



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Pesquisa de fungos endofíticos presentes em videira (*Vitis vinifera* L.) com capacidade para inibir o crescimento do agente causal da podridão negra (*Guignardia bidwellii*)

Francisca de Fátima Laranjeiro Sezões

Orientação:

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2016

“Enfim dum escolha faz-se um desafio
Enfrenta-se a vida de fio a pavio
Bebe-se a coragem até dum copo vazio
Nasce um novo dia e no braço outra asa
Brinda-se aos amores com o vinho da casa
E vem-nos à memória uma frase batida
Hoje é o primeiro dia do resto da tua vida”
Sérgio Godinho – O Primeiro Dia

AGRADECIMENTOS

O finalizar deste mestrado representa para mim a certeza de que com vontade e perseverança alcançamos tudo aquilo a que nos destinamos e como nada do que fazemos na nossa vida fazemos sozinhos, esta é mais uma etapa concluída na minha vida que não teria sido possível sem a ajuda de pessoas muito especiais.

Em primeiro lugar tenho de agradecer às minhas orientadoras Professora Rosário Félix e Doutora Carla Varanda pela orientação, conhecimentos, motivação, disponibilidade, companheirismo e por permitirem que com a vossa ajuda fosse possível chegar ao fim deste trabalho. Acredito que não podia ter tido ninguém melhor para me levar até ao fim deste percurso.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório, Nídia, André e Mónica pela disponibilidade que sempre mostraram e por toda a vossa ajuda no laboratório. O meu agradecimento ao Patrick pela ajuda na análise estatística e à Professora Maria João Cabrita pelo auxílio na análise cromatográfica. Agradeço ao Professor Zé Manel pela boa disposição que sempre faz tanta falta em momentos mais difíceis.

Para as avós dos meus filhos, Mãe, São e avó Joana, o meu muito obrigada por muitas vezes serem mais do que avós durante todo este tempo, serem verdadeiras Mães, sempre que não podia estar presente. Da mesma forma tenho de agradecer à minha irmã, Leila, que é muito mais do que uma tia fixe e que muitas vezes, sei que colocou os meus filhos em primeiro lugar, para que a minha ocupação e ausência fosse menos sentida. Agradeço ao meu pai, que mesmo longe me continua a ensinar que só com esforço e espírito de sacrifício podemos ir longe.

Ao meu marido Pedro agradeço a paciência, o trabalho redobrado que muitas vezes teve de acarretar e por continuar presente em mais uma etapa importante da minha vida.

Por fim agradeço aos meus filhos, Carolina e António, porque são vocês a luz dos meus olhos e é por vocês que nunca desisto. Os vossos sorrisos são a minha maior inspiração.

A todos MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Neste trabalho testou-se o potencial antagonista de 16 fungos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinifera* L.), de castas representativas do Alentejo produzidas em modo de proteção integrada e em modo biológico, contra *Guignardia bidwellii*. Os isolados identificados após ITS-PCR e sequenciação pertencem aos gêneros *Epicoccum*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Athelia*, *Phoma* e *Gibberella*. Os isolados testados mostraram atividade antagonista contra *G. bidwellii* quer por inibição direta, quer através da produção de compostos voláteis, à exceção dos dois isolados de *B. cinerea*. No entanto, todos os isolados produziram alguns compostos voláteis com reconhecida atividade antimicrobiana, tais como benzaldeído, 3-metil-1-butanol e derivados de ácido propanoico. Foi ainda observado que seis dos isolados produziram também metabolitos não voláteis com capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii*. Os resultados obtidos vêm mostrar o potencial dos fungos endofíticos como agentes de luta biológica no controlo de *G. bidwellii*, podendo constituir novas alternativas no âmbito de Proteção de Plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Videira, podridão negra, fungos endofíticos, voláteis, antagonismo.

ABSTRACT

Endophytic fungi present in grapevines (*Vitis vinifera* L.) with the ability to inhibit the growth of the causal agent of black rot (*Guignardia bidwellii*)

In this work the antagonistic potential of 16 endophytic grapevine fungi isolates (*Vitis vinifera* L.), from representative cultivars of the Alentejo region produced either under integrated pest management or organic mode, was tested against *Guignardia bidwellii*. Isolates were identified through ITS-PCR and sequencing, as belonging to the genera *Epicoccum*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Athelia*, *Phoma* and *Gibberella*. Isolates showed antagonist activity against *G. bidwellii* either by direct inhibition or through the production of volatile compounds, with the exception of two isolates of *B. cinerea*. Nevertheless, all isolates produced volatile compounds with known antimicrobial activity such as benzaldehyde, 3-methyl-1-butanol and propionic acid derivatives. Additionally, six isolates produced non-volatile metabolites with the ability to inhibit *G. bidwellii* growth. These results show the potential that endophytic fungi have as agents for biological control of *G. bidwellii*, opening new options in the field of Plant Protection.

KEY-WORDS: Grapevine, black rot, endophytic fungi, volatile, antagonism.

ABREVIATURAS

°C – grau centígrado

cm - centímetro

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxinucleótidos trifosfatados

EDTA – ácido etilenodiamino tetra acético

g – aceleração da gravidade

h – hora

ITS – ‘Internal Transcribed Spacer’

M – molar

m – metro

mm – milímetro

ng - nanograma

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

MW – peso molecular

PCR – ‘Polimerase Chain Reaction’

pb – pares de bases

rDNA – DNA ribossomal

rpm – rotações por minuto

seg. – segundos

sp. – espécie

spp. – espécies

TAE – tampão tris/acetato/EDTA

V – volt

v/v – volume/volume

μl – microlitro

μm – micrometro

OTU - ‘operational taxonomic unit’

Bases nucleotídicas

A – Adenina

T – Timina

G – Guanina

C – Citosina

ÍNDICE

<i>Agradecimentos</i>	ii
<i>Resumo</i>	iii
<i>Abstract</i>	iv
<i>Abreviaturas</i>	v
<i>Índice de figuras</i>	ix
<i>Índice de tabelas</i>	xii
<i>1. Introdução</i>	1
1.1 - A cultura da vinha e a sua história	2
1.2 - A vitivinicultura em Portugal	2
1.3 - As doenças da vinha	6
1.3.1 – Podridão negra da videira – ‘Black Rot’	9
1.3.1.1 – Ciclo de vida	9
1.3.1.2 – Sintomas	11
1.3.1.3 – Importância da doença em Portugal	13
1.4 – Controlo das doenças da vinha	14
1.4.1 – Modos de proteção da vinha: proteção integrada e agricultura biológica	16
1.4.1.1 – Proteção integrada	17
1.4.1.2 – Agricultura biológica	18
1.5 – Fungos endofíticos	19
1.5.1 – Definição e ecologia	19
1.5.2 – Importância dos microrganismos endofíticos e o seu potencial para o uso em Proteção de Plantas	22
<i>2. – Objetivo</i>	26
<i>3. – Materiais e Métodos</i>	28
3.1 – Material vegetal	29
3.2 – Isolamento do fungo fitopatogénico <i>Guignardia bidwellii</i>	30
3.3 – Isolamento dos fungos endofíticos	30

3.4 – Identificação molecular dos fungos endofíticos	31
3.5 – Testes de antagonismo	33
3.5.1 – Teste de antagonismo direto	33
3.5.2 – Teste dos compostos voláteis	34
3.5.3 – Teste dos compostos não voláteis	35
3.6 – Extração e análise cromatográfica dos compostos voláteis	37
3.7 – Análise estatística	38
4. – <i>Resultados</i>	39
4.1 – Isolamento e identificação de fungos	40
4.2 – Testes de antagonismo	45
4.2.1 – Teste de antagonismo direto	45
4.2.2 – Teste dos compostos voláteis	54
4.2.2.1 – Identificação dos compostos voláteis	59
4.2.3 – Testes dos compostos não voláteis	59
5. – <i>Discussão</i>	64
6. – <i>Conclusão</i>	78
<i>Referências</i>	81
<i>Anexos</i>	88
Anexo I	88
Anexo II	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alto-relevo representando a vinha no período romano no século I a.C.	2
Figura 2 – Mapa representativo das regiões vitivinícolas de Portugal, onde estão incluídas as 8 sub-regiões do Alentejo.	6
Figura 3 – Ciclo da doença podridão negra.	10
Figura 4 – Folhas com sintomas de podridão negra: A) pequenas manchas de forma circular; B) picnídios visíveis em mancha necrosada.	12
Figura 5 – Sintomas de podridão negra: A) em pânpanos com picnídios visíveis em mancha com forma alongada; B) em pecíolos.	12
Figura 6 – Sintomas de podridão negra nos cachos.	13
Figura 7 – Sintomas do ataque do fungo <i>Guignardia bidwellii</i> em: A – folhas; B – sarmentos com os picnídios visíveis.	14
Figura 8 – Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualistas ou parasitas entre fungo endofítico e planta hospedeira. A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e avirulência do fungo resulta numa interação mutualista. Na ausência de equilíbrio a interação é parasitária ocorrendo doença.	20
Figura 9 – Esquema do processo de amostragem de folhas de videira.	29
Figura 10 – Esquema do processo de amostragem de folhas de videira com o número de isolados escolhidos por cada casta.	31
Figura 11 – Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos ‘primers’ ITS1 e ITS4.	32
Figura 12 – Esquema representativo do teste de antagonismo por inibição direta.	34
Figura 13 – Esquema representativo do teste de inibição por emissão de compostos voláteis.	35
Figura 14 – Teste dos compostos não voláteis: A – crescimento dos fungos isolados em meio de cultura PDB; B – crescimento de um fungo depois do período de incubação de 12 dias.	36
Figura 15 – Esquema representativo do teste dos compostos não voláteis.	37
Figura 16 – A: Fungos endofíticos isolados de folhas de videira; B – Placa de Petri com <i>G. bidwellii</i> .	40
Figura 17 – Produtos obtidos após purificação dos produtos ITS-PCR, utilizando DNA extraído de fungos crescidos em placa contendo PDA, em gel de agarose a 1%. Os tamanhos de algumas das bandas estão indicados à direita. M- marcador 100bp ‘DNA Ladder’ (Fischer); 1 – <i>Botrytis cinerea</i> 2; 2 – <i>Epicoccum nigrum</i> 5; 3 – <i>Alternaria carthami</i> ; 4 – <i>E. nigrum</i> 1; 5 – <i>E. nigrum</i> 3; 6 – <i>Epicoccum</i> sp. 1; 7 – <i>Epicoccum</i> sp. 2; 8 – <i>E. nigrum</i> 4; 9 – <i>Phoma exigua</i> ; 10 – <i>Botrytis cinerea</i> 1; 11 – <i>Gibberella pulicaris</i> ; 12 – <i>Alternaria</i> sp. 2; 13 – <i>Alternaria tenuissima</i> ; 14 – <i>E. nigrum</i> 2; 15 – <i>Athelia bombacina</i> ; 16 – <i>Alternaria</i> sp. 2.	41
Figura 18 – Total de fungos isolados distribuídos por OTU.	43
Figura 19 – Árvore filogenética obtida por aplicação do método	

‘Neighbour-Joining’, a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS1-ITS4. Os valores numéricos representam os ‘bootstraps’.	44
Figura 20 – Número de fungos identificados de acordo com o modo de produção da vinha.	45
Figura 21 – Placas de Petri com fungo endofítico e <i>G. bidwellii</i> colocados diametralmente opostos na placa (dia 0 do teste de antagonismo direto).	46
Figura 22 - Placa de teste de <i>G. bidwellii</i> com o fungo antagonista <i>Athelia bombacina</i> no 5º dia do teste de antagonismo direto.	48
Figura 23 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>G. bidwellii</i> ao longo do tempo.	48
Figura 24 – Crescimento de <i>G. bidwellii</i> no 7º dia, nas placas de teste com os fungos endofíticos: A – <i>Botrytis cinerea</i> 1; B - <i>Botrytis cinerea</i> 2; C – <i>Athelia bombacina</i> ; D – <i>Phoma exigua</i> ; E – <i>Epicoccum</i> sp. 2 e F – controlo. Lado esquerdo das placas – <i>G. bidwellii</i> ; lado direito das placas – fungo antagonista.	49
Figura 25 – Crescimento de <i>G. bidwellii</i> no 12º dia, nas placas de teste com os fungos endofíticos: A – <i>Phoma exigua</i> ; B – <i>Alternaria tenuissima</i> e C –controlo. Lado esquerdo das placas – <i>G. bidwellii</i> ; lado direito das placas – fungo antagonista.	50
Figura 26 – Tipo de interação A entre <i>G. bidwellii</i> e: A - <i>Botrytis cinerea</i> 1, B – <i>Botrytis cinerea</i> 2, C - <i>Athelia bombacina</i> . Lado esquerdo das placas – <i>G. bidwellii</i> ; lado direito das placas – fungo antagonista.	52
Figura 27 – Tipo de interação C entre <i>G. bidwellii</i> e: A – <i>Epicoccum nigrum</i> 5, B - <i>Epicoccum nigrum</i> 3, C - <i>Epicoccum nigrum</i> 4, D - <i>Alternaria</i> sp. 2, E - <i>Epicoccum nigrum</i> 1, F – <i>Gibberella pulicaris</i> , G – <i>Epicoccum</i> sp. 1, H – <i>Epicoccum</i> sp. 2, I – <i>Alternaria</i> sp. 1. Lado esquerdo das placas – <i>G. bidwellii</i> ; lado direito das placas – fungo antagonista.	53
Figura 28 – Tipo de interação D entre <i>G. bidwellii</i> e: A – <i>Alternaria carthami</i> , B – <i>Phoma exigua</i> , C – <i>Alternaria tenuissima</i> , D - <i>Epicoccum nigrum</i> 2. Lado esquerdo das placas – <i>G. bidwellii</i> ; lado direito das placas – fungo antagonista.	54
Figura 29 – Exemplo de montagem do teste dos compostos voláteis.	55
Figura 30 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>G. bidwellii</i> em função do tempo.	57
Figura 31 – Valores de percentagem de inibição do crescimento de <i>G. bidwellii</i> no teste de antagonismo direto e no teste dos compostos voláteis.	58
Figura 32 – Teste dos compostos voláteis no tempo 7: A – <i>Alternaria carthami</i> , B – <i>Alternaria tenuissima</i> , C – <i>Epicoccum nigrum</i> 2 e D – <i>Athelia bombacina</i> .	60
Figura 33 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>G. bidwellii</i> no tempo 7.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Áreas de plantação de vinha por região vitivinícola de Portugal Continental.	3
Tabela 2 – Produção de vinho a nível mundial.	4
Tabela 3 – Área ocupada pelas principais castas cultivadas em Portugal.	5
Tabela 4 – Identificação de cada um dos fungos endofíticos isolados com correspondência à casta e ao modo de produção da vinha.	42
Tabela 5 – Valores do raio de crescimento de <i>G. bidwellii</i> (cm) ($r_{G. bidwellii} \pm SE$) na presença dos vários fungos e nos vários dias do teste de antagonismo direto.	47
Tabela 6 – Percentagem de inibição do crescimento de <i>G. bidwellii</i> no dia 15 do teste de antagonismo direto.	51
Tabela 7 – Tipo de interação dos fungos endofíticos com <i>G. bidwellii</i> .	51
Tabela 8 – Valores do raio micelar de crescimento ($r_{G. bidwellii} \pm SE$) nos vários tempos do teste dos compostos voláteis.	56
Tabela 9 – Percentagem de inibição do crescimento de <i>G. bidwellii</i> no tempo 12 do teste dos compostos voláteis.	58
Tabela 10 – Valores do raio micelar de crescimento ($r_{G. bidwellii} \pm SE$) nos vários tempos do teste dos compostos não voláteis.	61
Tabela 11 – Percentagem de inibição do crescimento de <i>G. bidwellii</i> nos vários volumes do teste dos compostos não voláteis.	63



1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A cultura da vinha e a sua história

A vinha é uma das culturas mais plantadas em todo o mundo, com um total de área de plantação, no ano de 2015, de aproximadamente 7,5 milhões de hectares (OIV, 2015).

A videira pertence à família das Vitáceas, cuja origem reside num passado muito anterior ao do Homem, há cerca de 65 milhões de anos. Em Portugal os primeiros vestígios do género *Vitis*, têm 13 a 14 milhões de anos. A videira chega à Europa sob a influência dos Romanos e é difundida por todas as regiões que a cultura ainda hoje ocupa. Os altos-relevos existentes (figura 1) demonstram a importância da vinha na época romana. Portugal entra no mercado do vinho, com o fim do domínio muçulmano, iniciando a exportação para Inglaterra e EUA, e no final da Idade Média, possuía uma das maiores frotas comerciais do mundo. Foi sob a gestão do Marquês de Pombal, depois do terramoto de 1755, que foi criada a região demarcada de produção de vinho do Porto e a Real Companhia de Agricultura e Vinha do Douro (Infovini, 2016; IVV, 2016).



Figura 1 - Alto-relevo representando a vinha no período romano no século I a.C. (Fonte: Historiaschistoria, 2016).

Hoje em dia a vinha e o vinho constituem um património cultural e económico que importa preservar e valorizar. Portugal tem uma longa tradição vitivinícola, onde o vinho tem fortes raízes culturais e históricas. O consumo de vinho está incorporado na gastronomia, faz parte da dieta mediterrânica e é preponderante a nível social, cultural e económico.

1.2 – A vitivinicultura em Portugal

A viticultura em Portugal, em paralelo com a maior parte dos países vitícolas europeus tem sofrido grandes oscilações. No entanto, é inquestionável a importância na economia

portuguesa, constituindo uma atividade produtiva fundamental e representando cerca de 16% da produção agrícola (período de 2000-2005) (INE, 2011). A área de vinha plantada em Portugal Continental, em julho de 2014 era de cerca de 218 mil hectares, correspondendo à quarta maior região na União Europeia (IVV, 2014; OIV, 2015), com 2,59% do território nacional ocupado com vinha, distribuído pelas várias regiões do país (tabela 1).

Tabela 1 - Áreas de plantação de vinha por região vitivinícola de Portugal Continental (adaptado de IVV, 2014)

Região	Área (ha)	
	DOP*	Total
Minho	15 810	27 432
Trás-os-Montes	417	23 303
Douro	40 378	43 611
Beiras	8370	52 670
Lisboa	1074	22 425
Tejo	1161	15 663
Península de Setúbal	2154	8622
Alentejo	10 090	23 188
Algarve	119	1773
Total	79 573	218 677
*Área das declarações de Colheita e Produção		Situação em 31/07/2014

Em relação à produção de vinho, a ‘International Organisation of Vine and Wine’ (OIV) classifica Portugal, desde 2010 a 2014, no 11º lugar do ranking mundial, situado à frente de países como a Nova Zelândia (tabela 2). De 2008 a 2012, verificou-se que Portugal foi o terceiro país com maior crescimento de área de vinha (8%), sendo apenas ultrapassado por países como o Chile e a China (OIV, 2016).

Nos últimos anos, o sector vinícola tem também sido responsável pelo aumento das exportações portuguesas. Na campanha de 2013/2014, a produção de vinho situou-se nos 6,2 milhões de hectolitros, representando 45% da produção de vinho exportada e as exportações geraram em 2013 valores de 724,7 milhões de euros (IVV, 2014; Viniportugal, 2016).

Tabela 2 – Produção de vinho a nível mundial (adaptado de OIV, 2015)

País	2014 (previsão) / milhões de hl	Posição
França	46 696	1
Itália	44 739	2
Espanha	41 620	3
Estados Unidos	22 300	4
Argentina	15 197	5
Austrália	12 000	6
África do Sul	11 316	7
China	11 178	8
Chile	10 500	9
Alemanha	9334	10
Portugal	6195	11
Roménia	4093	12
Nova Zelândia	3204	13
Grécia	2900	14
Hungria	2734	15
Brasil	2732	16
Áustria	2250	17
Bulgária	1228	18
TOTAL	278 800	

Portugal é também um dos países com mais variedade de castas autóctones, as quais fazem da produção nacional um caso único e conferem aos vinhos portugueses a diferenciação da produção dos restantes países da Europa e do resto do mundo. Estima-se que, em Portugal existam mais variedades de castas do que em Itália e seis vezes mais do que em Espanha e em França e são estas que constituem uma vantagem competitiva para o setor vitivinícola (IVV, 2016). Para além das castas autóctones, existem em Portugal inúmeras variedades estrangeiras, perfeitamente adaptadas à geografia, às condicionantes do clima e solos portugueses. As principais castas cultivadas em Portugal (tabela 3) representam cerca de 55% da área total da vinha, havendo uma predominância nas castas tintas com 38% do total da área de vinha plantada e onde se incluem 3 castas internacionais (IVV, 2014).

Tabela 3 – Área ocupada pelas principais castas cultivadas em Portugal (adaptado IVV, 2014)

Castas	Área (ha)	%
Aragonez / Tinta Roriz / Tempranillo	15 291,73	7
Touriga Franca	12 231,41	6
Castelão/ João Santarém /Periquita	9286,61	4
Fernão Pires / Maria Gomes	9126,08	4
Touriga Nacional	8183,47	4
Trincadeira / Tinta Amarela	7631,65	3
Baga	4995,94	2
Síria / Roupeiro / Códega	4909,36	2
Arinto / Pedernã	4244,08	2
Syrah / Shiraz	3925,29	2
Loureiro	3819,92	2
Alicante Bouschet	3709,67	2
Tinta Barroca	3645,73	2
Vinhão / Sousão	2952,65	1
Alvarinho	2224,20	1
Malvasia Fina / Boal	2094,35	1
Rufete / Tinta Pinheira	2077,95	1
Marufo / Mourisco Roxo	2063,93	1
Malvasia Rei	1897,26	1
Jaen / Mencia	1825,53	1
Caladoc	1780,56	1
Cabernet Sauvignon	1712,08	1
Rabigato	1553,22	1
Antão Vaz	1.339,07	1
Trajadura / Treixadura	1.171,54	1
Azal	1.079,67	0.5

O Instituto da Vinha e do Vinho (IVV) divide Portugal em 14 regiões vitivinícolas: Minho, Trás-os-Montes, Douro/Porto, Terras de Cister (Távora-Varosa), Beira Atlântico (Bairrada), Terras do Dão, Terras da Beira (Beira Interior), Lisboa, Tejo, Península de Setúbal, Alentejo, Algarve, Açores e Madeira (figura 2).

O Alentejo é uma das maiores regiões vinícolas do país, com cerca de 23 mil ha de plantação de vinha em 2014, divididos por 8 sub-regiões (figura 2) (IVV, 2014). Atualmente, tem um enorme potencial vitivinícola, com um clima Mediterrânico, onde a temperatura nos meses de verão pode ser bastante elevada o que juntamente com os seus

solos pobres conferem às uvas uma desejável acumulação de açúcares e compostos fenólicos, que se traduz na qualidade dos vinhos.

As principais variedades de uva para vinho plantadas no Alentejo, incluem para além de castas autóctones, que imprimem um forte carácter regional aos vinhos, castas estrangeiras, de valor reconhecido e que reforçam a liderança vitivinícola da região. De entre as castas brancas, as mais importantes são Roupeiro, Antão Vaz e Arinto. Em relação às tintas, salienta-se a importância das castas Trincadeira, Aragonez, Castelão, Alicante Bouschet, Syrah e Cabernet Sauvignon (CVRA, 2016; Infovini, 2016).

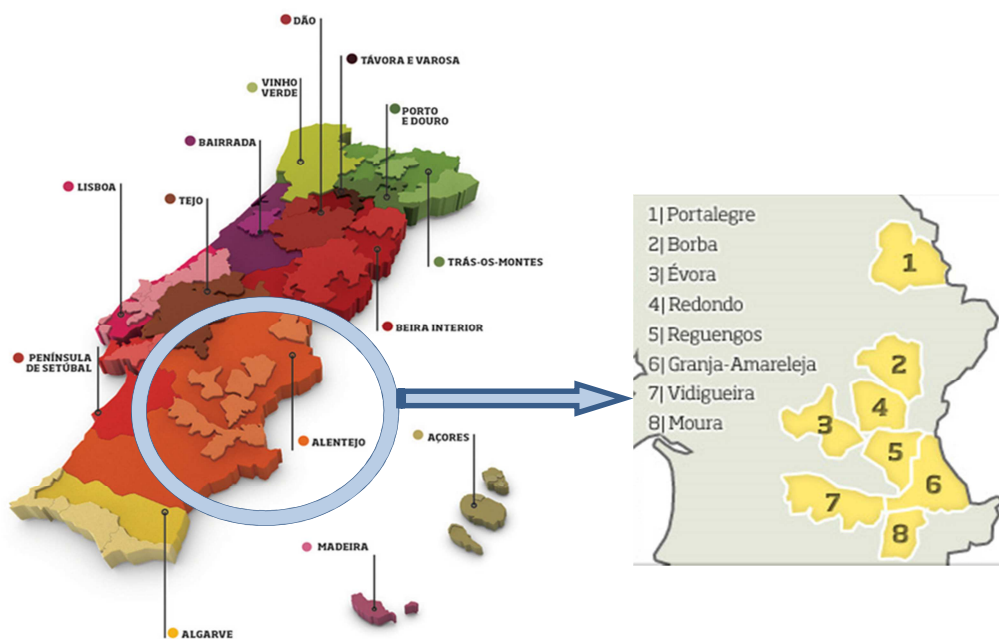


Figura 2 – Mapa representativo das regiões vitivinícolas de Portugal, onde estão incluídas as 8 sub-regiões do Alentejo (Fonte: IVV, 2014; IVV, 2016; Viniportugal, 2016).

