

Melhoramento genético de castanheiro. Seleção e propagação de clones melhorados com resistência à doença da tinta para utilização como porta-enxertos

Do programa de melhoramento genético do castanheiro, iniciado pelo INIAV em 2006, foram selecionados clones com resistência à doença da tinta. Os novos clones, com entrada prevista no mercado para 2020/2021, são propagados em larga escala, por micropropagação e estacaria.

Andreia Amaral, Patrícia Fernandes e Rita Lourenço Costa . INIAV, I.P.



O programa de melhoramento genético

O INIAV iniciou em 2006 um programa de melhoramento genético para a resistência à doença da tinta do castanheiro, causada pelo oomiceta *Phytophthora cinnamomi* Rands, baseado em cruzamentos controlados entre a espécie europeia, *Castanea sativa* Mill, muito sensível ao agente patogénico, e as espécies asiáticas resistentes: *Castanea crenata* Siebold & Zucc (castanheiro japonês) e *Castanea mollissima* Blume (castanheiro chinês). O objetivo seria a introgressão de genes de resistência das espécies asiáticas na espécie europeia, produzindo-se, deste modo, uma geração segregante entre os dois progenitores, desde indivíduos sensíveis a indivíduos mais resistentes (Costa *et al.*, 2011). Este programa possui uma vertente aplicada, que tem como objetivo selecionar e produzir uma nova geração de porta-enxertos de castanheiro, com resistência melhorada à doença da tinta, com “pedigree” e entidade genética determinada, para, com a sua entrada no mercado brevemente, impulsionar o setor produtivo da castanha. O mercado nacional e europeu possuem um elevado défice de material vegetal melhorado de castanheiro. Os clones comercializados em Portugal são provenientes dos programas de melhoramento dos anos 60 do século XX, pouco adaptados às condições de clima atuais.

A produtividade (toneladas/hectare) dos

soutos portugueses é menos de metade do valor potencial, para o que muito contribui o elevado défice em materiais vegetais melhorados para a resistência às principais doenças. A tinta, provocada por *Phytophthora* spp, continua a ser a principal ameaça para o castanheiro. A luta química, que foi sendo utilizada nas últimas décadas, tem provado não ser nem eficaz, nem ambientalmente aceitável. Por outro lado, não existe controlo biológico disponível, como existe para o cancro, provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr., através da hipovirulência, ou para a praga da vespa-das-galhas-do-castanheiro, provocada por *Dryocosmus kuryphilus* Yasumatsu, através do parasitoide *Torymus sinensis* Kamijo.

A seleção dos novos clones foi efetuada da seguinte forma: as raízes das plantas obtidas dos cruzamentos controlados (descendências de irmãos completos) foram inoculadas com o agente patogénico causal da doença da tinta, *Phytophthora cinnamomi*, escolhendo-se os indivíduos mais resistentes (Santos *et al.*, 2017). Os novos clones vêm sendo propagados em larga escala, por micropropagação e estacaria, na unidade piloto de experimentação do castanheiro do INIAV, em Marvão, financiada pelo Programa Alentejo 2020, no âmbito do projeto **NEW Cast Rootstocks** (<https://projects.iniaiv.pt/NewCastRootstocks>).

Propagação de clones melhorados. Micropropagação e estacaria

A micropropagação é uma técnica que consiste no crescimento de plântulas em condições de assepsia, dentro de recipientes contendo meios de cultura gelificados,

com todos os nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento necessários ao seu desenvolvimento. Consiste em diferentes etapas, nomeadamente: (1) estabelecimento *in vitro*, a partir de gemas axilares; (2) multiplicação, onde se produzem milhares de cópias do mesmo genótipo (clonagem); (3) alongamento, fase onde as plantas atingem maior porte e vigor; (4) enraizamento e (5) aclimatização *ex vitro* (Figura 1).



Figura 1 – Micropropagação de clones melhorados de castanheiro

A fase mais crítica deste processo corresponde à aclimatização, uma vez que as plantas *in vitro* encontram-se em condições heterotróficas; têm todos os nutrientes, vitaminas e hormonas disponíveis e necessários ao seu desenvolvimento, no meio de cultura e a humidade relativa dentro dos recipientes de cultura é próxima da saturação (100%). Ao passar para as condições *ex vitro*, a humidade reduz-se para níveis de cerca de 55%-60% e as plântulas passam a comportar-se como autotróficas, sintetizando os nutrientes através da fotossíntese. A baixa sobrevivência que, por vezes, se observa durante a aclimatização de plantas regeneradas, através da micropropagação, tem sido atribuída, entre

vários fatores, à baixa capacidade do aparelho fotossintético.

