

HERITABILIDADE DE ALGUNS ASPECTOS DA RESISTÊNCIA DA *CASTANEA SATIVA* MILL. À *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS.*

ANTÓNIO LOPES GOMES E CARLOS ABREU

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO, 5001 VILA REAL CODEX, PORTUGAL

RESUMO

Plântulas, com 2 a 4 folhas após a germinação, provenientes de duas populações distintas-

-semente colhida num povoamento sem melhoramento prévio e descendências de progenitores resistentes-, foram transplantadas para solo infestado com propágulos do fungo *Phytophthora cinnamomi*. A percentagem de sobrevivência, no fim do período vegetativo, foi de 30% para a primeira população e de 66% para a segunda ($P < 0,001$).

Com base nesta diferença e admitindo o pressuposto de que os progenitores resistentes foram seleccionados, pela resistência, na população base sem molhoramento, foi estimada a heritabilidade do carácter em $h^2 = 0,45$, pela metodologia dos caracteres limiares.

A inoculação subcortical com micélio de *P. cinnamomi* em plantas sobreviventes do ensaio referido (agregadas em famílias de meios-irmãos) permitiu avaliar as heritabilidades familiar e individual da dimensão da lesão devida à infecção em $h^2_f = 0,63 \pm 0,25$ e $h^2_i = 0,36 \pm 0,08$ respectivamente ($P = 0,0639$).

P.C.: *Castanea sativa*, *Phytophthora cinnamomi*, heritabilidade, resistência.

SUMMARY

Embryo plants with 2 to 4 leaves after germination, originating from two distinct populations of seed collected from a forest without previous improvement and being descendents of resistant progenitors, were transplanted in soil infected with propagulum from the fungus *Phytophthora cinnamomi*. The percentage of survivors at the end of the vegetative phase, was 30% from the first population and 66% of the second ($p < 0,001$).

Based on this difference and accepting the presumption that the resistant progenitors were selected, for resistance, in a population without improvement, it was estimated the heritability of the character as $h^2 = 0,45$, for the methodology at the threshold characters.

The inoculation of the sub-cortical with mycellium from *P. cinnamomi* in the surviving plants for the referred trials (aggregated in family by half-sibs) permitted evaluation of the family and individual heritability for the dimension of the lesion due to the infection in $h^2_f = 0,63 \pm 0,25$ and $h^2_i = 0,36 \pm 0,08$ respectively ($P = 0,0639$).

K.W.: *Castanea sativa*, *Phytophthora cinnamomi*, heritability, resistance

* The research was financed by NATO's Scientific Affairs Division, Programme Science for Stability.

INTRODUÇÃO

A *Castanea sativa* é uma espécie que se reveste de extraordinária importância para a Itália, França, Espanha, Portugal e Turquia. Este mérito advém-lhe da sua dupla aptidão: produtora de madeira de óptima qualidade para marcenaria e de fruto de alto valor alimentar e muito apreciado por uma gama larga da população mundial.

O fruto, denominado por castanha, foi durante vários anos apelidado de pão dos pobres, em virtude de ter constituído a base alimentar das populações rurais das zonas em que a espécie era cultivada. Hoje, com excepção da Turquia, a castanha deixou de ter o papel de alimento energético e, no dizer de ANGIBOUST (1979), cessou aquele desempenho para se tornar um artigo de semi-luxo.

Em 1838 surgiu em Portugal uma doença, primeiro nas margens do rio Lima, Litoral Norte, generalizada a breve trecho a toda a área daquela região (Minho); e alguns anos depois, a todas as zonas de Portugal em que se cultivava o castanheiro.

A enfermidade, vulgarmente conhecida por "doença da tinta", é causada normalmente pelo fungo *Phytophthora cinnamomi* e, mais raramente, por *P. cambivora* (FERNANDES, 1952).

Estes fungos, em especial o primeiro, são considerados extraordinariamente virulentos, no sentido definido por CORBAZ (1990), e tanto assim que SHEARER e DILLON (1995) isolaram a *P. cinnamomi* de 38 espécies vegetais das 105 que vegetam em locais onde a *Eucalyptus marginata* acusava sintomas de ataque, exteriorizados pela podridão da raiz. Também ZENTMYER (1980) refere um vasto leque de espécies susceptíveis a este fungo.