1.3 – As doenças da vinha

As doenças que afetam a videira podem causar substanciais perdas de produção, com elevados prejuízos económicos e desde há muito que o Homem se debate para as compreender e combater. Uma das citações mais antigas na literatura sobre doenças das plantas, mais especificamente sobre a ferrugem da videira é encontrada no Antigo Testamento (750a.C.) (Agrios, 2005).

Um dos exemplos das consequências nefastas que as doenças podem ter nas vinhas, aconteceu na segunda metade do século XIX e condicionou durante muitas décadas toda

a viticultura europeia. O primeiro desastre natural foi o ataque de oídio (*Erysiphe necator*), que invadiu a Europa em 1845 e alastrou em poucos anos a quase todas as regiões vitícolas da Península Ibérica. Poucos anos depois surge aquela que talvez tenha sido a doença com maior impacto na viticultura Ibérica, o míldio (*Plasmopora viticola*). É por esta altura que são introduzidos o enxofre e o cobre para combate às doenças (Agrios, 2005).

As doenças das plantas podem ser agrupadas segundo vários critérios, como por exemplo pelo tipo de agente que causa a doença. Segundo este critério os agentes causais das doenças, podem ser de dois tipos: bióticos, quando são organismos vivos tais como fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus, viróides e nemátodes ou abióticos como resultado de fatores ambientais (luz, temperatura, água), fatores químicos (nutrientes, pesticidas) ou fatores do solo (pH, textura) (Agrios, 2005).

Para além das perdas diretas no campo e em qualidade, financeiramente as doenças são responsáveis por prejuízos elevados, não só pela produção perdida, como também pelos custos associados ao controlo e combate das mesmas. Em termos económicos, são imputadas às doenças cerca de 14% das perdas totais de produção, incluindo as perdas ocorridas no campo e em pós-colheita (FAO, 2016).

A videira, durante o seu ciclo vegetativo, está sujeita a inúmeras doenças e pragas das quais deve ser protegida, uma vez que para além de alterarem ou destruírem a produção podem também afetar a perenidade da planta. Sendo a videira uma planta lenhosa perene, no seu habitat natural, esta segue um ciclo vegetativo anual próprio, com diferentes fases de desenvolvimento designadas por Estados Fenológicos de Baggiolini. O conhecimento destes, por parte dos viticultores é muito importante, uma vez que a sensibilidade da videira às diferentes pragas e doenças está intimamente ligada ao seu estado de desenvolvimento, sendo particularmente sensível entre a pré-floração e o fecho dos cachos (Garrido *et al.*, 2004).

Na vinha as doenças criptogâmicas são as que têm mais expressão, sendo os fungos considerados os maiores inimigos da videira. A gravidade da ocorrência das doenças causadas por fungos está fortemente ligada às condições climatéricas, mas depende, também do modo de condução da vinha, do estado sanitário das plantas e da cultivar, que pode apresentar maior ou menor tolerância a essas doenças.

Em Portugal, a produção de vinho na campanha de 2014, teve um decréscimo de cerca de 6% face ao ano anterior, devido às condições climatéricas registadas e aos ataques frequentes de doenças. Existiram regiões com diferenças de produção de menos 25%,

comparadas com o ano anterior e produtores com perdas de produção de 45% devido a ataques frequentes dos agentes causadores do míldio e do oídio (IVV, 2016).

De entre as doenças mais importantes da videira destacam-se o **míldio** da videira, o qual constitui um dos grandes problemas da vinha pela sua ação extremamente nefasta, chegando a dizimar vinhas por completo. É causado pelo pseudofungo *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) (Berl. et de Toni) que se desenvolve em todos os órgãos, em condições de temperaturas ótimas de 20°C e humidades relativas muito elevadas, tornando-se epidémico na presença de água nos órgãos vegetais da planta. **Oídio** da videira, causado pelo fungo *Erysiphe necator* (Schw.), é frequentemente descrito como uma das grandes doenças da vinha. Este fungo ataca todos os órgãos verdes da planta, e cachos e o seu desenvolvimento é fortemente dependente da temperatura, com temperaturas ótimas entre 20-27°C e humidades relativas muito elevadas. Uma vez que o fungo pode atacar os cachos, desde muito cedo, podendo evoluir até ao fendilhamento dos bagos, após a formação dos mesmos, torna propício o ataque de outros fungos, como a podridão cinzenta. **Podridão cinzenta**, causada pelo fungo *Botrytis cinerea* (Pers.) tem um grande número de hospedeiros. Atinge todos os órgãos da videira desde o gomo até aos cachos, estando presente ao longo de quase todo o ciclo vegetativo. As condições favoráveis ao aparecimento deste fungo encontram-se associadas ao excessivo vigor vegetativo, a feridas que constituem porta de entrada para o fungo e a elevada humidade relativa. A **Escoriose** da videira é capaz de provocar importantes quebras de produção e pode afetar a cultura desde a fase inicial do ciclo vegetativo. É causada pelo fungo *Phomopsis viticola* (Sacc.) que se manifesta com condições de chuva e temperatura ótima de 23°C, ou seja primaveras chuvosas, o que nestas condições torna a doença particularmente perigosa, uma vez que são os tecidos jovens os mais suscetíveis à infeção. **Eutipiose** é uma das doenças do lenho mais destrutivas que afeta essencialmente vinhas adultas ou já envelhecidas e desenvolve-se em ramos mortos propagando-se o agente causal, o fungo *Eutypa spp.* para as videiras sãs, através de feridas recentes, como feridas da poda onde penetra no tecido vascular da videira. O fungo conserva-se sobre madeira morta e entra em atividade após uma chuva com duração de 2 a 3 dias, sendo também favorecido pelo frio. **Esca** é também uma doença do lenho causada por um complexo de fungos, cuja atuação ainda hoje é mal conhecida. *Phaeomoniella clamydospora*, *Phaeoacremonium spp.*, *Fomitiporia mediterranea*, *Fomitiporia punctata*, são os mais comuns. Os fungos hibernam na madeira atacada e a sua disseminação faz-se com o vento, penetrando na videira através das feridas da poda

e degradando os tecidos do lenho por meio de toxinas (Pearson & Goheen, 1990; Fischer & Kassemeyer, 2003; Bertsch *et al.*, 2013). **Podridão negra** da videira (‘Black Rot’) será abordada no capítulo 1.3.1.

1.3.1 – Podridão negra da videira – ‘Black Rot’

A podridão negra ou ‘Black Rot’ da videira é um das doenças mais importantes a nível económico no nordeste dos Estados Unidos, Canadá, Europa e América do Sul. É por isso uma doença de distribuição mundial, originária da América do Norte onde foi identificada, pela primeira vez numa vinha do estado do Kentucky em 1804, tendo sido apenas estudada em detalhe por Viala & Ravaz em 1886. Apareceu na Europa em finais do século XIX, juntamente com os agentes causais do míldio e do oídio, a partir de material de propagação vegetativo de videiras americanas importadas para a reconstituição das vinhas destruídas pela filoxera, mas com raras ocorrências em climas mediterrâneos (Pearson & Goheen, 1990; Rego & Oliveira, 2007). Na Europa, até à década de 80, as únicas referências importantes do aparecimento da doença eram de zonas com clima temperado, como o Norte de Itália e o Sudoeste de França, mas em finais dos anos 80, verificaram-se também prejuízos no Sul da Suíça (Pezet & Jermini, 1989, citado por Rego & Oliveira, 2007). Mais recentemente, na Alemanha, várias regiões foram afetadas pela doença com cerca de 30-80% dos cachos afetados (Harms *et al.*, 2005).

A doença é causada pelo fungo Ascomycota *Guignardia bidwellii* Viala & Ravaz (anamorfo *Phyllosticta ampellicida* (Engelman) van der Aa = *Phoma uvicola* Berck. & Curtis) e afeta maioritariamente a videira (*Vitis* spp.), mas também outros hospedeiros da família das Vitáceas (*Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp., *Cissus* spp.) (Van Der Aa, 1973, citado por Wicht *et al.*, 2012). Caracteriza-se por ter esporos assexuados, os conídios e esporos sexuados ou de resistência, os ascósporos, que se formam dentro de uma estrutura denominada asco (Pearson & Goheen, 1990).

1.3.1.1 - Ciclo de Vida

A podridão negra está frequentemente relacionada com os ataques do ano anterior uma vez que o fungo hiberna, sob a forma de pseudotecas, formadas, precisamente em órgãos atacados no ano anterior, sobretudo em bagos mumificados caídos no solo ou em cachos aderentes à videira. Na primavera as pseudotecas, com as chuvas, libertam os

ascósporos (fonte de infecção primária), que são transportados pelo vento e infetam gomos e folhas jovens (figura 3). Os ascósporos germinam na presença de água ou humidade relativa superior a 90%. Os primeiros sintomas (manchas castanho-avermelhadas, onde 3 a 4 dias depois aparecem os picnídios) surgem após um período de incubação que pode durar de 3 a 4 semanas. A fonte de infecção secundária, os conídios são libertados dos picnídios com a chuva, infetando folhas, ramos, inflorescências e mais tarde bagos. Ambos os esporos, ascósporos e conídios são libertados com chuva de primavera ou verão e necessitam de água para germinar e infetar a planta (Pearson & Goheen, 1990).

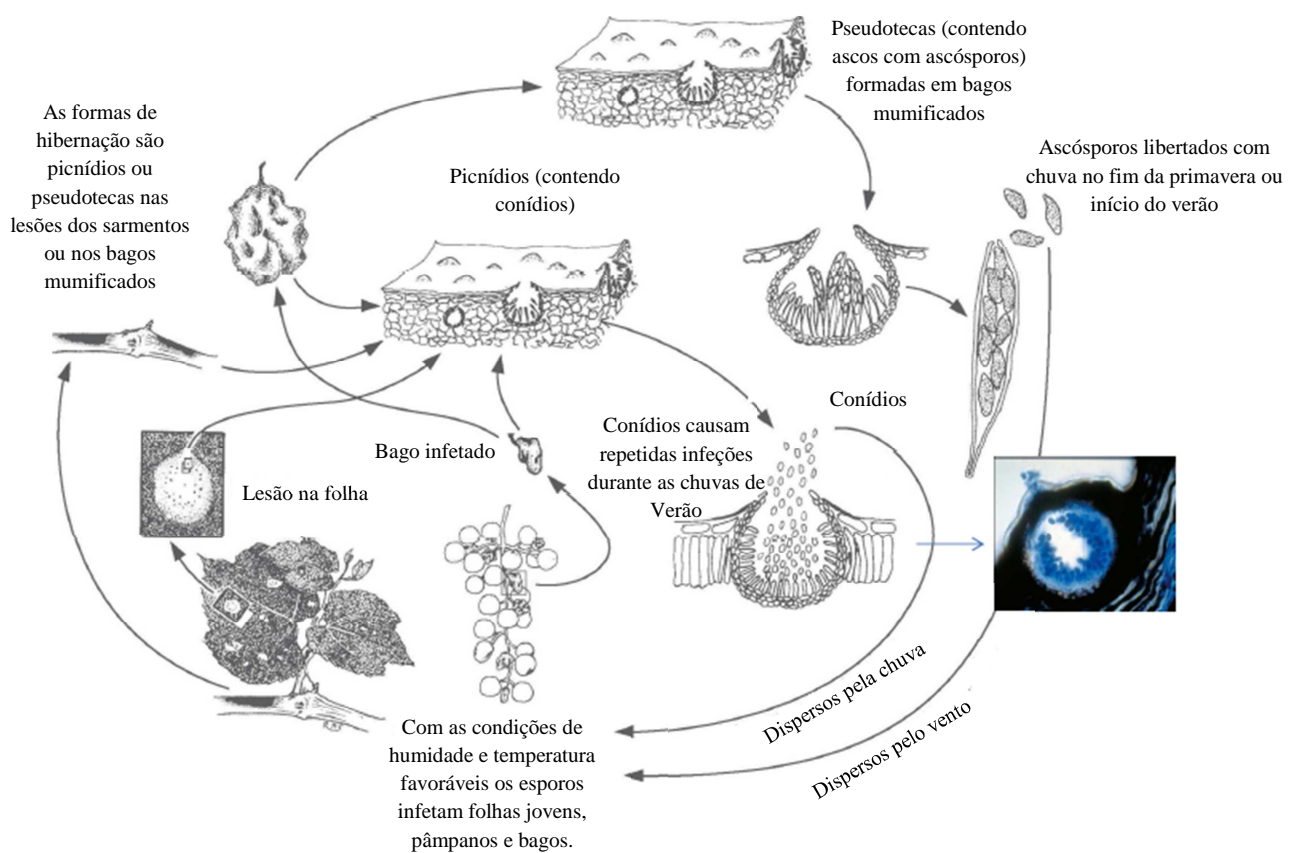


Figura 3 – Ciclo da doença podridão negra (adaptado de Pearson & Goheen, 1990).

Os ataques podem ocorrer com as infeções primárias e secundárias a sobreporem-se até que acontece uma das duas situações prováveis: esgotamento das pseudotecas e/ou falta de recetividade dos órgãos da planta, o que normalmente sucede com o terminar dos crescimentos vegetativos (Dubos, 1999). As infeções primárias podem acontecer logo na saída das primeiras folhas e com a temperatura ótima, os esporos precisam apenas de 6 horas de humectação para germinar e infetar (Cabral *et al.*, 2013).

A doença é favorecida por temperaturas de 27°C e humidade relativa elevada, de cerca de 90%, ou seja condições que correspondem à primavera e início de verões chuvosos (Rego & Oliveira, 2007; Sosnowski *et al.*, 2012).

No estudo realizado em 2007 por Rego e Oliveira, em várias vinhas da região da Bairrada e do Alentejo, com o objetivo de determinar a verdadeira etiologia da doença, não detetaram o estado sexuado do fungo (*Guignardia bidwellii*) nas regiões prospectadas. Os autores admitem que por esse motivo, é razoável dizer que o ciclo da doença, em Portugal, esteja essencialmente a ser assegurado por o anamorfo *Phyllosticta ampellicida*. Assim, a sobrevivência do fungo é feita por picnídios e as infeções primaveris e estivais são asseguradas por conídios (Rego & Oliveira, 2007).

O período mais sensível da videira ao fungo é desde a saída das primeiras folhas até ao pintor. Em particular para os cachos a recetividade ao ataque do fungo é desde o período de pré-floração até ao fecho dos cachos. Após o pintor a suscetibilidade dos bagos baixa drasticamente em virtude do aumento do teor de açúcar (Hoffmam *et al.*, 2002).

As variedades apontadas como mais suscetíveis à doença são: Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Syrah, Carignan, Grenache, Sémillon, e Merlot (Dubos, 1999, Cabral *et al.*, 2013).

1.3.1.2 - Sintomas

Todos os órgãos verdes da videira em fase de crescimento são suscetíveis à infeção (Reynier, 1986). Nas folhas, os primeiros sintomas que aparecem são pequenas lesões de cor acastanhada, circulares, com cerca de 2 a 10 mm de diâmetro e com contorno castanho-escuro (figura 4A). Estas manchas aparecem dispersas pelo limbo e algumas podem coalescer entre si formando manchas de maior dimensão. Sobre estas manchas, formam-se, em poucos dias pontuações negras, os picnídios, que constituem o sinal da doença (figura 4B).

Nos pâmpanos e pecíolos surgem manchas necróticas de forma alongada, rodeadas de uma auréola castanho-escuro (figura 5). As lesões nos pecíolos podem originar a dessecação das folhas e nos pâmpanos podem contribuir para a sua quebra pelo vento (Reynier, 1986; Pearson & Goheen, 1990; Cabral *et al.*, 2013).

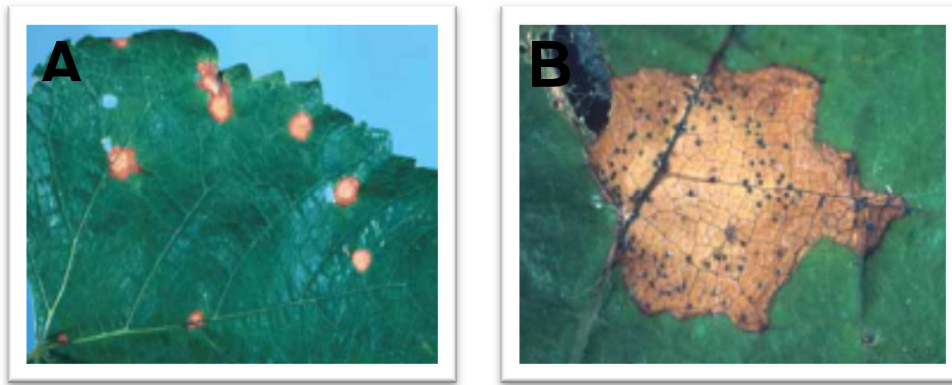


Figura 4 – Folhas com sintomas de podridão negra: A) pequenas manchas de forma circular; B) picnídios visíveis em mancha necrosada (Delgado, 2010).

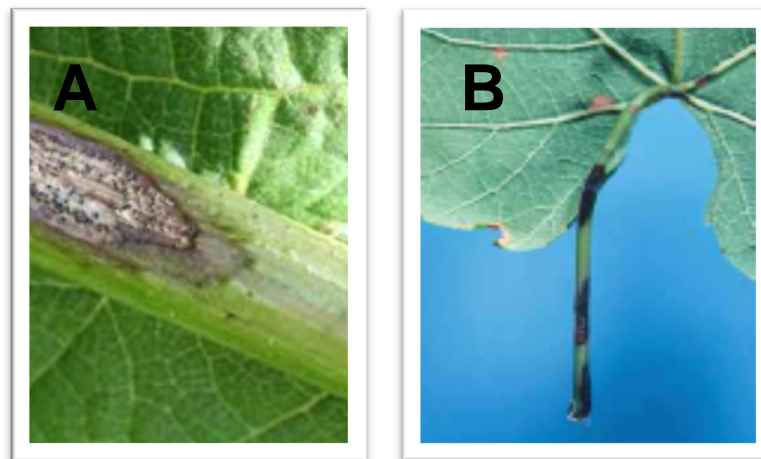


Figura 5 – Sintomas de podridão negra: A) em pânpanos com picnídios visíveis em mancha com forma alongada; B) em pecíolos (Delgado, 2010).

Apesar de todos os órgãos da planta serem suscetíveis ao fungo, a fase mais importante da doença e que causa os maiores prejuízos e perdas económica é a infeção nos cachos. Formam-se, inicialmente lesões em depressão com uma coloração característica castanho-rosada, mas rapidamente se tornam escuras com uma massa de picnídios à superfície. O fungo acaba por colonizar a totalidade do bago, que adquire um aspeto enrugado em 3 a 4 dias e mumifica (figura 6). O cacho pode ser atacado na totalidade ou exibir apenas alguns bagos infetados (Reynier, 1986; Pearson & Goheen, 1990; Rego & Oliveira, 2007; Cabral *et al.*, 2013).

O ataque aos cachos (figura 6) pode conduzir a perdas desde os 5 aos 80% da produção final da vindima (Delgado, 2010; Sofia & Neves, 2012). As perdas não são apenas de natureza quantitativa, mas também de natureza qualitativa, uma vez que também podem ter impacto na qualidade do vinho. Os bagos atacados mumificam ou apodrecem e os

vinhos resultantes perdem características organoléticas. Em prova, vinhos feitos a partir de uvas infetadas com o fungo, revelaram vários defeitos, tais como intensidade de cor, falta de frescura e reflexos ou notas de frutos estragados, em consequência da redução de antocianinas e taninos (Hoffman *et al.*, 2002; Delgado, 2010)

Os ataques precoces em folhas não causam prejuízos diretos, mas as manchas nestas constituem um reservatório para contaminações posteriores nos cachos, especialmente quanto mais estas estiverem ao nível dos cachos (Delgado, 2010; Sofia & Neves, 2012).



Figura 6 – Sintomas de podridão negra nos cachos (Delgado, 2010).

1.3.1.3 – Importância da doença em Portugal

Em Portugal, a podridão negra foi até agora considerada uma doença secundária uma vez que os seus estragos eram baixos e porque o conjunto de substâncias ativas utilizadas para o controlo do míldio e do oídio faziam também o controlo da podridão negra. Certo é que, por razões ainda desconhecidas, assiste-se a um aumento de incidência e severidade da doença em diversas regiões vitivinícolas, nomeadamente nas regiões do Dão, Bairrada e Alentejo (Sofia & Neves, 2012; Cabral, *et al.*, 2013; DGADR, 2016) sendo atualmente uma preocupação para os viticultores.

A doença é favorecida por temperatura (T) e humidade relativa (HR) elevada (T ótima 27°C, HR 90%), ou seja primavera e início de verão chuvosos, sendo este facto apontado como explicação para a ocorrência desta doença em clima mediterrâneo (Rego & Oliveira, 2007). As alterações climáticas globais e as condições meteorológicas excepcionais, que se têm vindo a verificar nos últimos anos, nomeadamente no Alentejo, podem estar na origem do ressurgimento da podridão negra, cujo agente causal tem vindo a ser considerado uma “espécie invasora” em países onde raramente ocorria (Harms *et al.*, 2005)

Em 2007, Rego & Oliveira apresentaram um estudo sobre o ressurgimento desta doença, com o objetivo de facilitar o seu diagnóstico e indicar os meios de luta mais adequados (Rego & Oliveira 2007).

Em 2009 foram emitidas pelas Estações de Avisos da Bairrada e do Dão as primeiras circulares de Avisos, com referência à podridão negra. Também em 2009 a DGADR (Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural) alertou as empresas para a crescente importância da doença, solicitando que requeressem autorizações de venda de produtos para esta finalidade (Cabral *et al.*, 2013).

Apesar de ainda não haver registos documentados, registou-se em 2011, um aumento da intensidade da doença, inclusive no Alentejo (figura 7), segundo os relatos dos técnicos de viticultura da ATEVA (Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo) e segundo testemunho de alguns produtores da região, embora a produção não tivesse sido muito afetada, uma vez que o ataque foi maioritariamente nas folhas e sarmentos e foi possível através de tratamentos fitossanitários reverter a situação.

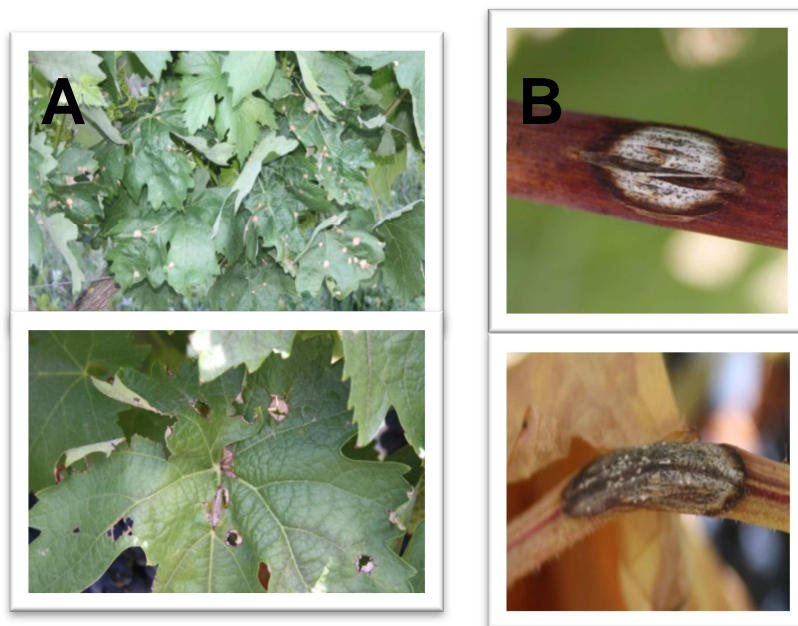


Figura 7 – Sintomas do ataque do fungo *Guignardia bidwellii* em: A – folhas; B – sarmentos com os picnídios visíveis (fotografias cedidas pelos técnicos de viticultura da Fundação Eugénio de Almeida).

1.4 – Controlo das doenças da vinha

A procura por soluções para combater pragas e doenças que afetam as plantas tem sido uma constante, desde que os agricultores, botânicos e outros cientistas se começaram a

familiarizar e a estudar as doenças, até aos dias de hoje, com a indústria agroquímica e farmacêutica a apostar na investigação para o desenvolvimento de moléculas mais eficazes no combate aos agentes patogénicos causadores de doenças.

