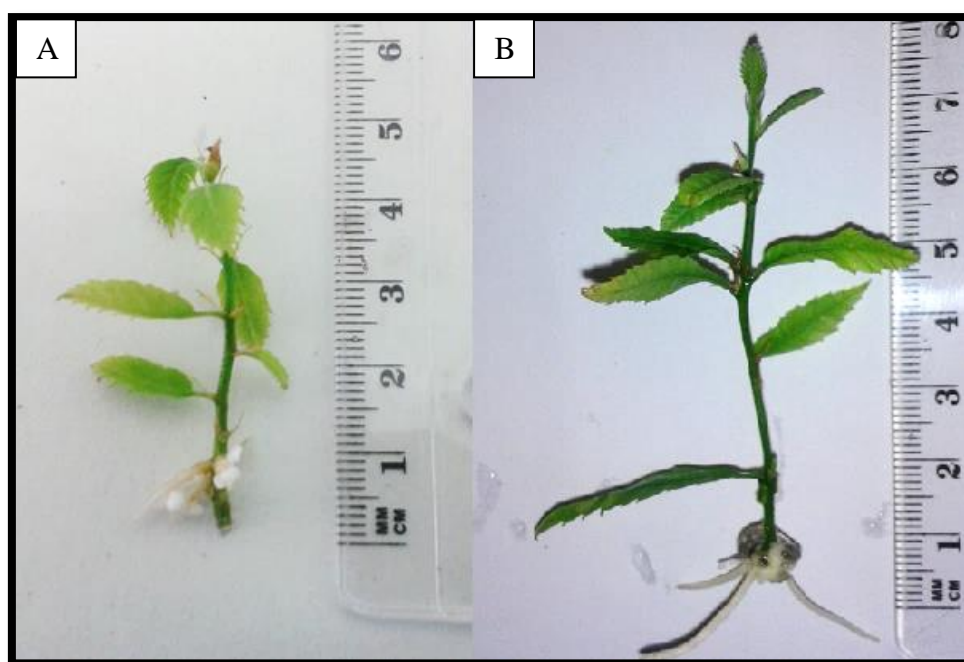


**Figura 15** - Efeito do recipiente na resposta do genótipo CX5 em meio WPMZ. A) altura do maior rebento; B) número de nós do maior rebento; C) número de rebentos por explante. Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão entre as réplicas. Valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) segundo o teste de Tukey.

### 3.1.3 Enraizamento

Este ensaio teve como objetivo fazer uma comparação entre dois métodos de enraizamento, o dipping *ex vitro* e a indução e alongamento *in vitro*. As plantas utilizadas neste ensaio eram provenientes do ensaio de multiplicação, foram testados os genótipos CX1, CX5 e 6333.