Em Portugal, a devastação causada pela doença foi assustadora, o que impeliu NATIVIDADE (1944) cit. FERNANDES (1953) a lançar as bases de um plano para salvar a espécie, tendo-se iniciado em 1945 os primeiros tratamentos pelo método de URQUIJO LANDALUCE (1941). Esperava-se, nos 25 anos subsequentes, um acréscimo de área de cultura de cerca de 80 000 ha, mas a incapacidade de ultrapassar a doença conduziu à regressão da espécie, cifrando-se a área cultivada em cerca de 30 000 ha em 1979 (NOGUEIRA e FERREIRA, 1979).

O melhoramento genético iniciado por GUERREIRO (1957) pela hibridação com *C. crenata*, após a constatação de que esta espécie não se constituía substituta da autóctone, não proporcionou os resultados almejados e muito menos no tempo requerido.

Durante muito tempo, a solução do problema levantado pela "doença da tinta" do castanheiro foi encarada de forma unilateral, isto é, pela via da resistência genética, esquecendo o papel dos simbioses radiculares e da sua acção sobre a microflora nefasta do solo (GRENTE, 1975), bem como o efeito que as condições físicas e químicas deste podem ter sobre a maior ou menor facilidade de contrair a doença, solos condutivos e supressivos, respectivamente, tal como acontece com *Pinus clausa* (BARNARD *et al*, 1993).

Posteriormente, FERNANDES (1961) pesquisa, em Portugal, a ocorrência de exemplares resistentes nas populações locais de *C. sativa*, tendo concluído que era de frequência insignificante, mas considerou, mediante o fraco contributo proporcionado pelas espécies exóticas, ser a melhor opção para, pela multiplicação vegetativa, se produzirem cavalos para a enxertia das variedades produtoras de bom fruto. Esta é, também, uma via que se afigura muito promissora, não apenas com aquela finalidade, mas com a de, pelo cruzamento entre si, produzirem semente com maior frequência de genes da resistência à doença e que origine plantas que garantam o sucesso da instalação de povoamentos para produção de madeira.

A pretensão de produzir plantas resistentes pela via sexuada implica saber se o carácter se transmite, como e em que medida, dos progenitores para as suas progénies. O objectivo

deste trabalho é, por isso, o de inferir, através da estimativa da heritabilidade restrita individual, se o carácter resistência à "doença da tinta" no castanheiro é transmissível por semente resultante do cruzamento entre progenitores que exibam o carácter.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma parte das sementes, donde se obtiveram as plantas que integraram o ensaio, foi colhida apanhando apenas uma castanha de 4 em 4 árvores, num povoamento de castanheiro bravo, de forma a constituir uma amostra representativa da população. Outra parte foi colhida, separadamente por clone, num pequeno banco clonal de castanheiros resistentes à "doença da tinta".

A germinação da semente fez-se, no mês de Março, em areia humedecida.

As plantas foram submetidas à prova de resistência à "doença da tinta" em duas etapas consecutivas, com método de infecção diferente em cada uma delas.

O primeiro ensaio foi instalado, em Maio, pela repicagem de plantas com 2 a 4 folhas, em filas de 15, numa parcela de terreno previamente infestado com cultura de *P. cinnamomi*. As filas, quatro do povoamento e uma de cada um dos dez progenitores resistentes à doença, foram distribuídas ao acaso.

O segundo ensaio foi instalado no campo ao compasso de 2mx2m, em blocos casualizados completos, com parcelas de uma só planta e com nove repetições.

As plantas utilizadas provieram das sobreviventes no mortório (primeiro ensaio), tendo sido transplantadas na época de repouso vegetativo, em Fevereiro do ano imediato.

Paralelamente, foram plantadas, numa só parcela de várias plantas, todas as sobreviventes do mortório que não fizeram parte dos blocos do ensaio.

Em Abril todas as plantas foram inoculadas sob casca, com um pequeno fragmento de gelose de agar com micélio de *P. cinnamomi* cultivado em placa de Petri.

No primeiro ensaio a observação relativa às plantas enquadrou-se em duas classes fenotípicas; as sobreviventes e as mortas. Este carácter limiar escapa à variação contínua, admitindo-se, todavia, que esta ocorre de forma subjacente, não detectável até um determinado limiar, a partir do qual a manifestação é visível e expressa-se em frequência relativa ou percentagem.

Por transformação adequada de escala admite-se que a distribuição é normal, e, bem assim, que as variâncias são independentes das médias; a unidade de expressão passou a ser o desvio padrão s .

A distância x do limiar, percentagem de plantas vivas, em relação à média foi lida na tabela de probabilidade integral (KEARSEY e POONI, 1996).

Aceitando-se o pressuposto de que a variância nas duas gerações consecutivas é igual, o que pode não se verificar, as médias de expressão foram formuladas em unidades de desvio padrão considerado de valor igual em cada população, donde se determinou a diferença D s .