O uso de compostos químicos foi introduzido na viticultura europeia, na altura das chamadas pragas americanas. A entrada do agente causador do míldio da videira, por volta de 1870, levou os cientistas a investigar compostos químicos com capacidade para controlar o organismo e a doença por ele causada. Foi Pierre Marie Alexis Millardet, um botânico francês, que verificou que nas vinhas pulverizadas com uma mistura, de sulfato de cobre, hidróxido de cálcio e água, também conhecida por 'Bordeaux mixture', a doença era controlada. Durante mais de 100 anos esta mistura foi utilizada em várias partes do mundo, como fungicida contra uma variedade de doenças e motivou a procura de novos compostos que pudessem ser usados com a mesma finalidade (Agrios, 2005).

Apesar de hoje, serem bem conhecidos os efeitos na saúde pública e meio ambiente do uso recorrente de pesticidas, sejam eles fungicidas, bactericidas, nematocidas, inseticidas ou herbicidas e de o seu uso ser regulamentado, estes foram, durante muito tempo usados livremente e sem qualquer restrição. Apenas na década de 50, começam a aparecer as primeiras preocupações com o uso desenfreado e descontrolado de pesticidas. A partir dos anos 60 nos EUA, foram banidos todos os pesticidas que continham mercúrio, pelo seu efeito cancerígeno. O uso de pesticidas começou a ser regulamentado e já nos anos 80, cerca de 85-90% dos pesticidas usados para o controlo de doenças nas plantas tinham sido banidos (Agrios, 2005).

Para o controlo das doenças causadas por fungos a abordagem mais usada passa pela utilização de fungicidas químicos que inibem diretamente o crescimento do patógeno e que para atenuarem a severidade da doença, necessitam de repetidas aplicações de forma a se conseguir manter a proteção das plantas.

Os efeitos negativos do uso contínuo de fungicidas químicos são bem visíveis, não só na deterioração da saúde humana e na contaminação ambiental mas também no desenvolvimento de resistências dos organismos patogénicos aos fungicidas (Heydari & Pessarakli, 2010; Schmid *et al.*, 2011). Certos fungicidas, normalmente sistémicos, têm modos de ação muito específicos e podem desenvolver resistências nos fungos aos produtos químicos, visando a sobrevivência das espécies. Geralmente dentro de uma população de fungos existem alguns indivíduos que são naturalmente resistentes e o uso contínuo de fungicidas elimina os indivíduos sensíveis à ação do produto químico e seleciona os indivíduos que efetivamente o produto não consegue eliminar. Os

sobreviventes vão dar lugar à próxima geração, onde a maior parte já tem resistência ao fungicida (Penn State Extension, 2016).

A preocupação com a toxicidade dos pesticidas origina uma pesquisa por métodos alternativos no controlo das pragas e doenças. Hoje em dia os vários métodos de controlo podem ser classificados como: i) regulamentar (legislativas), que visam excluir o agente patogénico do hospedeiro ou mesmo de uma área geográfica; ii) cultural, cujo objetivo é evitar o contacto da planta com agente patogénico através da criação de condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento do mesmo; iii) biológico, cujo objetivo passa por melhorar a resistência do hospedeiro ao ataque do patogénio ou favorecer microrganismos com ação antagonista com o patogénio e iv) os métodos físicos e químicos de controlo visam proteger a planta do inoculo do patogénio que já existe e cuja infeção no hospedeiro já está a ocorrer (Agrios, 2005).

A gestão do uso de pesticidas nas vinhas é uma preocupação e um tema constante nos debates da especialidade, como por exemplo na ‘14th International Advances in Pesticide Application conference’, que decorreu em Janeiro do presente ano em Barcelona e onde o principal tema foi a gestão integrada de pesticidas e doenças, baseada no desenvolvimento de novas tecnologias para o controlo de pesticidas, com o objetivo de promover o desenvolvimento sustentável da indústria vitivinícola. Neste campo a OIV representa um papel fundamental, com a constante preocupação em promover uma viticultura sustentável na gestão de pesticidas, entre outros fatores, dentro de um dos seus cinco eixos estratégicos do Plano Estratégico 2015-2019 (OIV, 2016).

É nesta perspetiva que o controlo biológico das doenças das plantas assume um papel muito importante. São vários os estudos desenvolvidos nos últimos anos sobre o uso de agentes biológicos no controlo de várias doenças, nomeadamente aquelas causadas por fungos (Alabouvette *et al.*, 2006).

1.4.1 – Modos de proteção da vinha: proteção integrada e agricultura biológica

É certo que a vitivinicultura é um setor de grande importância na economia, mas por outro lado a vinha é um tipo de produção responsável pelo uso de grandes quantidades de agroquímicos. Em algumas regiões a pressão de pragas e doenças da vinha ainda é

muita e faz aumentar os riscos de perdas de produção. Apesar disso têm sido dados grandes passos no sentido da redução do impacto das atividades humanas no ambiente e na própria saúde pública. O setor vitícola tem vindo a adaptar-se de igual modo às exigências quer ambientais, quer mesmo às exigências do consumidor, no que respeita ao aumento da qualidade do produto final. Os métodos de proteção fitossanitária da vinha têm vindo a evoluir nos últimos anos, com cada vez mais produtores a certificarem as vinhas em modo de produção integrada (MPI) ou em modo de produção biológico (MPB).

Segundo o manual de proteção fitossanitária para proteção integrada e agricultura biológica da vinha, estes modos têm como princípios e objetivos principais “*a obtenção de frutos são, de boas características organoléticas e de conservação, de modo a respeitar as exigências das normas nacionais e internacionais relativas à qualidade do produto, segurança alimentar e rastreabilidade, assegurando, simultaneamente, o desenvolvimento fisiológico equilibrado das plantas e a preservação do ambiente*” (Félix & Cavaco, 2009).

1.4.1.1 - Proteção integrada

A Diretiva 2009/128/CE, de 21 de Outubro, que estabelece um quadro de ação a nível comunitário para uma utilização sustentável dos produtos fitofarmacêuticos, define que a proteção integrada (PI) consiste na “*avaliação ponderada de todos os métodos de proteção das culturas disponíveis e a subsequente integração de medidas adequadas para diminuir o desenvolvimento de populações de organismos nocivos e manter a utilização dos produtos fitofarmacêuticos e outras formas de intervenção a níveis económica e ecologicamente justificáveis reduzindo ou minimizando os riscos para a saúde humana e o ambiente com a menor perturbação possível dos ecossistemas agrícolas e agro-florestais e incentiva mecanismos naturais de luta contra os inimigos das culturas*” (Oliveira *et al.*, 2014).

Deste modo, é necessário o conhecimento da cultura e dos inimigos desta, de forma a se poderem controlar eficazmente, de maneira sustentável e com os menores riscos para o Homem e o ambiente. Uma das principais características da PI nas culturas passa pela utilização racional, equilibrada e integrada de todos os meios de luta disponíveis (genéticos, culturais, biológicos, biotécnicos e químicos), com o objetivo de manter as populações de inimigos das culturas a níveis que não causem prejuízos. Devem ser preferidos os meios de luta indiretos, isto é, medidas de prevenção e que desfavorecem a

instalação do inimigo na cultura e só depois recorrer a meios de luta diretos e dentro destes usar como último recurso a luta química e apenas quando esta for reconhecidamente indispensável, utilizando os produtos fitofarmacêuticos permitidos neste modo de produção (Félix & Cavaco, 2009).

1.4.1.2 - Agricultura biológica

Em agricultura biológica a concretização dos objetivos passa pela gestão do ecossistema evitando ou excluindo a quase totalidade dos produtos químicos de síntese, nomeadamente produtos fitofarmacêuticos.

A produção biológica é definida no Reg. (CE) n°834/2007 do Conselho, de 28 de Junho, como *“um sistema global de gestão das explorações agrícolas e de produção de géneros alimentícios que combina as melhores práticas ambientais, um elevado nível de biodiversidade, a preservação dos recursos naturais, a aplicação de normas exigentes em matéria de bem-estar dos animais e método de produção em sintonia com a preferência de certos consumidores por produtos obtidos utilizando substâncias e processos naturais, desempenhando, assim, o modo de produção biológica um duplo papel social, visto que, por um lado, abastece um mercado específico que responde à procura de produtos biológicos por parte dos consumidores e, por outro, fornece bens públicos que contribuem para a proteção do ambiente e o bem-estar dos animais, bem como para o desenvolvimento rural”*.

De acordo com as orientações da agricultura biológica (AB), a proteção fitossanitária é vista de forma mais preventiva do que curativa, tentando sempre evitar ao máximo os tratamentos. Neste modo, a maioria dos produtos fitofarmacêuticos de síntese não são permitidos, devem-se utilizar produtos de origem vegetal, animal ou mineral e de impacte ambiental mínimo ou nulo e desde que estejam homologados para este fim (Félix & Cavaco, 2009).

O principal meio de proteção deve recair sobre a escolha do local, a seleção de variedades resistentes a pragas e doenças mais frequentes do local onde se instala a vinha, a gestão do coberto vegetal e a sanidade. Quando estas ferramentas culturais não são postas em prática de modo eficaz, o viticultor tende a compensar essas falhas com o uso de produtos fitossanitários.

Os benefícios da agricultura biológica na biodiversidade em geral e em particular nos microrganismos associados às plantas são ainda controversos. Os produtos

homologados para a viticultura biológica são essencialmente à base de cobre e o uso destes produtos pode ser extremamente problemático, devido à contaminação dos solos por acumulação deste, ao perigo relativo para a saúde da planta e qualidade do fruto (Schmid *et al.*, 2011).

1.5 – Fungos endofíticos

1.5.1 – Definição e ecologia

Os organismos vivos procuram condições de vida mais favoráveis à sua sobrevivência, incluído a procura por nutrientes e a proteção contra espécies predadoras, vencendo assim as dificuldades do meio ambiente e permitindo a adaptação dos organismos a este. Este fenómeno é conhecido na natureza como simbiose, onde diferentes tipos de interações simbióticas podem ser adotados, consoante os benefícios para o hospedeiro e o simbiote. A maioria dos organismos vivos tem relações simbióticas com microrganismos. Um exemplo bastante comum desta relação é o que acontece entre fungos endofíticos e plantas (Rodriguez & Redman, 2008).

O termo endofítico no sentido mais básico da palavra, refere-se somente à localização do microrganismo: endo=dentro e fítico=planta, não distinguindo um endofítico de um patogénico (Wilson, 1995; Schulz & Boyle, 2006).

Os microrganismos endofíticos encontram-se em praticamente todas as plantas estudadas e são principalmente fungos e bactérias que habitam durante todo, ou pelo menos um período do seu ciclo de vida no interior de uma planta hospedeira e que têm capacidade de ocupar e colonizar órgãos e tecidos desta, tanto inter como intracelularmente. Habitam, de um modo geral, as partes aéreas das plantas, como folhas e caules, sem lhes causar, aparentemente, nenhum dano ou sintomas visíveis e imediatos, estabelecendo uma interação simbiótica com a planta (Wilson 1995; Rodrigues & Redman, 2008; Pancher *et al.*, 2012; Torres & White, 2015;).

Podem ser transmitidos de uma geração para a outra, horizontalmente, através de esporos transportados pelo ar, ou podem ser transmitidos verticalmente, através de sementes do hospedeiro, como no caso de fungos endofíticos de gramíneas (Saikkonen, 2007; Hartley & Gange, 2009).

O tipo de relação simbiótica que se estabelece entre o fungo endofítico e a planta hospedeira é geralmente mutualista, mas também pode tornar-se parasita originando

doença na planta, assim expressam diferentes estilos de vida alternando entre mutualismo, comensalismo e parasitismo. Esta interação flexível é diretamente determinada pelas necessidades nutricionais do endófito, pelas condições ambientais, bem como por pequenas diferenças na expressão genética do fungo em resposta ao hospedeiro ou por reconhecimento do fungo por parte da planta hospedeira. Quando o equilíbrio estabelecido for perturbado, ou durante a senescência do hospedeiro, os fungos endofíticos podem tornar-se fungos patogênicos e provocar sintomas de doença na planta ou alternativamente o fungo é excluído devido a reações de defesa da planta (figura 8) (Kogel *et al.*, 2006; Schulz & Boyle, 2006; Rodriguez & Redman, 2008).

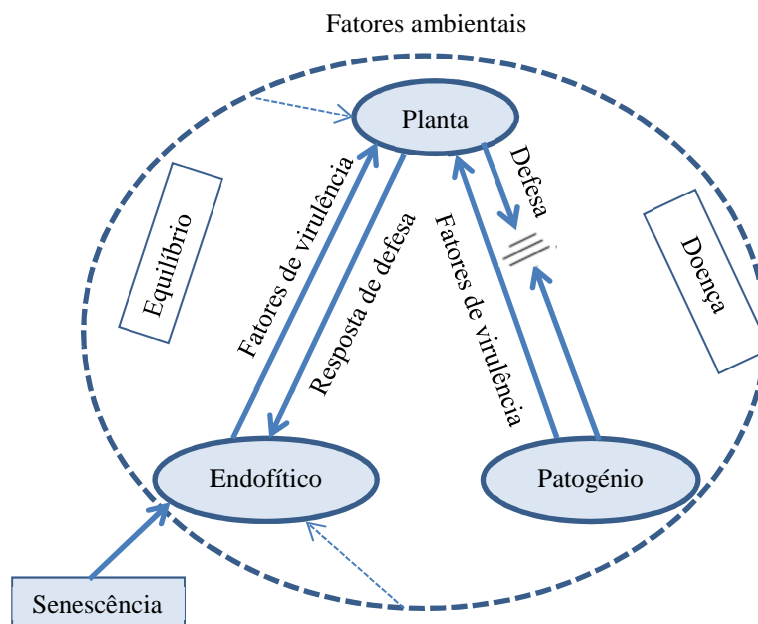


Figura 8 – Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualistas ou parasitas entre fungo endofítico e planta hospedeira. A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e a virulência do fungo resulta numa interação mutualista. Na ausência de equilíbrio a interação é parasitária ocorrendo doença (adaptado de Schulz & Boyle, 2006).

Uma vez que os fungos endofíticos podem existir quer em tecidos vegetais saudáveis ou doentes (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012), salienta-se a incerteza dos limites que separam fungos endofíticos de agentes patogênicos facultativos e/ou latentes. De facto, as diferenças nas infeções de fungos considerados endofíticos e aqueles considerados patogênicos latentes são pequenas e um endofítico, que vive no interior de uma planta

de acordo com as condições ambientais e com o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patogénio latente.

Uma das características que diferencia os fungos endofíticos dos restantes, quer sejam considerados saprófitas comensais, patogénios latentes ou mutualistas protetores, é que estes exibem um prolongado e impercetível período no qual o crescimento e colonização cessam temporariamente, retomando a sua atividade depois de alguma mudança nas condições ambientais ou no estado fisiológico do hospedeiro (Torres & White, 2012).

A interação dos fungos endofíticos com as plantas hospedeiras é um fenómeno complexo. A especificidade do microrganismo para o hospedeiro, requer uma estreita adaptação entre a planta hospedeira e o fungo, o que sugere que existe uma influência mútua, que advém de uma antiga evolução conjunta e que a longo prazo se torna permanentemente impressa na constituição genética de ambos os intervenientes, até estes desenvolverem sistemas genéticos complementares (Moricca & Ragazzi, 2008).

É importante, contudo, salientar que os fungos mutualistas, conferem ou são responsáveis pela adaptação das plantas ao stress causado, quer por fatores bióticos ou abióticos, aumentando a sua tolerância aos mesmos (González & Tello, 2011). No contexto deste trabalho, é relevante referir que muitas vezes, a tolerância ao stress causado por fatores bióticos, está relacionada com metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos, que possuem atividade antimicrobiana, isto é, os fungos endofíticos, têm a capacidade de proteger a planta hospedeira contra microrganismos fitopatogénicos (Gunatilaka, 2006). Estes também têm a capacidade de competir com os patogénios por espaço e nutrientes (Arnold *et al.*, 2003; González & Tello, 2011).

A composição de endófitos numa planta varia de acordo com a espécie vegetal e é influenciada por muitos fatores, como a variação geográfica, idade e estado fitossanitário das plantas e difere também entre os vários tecidos e órgãos de uma mesma planta hospedeira (Arnold *et al.*, 2003; Saikkonen, 2007; Moricca *et al.*, 2012).

Uma única planta pode conter várias dezenas de espécies de fungos endofíticos e uma única espécie vegetal, distribuída por uma determinada área geográfica, pode albergar centenas de espécies endofíticas (Rodriguez *et al.*, 2009).

1.5.2 – Importância dos microrganismos endofíticos e o seu potencial para uso em Proteção de Plantas

Os microrganismos endofíticos têm sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas, por parte de taxonomistas, micologistas, ecologistas, químicos e biólogos. A pesquisa atual sobre estes microrganismos tem como principal objetivo compreender melhor a sua ecologia e a sua evolução, o seu impacto sobre a composição dos ecossistemas e das plantas, assim como os seus produtos naturais únicos (Sakkonen, 2007; Aly *et al.*, 2011;).

Embora tenham sido descritos pela primeira vez no século XIX, começaram a ser estudados mais detalhadamente a partir dos anos 80, quando se percebeu a sua importância na proteção das plantas contra agentes fitopatogénicos, assim como a crescente evidência de que eles podem desempenhar um papel vital na saúde da planta, crescimento e fisiologia (Azevedo *et al.*, 2000).

Apesar de terem sido inicialmente descritos como assintomáticos e muitos dos endófitos isolados até ao momento não terem efeitos conhecidos nos hospedeiros, são vários os que já demonstraram ter uma função bem determinada nas plantas. Os fungos endofíticos podem aumentar o crescimento, reprodução e tolerância a fitopatogénios, herbívoros, insetos, assim como ao stress provocado por fatores abióticos (Saikkonen *et al.*, 2004). Atualmente sabe-se que podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos outros produtos de potencial interesse biotecnológico (Alabouvette *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010).

O potencial dos microrganismos endofíticos como fonte de metabolitos bioativos com possíveis aplicações na medicina e na agricultura tem suscitado muito interesse e originado muitos estudos sobre estes organismos e sobre o seu uso, no controlo biológico das doenças das plantas como alternativa aos pesticidas químicos (Aly *et al.*, 2011).

O controlo biológico consiste na inibição do crescimento, infeção e reprodução de um organismo, por outro e resulta de diferentes tipos de interação entre os organismos que partilham o mesmo espaço ecológico (Martínez *et al.*, 2015). As interações podem ser do tipo parasitismo ou micoparasitismo, no qual o agente patogénico é diretamente atacado por um “biocontrol agent” (BCA) específico, como exemplo a atividade parasitária do *Trichoderma* spp., um fungo antagonista que produz uma variedade de enzimas direcionadas para a degradação das paredes celulares dos agentes patogénicos (Alabouvette *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010); antibiose é um tipo de

antagonismo resultante da produção de metabolitos secundários por microrganismos que são tóxicos para outros microrganismos. A antibiose é um fenómeno muito comum e responsável pela atividade de muitos BCA, tais como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., e *Trichoderma* spp. Os tipos de metabolitos secundários produzidos e descritos como inibidores do crescimento de patogénios são antibióticos, bactericidas, enzimas com capacidade de degradar a parede celular e compostos voláteis com atividade antifúngica (Alabouvette *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010; Aly *et al.*, 2011); competição por nutrientes é um fenómeno que regula a dinâmica da população de microrganismos que partilham o mesmo espaço ecológico e que têm as mesmas necessidades fisiológicas, quando existe escassez de recursos. Apesar de ser difícil de demonstrar rigorosamente, a competição por nutrientes é um dos modos de ação dos BCA. Tem sido demonstrado que os microrganismos não patogénios associados a plantas, conseguem protegê-las por rápida colonização, esgotando, deste modo os substratos que ficam indisponíveis para o crescimento dos agentes patogénios (Alabouvette *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010).

Os estudos sobre os fungos endofíticos mostram que estes têm capacidade de produzir uma grande diversidade de metabolitos secundários com potencial aplicação em várias áreas. São capazes de produzir um número de metabolitos secundários importantes, conhecidos como produtos naturais das plantas, o que possibilita o uso alternativo destes como fonte desses metabolitos (Gunatilaka, 2006). Ao mesmo tempo, o facto de os microrganismos terem a capacidade de produzir os mesmos compostos que as plantas hospedeiras pode contribuir para o aumento das defesas desta contra patogénios. São também capazes de produzir metabolitos secundários diferentes dos produzidos pelas plantas hospedeiras e que têm igualmente interesses de aplicação na medicina e agricultura. Estudos realizados entre 2008 e 2009, sobre fungos endofíticos permitiram a identificação de mais de 100 novos produtos naturais (Aly *et al.*, 2011).

É possível encontrar na literatura vários trabalhos dedicados ao uso de microrganismos endofíticos para controlo biológico de agentes patogénios em diversas culturas. Rahmansyah & Rahmansyah (2013) publicaram um estudo sobre a aplicação de fungos endofíticos isolados de plantas de mangal como antagonistas de fungos causadores de fusariose verificando que 32% dos fungos isolados apresentavam atividade antagonista contra estes patogénios. Mais recentemente, Landum *et al.*, (2016) investigaram a atividade antagonista de fungos endofíticos isolados de oliveira, contra um dos agentes causais da antracnose, o fungo *Colletotrichum acutatum*. Neste estudo, alguns dos

fungos endofíticos isolados mostraram entre 60 a 80% de inibição do crescimento do fungo patogénico. Também Larran *et al.* (2016) publicaram um estudo recente sobre endófitos isolados do trigo, como possíveis controladores biológicos do fungo patogénico *Pyrenophora tritici-repentis* e constataram que a maior parte dos microrganismos isolados tinham atividade antagonista contra o agente causal da doença. A videira é uma das culturas onde a aplicação de produtos fitossanitários é extensivamente usada, quer pela pressão exercida pela ocorrência de pragas e doenças, quer pelo receio de muitos viticultores de perderem produção caso não protejam devidamente a cultura. Nesta perspetiva, têm sido desenvolvidos vários estudos sobre os microrganismos endofíticos da videira, quer investigando a diversidade e ecologia destes, quer o seu potencial uso no controlo biológico de doenças.

González & Tello, publicaram um estudo em 2011, sobre a diversidade de fungos endofíticos associados a várias castas de *Vitis vinifera*, com diferentes modos culturais, com o objetivo de identificarem novos agentes de controlo biológico para diversas doenças da vinha. Os autores revelam que alguns dos fungos por eles isolados já tinham sido identificados anteriormente como potenciais agentes de controlo biológico (González & Tello, 2011).

O estudo realizado por Núñez-Trujillo *et al.*, (2012) em videiras de variedades diferentes, cultivadas em Espanha e em Portugal, sobre a diversidade de fungos endofíticos associados a esta cultura, permitiu identificar vários fungos anteriormente descritos como possíveis agentes de controlo biológico, contra patogénicos. Os autores constataram, nos testes *in vitro*, que alguns dos endófitos isolados apresentavam algum tipo de antagonismo contra *Botrytis cinerea*, uns deles por inibição na zona de interação entre os dois fungos, outro por competição de espaço e nutrientes.

Musetti *et al.*, (2006) verificaram que o fungo endofítico *Alternaria alternata* tinha a capacidade de inibir por completo o patogénio *Plasmopara viticola* em folhas de videira infetadas. Uma vez que nos testes de antagonismo realizados, os investigadores observaram que nunca houve contato direto entre os dois fungos, colocaram a hipótese de que a inibição do crescimento de *P. viticola* era baseada na produção de compostos tóxicos por parte do fungo *A. alternata*, com efeito antagonista.

Aldrich *et al.* (2015) investigaram a razão pela qual plantas da mesma área de vinha apresentavam tolerâncias diferentes à infeção da *Xylella fastidiosa*, o agente causal da doença de Pierce na videira. Demonstraram que esta resistência “não genética” pode estar associada ao fungo isolado das plantas e identificado como *Cochliobolus* sp. que

apresentou nos testes *in vitro* capacidade antagonista contra *X. fastidiosa* por produção de um metabolito naturalmente isolado de vários fungos, que tem atividade antibacteriana e fitotóxica.



2 – OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consiste no estudo de fungos endofíticos presentes em folhas de videiras de algumas variedades mais importantes cultivadas na região do Alentejo, sem sintomas de podridão negra. Pretende-se isolar e identificar os fungos presentes em plantas cultivadas no modo de proteção integrada e em modo biológico, de forma a averiguar diferenças na biodiversidade dos fungos endofíticos. Os fungos obtidos serão testados, *in vitro*, individualmente, de forma a avaliar o seu potencial antagonista contra o agente causal da podridão negra, *Guignardia bidwellii*. Pretende-se ainda avaliar, quando existente, o tipo de antagonismo, se por antagonismo direto ou por produção de metabolitos secundários, nomeadamente compostos voláteis.