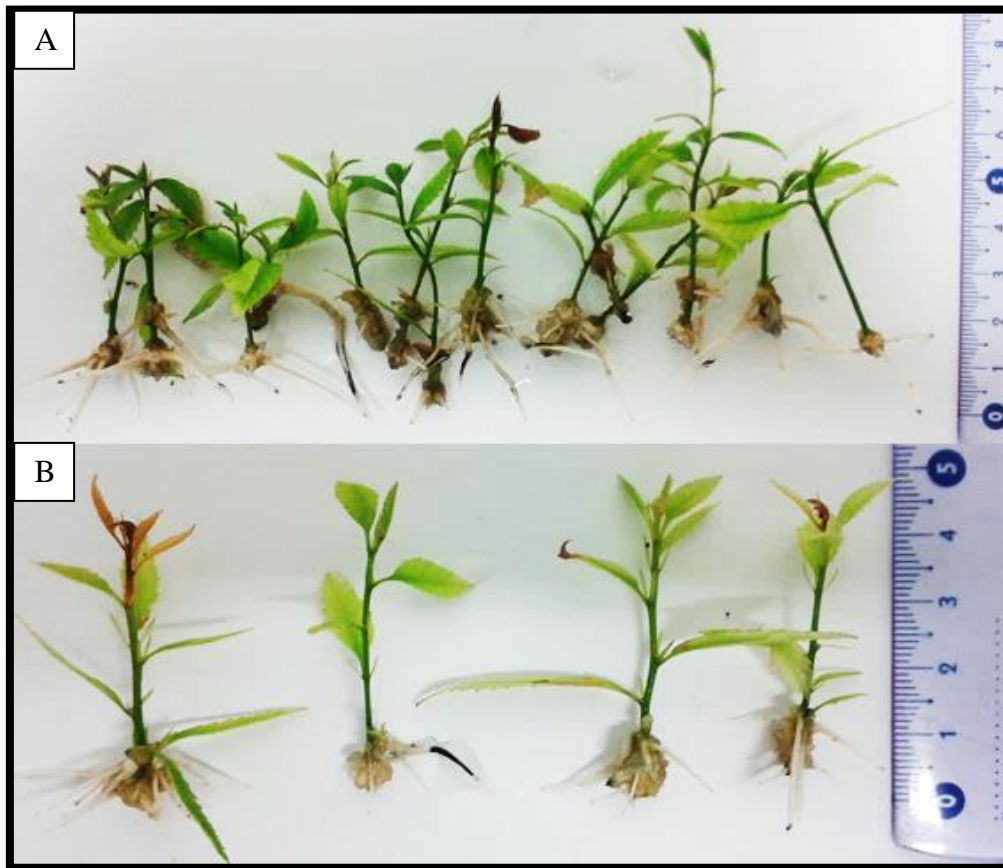
No enraizamento *ex vitro* ocorreu uma elevada taxa de mortalidade dos rebentos tratados com auxina, atingindo os 49%. A percentagem de plantas enraizadas (Fig. 16A) rondou os 13%. Quando os segmentos nodais foram enraizados *in vitro* a taxa de mortalidade dos explantes foi bastante mais reduzida 13% e a taxa de enraizamento foi consideravelmente inferior, pois apenas 16% dos rebentos desenvolveu raízes (Fig. 16B), porém, à semelhança do método anterior registou-se uma elevada percentagem de plantas não enraizadas.



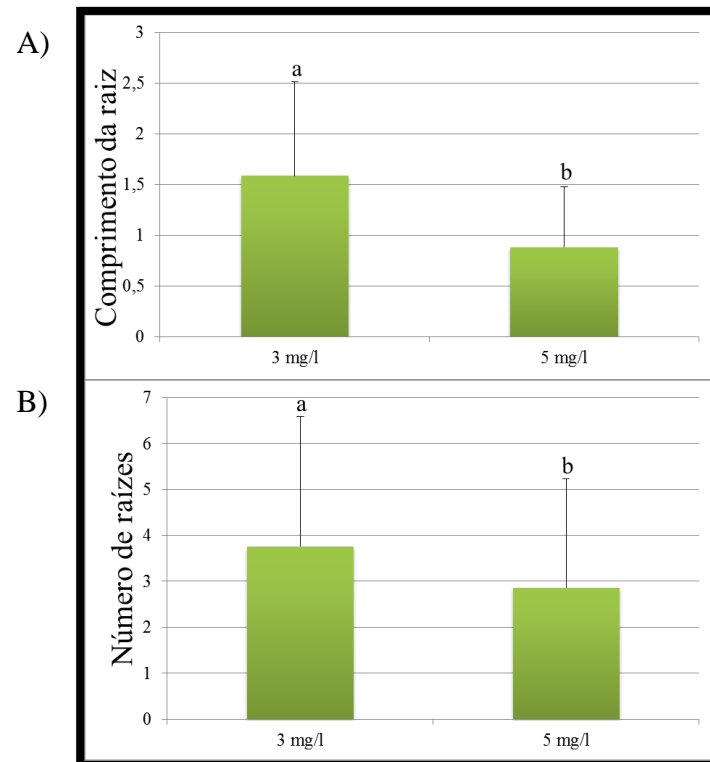
**Figura 16** - Enraizamento de rebentos caulinares obtidos pela proliferação de meristemas. A) Dipping *ex vitro*; B) indução e alongamento *in vitro*.