O protocolo de micropropagação foi sendo otimizado. Nas etapas de multiplicação e alongamento utilizam-se dois meios de cultura: Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962) e Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980) que se vão alternando, e hormonas do grupo da citocininas, a Benzilaminopurina e Zeatina. Os recipientes e os meios de cultura preparados são esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. As manipulações do material vegetal dão-se em condições de esterilidade, em câmaras de fluxo laminar, com pinças e bisturis esterilizados a cerca de 250 °C. No fitoclima, onde as culturas se desenvolvem, o fotoperíodo é de 16 horas de luz e oito horas de escuridão e a temperatura de 23 °C. As etapas do enraizamento e aclimatização são realizadas em simultâneo, tendo taxas de sucesso de aproximadamente 90%. As plântulas, depois de alongadas *in vitro*, são imersas durante um minuto em hormona de enraizamento (Ácido Indolbutírico - IBA) com uma concentração de 2 g/L e colocadas em *paperpots* com um substrato leve, de perlite e turfa, onde se formam as raízes. Os *paperpots* são colocados dentro de caixas e o processo de enraizamento decorre a uma temperatura de 21 °C com 24 horas de luz (Figura 2).

Na fase do enraizamento, em simultâneo com a aclimatização, já não existem condições de assepsia, mas ainda existem humidades próximas da saturação (75%-80%) idênticas à fase *in vitro*, até à formação de raízes. Uma vez formadas as raízes, as plantas, começam a comportar-se como autotróficas, sintetizando os nutrientes através da fotossíntese e a humidade vai sendo reduzida gradualmente. Assim, o material vegetal obtido por micropropagação tem a vantagem de ser um material isento de contaminações por microrganismos, o que se traduz em taxas de crescimento muito elevadas no campo, após plantação. Por outro lado, as raízes que se formam são bastante vigorosas e funcionais, contribuindo também para uma boa adaptação e crescimento em condições de campo (Figura 3).

A par e passo com a micropropagação também se está a implementar a estacaria, na unidade piloto de experimentação do castanheiro do INIAV, em Marvão. As estacas são colhidas em pés-mãe dos clones a propagar, que deverão ter no máximo até 5 anos, porque o enraizamento é uma característica de juvenildade. As estacas colhidas



Figura 2 – Enraizamento em simultâneo com aclimatização



Figura 3 – Castanheiros de micropropagação com 8 meses de viveiro

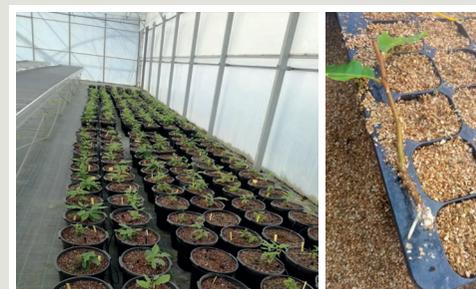


Figura 4 – Campo de pés-mãe e estacaria de castanheiro

nos pés-mãe seguem o mesmo processo das plântulas de micropropagação, isto é, são mergulhadas em hormona de enraizamento (IBA) e colocadas em *paperpots*. A formação das raízes dá-se em condições de humidade próxima da saturação e temperatura de 20 °C (Figura 4).

Do programa de melhoramento em curso, já com 12 anos, foram selecionados, até ao momento, sete genótipos que revelaram elevada resistência ao agente patogénico *P. cinnamomi*, após inoculação de raízes de réplicas de cada genótipo (clones). Os clones selecionados apresentam vigor e crescimentos bastante elevados, por se tratar de material híbrido muito jovem, obtido de cruzamentos controlados iniciados em 2006. O investimento na produção de genótipos melhorados de castanheiro, através de micropropagação, tem um retorno muito interessante, em termos de qualidade do material produzido.

No futuro próximo serão também efetuadas enxertias em viveiro, com as principais variedades de castanha, como acontece com outras espécies fruteiras. Desta forma, evitam-se os stresses inerentes à enxertia no campo, que potenciam a entrada de agentes patogénicos.

Nota final

Em conclusão, poderemos referir que a entrada destes novos clones melhorados no mercado, prevista para 2020-2021, vai impulsionar o setor da castanha, tanto a nível nacional como europeu. A produção de material vegetal de castanheiro, de qualidade e com diversidade genética, adaptado a diferentes condições de solo e clima das regiões de produção, é condição essencial para o aumento da produtividade dos souts nacionais, aproximando-os das produtividades dos souts de outros países europeus. 🌱

Bibliografia

- Costa, R.; Santos, C.; Tavares, F. *et al.* (2011). Mapping and transcriptomic approaches implemented for understanding disease resistance to *Phytophthora cinnamomi* in *Castanea* sp. *BMC Proceedings*, **5**:018.
- Lloyd, G.; McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society*, **30**:421-427.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-497.
- Santos, C.; Machado, H.; Correia, I.; Gomes, F.; Gomes-Laranjo, J.; Costa, R. (2015). Phenotyping *Castanea* hybrids for *Phytophthora cinnamomi* resistance. *Plant Pathology*, **64**:901-910.