3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Material vegetal

As amostras de folhas de videira utilizadas neste estudo foram retiradas das vinhas da Fundação Eugénio de Almeida, um dos maiores produtores de vinho do Alentejo, com uma área de plantação de vinha de aproximadamente 400 ha, situada em Évora. A geografia do território é bastante uniforme com a planície a dominar e com altitudes entre os 150 e 400 metros acima do nível do mar. O clima é mediterrânico, com médias anuais de precipitação de 600 mm e temperatura média de 15°C.

As amostras foram recolhidas em outubro de 2014 de 8 vinhas (figura 9), onde 4 seguem o modo de tratamento biológico e as outras 4 vinhas o modo de proteção integrada. As vinhas têm idades compreendidas entre 10 e 13 anos e o tipo de solos varia entre o argilo-arenoso e franco-arenoso.

De cada modo de tratamento foram escolhidas 4 castas de uva para vinho: Aragonês, Cabernet Sauvignon, Alicante Bouschest e Syrah e dentro de cada casta selecionaram-se aleatoriamente 10 plantas e de cada uma retiraram-se 3 folhas verdes, sem sintomas e com aspeto normal para a casta, também de forma aleatória. As folhas foram transportadas para o laboratório num recipiente refrigerado, guardadas a 4°C e processadas nas 48 horas seguintes.

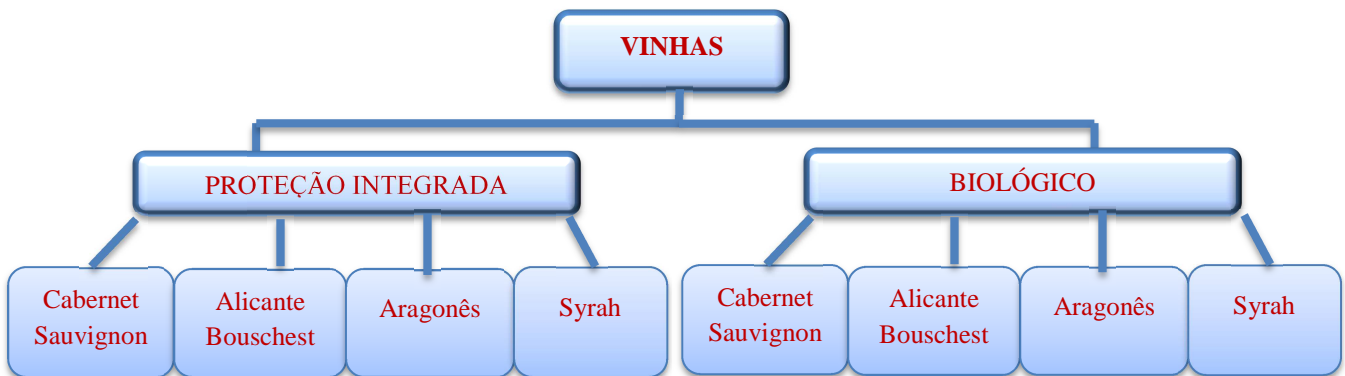


Figura 9 – Esquema do processo de amostragem de folhas de videira.

Os fungicidas usados nos tratamentos fitossanitários nas vinhas em modo de proteção integrada têm como substâncias ativas trifloxistrobina, folpete, fosetil-alumínio, iprovalicarbe, espiroxamina, benalaxil, fluopirame, penconazol, tebuconazol e oxiclreto de cobre. Nas vinhas em modo de produção biológico, os fungicidas usadas têm na sua base substâncias ativas de hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre, óxido cuproso e enxofre.

3.2 – Isolamento do fungo fitopatogénico *Guignardia bidwellii*

As operações de manuseamento de todos os fungos usados neste trabalho decorreram em câmara de fluxo laminar equipada com lâmpada de ultravioletas e com um bico de Bunsen, de forma a diminuir o risco de contaminações dos microrganismos em estudo. O material de vidro, plástico e os meios de cultura utilizados foram sujeitos a esterilização em Autoclave (Uniclave 88 A.J. Costa), à temperatura de 120°C, durante 20 min.

O fungo *Guignardia bidwellii*, pertencente à coleção de fungos fitopatogénicos do Laboratório de Micologia, Universidade de Évora/Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM), foi repicado em placas de Petri (60 mm), com meio de cultura ‘Potato Dextrose Agar’ (PDA), (Himedia) na proporção de 39 g em 1L de água destilada, para posterior utilização durante o decorrer do trabalho.

O período de incubação e crescimento do fungo foi de 7 dias, a 25±3°C. Após este tempo e depois de verificada a inexistência de contaminações, os isolados em cultura pura de *G. bidwellii*, foram mantidos à temperatura de 4°C, até à sua utilização.

3.3 – Isolamento dos fungos endofíticos

Para a pesquisa de fungos endofíticos, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços de cerca de 1 cm² e sujeitas a um tratamento de desinfeção superficial com a imersão das folhas numa solução de etanol a 96% (v/v), durante dois minutos, seguida de uma lavagem com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v) durante três minutos e repetindo novamente uma lavagem com a solução de etanol a 70% (v/v) por um minuto. Após esta desinfeção as folhas foram lavadas com água destilada esterilizada durante um minuto, tendo este passo sido repetido por três vezes, de modo a remover todos os resíduos de desinfetante.

As folhas tratadas e desinfetadas foram colocadas em placas de Petri (90 mm) contendo o meio de cultura PDA, preparado como descrito em 3.2. Cada placa foi marcada com a identificação da vinha, o modo de produção e a casta de onde foram retiradas as folhas. As placas foram incubadas a 25±3°C, por um período de 7 dias. Após este período os diferentes crescimentos miceliais obtidos foram repicados para placas de Petri individuais, contendo meio de cultura PDA, a partir das quais foram isolados por repicagens sucessivas até à obtenção de culturas puras.

Do total de fungos isolados obtidos de cada casta e de cada modo de tratamento foram selecionados apenas 2 fungos por casta, tendo como base diferenças visuais, dando origem ao total de 16 fungos endofíticos isolados e utilizados para este estudo (figura 10).

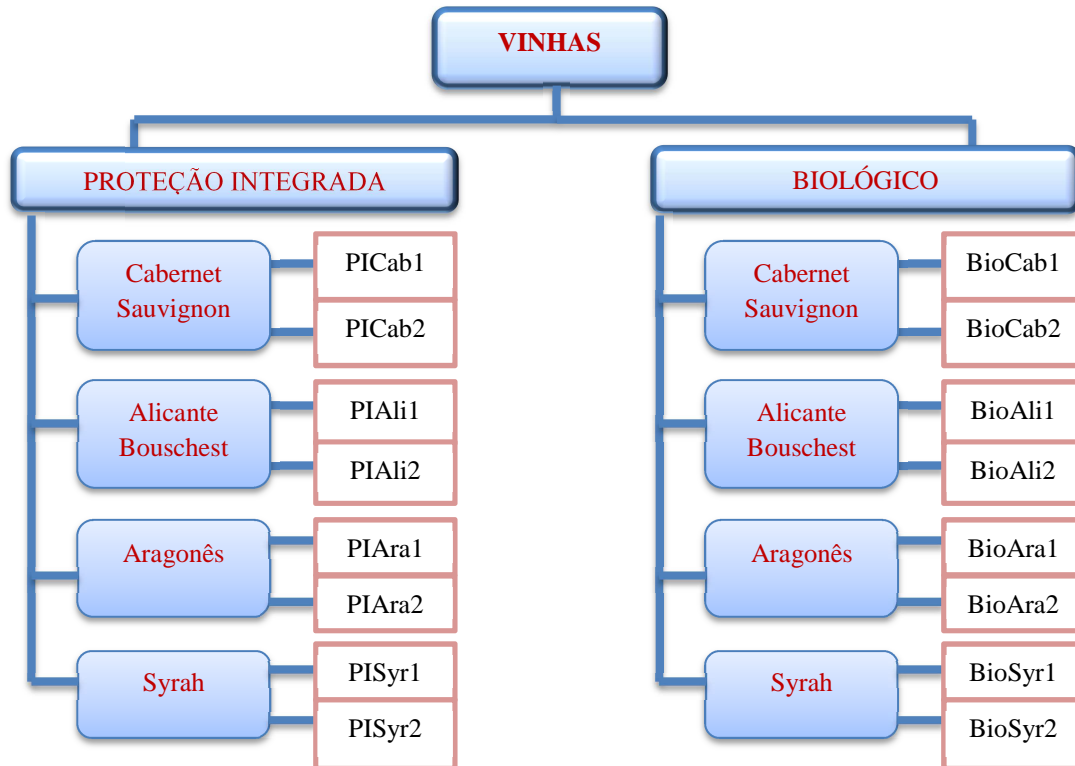


Figura 10 – Esquema do processo de amostragem de folhas de videira com o número de isolados escolhidos por cada casta.

3.4 – Identificação molecular dos fungos endofíticos

Para a identificação molecular dos fungos endofíticos isolados, extraiu-se o DNA, a partir das estruturas que cresceram em cultura pura. O micélio do fungo foi retirado com a ajuda de uma espátula esterilizada para um almofariz, onde foi macerado em presença de azoto líquido, de forma a congelar a amostra e facilitar a maceração e rompimento das paredes celulares. A amostra foi depois transferida para um microtubo e a extração do DNA foi feita com ‘DNeasy Plant Mini Kit’ (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado num espectrofotómetro NanoDrop ND-1.000. Todo o DNA obtido dos isolados foi ajustado para uma concentração final de 10ng/μL. Depois de extraído o DNA, a região ITS (‘Internal transcribed spacer’) (figura 11) foi amplificada por PCR (‘Polimerase Chain Reaction’) a partir do DNA genómico usando

os ‘primers’ ITS1 (5’TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’) e ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’) (White et al., 1990).



Figura 11 - Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos ‘primers’ ITS1 e ITS4.

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25µl, contendo 2,5 µl de PVP (polivinilpirrolidona, 40.000) (Sigma), 0,4 µM de cada um dos ‘primers’, 1mM de dNTPs (Thermo Fischer Scientific), 2,5 µl de tampão ‘Dream Taq’ suplementado com 30mM MgCl₂, 1,25 U de Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific) e 10 ng de DNA genômico do fungo.

As reações de PCR foram realizadas num termociclador MyCycler (Bio-Rad), nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg., ‘annealing’ dos ‘primers’ a 55°C por 30 seg., e extensão a 72°C por 30 seg., a extensão final decorreu a 72°C durante 7 min.. Uma vez que com as condições descritas não foi possível a amplificação da região ITS do DNA para alguns dos fungos, procedeu-se à otimização do PCR, variando as temperaturas de ‘annealing’ (50°C a 55°C) e selecionando a temperatura de ‘annealing’ dos ‘primers’ para 50°C, mantendo-se todo o anterior programa.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (1X: 0,04M Tris-acetato; 100ml 0,5M EDTA, pH8,0), com uma voltagem constante de 80V, durante 1 hora. Como referência foi utilizado o marcador 100bp ‘DNA Ladder’ (Fischer).

Os produtos de PCR obtidos foram purificados, utilizando o Kit GFX Gel DNA Purification Kit (GE Healthcare Biosciences) seguindo-se as indicações do fabricante. Os produtos purificados foram analisados em gel de agarose, como descrito anteriormente e quantificados, tendo sido posteriormente enviados para sequenciação na empresa MacroGen-Europa (Holanda). A análise das sequências ITS foi feita com o programa ‘BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3 (Hall, 1999). A procura de sequências homólogas foi feita com recurso à base de dados ‘Basic Local Alignment Search Tools’ (BLAST) do ‘National Center for Biotechnology Information (NCBI). As

sequências resultantes destes produtos de amplificação foram determinadas em ambas as direções. Sempre que possível as sequências foram identificadas até à espécie, com um grau de semelhança de 98%.

Para a análise filogenética foi utilizado o programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) com o método Neighbour-Joining com um suporte de ‘bootstraps’ de 1000 replicações.

3.5 – Testes de antagonismo

3.5.1 - Teste de antagonismo direto

A capacidade antagonista dos fungos isolados contra a *G. bidwellii* foi testada com o método de oposição direta descrito por Dennis e Webster (1971). Numa placa de Petri (90 mm) contendo meio de cultura PDA colocou-se um disco de cerca de 5 mm de micélio do fungo *G. bidwellii* em crescimento ativo, a cerca de 1 cm da parede da placa e no lado oposto colocou-se um disco de tamanho idêntico do fungo endofítico (figura 12). Para cada um dos 16 fungos testados foram feitas três réplicas. Os fungos foram incubados a 25±3°C. Paralelamente prepararam-se, também, três réplicas apenas com o fungo patogénico, a cerca de 1cm da parede da placa de Petri (90 mm), de forma a ser usado como controlo do teste de antagonismo direto.

A percentagem de inibição de crescimento do fungo patogénico por cada um dos fungos endofíticos isolados, foi estimada a partir da medição, com uma régua, do raio de crescimento (medição desde o ponto onde se colocou o disco com o micélio até à extremidade do crescimento da cultura), de *G. bidwellii* nas placas de Petri na presença de cada um dos fungos testados em oposição direta desta. Mediu-se, também o raio de crescimento da *G. bidwellii* nas placas de controlo. Todas as medições foram feitas consecutivamente nos primeiros 7 dias e a partir daí no 10º, 12º e 15º dias.

A percentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula de Royse & Ries (1977):

$$I = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100$$

I: Percentagem de inibição

R1: raio da colónia de fungo na placa de controlo

R2: raio da colónia de fungo na placa de teste

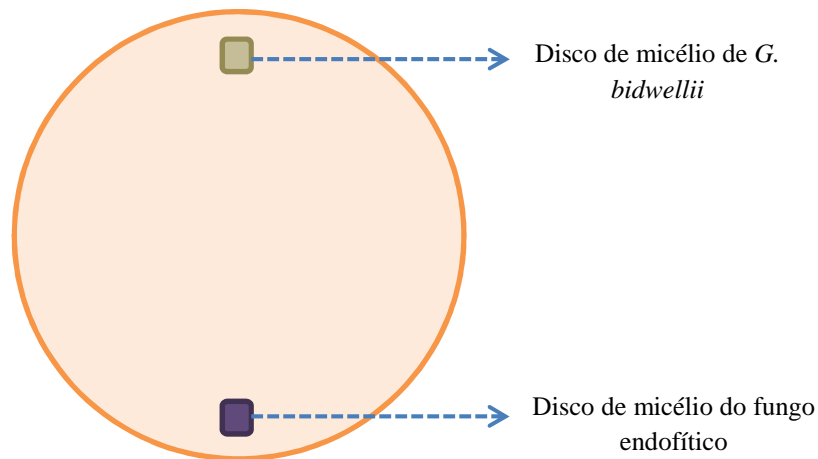


Figura 12 - Esquema representativo do teste de antagonismo direto.

O tipo de interação entre cada um dos fungos endofíticos e *G. bidwellii* foi estabelecido utilizando uma escala de A a D (Dharmaputra, 2003; Demirci *et al.*, 2012; Landum *et al.*, 2016). Os autores descrevem que o tipo de interação A ocorre quando há inibição do crescimento do fungo patogénico por contacto com o fungo antagonista. O tipo de interação B ocorre quando há sobreposição mútua do fungo patogénico e do fungo antagonista e onde ambos crescem lentamente, mas a diferentes velocidades. Classifica-se como interação do tipo C quando existe inibição mútua de crescimento dos dois fungos, com as hifas de crescimento separadas por uma distância $<0,2$ cm. Por sua vez na interação do tipo D existe o mesmo tipo de inibição mútua, contudo as hifas de crescimento estão separadas por uma distância $>0,2$ cm.

3.5.2 - Teste dos compostos voláteis

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar se a possível produção de compostos voláteis pelos fungos endofíticos tem influência no crescimento da *G. bidwellii*.

Para a realização do teste os fungos isolados foram incubados em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura PDA durante 5 dias (adaptado de Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Landum *et al.*, 2016). O fungo patogénico em estudo foi colocado a crescer em placas de Petri (60 mm) com meio de cultura PDA durante 2 dias. As placas foram mantidas a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

No fim dos períodos de tempo referidos, as placas pequenas contendo o fungo fitopatogénico foram colocadas, invertidas, no topo de cada uma das placas contendo cada um dos fungos isolados. As placas foram de seguida seladas com parafilme, para evitar

a difusão dos compostos voláteis e possíveis contaminações (figura 13). Foram também preparadas placas de Petri de 60 mm com *G. bidwellii*, que foram colocadas invertidas em placas de Petri (90 mm) contendo apenas meio de cultura PDA para controlo. Foram usadas três réplicas para cada fungo, assim como para o controlo.

As medições do raio de crescimento do patogénio foram feitas no dia 0 (imediatamente antes de inverter as placas de Petri com *G. bidwellii* no topo das placas de Petri contendo cada um dos fungos isolados), ao fim de 5 dias de incubação à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e ao fim de 10 dias. A percentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula descrita anteriormente.

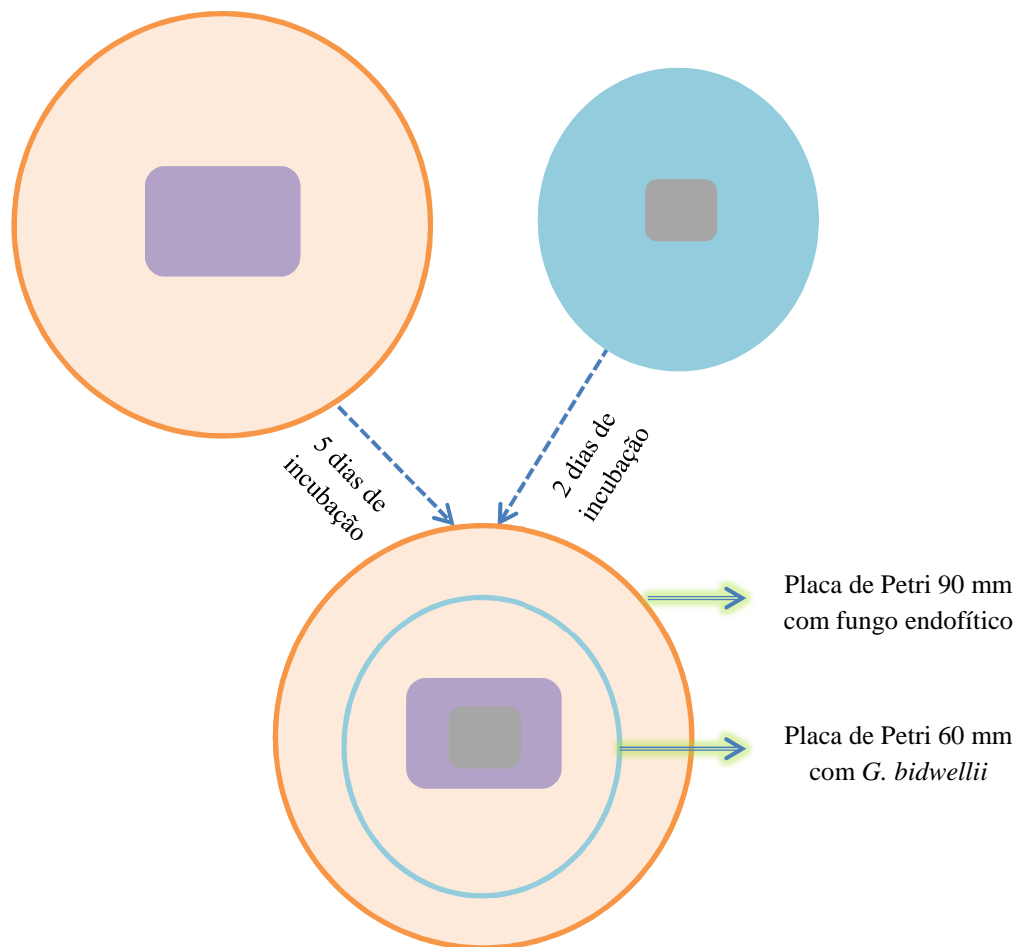


Figura 13 - Esquema representativo do teste de inibição por emissão de compostos voláteis.

3.5.3 - Teste dos compostos não voláteis

A atividade antagonista dos fungos isolados com o fungo patogénico foi, também, avaliada pelo teste dos compostos não voláteis, ou seja, avaliou-se a produção de metabolitos não voláteis por parte dos fungos endofíticos e se estes poderiam ter influência no crescimento de *G. bidwellii*.

O teste consistiu em colocar num erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de meio de cultura líquido, 'potato dextrose broth' (PDB), (Fluka), (24g em 1L de água destilada), um disco com cerca de 5 mm de diâmetro de micélio do fungo endofítico, retirado da margem da placa de Petri com PDA, zona onde o fungo cresce mais ativamente (adaptado de Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Landum *et al.*, 2016). Os erlenmeyers, devidamente identificados, com cada um dos fungos isolados, foram colocados numa incubadora, com agitação constante (150 rpm), à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 12 dias (figura 14). No fim deste período, as soluções foram centrifugadas a 10 000 g, durante 10 min e o sobrenadante filtrado com papel de filtro de 150 mm (Whatman), de forma a remover esporos e micélio dos fungos.



Figura 14 - Teste dos compostos não voláteis: A – crescimento dos fungos isolados em meio de cultura PDB; B – crescimento de um fungo depois do período de involução de 12 dias.

O segundo passo do procedimento deste teste passou por incubar em placas de Petri (90 mm) com meio de cultura PDA, durante 2 dias o fungo *G. bidwellii*, à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. No final destes dias, foram feitos, diretamente no meio de cultura, quatro orifícios circulares com cerca de 1 cm, diametralmente opostos e o mais próximo das paredes da placa possível. Um dos orifícios foi preenchido com 75 μL de PDB, utilizado como controlo negativo, enquanto cada um dos outros foi preenchido com o volume de 75 μL , 100 μL e 200 μL da solução filtrada do fungo endofítico como descrito anteriormente (figura 15). Para cada um dos fungos isolados foram feitas três réplicas. Em simultâneo preparou-se, também uma placa de Petri de 90 mm, com *G. bidwellii* com crescimento de 2 dias e onde se colocou em todos os orifícios meio de cultura líquido PDB. Esta placa serviu como controlo negativo do teste.

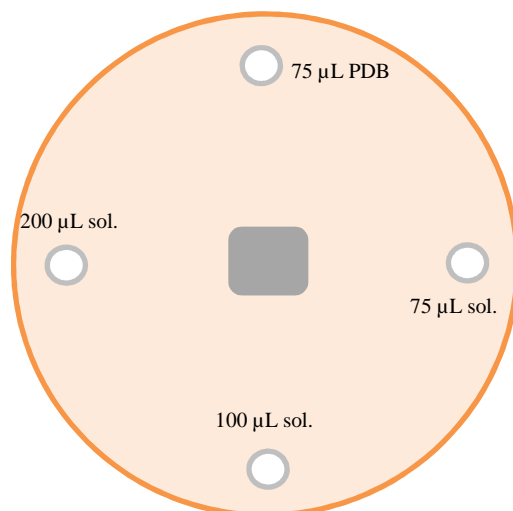


Figura 15 – Esquema representativo do teste dos compostos não voláteis.

As medições do raio de crescimento da *G. bidwellii* foram feitas ao fim dos 2 dias de crescimento desta em placa com PDA imediatamente antes de se adicionar a solução do fungo endofítico (considerado o dia 0 do teste dos compostos não voláteis) e ao fim de 5 dias de incubação.

3.6 – Extração e análise cromatográfica dos compostos voláteis

Os fungos endofíticos foram colocados a crescer em meio de cultura líquido PDB como descrito anteriormente (capítulo 3.5.3) e os metabolitos voláteis foram extraídos do meio filtrado através da técnica de HS-SPME (headspace solid-phase microextraction), com uma fibra de SPME revestida com os materiais divinilbenzeno/ carbonex/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 1 cm) (Supelco). Para a libertação dos compostos voláteis o forno programado a 40°C, e a fibra de SPME foi exposta durante 45 minutos para a adsorção dos compostos no 'headspace'.

As análises de GC-MS foram realizadas num equipamento Bruker Scion TQ 456 equipado com injetor com e sem repartição (split-splitless), uma 1ª coluna analítica ZB-Wax Plus (30 m x 0.25 mm i.d x 0.25 µm de espessura, Zebron), uma 2ª coluna ZB-5 (30 m x 0.25 mm i.d x 0.25 µm de espessura, Zebron) e acoplado a um espectrómetro de massa triplo quadrupolo. A injeção foi efetuada em modo automático, com o injetor programado para uma temperatura de 250°C, em modo split (1:50, 1min; 1:10, 3min). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial de 40°C

durante 1 minuto, aquecimento a 5°C/min. até 240°C e mantida esta temperatura durante 5 minutos. O tempo total da análise foi de 22 minutos.

A detecção foi realizada por espectrometria de massa no modo de varrimento contínuo, com ionização por impacto eletrônico (EI), a uma energia de 70V e a fonte de ionização mantida a 220°C. O intervalo de aquisição de massas foi de 40 a 450 m/z.