Depois deste ensaio comparativo estudou-se o efeito de duas concentrações diferentes de IBA, 3 mg/l e 5mg/l, no enraizamento. O tratamento contendo 3 mg/l de IBA (Fig. 17) foi o mais eficaz no que se refere aos parâmetros avaliados, nomeadamente, o comprimento da maior raiz e número de raízes produzidas (Fig. 18 A-B).



**Figura 17** - Enraizamento de rebentos caulinares obtidos através da proliferação de meristemas do genótipo CX5 em fascos luminarc. A) Indução e alongamento *in vitro* (3 mg/l IBA); B) Indução e alongamento *in vitro* (5 mg/l IBA).



**Figura 18** - Efeito da concentração de hormona, na formação de raízes A) comprimento da maior raiz; B) número de raízes. Os valores com letras diferentes apresentam diferenças significativas segundo o teste *t* student.

### 3.1.4 Aclimatização

No ensaio que compara o dipping *ex vitro* com a indução e alongamento *in vitro*, verificou-se que todas as plantas em ambos os métodos não sobreviveram a esta fase, onde se obteve uma taxa de mortalidade de 100%.

Relativamente ao ensaio onde se estudou o efeito da indução e alongamento *in vitro*, com duas concentrações diferentes de IBA, foi registado que no tratamento com a concentração de 3mg/l a taxa de sobrevivência foi de 45%, já com 5mg/l a taxa de sobrevivência nesta fase foi de 30%.



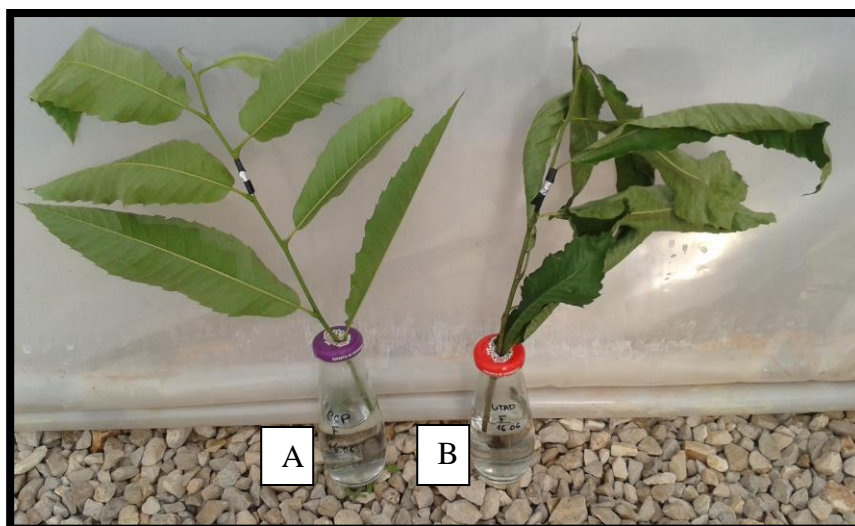
**Figura 19** - Plantas em substrato em cudevtes de 6/10 alvéolos, resultantes do ensaio de indução e alongamento *in vitro*, relativas as concentrações de 3 mg/l e 5 mg/l de IBA.

### 3.2 Avaliação da tolerância do castanheiro à *Phytophthora cinnamomi*

#### 3.2.1 Inoculação em ramo destacado

Os resultados deste ensaio não se revelaram conclusivos, mesmo assim fez-se uma apreciação global dos objetivos, ou seja, a avaliação da necrose provocada pelo fungo *P. cinnamomi*, com o fim de estudar a tolerância dos genótipos em estudo.