No presente caso só os indivíduos sobreviventes da população poderiam ser utilizados como progenitores. Aceitou-se esta frequência como intensidade de selecção e o valor do diferencial correspondente i , em unidades de desvio padrão, foi tirado de tabelas (KEARSEY e POONI, 1996).

Considerando a diferença D entre médias de expressão, relativas à população base e à das progénies dos progenitores resistentes, como a resposta à selecção (ganho genético) e tendo em conta a fórmula $D.s = h^2.i.s$ que a avalia, obtém-se $h^2 = D/i$ que representa a regressão das descendências sobre o progenitor médio e, pressupondo que não ocorre correlação ambiental entre progenitores e progénies, estima a heritabilidade do carácter.

Admitiu-se que os progenitores resistentes foram seleccionados no povoamento de castanheiros bravos em que se procedeu à colheita de semente de forma indiferenciada, considerando-a, portanto, como população base.

O modelo de análise de variância do segundo ensaio foi o indicado por WRIGHT (1964).

A estimativa da heritabilidade restrita individual, h^2_i , foi feita a partir da heritabilidade familiar (LERNER, 1964).

Assume-se que nas famílias de polinização livre os indivíduos são meios-irmãos e que a variância dos progenitores masculinos é igual à dos femininos.

RESULTADOS

No mortório, primeiro ensaio, no fim da época vegetativa, a percentagem de plantas vivas da população base cifrou-se em 30%, enquanto que da população considerada a descendência destes últimos (progenitores resistentes) atingiu, em média, 66%. A diferença entre as duas percentagens é significativa para uma probabilidade exterior inferior a 0,001.

A heritabilidade estimada para este evento, pela metodologia descrita para o carácter limiar, foi $h^2_i=0,45$.

Da inoculação subcortical praticada nas plantas que sobreviveram no mortório e foram transplantadas, para o campo, com nove meses de idade, todas elas se deixaram infectar.

Para além da diferença de percentagem de mortes observadas no mortório entre a população base e a das descendências de progenitores resistentes, o comportamento foi também distinto após a inoculação subcortical. Enquanto que da população base sobreviveram apenas 17% das plantas, as dos progenitores seleccionados pela resistência atingiram 96%, quase a totalidade.

Face aos resultados verificados com a inoculação das plantas sobreviventes do mortório, transpareceu a conveniência de se proceder a nova estimativa do parâmetro genético que traduz o efeito aditivo dos genes. Na circunstância e reportando os três sobreviventes da população base no decurso das duas fases consecutivas-mortório e inoculação subcortical-, ao número inicial, a percentagem foi de 5%. Com base nestes resultados a heritabilidade individual estimada foi $h^2_i=0,95$.

No segundo ensaio, a inoculação subcortical foi realizada em meados de Abril e, uma semana depois, todas as plantas tinham contraído a infecção. No fim da terceira semana, a lesão, em algumas plantas, tinha atingido um dos seus extremos, o ápice caulinar ou o colo, e, por isso, deixou de ser possível registar o seu progresso. As observações utilizadas para a análise de variância foram as registadas até esta data.

Entre indivíduos verificaram-se diferenças muito marcadas que vão desde 1cm até 27cm. Neste último caso o avanço médio diário ultrapassou 1cm por dia.

Da análise de variância efectuada verifica-se que há diferença entre famílias, com significância, pelo teste de F, apenas para 0,0639 de probabilidade exterior. Este facto não parece impugnar de todo a estimativa da heritabilidade, podendo significar que o ensaio deveria ter maior dimensão numérica, isto é, mais famílias e/ou mais plantas dentro destas.

As heritabilidades estimadas para a dimensão das lesões, foi $h^2_f=0,63\pm 0,246$, para a média familiar e $h^2_i=0,36\pm 0,083$, para a individual.

Nos casos de morte, quer no mortório, quer nas plantas inoculadas subcorticalmente no campo, muito embora não se tenha procedido ao isolamento da *P. cinnamomi* aceitou-se a doença como causa próxima, não obstante se admitir que outras possam ter ocorrido. No primeiro caso este pressuposto é mais falível, dado que no segundo foi possível e fácil seguir o avanço da lesão até à raiz e observar o apodrecimento desta na circunstância de

morte. Refira-se que uma planta da população base permitiu o avanço da lesão até ao colo, tendo emitido um rebento na inserção da raiz que reconstituiu a planta.