Os picos obtidos no cromatograma de cada amostra foram identificados por comparação do seu espectro de massa com as bases de dados NIST MS Search 2.0 e Wiley 7.

3.7 – Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi realizada sobre as diferenças entre os fungos antagonistas em cada período de cada teste de antagonismo, utilizando o programa IBM SPSS v.20. As comparações múltiplas foram feitas usando o teste Tukey HSD. Foram consideradas diferenças estatísticas entre os conjuntos de dados $p < 0,05$.



4 – RESULTADOS

4.1 – Isolamento e identificação de fungos

Os fungos endofíticos foram isolados de folhas de videira no início do outono, após o período de vindima, ou seja quando a planta está no final do ciclo vegetativo, mas ainda não entrou no período de dormência e mantém as folhas verdes com a finalidade de se obter o maior número de fungos isolados. Apesar de ser possível isolar fungos endofíticos de várias partes da planta, optou-se por escolher as folhas como amostra, uma vez que estas albergam um maior número e diversidade de fungos endofíticos (González & Tello, 2011).

Neste estudo foram isolados 16 fungos endofíticos, 8 dos quais provenientes de plantas em modo de proteção integrada e os outros 8 provenientes de plantas mantidas em modo biológico. Dos 8 fungos isolados a partir de plantas sujeitas a cada um dos modos de produção, 2 foram isolados de plantas da casta Cabernet Sauvignon, 2 de Alicante Bouschet, 2 de Aragonês e 2 de Syrah (tabela 4). Esta seleção foi feita com base nas características visuais dos fungos, tentando-se selecionar isolados com características diferentes (figura 16A). O fungo patogénico *G. bidwellii* cresceu em placa de Petri com meio PDA, com as características típicas do crescimento da espécie neste meio de cultura (figura 16B).

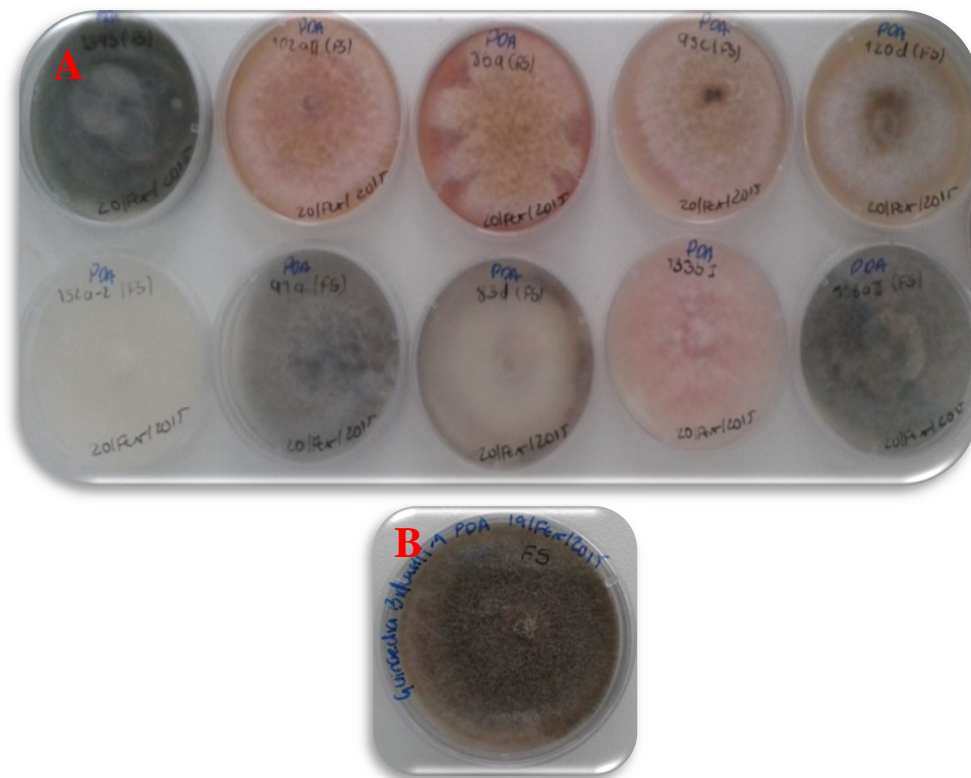


Figura 16 - A: Fungos endofíticos isolados de folhas de videira; B – Placa de Petri com *G. bidwellii*.

O DNA de cada um dos isolados, foi extraído e quantificado, tendo-se obtido valores variando entre 30ng/μL e 104ng/μL. Todo o DNA obtido dos isolados foi ajustado para uma concentração final de 10ng/μL.

Os 16 isolados em estudo, após amplificação pela técnica de ITS-PCR, originaram produtos com tamanhos variando entre 600pb e 900pb (figura 17).

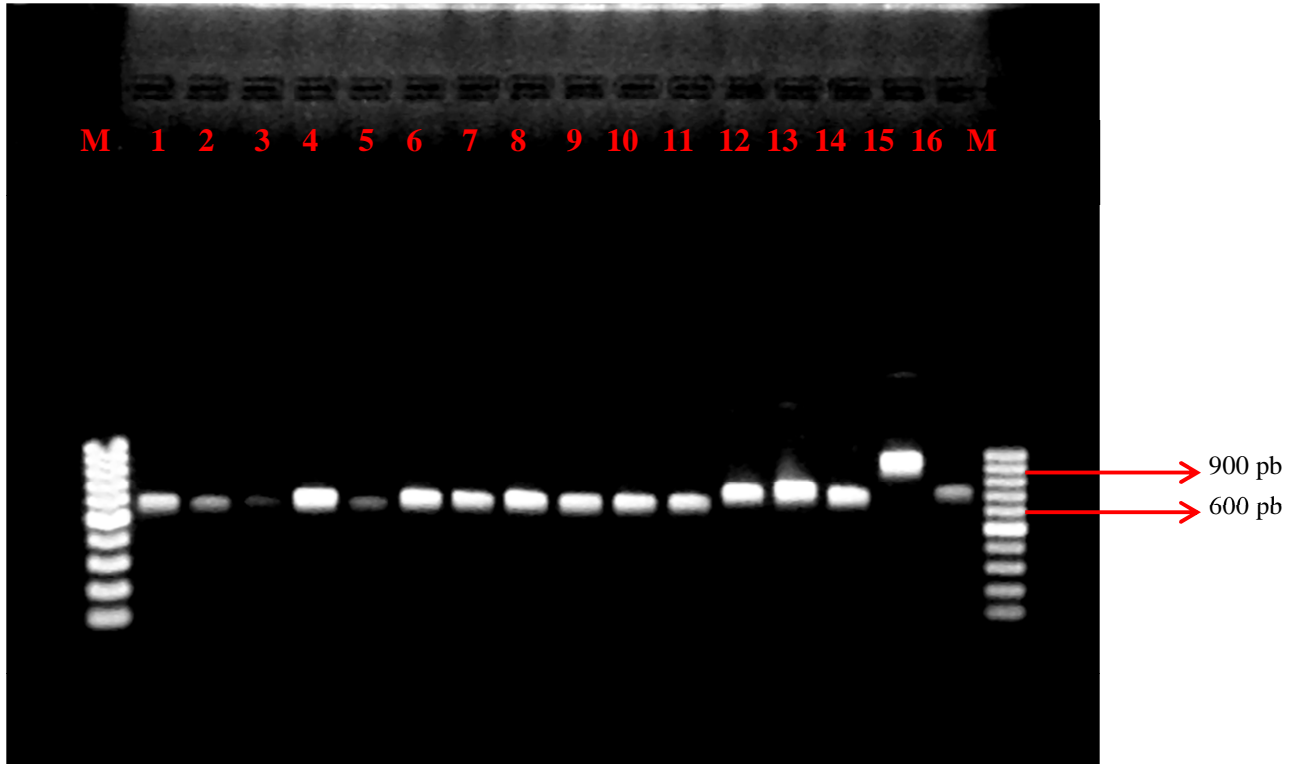


Figura 17 - Produtos obtidos após purificação dos produtos ITS-PCR, utilizando DNA extraído de fungos crescidos em placa contendo PDA, em gel de agarose a 1%. Os tamanhos de algumas das bandas estão indicados à direita. M- marcador 100bp 'DNA Ladder' (Fischer); 1 – *Botrytis cinerea* 2; 2 – *Epicoccum nigrum* 5; 3 – *Alternaria carthami*; 4 – *E. nigrum* 1; 5 – *E. nigrum* 3; 6 – *Epicoccum* sp. 1; 7 – *Epicoccum* sp. 2; 8 – *E. nigrum* 4; 9 – *Phoma exigua*; 10 – *Botrytis cinerea* 1; 11 – *Gibberella pulicaris*; 12 – *Alternaria* sp. 2; 13 – *Alternaria tenuissima*; 14 – *E. nigrum* 2; 15 – *Athelia bombacina*; 16 – *Alternaria* sp. 2.

Os 16 fungos identificados com base na sequência obtida da região ITS incluem 2 isolados pertencentes a *Alternaria* sp., 1 isolado pertencente a *Athelia bombacina*, 1 isolado de *Alternaria carthami*, 5 isolados de *Epicoccum nigrum*, 1 isolado de *Alternaria tenuissima*, 2 isolados de *Epicoccum* sp., 1 isolado de *Phoma exigua*, 2 isolados de *Botrytis cinerea* e 1 isolado de *Gibberella pulicaris* (tabela 4).

Tabela 4 - Identificação de cada um dos fungos endofíticos isolados com correspondência à casta e ao modo de produção da vinha.

Tipo de tratamento	Casta	Fungo
Proteção Integrada	Cabernet Sauvignon	<i>Alternaria</i> sp.1
		<i>Athelia bombacina</i>
	Alicante Bouschet	<i>Alternaria carthami</i>
		<i>Epicoccum nigrum</i> 1
	Aragonês	<i>Alternaria tenuissima</i>
		<i>Epicoccum nigrum</i> 2
	Syrah	<i>Epicoccum nigrum</i> 3
		<i>Epicoccum</i> sp. 1
Biológico	Cabernet Sauvignon	<i>Phoma exigua</i>
		<i>Botrytis cinerea</i> 1
	Alicante Bouschet	<i>Epicoccum nigrum</i> 4
		<i>Epicoccum</i> sp. 2
	Aragonês	<i>Alternaria</i> sp. 2
		<i>Gibberella pulicaris</i>
	Syrah	<i>Botrytis cinerea</i> 2
		<i>Epicoccum nigrum</i> 5

Neste estudo nem sempre foi possível a identificação dos isolados ao nível da espécie e alguns foram apenas identificados ao nível de género pelo que se optou por usar o termo OTU ('operational taxonomic unit' – unidade taxonómica operacional) para os diferenciar taxonomicamente. Como se pode constatar, os 16 fungos isolados pertencem a 9 diferentes OTUs representando 6 géneros diferentes (figura 18). O género obtido com mais frequência (44%) foi *Epicoccum*, com 7 dos 16 isolados a pertencerem a este género, logo seguido pelo género *Alternaria*, género a que pertencem 4 (25%) dos fungos endofíticos isolados. A espécie obtida com mais frequência foi *Epicoccum nigrum*, representando 5 dos 16 isolados (figura 18).

O alinhamento de todas as sequências (Anexo I) mostrou várias zonas conservadas entre os diferentes fungos, sendo o fungo *Athelia bombacina* o que revelou mais diferenças em relação aos restantes, como seria de esperar, uma vez que é o único fungo da Divisão Basidiomycota, pertencendo os restantes fungos à Divisão Ascomycota.

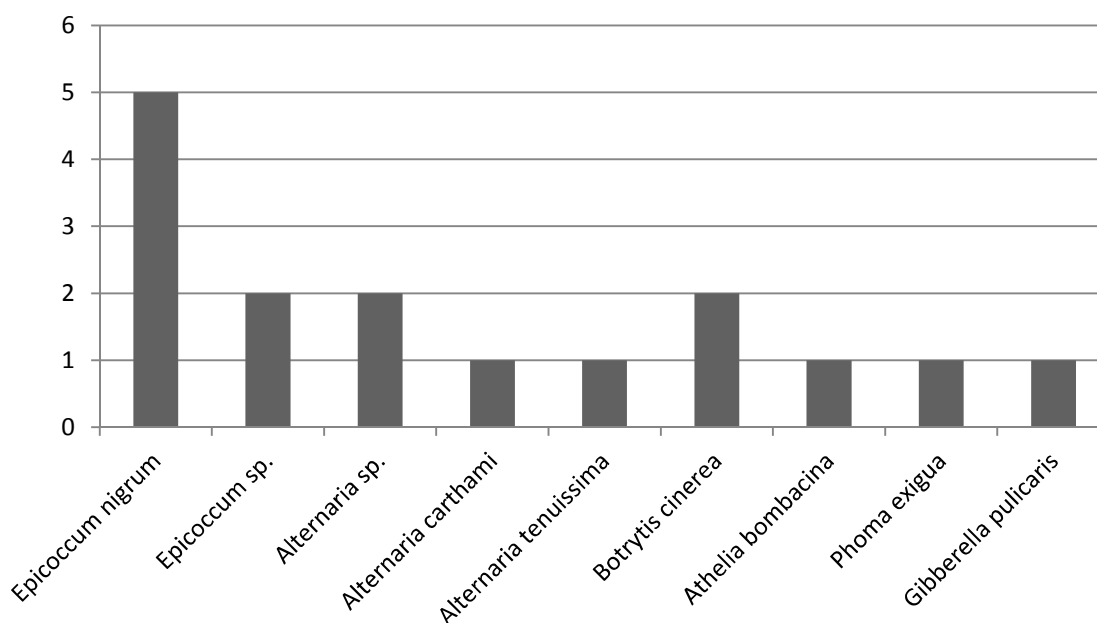


Figura 18 – Total de fungos isolados distribuídos por OTU.

A análise das sequências permitiu observar que alguns dos isolados, embora pertencentes à mesma espécie, apresentam diferenças nucleotídicas na região ITS1-ITS4: os 2 isolados de *Botrytis cinerea* apresentam 2 diferenças nucleotídicas entre si, assim como o isolado *Epicoccum nigrum* 4 apresenta uma diferença nucleotídica em relação aos outros 4 isolados de *Epicoccum nigrum*.

A análise filogenética obtida pelo alinhamento das sequências (Figura 19) mostra que os fungos pertencentes ao mesmo género se agrupam todos no mesmo ramo. O fungo *Phoma exigua* encontra-se filogeneticamente muito próximo dos fungos do género *Epicoccum* e o fungo *Gibberella pulicaris* encontra-se próxima do fungo *Botrytis cinerea*. O fungo *Athelia bombacina* encontra-se filogeneticamente muito distante de todos os outros aparecendo num ramo completamente isolado de todos os outros, o que é reforçado pelo facto dele ser o único a pertencer a uma Divisão diferente dos restantes. Os fungos isolados pertencem na sua maioria (94%) à Divisão Ascomycota, tendo apenas sido identificado um fungo pertencente à Divisão Basidiomycota, como já referido. O fungo pertencente a esta Divisão, *Athelia bombacina*, pertence à Classe Agaricomycetes, Ordem *Atheliales*. Todos os outros, pertencentes à Divisão Ascomycota, pertencem: à Classe Dothidiomycetes, Ordem *Pleosporales*, os fungos dos géneros *Epicoccum*, *Alternaria* e *Phoma*; à Classe Leotiomycetes, Ordem *Helotiales*, o fungo *Botrytis cinerea* e à Classe Sordariomycetes, Ordem *Hypocreales*, o fungo *Gibberella pulicaris*.

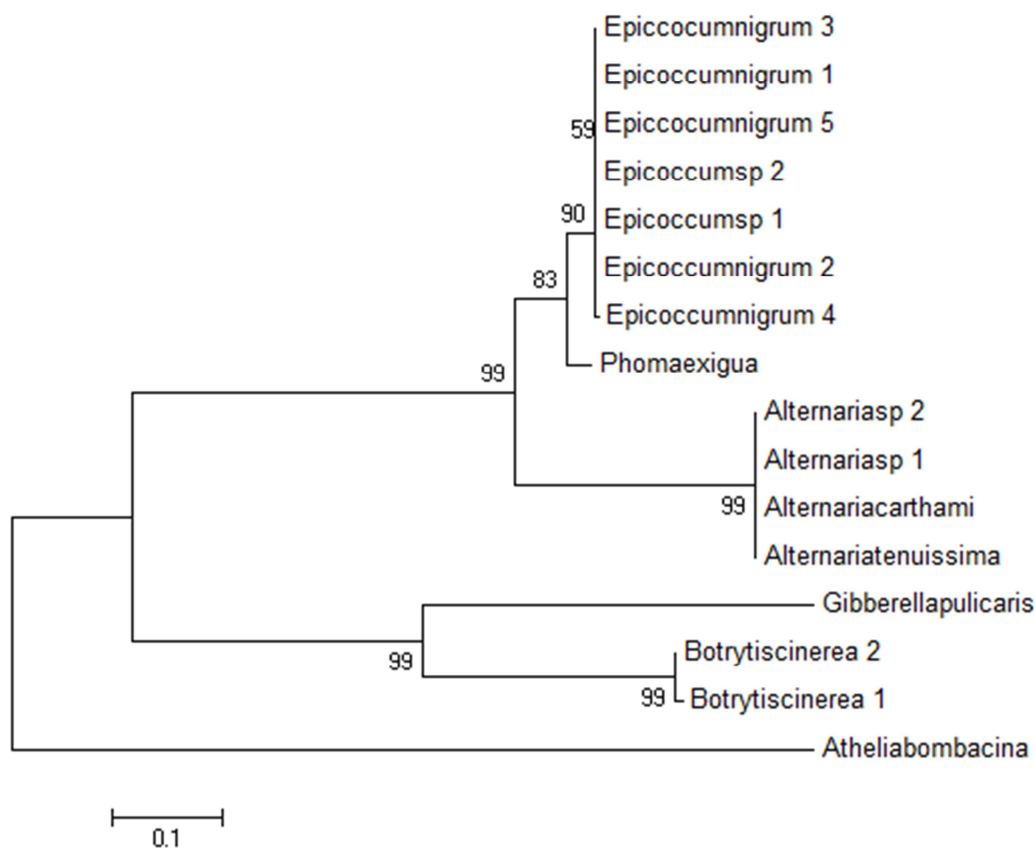


Figura 19 - Árvore filogenética obtida por aplicação do método 'Neighbour-Joining', a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS1-ITS4. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

As espécies de fungos endofíticos isolados no modo de proteção integrada da vinha são diferentes dos isolados no modo de tratamento biológico (tabela 4). Foi observada uma menor diversidade ao nível do género no modo de proteção integrada, onde há claramente uma predominância dos géneros *Epicoccum* e *Alternaria* (figura 20).

Foi possível observar que as variedades Alicante Bouschet e Syrah apresentam entre si a maior semelhança de espécies de fungos endofíticos isolados, visto que em ambas as castas foram identificados 6 dos 7 isolados como pertencentes ao género *Epicoccum*. Na casta Cabernet Sauvignon os 4 fungos isolados foram todos identificados como espécies diferentes, enquanto na casta Aragonês foi possível identificar 2 fungos do género *Alternaria*, um identificado no modo de proteção integrada e outro no modo biológico (tabela 4).

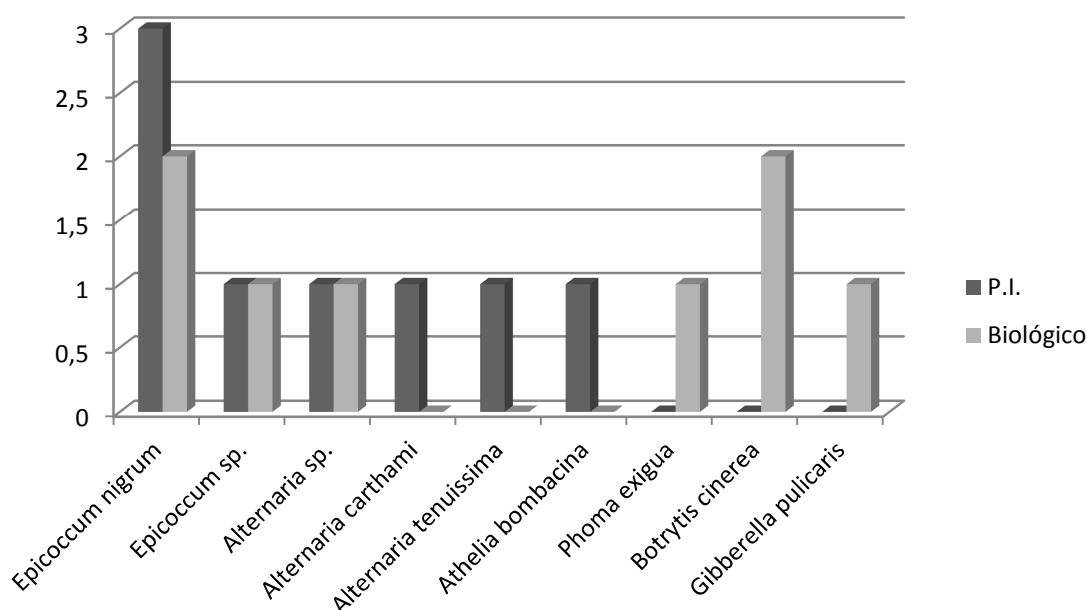


Figura 20 – Número de fungos identificados de acordo com o modo de produção da vinha.

4.2 – Testes de antagonismo

O antagonismo entre microrganismo pode ser avaliado com o uso de testes realizados *in vitro* ou *in vivo*, sendo que o curso normal dos ensaios abrange uma seleção natural inicial feita em laboratório para posteriormente se testar no campo em condições controladas. Os testes *in vitro* avaliam a inibição do crescimento dos fungos patogénicos pelos microrganismos endofíticos, quer por antagonismo direto ou por produção de metabolitos secundários, voláteis ou não voláteis.

Neste estudo, avaliou-se de forma quantitativa a capacidade antagonista de cada fungo endofítico selecionado contra o fungo patogénico *G. bidwellii* assim como o modo de ação antagonista de cada fungo na inibição do crescimento do fungo patogénico.

4.2.1 - Teste de antagonismo direto

A atividade antagonista dos fungos endofíticos isolados contra o fungo *G. bidwellii* foi primeiramente testada através do teste de antagonismo direto. Foram testados todos os fungos isolados e identificados, porque muito embora alguns tenham sido identificados como sendo a mesma espécie, apresentam algumas características visuais diferentes que influenciaram inicialmente a sua escolha para inclusão neste trabalho. Para além disso, a

sua sequenciação revelou algumas diferenças nucleotídicas entre organismos da mesma espécie.

O dia do início do teste de antagonismo direto (dia 0) consistiu em colocar os discos de micélio do fungo endofítico numa posição da placa de Petri diametralmente oposta ao disco de micélio de *G. bidwellii* (figura 21).

Todos os fungos testados apresentaram algum antagonismo contra *G. bidwellii*, embora em diferentes proporções, impedindo o seu crescimento a partir de um determinado tempo de incubação.

Na tabela 5 encontram-se os valores do raio de crescimento do fungo patogénico na placa de Petri de controlo, assim como em cada uma das placas de teste, na presença de cada um dos fungos testados durante cada um dos dias do teste de antagonismo direto.

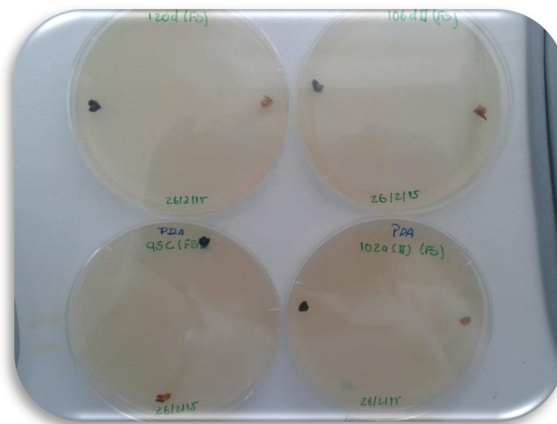


Figura 21 - Placas de Petri com fungo endofítico e *G. bidwellii* colocados diametralmente opostos na placa (dia 0 do teste de antagonismo direto).

De uma forma geral, a partir do 7º dia do teste de antagonismo direto há um abrandamento do crescimento de *G. bidwellii*, na presença dos fungos endofíticos quando comparado com o controlo. A partir do 10º dia do teste todos os valores de raios de crescimento do fungo patogénico são inferiores ao do controlo, para todos os fungos testados, evidenciando que todos os fungos estudados têm ação inibidora no crescimento de *G. bidwellii*.

Até ao 15º dia, o raio do crescimento do agente patogénico mantém-se relativamente constante, exceto no controlo, situação na qual o patogénico continua a crescer. No caso de *Botrytis cinerea* 1 e *Botrytis cinerea* 2 o efeito antagonista é evidente logo a partir do 4º dia do teste e no caso do fungo *Athelia bombacina*, é possível ver um abrandamento do crescimento de *G. bidwellii* logo a partir do 5º dia (figura 22).