Considero importante referir que nas primeiras horas de experiência observaram-se alguns sintomas visíveis, no que toca a desidratação das folhas, apenas foi observado no genótipo suscetível inoculado com fungo, todos os ramos se encontravam com o aspeto semelhante ao da figura 20B. Deste modo importa referir que os sintomas demonstrados na figura 20, podem não estar relacionados com a ação do fungo, mas sim pelos fatores externos que influenciaram este ensaio.



**Figura 20** - Aspeto dos ramos referentes aos clones A) CCP e B) UTAD, inoculados com *Phytophthora cinnamomi* após 4 horas.

Deste modo, comparou-se de uma forma geral o comprimento da necrose registada nos ramos inoculados com meio de cultura (controlo), e os ramos inoculados com *P. cinnamomi*, assim obteve-se em termos médios um maior comprimento da lesão nos ramos referentes ao controlo, em comparação com os ramos inoculados com *P. cinnamomi*. Os resultados obtidos revelaram de alguma forma que as condições em que o ensaio foi realizado não foram as melhores, pois existiram diversos fatores que influenciaram o decorrer da experiência, nomeadamente, as condições climáticas, conservação do material vegetal, rega aquedada de modo a manter a humidade pretendida. Durante a realização do ensaio verificaram-se temperaturas excecionalmente elevadas, e algum material vegetal apresentava

sintomas de *stress* hídrico (visíveis nas folhas), pelo que se escolheram os ramos aparentemente menos afetados para realizar o ensaio. Ainda assim, e porque as temperaturas se mantiveram muito elevadas nos dias seguintes, grande parte dos ramos apresentou sinais de desidratação. Apesar disso, o ensaio foi mantido e terminado ao fim dos 8 dias previstos. A análise das zonas inoculadas apresentou sinais de necrose, mais ou menos extensos, mas que não foi possível atribuir à inoculação com *P. cinnamomi*, em alguns ramos os tecidos apresentavam-se necróticos no local onde foi feita a incisão, mesmo assim apresentava-se verde no sentido contrário ao da inoculação, visivelmente os tecidos não se encontravam colonizados.

## 4 Discussão

---





O castanheiro é uma das espécies lenhosas com mais interesse económico em Portugal, pela produção de fruto, bem como pela qualidade da madeira, devido à doença da tinta, desde o início do século esta espécie tem vindo a ser substituída por outras com maior rentabilidade, e assim a sua área de cultivo tem vindo a diminuir, dado à suscetibilidade que esta apresenta aos fungos *Phytophthora* spp. (Gonçalves, 1991).

A micropropagação em comparação com os métodos convencionais, garante a produção de um elevado número de plantas a partir de apenas um explante (Chawla, 2009). Surge assim uma alternativa importante no sentido de permitir a multiplicação em larga escala de clones selecionados pelas suas características de resistência à doença da tinta (Gonçalves, 1991).

No decorrer do trabalho foi estudado o efeito de diversos fatores no desenvolvimento das plantas *in vitro*, nomeadamente o efeito do tipo citocinina benziladenina (BA) e zeatina, utilizadas na fase da multiplicação, foi também estudado o efeito de três diferentes tipos de recipientes nesta fase. No enraizamento estudou-se dipping *ex vitro* e indução e alongamento *in vitro*, bem como o efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol butírico (IBA) para a indução de raízes. Por fim, tentou-se avaliar a tolerância de diversos genótipos de castanheiro ao fungo *P. cinnamomi* que provoca a doença-da-tinta do castanheiro.

#### **4.1 Propagação *in vitro* do castanheiro**

Para o sucesso da etapa da multiplicação é necessário estudar os tipos de reguladores de crescimento e as concentrações adequadas aos genótipos em estudo. Neste sentido, as citocininas desempenham um papel fundamental para a obtenção de respostas satisfatórias nesta fase.