CONCLUSÕES

1- A percentagem de plantas sobreviventes, das repicadas para o mortório com 2 a 4 folhas após a germinação, 30% para a população base e 66% para a população das progénies de progenitores resistentes, é significativamente diferente para 0,001 de probabilidade exterior.

2- Pelo facto de todas as plantas infectarem por inoculação subcortical com *P. cinnamomi*, conseguindo algumas delas sustentar o avanço das lesões, leva a suspeitar que a resistência da *C. sativa* à "doença da tinta" é do tipo horizontal ou durável.

3- A diferença percentual de plantas sobreviventes, sempre maior na população descendente de progenitores resistentes, mas muito mais acentuada no caso de inoculação subcortical do que no mortório, aponta no sentido de a resistência à "doença da tinta" na *C. sativa* comportar dois mecanismos; um de oposição à penetração do agente patogénico por parte do hospedeiro e outro à capacidade de dificultar o avanço da lesão uma vez contraída a infecção.

4- A conjugação sequencial dos dois sistemas, na pesquisa de plantas resistentes à doença, parece ter grandes virtualidades para seleccionar indivíduos resistentes; prático e fácil de aplicar na primeira fase, repicagem em mortório, reduzindo o universo para inoculação subcortical, forma mais drástica e de infecção assegurada, mas de mais difícil implementação e pouco ajustável a número vultoso.

5- Com a salvaguarda que possa merecer o pressuposto de que as progénies dos indivíduos resistentes pertencem a progenitores seleccionados na população base que serviu de testemunha, o parâmetro heritabilidade restrita individual da resistência à "doença da tinta" em *C. sativa* é muito elevado, $h^2_i=0,45$ para a sobrevivência em mortório e $h^2_i=0,95$ para a sobrevivência após inoculação subcortical, augurando uma óptima resposta à selecção e, portanto, susceptível de melhoramento genético fácil.

6- A diferença entre famílias relativa ao avanço das lesões, significativa apenas para o nível de 0,0639 de probabilidade exterior para o teste de F, permite estimar uma heritabilidade individual de $h^2_i=0,36 \pm 0,083$, suficientemente expressiva para proporcionar ganho genético razoável por selecção.

7- A percentagem de indivíduos que podem ser considerados com resistência, 5%, no interior de algumas populações de castanheiro bravo de *C. sativa* existentes em Portugal, é bastante superior ao referido por FERNANDES (1972). Esta constatação torna fácil a consecução de uma população de melhoramento, com larga base genética, para selecção recorrente.

BIBLIOGRAFIA

ANGIBOUST, A. (1979)- Redoner au châtaignier sa place dans l'économie française. L'Arboriculture Fruitière. Fev., (300): 37-42.

BARNARD, E. L., CORDELL, C. E., GILLY, S. P., KAIS, A. G. (1993)- Comparative performance of sand and long leaf pines on a *Phytophthora cinnamomi*- infested sand hill in west Florida. SJAF 17 (2): 90-95.

CORBAZ, R. (1990)- Principes de phytopathologie. Schiiler SA, Bienne, Suisse: 286.

FERNANDES, C.T. (1953)- Ensaios experimentais tendo em vista o repovoamento pelo castanheiro de regiões muito afectadas pela doença da tinta. Alcobaça, D. G. S. F. Aqu., 8.

FERNANDES, C.T. (1961)- Estudos e trabalhos realizados no Centro de Estudos do Castanheiro, in: <<Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas>>., vol 28, Tomo 1, Lisboa: 79-88.

FERNANDES, C.T. (1972)- Aspects de l'amélioration du châtaignier pour la resistance à la "maladie de l'encre", in: <<Actas III Congr. Un. Fit. Med.>>, Oeiras: 314-20.

GUERREIRO, M. G. (1957)- Castanheiros, alguns estudos sobre a sua ecologia e o seu melhoramento genético, Alcobaça: 111.

KEARSEY, M. J.; POONI H. S. (1996) The Genetical Analysis of Quantitative Traits, Chapman e Hall, 378.

LERNER, I.M. (1964)- La base genética de la selección. Ed. GEA, Barcelona: 409.

SHEARER, B.L., DILLON, M. (1995)- Susceptibility of plant species in *Eucalyptus marginata* forest to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, (43) : 113-34.

URQUIJO LANDALUCE, P. (1941) Nuevo método de la lucha contra la tinta del Castaño. *Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr.*, Vol.X: 24.

WRIGHT, J.W. (1964). *Mejoramento genetico de los arboles forestals* FAO, Roma: 436.

ZENTMYER, G. (1980)- *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph n° 10, APS, Minnesota.