RESULTADOS

Tabela 5 – Valores do raio de crescimento de *G. bidwellii* (cm) ($r_{G. bidwellii} \pm SE$) na presença dos vários fungos e nos vários dias do teste de antagonismo direto.

	1	2	3	4	5	6	7	10	12	15
Controlo	0,13±0,03	0,60±0,10	0,97±0,13	1,47±0,03	1,90±0,06	2,33±0,13	3,00±0,10	4,30±0,25	5,27±0,58	6,77±0,43
<i>E. nigrum</i> 1	0,17±0,04	0,73±0,03	1,20±0,06	1,87±0,09	2,47±0,03	2,80±0,06	3,13±0,09	3,37±0,09	3,30±0,10	3,27±0,12
<i>E. nigrum</i> 2	0,07±0,02	0,53±0,03	0,97±0,03	1,43±0,03	1,97±0,03	2,57±0,09	2,93±0,03	3,57±0,09	3,60±0,10	3,63±0,12
<i>E. nigrum</i> 3	0,17±0,03	0,80±0,06	1,20±0,12	1,83±0,15	2,50±0,06	2,80±0,15	3,13±0,03	3,20±0,06	3,17±0,07	3,10±0,10
<i>E. nigrum</i> 4	0,07±0,02	0,60±0,06	1,10±0,15	1,50±0,15	2,07±0,27	2,57±0,18	3,00±0,17	3,43±0,12	3,50±0,06	3,50±0,10
<i>E. nigrum</i> 5	0,08±0,02	0,60±0,00	1,10±0,12	1,57±0,12	2,20±0,10	2,60±0,15	2,93±0,03	3,10±0,06	3,13±0,03	3,10±0,06
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0,05±0,00	0,60±0,06	1,00±0,10	1,63±0,22	2,03±0,18	2,67±0,15	3,07±0,09	3,23±0,03	3,20±0,06	3,27±0,13
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0,20±0,00	0,93±0,07	1,57±0,09	2,33±0,12	2,90±0,10	3,33±0,03	3,47±0,03	3,63±0,09	3,60±0,00	3,60±0,00
<i>Alternaria</i> sp. 1	0,08±0,02	0,57±0,03	1,10±0,10	1,63±0,15	2,20±0,10	2,67±0,15	3,10±0,12	3,30±0,31	3,43±0,15	3,30±0,20
<i>Alternaria</i> sp. 2	0,20±0,06	0,83±0,07	1,43±0,22	2,13±0,33	2,73±0,33	3,10±0,31	3,33±0,12	3,40±0,10	3,50±0,12	3,47±0,15
<i>A. tenuissima</i>	0,00±0,00	0,37±0,09	0,77±0,03	1,30±0,06	1,87±0,07	2,43±0,03	2,93±0,09	3,73±0,07	3,83±0,15	3,93±0,20
<i>A. carthami</i>	0,12±0,06	0,53±0,09	1,17±0,07	1,53±0,15	2,23±0,09	2,67±0,12	3,23±0,18	3,53±0,12	3,60±0,12	3,67±0,18
<i>Botrytis cinerea</i> 1	0,02±0,02	0,50±0,00	0,80±0,06	1,27±0,41	1,20±0,35	1,20±0,35	1,17±0,34	1,13±0,32	1,10±0,30	1,17±0,28
<i>Botrytis cinerea</i> 2	0,20±0,06	0,87±0,07	1,43±0,09	1,93±0,09	1,97±0,09	1,93±0,09	2,00±0,12	2,07±0,09	2,17±0,12	2,17±0,12
<i>Athelia bombacina</i>	0,12±0,02	0,67±0,03	1,27±0,03	1,80±0,00	2,40±0,00	2,20±0,00	2,30±0,10	2,53±0,03	2,80±0,06	2,70±0,15
<i>Phoma exigua</i>	0,10±0,00	0,83±0,09	1,60±0,10	2,27±0,12	3,00±0,10	3,60±0,10	4,00±0,10	4,27±0,12	4,17±0,12	4,33±0,12
<i>Gibberella pulicaris</i>	0,13±0,02	0,77±0,03	1,33±0,09	1,90±0,06	2,53±0,07	2,80±0,06	2,80±0,10	3,03±0,13	2,80±0,10	2,80±0,06

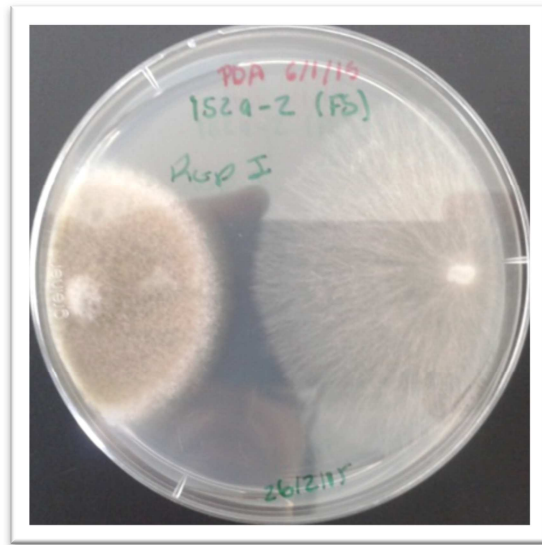


Figura 22 - Placa de teste de *G. bidwellii* com o fungo antagonista *Athelia bombacina* no 5º dia do teste de antagonismo direto.

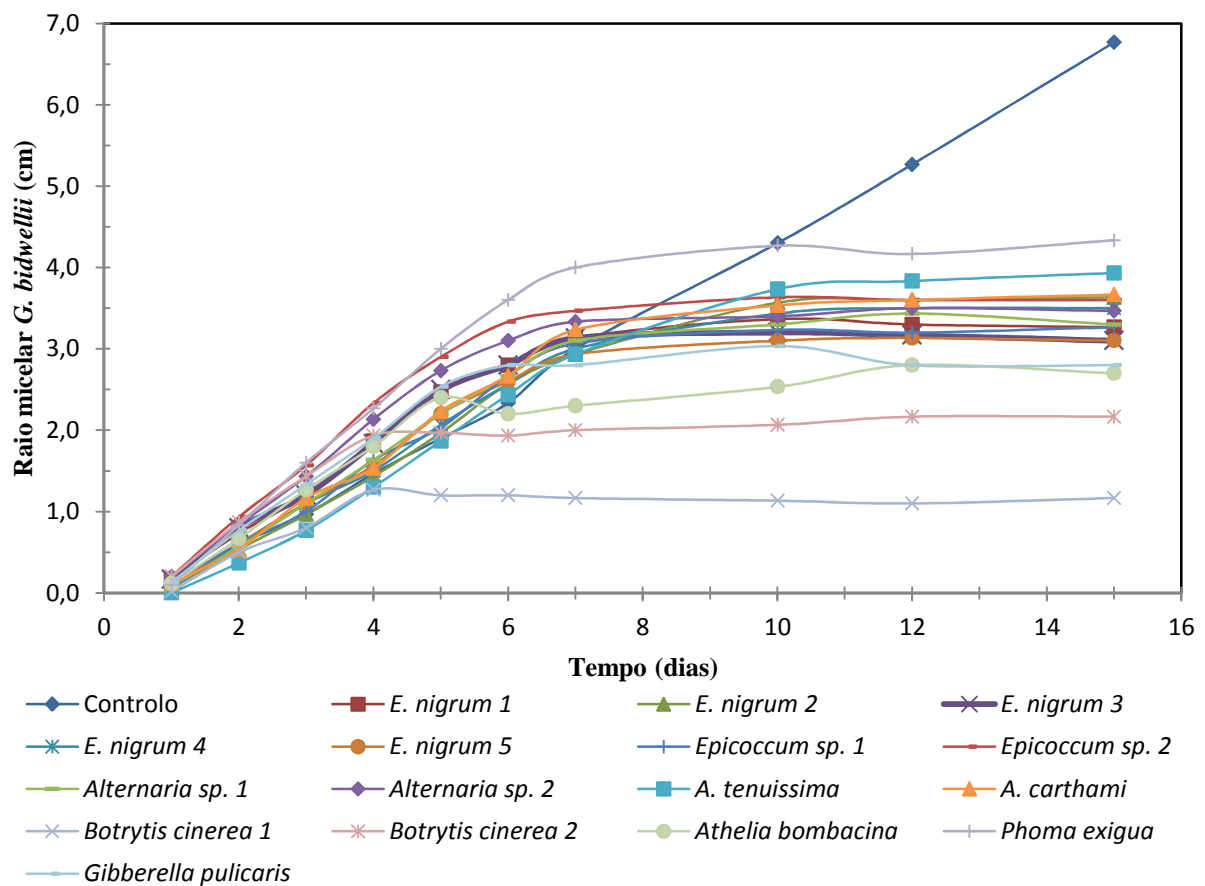


Figura 23 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *G. bidwellii* ao longo do tempo.

Por sua vez o fungo *Phoma exigua* é o que apresenta um efeito antagonista mais débil no que diz respeito à capacidade de inibir o crescimento do fungo patogénico, uma vez que foi na presença deste fungo que o crescimento do agente patogénico mais se aproximou do valor do controlo. No caso do fungo *Alternaria tenuissima* verificou-se um aumento do valor de raio de crescimento do 7º até 10º dia do teste, adotando um carater relativamente constante apenas a partir deste.

A análise estatística dos resultados acima apresentados permitiu averiguar as diferenças entre o raio de crescimento de *G. bidwellii* nas placas do teste e na placa do controlo. Analisaram-se estatisticamente os valores de crescimento no 2º, 7º, 12º e 15º dia do teste, admitindo diferenças significativas para um valor de $p < 0,05$. No 2º dia do teste não se verificaram diferenças significativas no crescimento do fungo patogénico na presença dos fungos endofíticos em relação ao controlo.

Contudo no 7º dia o crescimento de *G. bidwellii* na presença dos fungos *Botrytis cinerea* 1, *Botrytis cinerea* 2, *Athelia bombacina* em comparação com o controlo (figura 24A, 24B, 24C e 24F) mostrou que estes apresentaram um elevado efeito antagonista, inibindo o crescimento do agente patogénico, facto evidenciado pelas diferenças significativas nos valores do crescimento medidos na placa controlo e nas placas com a presença dos antagonistas.

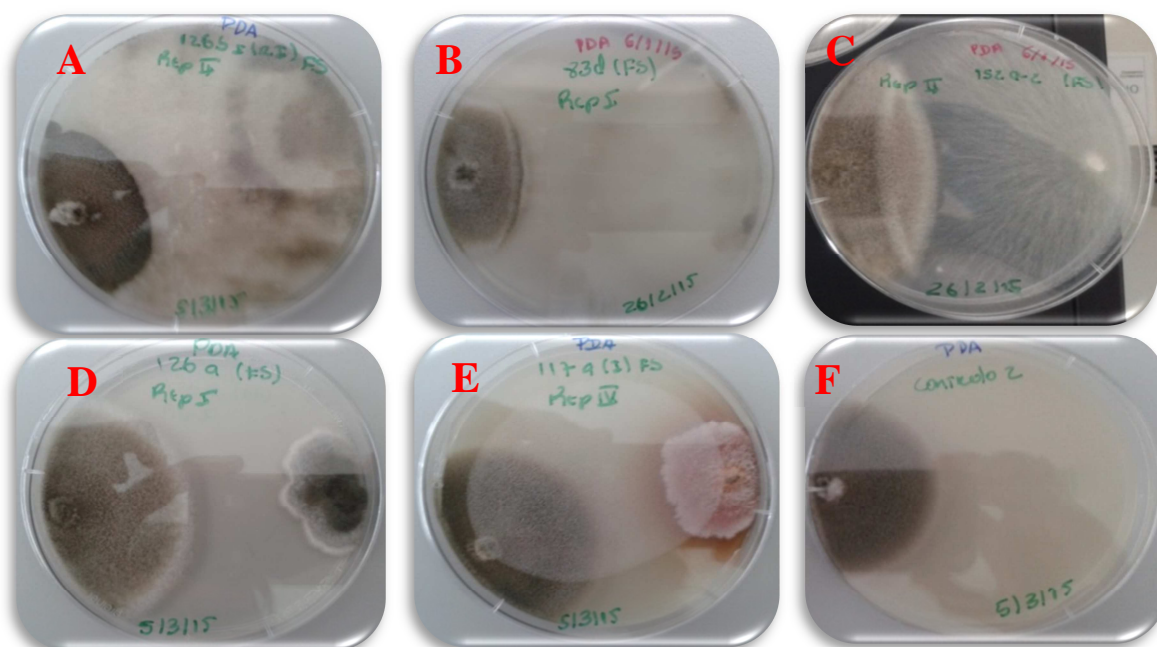


Figura 24 - Crescimento de *G. bidwellii* no 7º dia, nas placas de teste com os fungos endofíticos: A – *Botrytis cinerea* 1; B -*Botrytis cinerea* 2; C – *Athelia bombacina*; D – *Phoma exigua*; E – *Epicoccum* sp. e F – controlo. Lado esquerdo das placas – *G. bidwellii*; lado direito das placas – fungo antagonista.

Curiosamente, no 7º dia, na presença dos fungos *Phoma exigua* e *Epicoccum* sp. 2 mostraram diferenças significativas dos valores de raio de crescimento de *G. bidwellii* em relação ao controlo, mas neste caso o raio de crescimento do fungo patogénico foi significativamente maior na presença deste antagonistas do que no controlo (figura 24D, 24E e 24F).

No tempo 12 (12º dia), verificaram-se diferenças significativas no crescimento de *G. bidwellii* em relação ao controlo, sendo menor quando na presença dos fungos antagonistas, com exceção dos fungos *Alternaria tenuissima* e *Phoma exigua* (figura 25). Finalmente no 15º dia do teste também se registaram diferenças significativas do raio de crescimento de *G. bidwellii* na presença de todos os fungos endofíticos estudados, em relação ao crescimento desta na placa controlo.

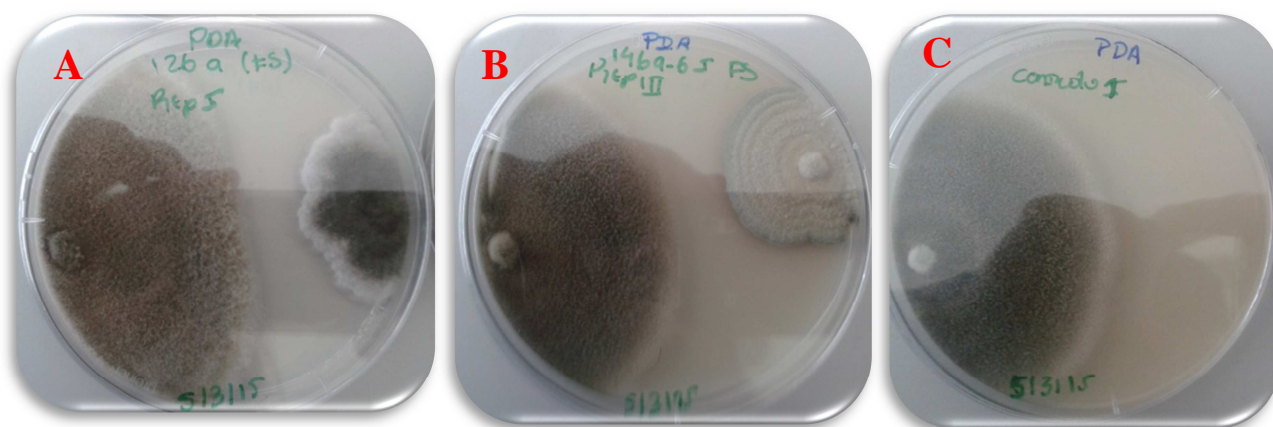


Figura 25 - Crescimento de *G. bidwellii* no 12º dia, nas placas de teste com os fungos endofíticos: A – *Phoma exigua*; B – *Alternaria tenuissima* e C – controlo. Lado esquerdo das placas – *G. bidwellii*; lado direito das placas – fungo antagonista.

O cálculo da percentagem de inibição foi feito através da fórmula indicada no capítulo 3.5.1 usando os valores obtidos no 15º dia (tabela 6).

As maiores percentagens de inibição do crescimento de *G. bidwellii* são originadas pelos fungos *Botrytis cinerea* 1, com o valor de 82,7 %, *Botrytis cinerea* 2, 67,9% e *Athelia bombacina*, com 60,1% de inibição de crescimento.

Os endófitos com menor percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii*, tal como expectável pelos valores de crescimento ao longo do tempo, são os fungos *A. tenuissima* e *Phoma exigua*, com valores de 41,9% e 35,9%, respetivamente.

O fungo *Gibberella pulicaris* tem um potencial antagonista contra *G. bidwellii* interessante, com uma percentagem de inibição de 58,6%, sendo o 4º valor mais elevado

dentro dos 16 fungos testados e superior aos valores dos fungos dos gêneros *Epicoccum* e *Alternaria*.

Tabela 6 – Percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii* no dia 15 do teste de antagonismo direto.

Fungo endofítico	% Inibição
<i>E. nigrum</i> 1	51,7
<i>E. nigrum</i> 2	46,3
<i>E. nigrum</i> 3	54,2
<i>E. nigrum</i> 4	48,3
<i>E. nigrum</i> 5	54,2
<i>Epicoccum</i> sp. 1	51,7
<i>Epicoccum</i> sp. 2	46,8
<i>Alternaria</i> sp. 1	51,2
<i>Alternaria</i> sp. 2	48,8
<i>A. tenuissima</i>	41,9
<i>A. carthami</i>	45,8
<i>Botrytis cinerea</i> 1	82,7
<i>Botrytis cinerea</i> 2	67,9
<i>Athelia bombacina</i>	60,1
<i>Phoma exigua</i>	35,9
<i>Gibberella pulicaris</i>	58,6

O tipo de interação entre cada fungo endofítico individualmente com o fungo patogénico foi estabelecido com recurso a uma escala de A a D, com base no crescimento do fungo endofítico e do fungo patogénico quando colocados em lados diametralmente opostos da mesma placa de Petri com meio de cultura PDA (tabela 7).

Tabela 7 – Tipo de interação dos fungos endofíticos com *G. bidwellii*.

Fungo endofítico	Tipo de interação
<i>Botrytis cinerea</i> 1	
<i>Botrytis cinerea</i> 2	A
<i>Athelia bombacina</i>	
<i>Alternaria</i> sp. 1	
<i>Epicoccum</i> sp. 1	
<i>Epicoccum</i> sp. 2	C
<i>Alternaria</i> sp. 2	
<i>E. nigrum</i> 1	

<i>E. nigrum 2</i>	
<i>E. nigrum 4</i>	
<i>E. nigrum 5</i>	
<i>Gibberella pulicaris</i>	
<i>Alternaria tenuissima</i>	
<i>Alternaria carthami</i>	
<i>Phoma exigua</i>	D
<i>E. nigrum 2</i>	

No caso da interação entre *G. bidwellii* e *B. cinerea 1*, *B. cinerea 2* ou *Athelia bombacina* (figura 26) existe claramente uma zona de sobreposição, em que o fungo antagonista continua o seu crescimento por cima do fungo patogénico, inibindo quase por completo o crescimento de *G. bidwellii*, desde o momento que os dois fungos se tocam (tipo de interação A).

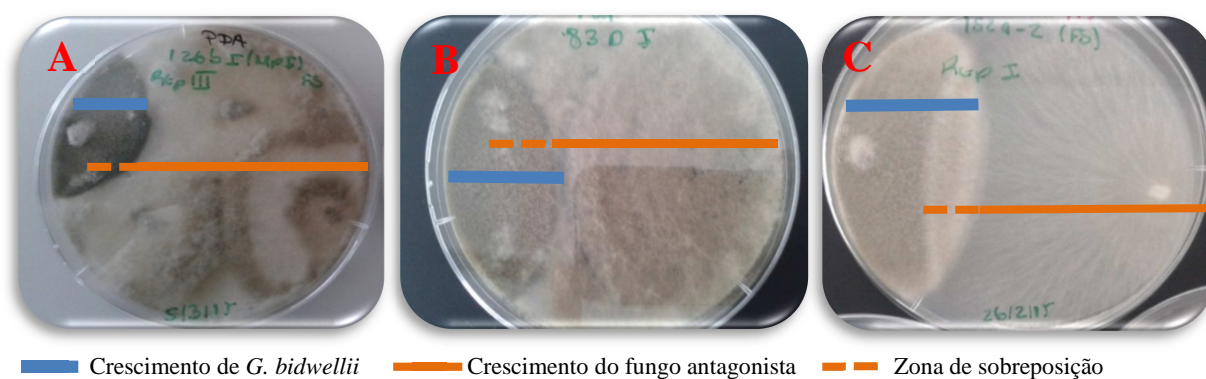


Figura 26 - Tipo de interação A entre *G. bidwellii* e: A - *Botrytis cinerea 1*, B – *Botrytis cinerea 2*, C - *Athelia bombacina*. Lado esquerdo das placas – *G. bidwellii*; lado direito das placas – fungo antagonista.

Os fungos endofíticos identificados como *Epicoccum* sp. 1, *Epicoccum* sp. 2, *Epicoccum nigrum 1*, *Epicoccum nigrum 3*, *Epicoccum nigrum 4*, *Epicoccum nigrum 5*, *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 2 e *Gibberella pulicaris* têm uma interação com o fungo patogénico *G. bidwellii* classificada como do tipo C, onde há uma inibição mútua do crescimento do fungo antagonista e do fungo patogénico, com as hifas de crescimento separadas por uma distância menor que 0,2 cm (figura 27).

O tipo de interação D ocorre quando há uma inibição mútua do crescimento dos dois fungos, mas neste caso as hifas de crescimento são separadas por uma distância superior a 0,2 cm. Este tipo de interação foi verificado na presença dos fungos *Alternaria carthami*, *Phoma exigua*, *Alternaria tenuissima* e *Epicoccum nigrum 2* (figura 28).

A interação do tipo B com *G. bidwellii* não foi identificada para nenhum dos fungos endofíticos.

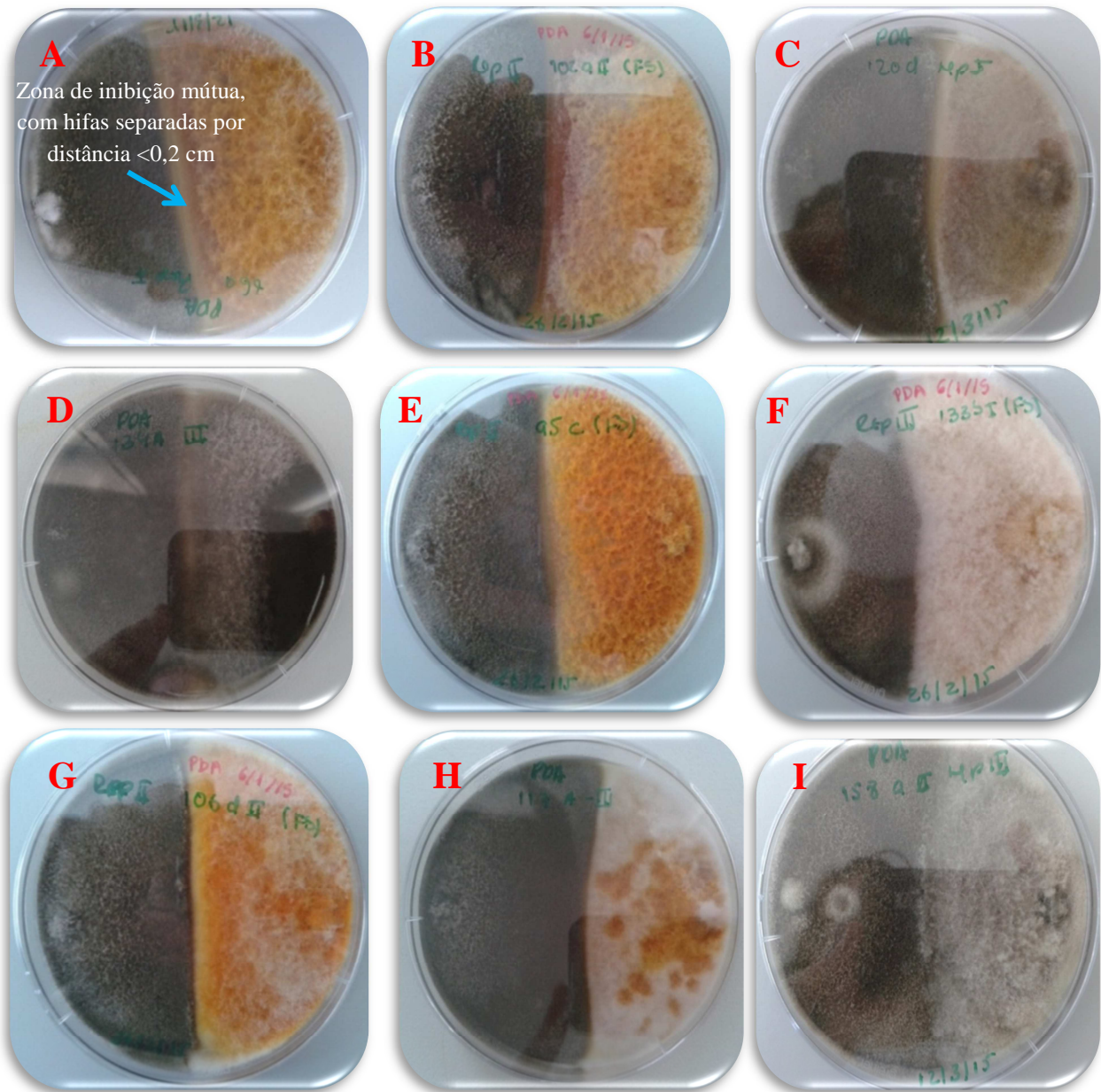


Figura 27 - Tipo de interação C entre *G. bidwellii* e: A – *Epicoccum nigrum* 5, B - *Epicoccum nigrum* 3, C - *Epicoccum nigrum* 4, D - *Alternaria* sp. 2, E - *Epicoccum nigrum* 1, F – *Gibberella pulicaris*, G – *Epicoccum* sp. 1, H – *Epicoccum* sp., I – *Alternaria* sp. 1. Lado esquerdo das placas – *G. bidwellii*; lado direito das placas – fungo antagonista.