##### **4.1.1 Efeito da citocinina e do genótipo**

Fazendo uma apreciação dos resultados, constatou-se que o tratamento com zeatina foi mais eficiente no que diz respeito ao crescimento em altura e número de nós por explante, já o genótipo com melhor resposta foi o CX5. O genótipo CX5 no tratamento com zeatina, registou em termos médios maior crescimento em altura com cerca de 4 cm, e maior número de nós apresentando cerca de 4 nós por explante em média.

No que diz respeito ao número de nós em ambos os genótipos testados foi no tratamento com BA onde se observou maior número de rebentos.



A zeatina inibe o desenvolvimento de rebentos axilares, promovendo assim o desenvolvimento de explantes mais vigorosos (Tetsumura e Yamashita, 2004). No que diz respeito ao BA, este mostrou os resultados mais satisfatórios no que se refere à proliferação de rebentos axilares (Vieitez *et al.*; 1980, citado por Tafazoli *et al.*, 2011). Na fase da multiplicação os meios com BA revelam-se significativamente melhores no que toca à produção de rebentos, comparativamente com o meio com zeatina, pois a citocinina zeatina afeta negativamente a propagação de rebentos (Osterc, 2005). As diferenças genéticas entre os diferentes genótipos e o tipo de subcultura também se revelam extremamente importantes (Sanches *et al.*, 1997).

#### 4.1.2 Efeito do recipiente

No que diz respeito aos recipientes testados, tem termos estatísticos apenas se registaram diferenças significativas entre os tubos de ensaio e os frascos luminarc, relativamente à altura dos explantes, número de nós e número de rebentos. Assim, importa referir em termos qualitativos o que se observou no que toca à morfologia dos rebentos caulinares formados. Nos tubos de ensaio, as folhas apresentam-se mais expandidas, enquanto que nos frascos as folhas têm uma morfologia mais parecida com a que se verifica em condições naturais.

O tipo de recipiente é um fator importante a ter em conta na cultura *in vitro*, deve proporcionar as trocas gasosas entre o explante e o exterior, de maneira a evitar a acumulação de gases como o etileno que podem condicionar a resposta da cultura (Canhoto, 2010).

## 4.2 Enraizamento

Relativamente ao enraizamento, no que diz respeito ao ensaio preliminar onde se comparou o método de enraizamento por dipping *ex vitro* e enraizamento *in vitro*. Os resultados em ambos não foram satisfatórios, a percentagem de plantas enraizadas *ex vitro* foi de 13%, já enraizadas *in vitro* foi de 16%. Não obstante, todas as plantas deste ensaio morreram.

Estes resultados podem ter sido influenciados por diversos fatores, nomeadamente, no caso do enraizamento *ex vitro*, poderá ter sido o elevado tempo de exposição à auxina, causado a morte por intoxicação, e o tamanho dos rebentos caulinares utilizados, pois utilizaram-se todos os rebentos que foram gerados a partir do ensaio de multiplicação, e não

houve seleção dos rebentos por tamanho. No enraizamento *in vitro* registou-se que na fase de alongamento, quando os rebentos foram expostos à privação de hormona no meio WPM com adição carvão ativado, registou-se perda das folhas em alguns explantes, mas também se verificou, que depois da queda das folhas os rebentos axilares e apicais desenvolveram rapidamente novos gomos, esta situação pode ter ocorrido devido ao fato de não se ter reduzido a concentração de macronutrientes para metade durante esta fase, pois este revela-se um importante fator para o sucesso desta fase segundo Cortizo *et al.* (1999).

Relativamente ao ensaio onde se estudou o enraizamento *in vitro* com diferentes concentrações de auxina observaram-se diferenças significativas entre as concentrações, os resultados mostram que a concentração de 3mg/l de IBA, foi a que desencadeou os melhores resultados no que diz respeito ao comprimento da maior raiz e do número de raízes formadas.