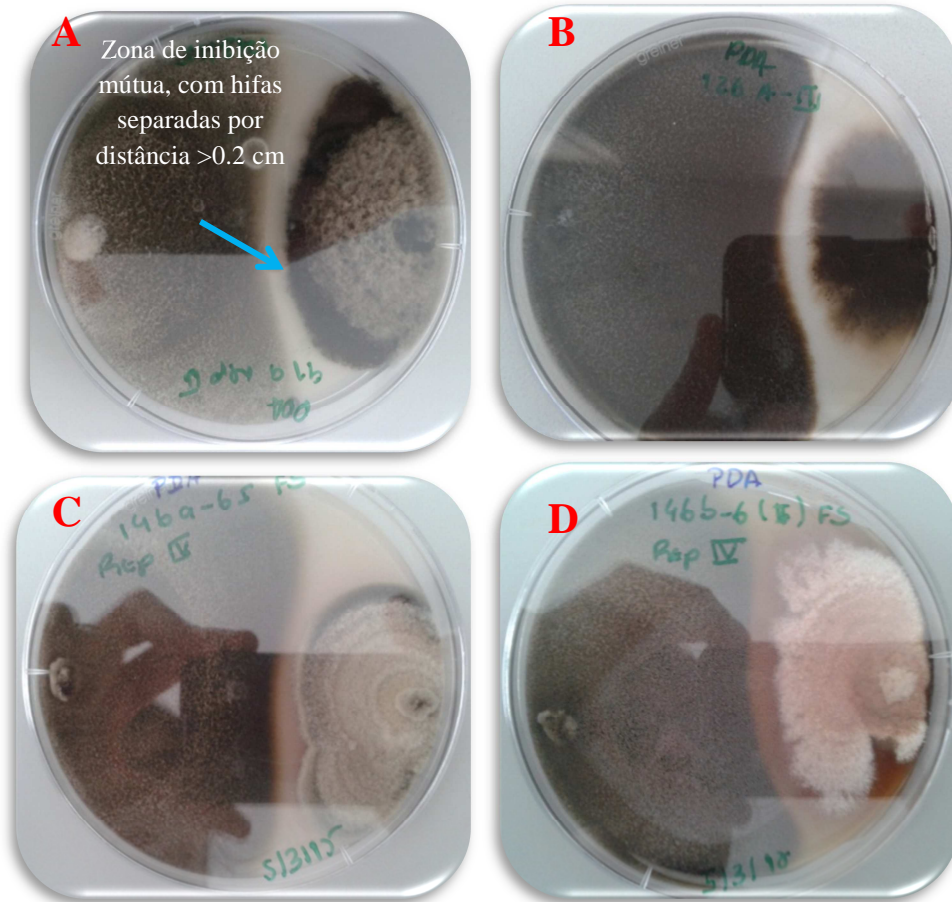


Figura 28 - Tipo de interação D entre *G. bidwellii* e: A – *Alternaria carthami*, B – *Phoma exigua*, C – *Alternaria tenuissima*, D - *Epicoccum nigrum* 2. Lado esquerdo das placas – *G. bidwellii*; lado direito das placas – fungo antagonista.

4.2.2 - Teste dos compostos voláteis

A inibição do crescimento de *G. bidwellii* pela produção de compostos voláteis emitidos pelos fungos endofíticos foi também avaliada. Testaram-se todos os fungos endofíticos isolados que foram colocados a crescer durante 5 dias em placa de Petri (90 mm) com meio de cultura PDA, antes da montagem do teste, enquanto a *G. bidwellii* cresceu durante 2 dias em placa de Petri (60mm). No dia 0 do teste dos compostos voláteis (dia de montagem do teste) o fungo *G. bidwellii* já tinha um crescimento de 2 dias e logo este será considerado como o tempo 2. As medições do raio de crescimento do fungo foram feitas 5 dias após a montagem, considerado o tempo 7 do teste, e 10 dias após a montagem, considerado o tempo 12. Colocou-se também uma placa de Petri (60mm) com *G. bidwellii* invertida numa placa de Petri (90mm) contendo apenas meio PDA,

para servir de controlo. Na figura 29 é apresentado um exemplo do teste dos compostos voláteis.

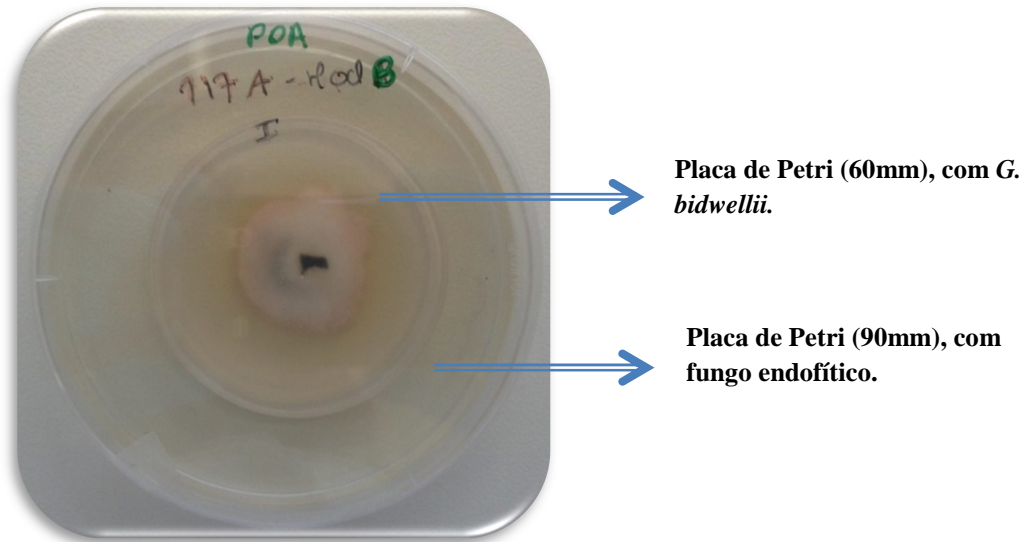


Figura 29 - Exemplo de montagem do teste dos compostos voláteis.

A primeira evidência dos resultados deste teste é que para a maioria dos fungos endofíticos o crescimento de *G. bidwellii* do tempo 7 para o tempo 12 permanece quase inalterado. Esta observação também é feita para o controlo, onde o valor médio no tempo 7 é praticamente o mesmo que no tempo 12, tendo em conta o erro associado.

É apresentado na tabela e no gráfico de barras o erro associado ao cálculo da média entre as 3 réplicas usadas no teste, para cada fungo e também para o controlo e é possível verificar-se que para alguns fungos endofíticos este erro pode ser bastante significativo, uma vez que existiam diferenças do crescimento de *G. bidwellii* entre réplicas com o mesmo fungo endofítico.

Verifica-se que, tanto no tempo 7 como no tempo 12, todos os fungos endofíticos têm a capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii* (com exceção de *Botrytis cinerea* 1 e *Botrytis cinerea* 2), uma vez que estes apresentam valores de raio de crescimento na presença dos fungos endofíticos inferiores aos da placa controlo (tabela 8, figura 30).

O cálculo estatístico das diferenças entre os valores do raio de crescimento de *G. bidwellii* com os fungos endofíticos e na placa de Petri de controlo, considerando diferenças significativas para um valor de $p < 0.05$, mostra que no tempo 7, existem diferenças significativas para os fungos *Alternaria* sp. 1, *E. nigrum* 4, *E. nigrum* 1, *Athelia bombacina*, *Epicoccum* sp. 2, *Phoma exigua*, *Alternaria tenuissima* e *E. nigrum*

Tabela 8 – Valores do raio micelar de crescimento ($r_{G. \textit{bidwellii}} \pm SE$) nos vários tempos do teste dos compostos voláteis.

Fungo endofítico	Raio micelar \pm SE (cm)		
	Tempo 2	Tempo 7	Tempo 12
Controlo	0,92 \pm 0,02	1,65 \pm 0,03	1,67 \pm 0,02
<i>E. nigrum 1</i>	1,00 \pm 0,09	0,90 \pm 0,08	1,45 \pm 0,58
<i>E. nigrum 2</i>	1,00 \pm 0,03	1,18 \pm 0,13	1,17 \pm 0,17
<i>E. nigrum 3</i>	0,93 \pm 0,02	1,08 \pm 0,19	1,13 \pm 0,19
<i>E. nigrum 4</i>	0,92 \pm 0,04	0,90 \pm 0,03	0,87 \pm 0,04
<i>E. nigrum 5</i>	1,08 \pm 0,02	1,35 \pm 0,13	1,47 \pm 0,16
<i>Epicoccum sp. 1</i>	0,98 \pm 0,04	1,37 \pm 0,38	1,55 \pm 0,36
<i>Epicoccum sp. 2</i>	1,05 \pm 0,08	1,03 \pm 0,11	1,00 \pm 0,09
<i>Alternaria sp. 1</i>	0,88 \pm 0,04	0,87 \pm 0,10	0,90 \pm 0,08
<i>Alternaria sp. 2</i>	0,90 \pm 0,05	1,48 \pm 0,56	1,45 \pm 0,58
<i>A. tenuissima</i>	0,97 \pm 0,06	0,87 \pm 0,03	0,92 \pm 0,07
<i>A. carthami</i>	1,05 \pm 0,03	1,58 \pm 0,51	1,63 \pm 0,49
<i>Botrytis cinerea 1</i>	0,82 \pm 0,07	2,30 \pm 0,23	2,55 \pm 0,03
<i>Botrytis cinerea 2</i>	1,05 \pm 0,05	2,40 \pm 0,08	2,38 \pm 0,17
<i>Athelia bombacina</i>	1,10 \pm 0,03	1,30 \pm 0,08	1,17 \pm 0,06
<i>Phoma exigua</i>	1,02 \pm 0,11	1,12 \pm 0,13	1,47 \pm 0,03
<i>Gibberella pulicaris</i>	1,00 \pm 0,03	1,52 \pm 0,39	1,65 \pm 0,48

. Estes fungos, logo no tempo 7 (ao fim de 5 dias de teste) podem inibir o crescimento do fungo patogénico por emissão de compostos voláteis, já que na presença de todos eles o raio de crescimento de *G. bidwellii* é inferior ao do controlo. No teste com os fungos *Botrytis cinerea 1* e *Botrytis cinerea 2*, também se verificam diferenças significativas no crescimento de *G. bidwellii* em relação ao crescimento na placa controlo. Contudo, como já tinha sido referido, estas diferenças verificam-se porque, neste caso o crescimento do fungo patogénico é muito superior na presença destes endofíticos ao do controlo, o que permite deduzir que não haverá efeito antagonista destes fungos por emissão de compostos voláteis.

Por sua vez no tempo 12, é na presença dos fungos endofíticos *Alternaria sp. 1*, *E. nigrum 4*, *Athelia bombacina*, *Epicoccum sp. 2*, *Phoma exigua*, *Alternaria tenuissima* e *Botrytis cinerea 1* e 2, que aparecem diferenças significativas do crescimento de *G. bidwellii* em relação ao controlo.

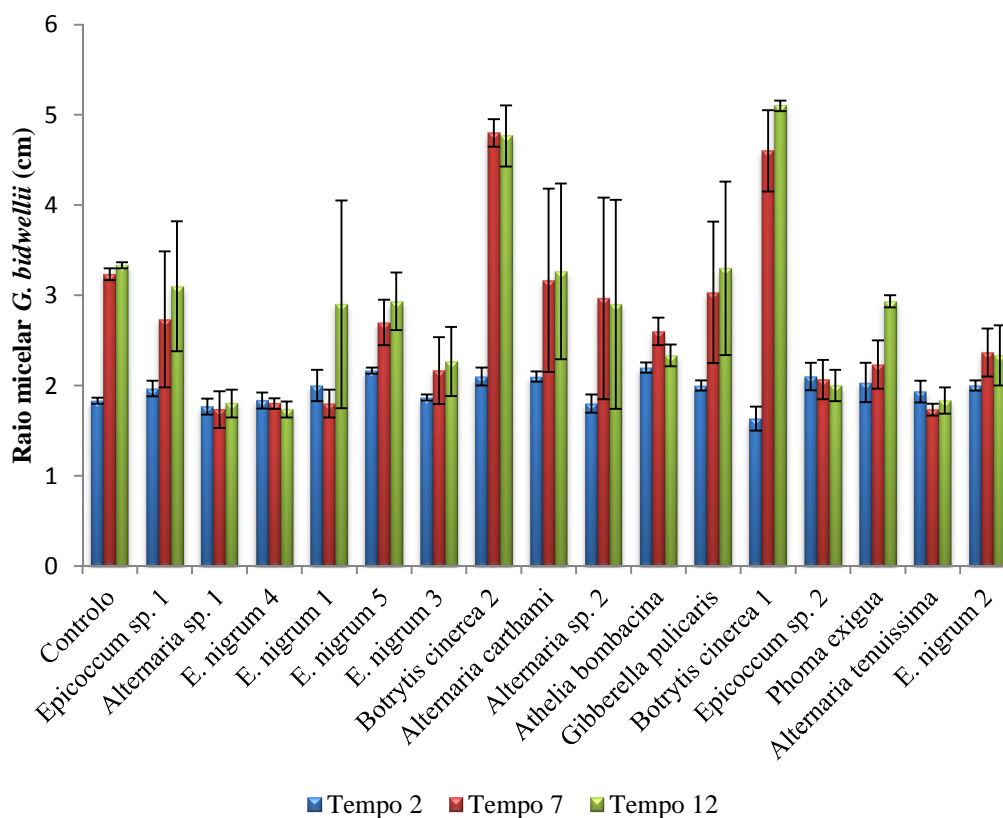


Figura 30 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *G. bidwellii* em função do tempo.

A percentagem de inibição foi calculada com base na fórmula indicada no capítulo 3.5.1, para o tempo 12 (tabela 9).

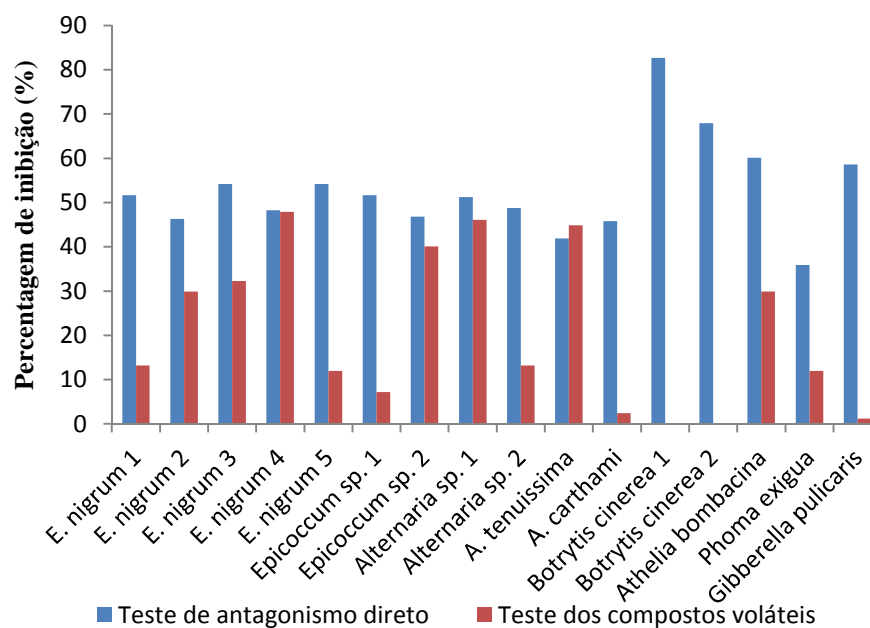
As percentagens de inibição do crescimento de *G. bidwellii* por emissão de compostos voláteis foram muito variáveis e o maior valor 47,9% foi obtido com o fungo *E. nigrum* 4, seguido de *Alternaria* sp. 1, com 46,1% e *A. tenuissima* com 44,9%, o que indica que estes fungos têm a capacidade de produzir metabolitos voláteis que inibem/atrasam o crescimento do fungo patogénico. Por outro lado, as percentagens mais baixas foram obtidas com os fungos *Gibberella pulicaris*, 1,2%, *A. carthami*, 2,4% e *Epicoccum* sp. 1, 7,2%. Os valores para os fungos *Phoma exigua*, *Athelia bombacina*, *Alternaria* sp. 2, *Epicoccum* sp. 2, *E. nigrum* 5, *E. nigrum* 3, *E. nigrum* 2 e *E. nigrum* 1, variam entre 12% e 40,1%, mas apesar disso pode-se avançar que todos eles produzem compostos voláteis com a capacidade de causar alguma inibição no crescimento de *G. bidwellii*.

A comparação dos testes de antagonismo direto e dos compostos voláteis (figura 31), através da percentagem de inibição calculada para cada fungo endofítico permite

Tabela 9 – Percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii* no tempo 12 do teste dos compostos voláteis.

Fungo endofítico	% Inibição
<i>E. nigrum</i> 1	13,2
<i>E. nigrum</i> 2	29,9
<i>E. nigrum</i> 3	32,3
<i>E. nigrum</i> 4	47,9
<i>E. nigrum</i> 5	12,0
<i>Epicoccum</i> sp. 1	7,2
<i>Epicoccum</i> sp. 2	40,1
<i>Alternaria</i> sp. 1	46,1
<i>Alternaria</i> sp. 2	13,2
<i>A. tenuissima</i>	44,9
<i>A. carthami</i>	2,4
<i>Botrytis cinerea</i> 1	0
<i>Botrytis cinerea</i> 2	0
<i>Athelia bombacina</i>	29,9
<i>Phoma exigua</i>	12,0
<i>Gibberella pulicaris</i>	1,2

constatar que todos os valores obtidos são mais baixos no teste dos compostos voláteis, com exceção do fungo *Alternaria tenuissima*, para todos os fungos endofíticos estudados.

Figura 31 – Valores de percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii* no teste de antagonismo direto e no teste dos compostos voláteis.

4.2.2.1 – Identificação dos compostos voláteis

Os metabolitos voláteis produzidos por cada fungo endofítico foram identificados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa e foi possível verificar que os todos endófitos produziram compostos voláteis, embora de diferentes famílias químicas.

Os compostos prováveis identificados são diversos, desde álcoois, alcanos, cetonas, esteress, éteres, aldeídos, fenóis, ácidos e terpenos (Anexo II).

Verifica-se que o clorofórmio e os álcoois 2-etil-1-hexanol e 3-metil-1-butanol foram os compostos prováveis mais vezes encontrados, sendo produzidos por praticamente todos os fungos endofíticos. Também foram identificados vários derivados de ácido propanoico em todas as amostras analisadas, com exceção de *G. pulicaris*. Para além destes foi possível identificar vários outros produtos comuns a vários fungos endofíticos, tais como 3-metil-pentano, acetato de etilo, benzaldeído, 2-metil-1-propanol, ácido acético, fenol, 1,2-propenodiol, 3-hidroxi-2-butanona, 2-butanona e benzoato de etilo.

Alguns dos compostos identificados aparentam ser característicos de algumas amostras, como é o caso dos terpenos 3,7-dimetil-2,6-octadienal (Citral) e 4-metil, 2-(2-metilprop-1-enil)oxano ('Rose oxide') e dos compostos nonanal e acetato de 3-metil-1-butanol, que apenas foram identificados na amostra de *Athelia bombacina*. Também os compostos ácido acético-2-hidroxi-metil-éster e 5-etil-4-metil-3-heptanona apenas foram identificados na amostra do fungo *Phoma exigua*. O composto oxime-metoxifenil foi apenas identificado em *Alternaria tenuissima*, assim como o composto 1,8-cineole e o álcool 2-butoxi-etanol, apenas identificados como produzidos pelo fungo *E. nigrum* 2. Por fim os compostos isobutil-vinil-éter e 1,2,4-trimetil benzeno foram apenas indicado como compostos voláteis prováveis do fungo *Giberella pulicaris*.

4.2.3 - Teste dos compostos não voláteis

A produção de compostos não voláteis pelos fungos endofíticos com capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii* foi também testada e todos os fungos endofíticos foram avaliados neste teste.

Um disco de micélio de *G. bidwellii* foi colocado numa placa de Petri (90mm) contendo PDA, 2 dias antes da montagem do teste (dia 0 do teste corresponde ao tempo 2). Após esse tempo foram colocados diferentes volumes (75µl, 100 µl e 200 µl) de meio PDB, onde cresceram cada um dos fungos nos orifícios diametralmente opostos da placa, com

G. bidwellii ao centro e o raio de crescimento foi medido 5 dias após a montagem do teste (tempo 7).

Os resultados obtidos neste teste mostram que apenas os fungos endofíticos *Epicoccum* sp. 2, *Alternaria* sp. 2, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria carthami*, *Athelia bombacina* e *Gibberella pulicaris* têm a capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii* por produção de metabolitos secundários não voláteis (figura 32). Em todos os outros fungos testados o patógeno cresce até aos orifícios onde foram colocados os fungos endofíticos, em todos os volumes, assim como no controlo, orifício da placa com 75 μ l de meio PDB.

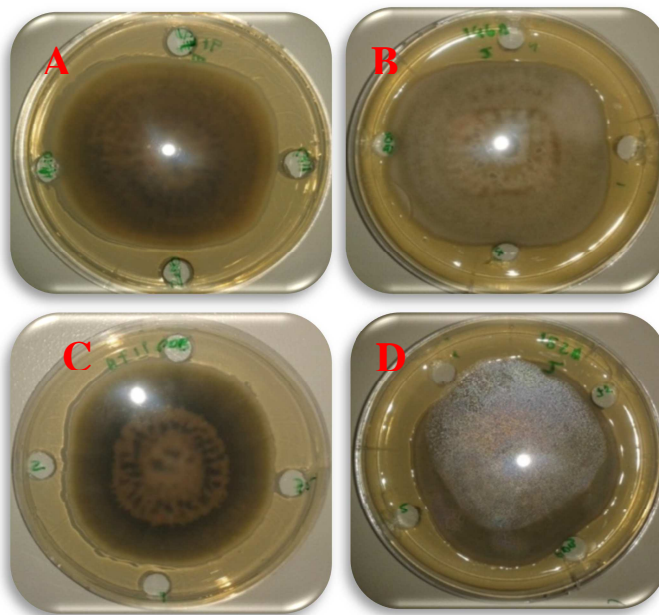


Figura 32 - Teste dos compostos voláteis no tempo 7: A – *Alternaria carthami*, B – *Alternaria tenuissima*, C – *Epicoccum nigrum* 2 e D – *Athelia bombacina*.

Verifica-se que nos fungos que apresentaram inibição do crescimento de *G. bidwellii*, em particular *Epicoccum* sp. 2, *Alternaria* sp. 2, *Alternaria carthami* e *Alternaria tenuissima*, esta inibição foi tanto maior quanto maior o volume de meio PDB com o fungo endofítico aplicado, verificando uma relação crescente entre a inibição e o volume de fungo. No caso de *Gibberella pulicaris* constatou-se um aumento da inibição do crescimento de *G. bidwellii*, com o aumento do volume de 75 μ l para 100 μ l, mas o mesmo não se verificou com o aumento do volume de 100 μ l para 200 μ l, tendo mesmo o patógeno mostrado um maior crescimento quando o maior volume foi usado (tabela 10, figura 33).

RESULTADOS

Tabela 10 – Valores do raio micelar de crescimento ($r_{G. bidwelli} \pm SE$) nos vários tempos do teste dos compostos não voláteis.