A imersão basal do rebento caulinar numa solução concentrada de IBA proporciona percentagens de enraizamento inferiores as obtidas com IBA em meio de cultura, o dipping *ex vitro* poderá revelar-se vantajoso neste ponto de vista pois permite a supressão de um passo de manipulação (Gonçalves, 1991).

Os tratamentos habituais para a indução do enraizamento, consistem na exposição durante 7-8 dias dos rebentos caulinares a doses baixas de concentração de IBA (3-10 mg/l), ou quando se fala na emersão da parte basal dos rebentos em soluções concentradas de IBA (0.5-1 g/l) transferindo-se posteriormente para um meio ou substrato sem auxina (Cortizo *et al.*, 1999).

### **4.3 Aclimatização**

Na fase da aclimatação, no que se refere ao ensaio preliminar que compara o enraizamento *ex vitro* com o enraizamento *in vitro* a taxa de mortalidade foi de 100% em ambos. Relativamente ao ensaio onde se estudou o efeito do enraizamento *in vitro*, com duas concentrações diferentes de IBA, foi registado que no tratamento com a concentração de 3 mg/l a taxa de sobrevivência foi de 45%, já com 5 mg/l a taxa de sobrevivência nesta fase foi de 30%.

Nesta etapa foram encontrados alguns problemas de vários níveis, principalmente relacionados com a câmara de fitoclima onde as plantas permaneceram na fase inicial da aclimatização e onde ainda até a data permanecem. Como este trabalho foi desenvolvido num laboratório novo, não se conhecia bem o funcionamento dos equipamentos, ou seja, na câmara de fitoclima, observaram-se problemas relacionados com a concentração de humidade, e falta

de renovação de ar, que de alguma maneira influenciou o estado sanitário das plantas no que diz respeito à contaminação com fungos, que levou a morte de diversas plantas.

Uma das principais ameaças à sobrevivência dos explantes durante a fase da aclimatização é a necrose do meristema apical do rebento, quando esta situação ocorre a dominância apical é assumida pelo gomo axilar mais próximo (Vieitez *et al.*, 2007)

Para o sucesso da aclimatização a fase de enraizamento revela-se determinante para a manutenção de um bom estado fisiológico dos rebentos, condicionando assim a capacidade de resistência às alterações ambientais e de sistemas de nutrição a que as plantas ficam sujeitas (Gonçalves, 1991).

#### **4.4 Avaliação da tolerância do Castanheiro à *Phytophthora cinnamomi***

Neste ensaio avaliou-se a tolerância de diversos genótipos de castanheiro ao fungo *P. cinnamomi* que provoca a doença-da-tinta do castanheiro, pois atualmente surge a necessidade de encontrar genótipos que apresentem tolerância ao fungo, neste sentido foi realizado um ensaio por inoculação de ramo destacado que nos permitiu avaliar previamente o grau de tolerância de determinados genótipos.

##### **4.4.1 Inoculação em ramo destacado**

Comparou-se de uma forma geral o comprimento da necrose registada nos ramos inoculados com meio de cultura (controlo), e os ramos inoculados com *P. cinnamomi*. Obteve-se em termos médios um maior comprimento da lesão nos ramos refentes ao controlo, em comparação com os ramos inoculados com *P. cinnamomi*.

Os resultados obtidos não foram conclusivos e revelaram que as condições em que o ensaio foi realizado não foram ideais, existiram diversos fatores que influenciaram o decorrer da experiência, nomeadamente, as condições climatéricas, conservação do material vegetal, rega aquedada de modo a manter a humidade pretendida.

Esta metodologia permite avaliar a resistência de árvores adultas, possibilitando testar uma grande quantidade de material vegetal num curto período de tempo, de forma a avaliar o grau de tolerância ao fungo que provoca a doença-da-tinta do castanheiro (Gouveia, 1993).

Nos primeiros dias em que decorreu o ensaio a temperatura ambiente rondou em média durante o dia, os 30 °C, considero que este facto contribuiu para o insucesso deste ensaio, pois a viabilidade do fungo foi posta em causa devido as altas temperaturas que se

fizeram sentir. O facto da rega possivelmente não estar programada de forma adequada para manter as condições de humidade ideais para a propagação do fungo.

## **5 Conclusões e perspectivas futuras**

---





Este trabalho foi importante no que se refere à otimização dos protocolos de micropropagação, pois os resultados revelaram-se satisfatórios, no entanto, a utilização da citocinina zeatina nesta fase, em termos económicos deveria ser evitada pois é uma hormona que tem um elevado custo, assim surge a necessidade de encontrar outras alternativas que nos ofereçam resultados semelhantes.

No que diz respeito ao enraizamento *in vitro*, considero que se devem ser feitos alguns ajustes, nomeadamente testar a redução da concentração dos sais para metade, foi também muito importante a passagem das plantas com as raízes desenvolvidas no meio de alongamento para o substrato com perlite, pois as plantas tiveram a oportunidade de desenvolver raízes secundárias, o que se revelou fundamental para a o seu suporte quando transplantadas para alvéolos com mistura de substrato.

Relativamente ao ensaio de inoculação em ramo, com *P. cinnamomi*, este não foi conclusivo devido aos fatores climáticos adversos à propagação do fungo. Como este ensaio tem de ser realizado com recurso a ramos do ano (maio-junho) de plantas já estabelecidas no campo e como nesta época as temperaturas foram elevadas, a viabilidade do fungo no decorrer do ensaio esteve comprometida. Deste modo, para haver um melhor controlo da temperatura e humidade no decorrer da experiência, esta deveria ser realizada numa estufa climatizada, evitando assim a desidratação dos tecidos.

Outra alternativa seria realizar ensaios com plantas em solo, pois trata-se de um fungo radicular, contudo, a realização desses ensaios implicaria períodos de tempo longos, incompatíveis com os prazos da tese de mestrado. Por esse motivo, optou-se por um tipo de ensaio de curta duração.

## **6 Referências bibliográficas**

---







Abreu, C. A. (1992). Chestnut ink disease: management practices and resistance. Em: R.E. Wallace and L.G. Spinella (eds.): *Proceedings of the world chestnut industry conference*. 153-157. Chestnut marketing association. Florida.

Beltrame, H.S. (2013). *Micropropagação de clones híbridos de Castanea sativa x C. crenata e C. sativa x C. molíssima para posterior estudos de resistência a Phytophthora cinamomi*. Dissertação de mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra. Coimbra. 72pp.

Biraghi, A. (1946). *Il cancro del castagno causato da Endothia parasítica*. Agric. Ital. 7:1-9.

Canhoto, J.M. (2010). *Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.

Capelo J. e Catry F. (2007). A distribuição do castanheiro em Portugal. Em: J. Silva (eds.) *Árvores e Florestas de Portugal: Do Castanheiro ao Teixo*. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento. Lisboa

Carvalho, J. e Vidal, M. (2003). *Noções De Cultivo E Tecidos Vegetais*. 1ª Edição. Embrapa. Campina Grande, PB.

Carvalho, J. M. (2014). *Métodos de luta alternativos contra a doença da tinta do castanheiro*. Dissertação Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais. Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa. Lisboa. 74pp.

Chawla, H.S. (2009). *Introduction to plant biotechnology*. 3ª Edition, Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA

Cortizo, E. V., Madriñán, M. L. e Madriñán, M. L. (1999). *O Castiñeiro: Biología e Patología*. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela.

Costa, R., Santos, C., Machado, H., Correia, I., Gomes, F. e Gomes-Laranjo, J. (2011). *Phenotyping Castanea hybrids for Phytophthora cinnamomi resistance*. British Society for Plant Pathology 64-901-910 doi: 10.1111/ppa.12313

---

Dodds, J. H. e Roberts, L.W. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2ª Edição. Cambridge University Press. UK

Gonçalves, J.C. (1991). *Influência de alguns fatores na micropropagação de castanheiro*. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 80pp.

Gouveia, M. E. (1993). *Doença Da Tinta Do Castanheiro – Avaliação Da Resistência à Phytophthora cinnamomi Rands*. Instituto Superior De Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 135pp.

Hardham, A. R. (2005). *Pathogen profile Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6 (6), 589–604. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00308.X

Instituto Nacional de Estatística. (2012). *Índices de Preços na Produção Industrial*. Acedido em 24 de maio de 2015, em: <http://www.ine.pt>.

Lopes, S. M. (2007). *Alterações bioquímicas em clones de castanheiro inoculadas com Phytophthora cinnamomi*. Dissertação de Mestrado em Biologia e Geologia para o Ensino - Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 83pp.

McCown, B. e Lloyd, G (1981). *Woody plant médium (WPM) – a mineral nutrients formulation for microculture of woody plant species*. HartScience. 16:453

Monteiro, M. e Patrício, M. (2007). *Conservação, Regeneração E Exploração Do Castanheiro*. Em: J. Silva (eds.) *Arvores e Florestas de Portugal: Do Castanheiro ao Teixo*. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento. Lisboa

Murashige, T. (1974). *Plant propagation through tissue cultures*. Annual review of plant physiology. 25:135-166.

Osterc, G., Zavrl, M., Vodenik, T. e Luthar, Z. (2005). *The propagation of chestnut (Castanea sativa Mill.) nodal explants*. Acta Agriculturae Slovenica. 85-2: 411-418.

Paiva, J. A. (2007). *Biologia e ecologia das florestas de castanheiro*. Em: J. Silva (eds.) *Arvores e Florestas de Portugal: Do Castanheiro ao Teixo*. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento. Lisboa

Saad, A. I. e Elshahed, A. M. (2012). *Plant Tissue Culture Media*. Department of Botany and Microbiology. Faculty of Science - University, Libya. 29-40. InTech. Acedido em 20 junho 2015 em: <http://dx.doi.org/10.5772/50569>

Sanchez, M. C., San-Jose, M. C., Fero, E., Ballester, A. e Vieitez, A. M. (1997): *Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut*. Journal of Horticultural Science, 72: 433-443.

Tafazoli, M., Nars, S. M., Jalilvand, H. e Bayat, D. (2011). *Plant regeneration through indirect Organogenesis of chestnut (Castanea sativa Mill.)*. Academic Journals. Iran. DOI: 10.5897/AJB11.2696

Taiz, L. e Zeiger, E. (2010). *Plant physiology*. 5ª Edition, Sunderland: Sinauer Associates.

Tetsumura, T. e Yamashita, K. (2004). *Micropropagation of Japanese Chestnut (Castanea crenata Sieb. et Zucc.) Seedlings*. HortScience, 39: 1684-1687

Vannini A. e Vettraino, A. (2001). *Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut*. For. Snow Landsc. Res. 76, 3: 345–350. Acedido a 5 junho 2015 em <http://www.wsl.ch/dienstleistungen/publikationen/pdf/4859.pdf>

Vettraino, A. M., Natili, G., Anselmi, N. e Vannini A. (2001). *Recovery and pathogenicity of Phytophthora species associated with a resurgence of ink disease in Castanea sativa in Italy*. Plant Pathology. 50,90-96. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00528.

Vieitez, A. M., Sánchez, M. C., García-Nimo, M. L., e Ballester A. (2007). *Protocol For Micopropagation Of Castanea Sativa*. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. 299-312. Spain. Doi: 10.1007/978-1-4020-6352-7\_28

Zentmyer, G. A. (1981). *The effect of temperature on growth and pathogenesis of Phytophthora cinnamomi and on growth of its advocato host*. Phytopatology. 71: 925-928