Fungo endofítico	Raio micelar \pm SE (cm)							
	Tempo 2				Tempo 7			
	75 μ lC	75 μ l	100 μ l	200 μ l	75 μ lC	75 μ l	100 μ l	200 μ l
<i>E. nigrum 1</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>E. nigrum 2</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>E. nigrum 3</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>E. nigrum 4</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>E. nigrum 5</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Epicoccum sp. 1</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Epicoccum sp. 2</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,27 \pm 0,03	3,17 \pm 0,07	3,10 \pm 0,10
<i>Alternaria sp. 1</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Alternaria sp. 2</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,23 \pm 0,07	3,00 \pm 0,06	2,83 \pm 0,03
<i>A. tenuissima</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,10 \pm 0,12	2,93 \pm 0,03	2,73 \pm 0,03
<i>A. carthami</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,17 \pm 0,03	3,00 \pm 0,06	2,83 \pm 0,09
<i>Botrytis cinerea 1</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Botrytis cinerea 2</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Athelia bombacina</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,20 \pm 0,06	3,20 \pm 0,10
<i>Phoma exigua</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00
<i>Gibberella pulicaris</i>	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	1,25 \pm 0,00	3,30 \pm 0,00	2,90 \pm 0,06	2,73 \pm 0,03	2,77 \pm 0,03

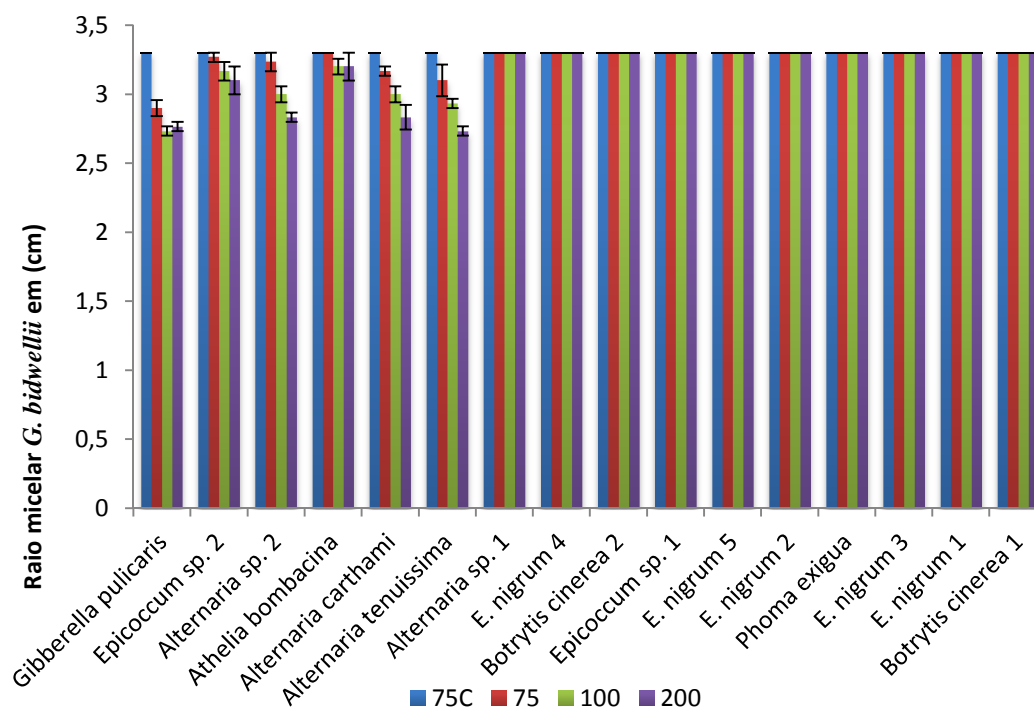


Figura 33 – Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *G. bidwellii* no tempo 7.

Neste teste as diferenças significativas, ($p < 0.05$), foram calculadas para cada fungo endofítico, entre o raio de crescimento de *G. bidwellii* para cada volume em relação ao controlo, calculando-se também as diferenças entre volumes. Para os fungos *Epicoccum sp. 2* e *Athelia bombacina*, não se constatarem diferenças significativas em nenhum dos casos mencionados. Já para os fungos *Gibberella pulicaris* apenas se encontraram diferenças significativas do crescimento do fungo patogénico em relação ao controlo, não se verificando diferenças significativas no raio de crescimento entre os vários volumes. Para *Alternaria carthami*, para além de se evidenciarem diferenças significativas do raio de crescimento de *G. bidwellii* em relação ao controlo, também se verificou uma diferença significativa entre os volumes de 75 μ l e de 200 μ l. No caso de *Alternaria sp. 2* e *Alternaria tenuissima* as diferenças significativas surgem no raio de crescimento de *G. bidwellii* para os volumes de 100 μ l e 200 μ l em relação ao controlo e também com os volumes de 75 μ l e de 200 μ l entre si, para os dois fungos e entre os volumes 100 μ l e 200 μ l apenas para *Alternaria tenuissima*.

O cálculo da percentagem de inibição foi feito através da fórmula apresentada no ponto 3.5.1, para os fungos para os vários volumes dos fungos endofíticos que apresentaram inibição (tabela 11). O fungo endofítico com maior percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii* é *Alternaria tenuissima* para um volume de 200 μ l, com

17,3%. Verifica-se no entanto que o fungo *Gibberella pulicaris* têm também uma taxa de inibição elevada para todos os volumes.

Tabela 11 – Percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii* nos vários volumes do teste dos compostos não voláteis.

Fungo endofítico	% Inibição		
	75 µl	100µl	200µl
<i>E. nigrum 2</i>	0,9	3,9	6,1
<i>Alternaria sp. 2</i>	2,1	9,1	14,2
<i>A. tenuissima</i>	6,1	11,2	17,3
<i>A. carthami</i>	3,9	9,1	14,2
<i>Athelia bombacina</i>	0,0	3,0	3,0
<i>Gibberella pulicaris</i>	12,1	17,3	16,1



5 – DISCUSSÃO

O controlo de doenças das plantas causadas por fungos, usando microrganismos não patogénicos que ocorrem naturalmente nas plantas, representa uma abordagem promissora no controlo de doenças e uma alternativa atrativa aos fungicidas químicos. Estes microrganismos, em particular os fungos endofíticos colonizam as plantas sem lhes causar nenhum sintoma aparente de doença podendo mesmo ter efeitos benéficos no crescimento das plantas, quer indiretamente, tornando-as menos suscetíveis a ataques de patogénios quer diretamente, protegendo-as pelo efeito antagonista dos endófitos nos agentes causadores das doenças (Alabouvette *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006; Aly, 2011).

Selecionaram-se para este estudo 16 isolados de fungos endofíticos de videira, cuja identificação molecular mostrou que 15 pertencem à Divisão Ascomycota. Segundo a bibliografia, a maioria das espécies de fungos endofíticos pertence à Divisão Ascomycota, não sendo exceção os que colonizam a videira, como é demonstrado por este estudo e corroborado por outros autores (Gunatilaka, 2006; Casieri, 2009; Rodriguez & Redman, 2008; González & Tello, 2011;).

Os resultados obtidos na identificação dos fungos endofíticos, mostraram que 44% pertencem ao género *Epicoccum* e 25% pertencem ao género *Alternaria* representando estes dois géneros a maioria dos isolados testados, o que está de acordo com vários estudos desenvolvidos, onde os géneros *Epicoccum* e *Alternaria* são identificados com frequência como endófitos de videira (González & Tello, 2011; Pancher *et al.*, 2012; Martini *et al.*, 2009; Shmid *et al.*, 2011), assim como de outras plantas, como a oliveira (Landum *et al.*, 2016).

Apesar de se terem utilizado apenas 16 isolados neste estudo, foi possível identificar 9 OTUs, podendo-se afirmar, com os resultados obtidos, que a videira parece apresentar uma elevada diversidade de microrganismos endofíticos.

Estudos anteriores (González & Tello, 2011) indicam que as plantas de videira albergam uma elevada diversidade de microrganismos endofíticos e que a maior parte dos fungos obtidos são espécies frequentes, sugerindo que a maior parte da comunidade endofítica desta cultura é dominada por um grupo relativamente constante de espécies, em vez de espécies mais raras. Também neste estudo se pode considerar essa hipótese, uma vez que cerca de quase metade dos isolados identificados pertencem ao género *Epicoccum* e dentro deste, cinco são da espécie *E. nigrum*. Assim como se identificaram quatro isolados do género *Alternaria*.

Um dos objetivos do trabalho consistia em avaliar as possíveis diferenças da comunidade endofítica de vinhas com tratamentos fitossanitários em modo de proteção integrada e em modo de proteção biológica, uma vez que está descrito que o modo de proteção fitossanitária da videira, com produtos químicos de síntese ou com produtos do modo de tratamento biológico, afeta a comunidade microbiológica das plantas, especialmente os fungos (Schmid *et al.*, 2011). Pode-se verificar que as espécies de fungos endofíticos isolados no modo de proteção integrada da vinha foram diferentes das isoladas no modo de tratamento biológico. Foi ainda observada uma menor diversidade ao nível do género no modo de proteção integrada, onde há claramente uma predominância dos géneros *Epicoccum* e *Alternaria* (figura 18). A menor diversidade de fungos endofíticos em modo de proteção integrada era expectável, podendo estar associada ao uso contínuo de fungicidas de síntese química neste modo de tratamento. Estes produtos são apontados como causadores do decréscimo da biodiversidade dos sistemas agrícolas pelo que, quando usados continuamente, podem ter influência na composição da comunidade microbiológica, enquanto os produtos usados em modo de proteção biológica são menos agressivos para o meio ambiente e logo para os microrganismos (Schmid *et al.*, 2011; Pancher *et al.*, 2012). Por outro lado, o uso de fertilizantes orgânicos em vinhas em modo de produção biológica pode ser uma fonte de microrganismos que se estabelecem na videira como endófitos (Pancher *et al.*, 2012).

O papel dos fungos endofíticos associados a plantas lenhosas perenes, como a videira pode ser complexo, já que estes podem viver toda ou parte do seu ciclo de vida dentro dos tecidos das plantas sem lhes causar sintomas, quer como patogénios em estado latente, quer como saprófitas em dormência (Wilson, 1995). O tipo de interação que se estabelece entre o fungo endofítico e a planta é geralmente mutualista, mas também pode tornar-se parasita originando doença na planta hospedeira. Pensa-se que a interação mutualista seja o resultado de um equilíbrio estabelecido entre a resposta de defesa da planta à invasão do fungo e a virulência ou as necessidades nutricionais do endófito, bem como das condições ambientais onde decorre a interação. Se este equilíbrio for perturbado por qualquer razão surgem sintomas de doença na planta ou o fungo é excluído devido a reações de defesa da planta (Schulz & Boyle, 2006). Existe uma plasticidade no tipo de interação que os fungos realizam com as plantas, onde tanto patogénios, quanto mutualistas e saprófitas penetram nos tecidos vegetais e permanecem latentes como uma estratégia para captar nutrientes do hospedeiro (Rodriguez & Redman, 2008)

O fungo *Botrytis cinerea*, considerado um importante agente patogénico das videiras foi identificado como endofítico em dois isolados neste estudo. Uma vez que as plantas usadas neste trabalho não manifestavam sintomas de nenhum tipo de doença, pode-se assumir a presença da *Botrytis cinerea* como um patogénio latente, que se comporta como endofítico da planta e que apenas se poderá tornar patogénico perante condições fisiológicas e ambientais específicas. A ocorrência deste fungo como endofítico da videira já foi reportada noutros estudos (Casieri *et al.*, 2009; Gonzalez & Tello, 2011; Pancher *et al.*, 2012). Curiosamente, ao contrário de outros estudos, onde este agente patogénico foi isolado mais frequentemente em vinhas em modo de proteção integrada (Pancher *et al.*, 2012), neste caso os dois isolados de *Botrytis cinerea* foram obtidos de vinhas em modo biológico. Uma justificação para isso pode ser o facto de este modo de proteção das vinhas ser muito restrito no uso de produtos químicos de síntese, o que permite a existência de todo um ecossistema mais equilibrado, proporcionando benefícios para as plantas, nomeadamente ao nível da biodiversidade microbiana, onde possam existir fungos patogénicos latentes em equilíbrio com outros fungos e que podem nesta condição assegurar alguma proteção nas plantas.

O género *Phoma* está geograficamente difundido e consiste num grande grupo de fungos que se encontram em vários nichos ecológicos. Os fungos pertencentes a este género possuem, para além de algumas espécies saprófitas, outras que também constituem agentes patogénicos importantes. Em particular o fungo *Phoma exigua* foi descrito não só como patogénico para as plantas como também para humanos. Ainda assim, a maioria das espécies, aparenta apenas colonizar os tecidos das plantas e em alguns casos a natureza patogénica de fungos do género *Phoma* é considerada útil para possíveis agentes de controlo biológico de outros patogénios de plantas (Aveskamp *et al.*, 2008; González & Tello, 2011). Na videira algumas das espécies do género *Phoma* reconhecidas como patogénicas, foram isoladas de troncos de plantas com sintomas necróticos (Machowicz-Stefaniak & Król, 2006). No que diz respeito ao fungo *Phoma exigua* não foi encontrado nenhum estudo que relacione esta espécie com doenças da videira e a presença de espécies do género *Phoma* como endofíticos na videira já foi descrita por vários autores (Casieri *et al.*, 2009; Gonzalez & Tello, 2011; Pancher *et al.*, 2012).

Tal como no caso de *Botrytis cinerea*, as espécies de *Phoma* isoladas de plantas assintomáticas (Pancher *et al.*, 2012) pertencem a vinhas em modo de proteção integrada, contrariamente ao que acontece neste estudo, onde o fungo *Phoma exigua* foi

identificado em plantas em modo de tratamento biológico, o que permite mais uma vez colocar a hipótese de que existe um maior equilíbrio na comunidade microbiana destas plantas.

Uma vez que as comunidades de fungos endofíticos geralmente demonstram ter especificidade do hospedeiro ao nível de espécies de plantas, o que pode ser influenciado pelo microhabitat e microclima (Saikkonen, 2007), as diferenças obtidas no tipo de fungos encontrados no modo de proteção integrada e modo biológico, em relação à literatura podem estar relacionadas com vários fatores, nomeadamente com as variações geográficas (Martini *et al.*, 2009; González & Tello, 2011), e dentro destas o tipo de terroir e o tipo de clima, com as castas utilizadas e também com a metodologia adotada em cada estudo (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012; Pancher *et al.*, 2012).

O fungo *Gibberella pulicaris* foi identificado na endosfera da videira pela primeira vez por Pancher *et al.* (2012), apesar de outros autores já terem isolado outras espécies do género *Gibberella* em estudos de fungos endofíticos da videira (González & Tello, 2011; Núñez-Trujillo *et al.*, 2012;). Este fungo é um conhecido fungo saprófita do solo e patogénio das plantas (Beremand *et al.*, 1991), mas não se encontram estudos que o relacionem como patogénico para a videira.

Nas plantas em modo de proteção integrada os fungos isolados pertencem (com exceção de *Athelia bombacina*) aos géneros *Alternaria* (*Alternaria* sp., *Alternaria carthami* e *Alternaria tenuissima*) ou *Epicoccum* (*Epicoccum nigrum* e *Epicoccum* sp.). *E. nigrum* é um fungo que coloniza várias plantas e é saprófita dos tecidos mortos destas. As espécies do género *Epicoccum* são conhecidas por produzirem vários metabolitos secundários com atividade antibiótica (Martini *et al.*, 2009; Kalinák *et al.*, 2013; Fatima *et al.*, 2016) e atividade antifúngica contra vários fungos patogénicos da videira, tais como *Plasmopara viticola* (Kortekamp, 1997) e *Botrytis cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006).

Os fungos pertencentes ao género *Alternaria* são descritos como promissores agentes de controlo biológico contra fungos patogénicos da videira como *Plasmopara viticola* (Musetti *et al.*, 2006). Os fungos pertencentes a este género são saprófitas, endofíticos e patogénicos, vastamente distribuídos no solo e em matéria orgânica em decomposição (Polizzotto *et al.*, 2012). Neste estudo foi possível identificar duas espécies de *Alternaria*, *Alternaria tenuissima* e *Alternaria carthami*. Em 2 outros isolados não foi possível chegar à espécie. A identificação de *Alternaria tenuissima* na endosfera da videira já foi relatada por outros autores (González & Tello, 2011; Núñez-Trujillo *et al.*,

2012), porém não foram encontradas referências ao isolamento da espécie *Alternaria carthami*.

O fungo *Athelia bombacina* pertence à Divisão Basidiomycota, sendo que fungos desta Divisão são menos frequentemente isolados da endosfera da videira (González & Tello, 2011; Casieri, 2009), talvez por isso não foi possível encontrar referências na literatura deste fungo isolado como endofítico da videira. Contudo foi referenciado com sucesso por Heye & Andrews (1982) como antagonista do agente patogénico da macieira, *Venturia inaequalis*.

É interessante constatar que os fungos endofíticos mais estudados como promissores antagonistas e agentes de controlo biológico, espécies dos géneros *Alternaria* e *Epicoccum*, integram neste estudo 11 dos 16 fungos isolados, indicando que a comunidade endofítica da videira pode ser uma fonte útil para o controlo biológico de doenças desta cultura.

Existem estudos que evidenciam diferenças na comunidade de fungos endofíticos de diferentes cultivares de videira. Casieri *et al.* (2009) e González & Tello (2011) referem que o número e composição das OTUs isoladas diferem entre as castas analisadas.

As variedades Alicante Bouschet e Syrah apresentam entre si a maior semelhança de espécies de fungos endofíticos isolados e a menor diversidade dentro da própria casta, enquanto a casta Cabernet Sauvignon, contrariamente ao descrito por González & Tello (2011), é aquela que apresenta maiores diferenças dentro da própria casta e entre castas. As características de cada casta em termos de teor de açúcares, pH, acidez e compostos fenólicos podem justificar as diferenças na comunidade endofítica. Contudo, considerando que o microclima e o microhabitat dentro de cada planta também têm influência, as diferenças encontradas entre castas, não se justificam apenas por diferenças genéticas mas também por fatores externos (Saikkonen, 2007). Casieri *et al.* (2009) refere também que o facto de as castas terem origem em diferentes viveiros pode justificar as diferenças de microrganismos endofíticos encontrados.

É importante referir que neste trabalho não foram encontradas algumas espécies de fungos patogénicos da videira, tais como os agentes causais da Esca, doença de Pierce e Escoriose, ao contrário de outros estudos, onde é frequente o isolamento destes fungos (Gonzalez & Tello, 2011).

As propriedades antagonistas dos microrganismos que atuam como agentes de controlo biológico são baseadas em vários mecanismos que envolvem a competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo e antibiose (produção de metabolitos

secundários/compostos voláteis) e que pode afetar o agente patogénico ou promover o crescimento das plantas hospedeiras ou ainda ativar mecanismos de defesa nestas (Heydari & Pessarakli, 2010). Geralmente os modos de ação dos microrganismos não ocorrem de forma isolada mas sim em simultâneo.

No teste de antagonismo direto efetuado neste trabalho verificou-se que no 2º dia do teste, nenhum fungo endofítico mostrava a capacidade antagonista de inibir o crescimento de *G. bidwellii* e uma vez que os mecanismos de inibição podem envolver as várias formas acima referidas no 2º dia do teste a proximidade dos dois fungos na placa de Petri poderia ser insuficiente para se verificar qualquer um dos mecanismos de inibição, não se verificando assim qualquer antagonismo.

Os resultados do cálculo de inibição deste teste de antagonismo mostram que são os fungos *Botrytis cinerea* 1 e 2, com percentagens de inibição de 82,7% e 67,9%, respetivamente, que têm um maior efeito antagonista contra o fungo *G. bidwellii*, mostrando a capacidade de inibir o crescimento deste a partir do 4º dia do teste de antagonismo. As diferentes capacidades antagonistas (82,7% e 67,9%) das duas espécies de *Botrytis cinerea* podem ser justificadas pelas diferenças dos dois isolados, não só as visuais mas também as diferenças nucleotídicas das sequências (duas na região ITS).

O fungo *Botrytis cinerea* é amplamente conhecido pelo seu carácter fitopatogénico, cuja “habilidade” saprófita e versatilidade nutricional lhe induz vantagens de sobrevivência (Jaspers *et al.*, 2013). É possível que seja essa a razão pela qual tem a capacidade de inibir eficazmente o crescimento de *G. bidwellii*, ou seja como fungo endofítico, a sua habilidade antagonista pode advir da competição por espaço e nutrição, esgotando estes recursos, que são fatores limitantes para o estabelecimento de qualquer fungo e logo impedindo o crescimento de *G. bidwellii* (Alabouvette *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010).

O fungo *Athelia bombacina*, com a terceira maior percentagem de inibição, 60,1%, tem também um rápido crescimento em relação ao fungo patogénico inibindo o crescimento deste logo a partir do 5º dia. Também tem a capacidade de colonizar o meio de cultura promovendo uma proximidade física com *G. bidwellii* e competindo com esta, também, por espaço e nutrientes.

Heydari & Pessarakli (2010) mostraram que microrganismos não patogénicos associados a plantas, geralmente protegem os hospedeiros porque conseguem uma rápida colonização, esgotando os recursos nutricionais muitas vezes limitados, não permitindo que estes sejam acessíveis para o crescimento dos agentes patogénicos.

Todavia o facto de estes endófitos inibirem o crescimento de *G. bidwellii* logo a partir do 4º e do 5º dia, antes de haver contacto físico das hifas de crescimento dos dois fungos pode sugerir que o modo de ação antagonista acontece, não só pelo esgotamento dos recursos nutricionais de espaço, como também pela produção de certos metabolitos por parte dos fungos endofíticos, em vez de apenas competição ou parasitismo.

O teste de inibição direta permitiu definir diferentes tipos de interação entre os fungos (potencial antagonista x patogénio). A interação do tipo A entre o fungo patogénico e o fungo antagonista é definida quando há inibição do crescimento do patogénio por contacto com o antagonista, onde este tem uma velocidade de crescimento muito elevada, quando comparada com a velocidade de crescimento do fungo patogénico. Os dois fungos endofíticos identificados como *Botrytis cinerea*, assim como o fungo *Athelia bombacina*, mostraram este comportamento. Este tipo de interação reforça a ideia de que a rápida colonização do meio por parte dos fungos endofíticos é, em parte, responsável pela inibição do crescimento do fungo patogénico e que o mecanismo de ação antagonista por competição de espaço é usado por estes fungos endofíticos.

É interessante verificar que os fungos *E. nigrum* 1, *E. nigrum* 2, *E. nigrum* 3, *E. nigrum* 4 e *E. nigrum* 5, apesar de pertencerem todos à mesma espécie apresentam comportamentos antagonistas ligeiramente diferentes com percentagens de inibição a variar no intervalo de 46,3% a 54,2%. Estas diferenças podem ser justificadas pela elevada variabilidade genética encontrada entre isolados do fungo *E. nigrum*, descrita em vários estudos (Arenal *et al.*, 1999; Martini *et al.*, 2009). Neste caso, apenas se encontrou uma diferença nucleotídica do fungo *E. nigrum* 4, em relação aos restantes, na região ITS amplificada, no entanto poderão existir outras diferenças genéticas, noutras regiões do genoma dos fungos, o que poderá também justificar as diferenças visuais avaliadas no início do trabalho prático e que influenciaram o processo de escolha das amostras de fungos endofíticos isolados das plantas de videira, para serem testados como possíveis antagonistas de *G. bidwellii*.

É importante, no entanto salientar que todos os fungos pertencentes ao género *Epicoccum*, apresentam atividade antagonista contra *G. bidwellii*, assim como todos os fungos do género *Alternaria*, embora com percentagens de inibição do crescimento do fungo patogénico variáveis, tal como descrito para outros fungos fitopatogénicos (Kortekamp, 1997; Elmer & Reglinski, 2006; Musetti *et al.*, 2006).

Todos os fungos do género *Epicoccum* isolados neste trabalho, com exceção de *E. nigrum* 2, apresentam uma interação do tipo C com o fungo *G. bidwellii*, na qual se

descreve uma inibição mútua dos 2 fungos, com as hifas de crescimento separadas por uma distância inferior a 0,2 cm. Apesar de os fungos se tocarem, não há sobreposição de nenhum deles, mantendo-se o seu crescimento inalterado, o que mostra que há efetivamente um antagonismo mútuo e que os fungos endofíticos conseguem impedir a propagação do fungo patogénico, mais uma vez por competirem por espaço e nutrientes. Os fungos *Gibberella pulicaris*, *Alternaria sp.1* e *Alternaria sp. 2*, também apresentaram este tipo de interação com *G. bidwellii*.

Os fungos com as menores percentagens de inibição do crescimento de *G. bidwellii* foram *Phoma exigua*, *Alternaria carthami*, *Alternaria tenuissima* e *E. nigrum 2*, cujo tipo de interação com o patógeno é classificada do tipo D, onde ocorre uma inibição mútua do crescimento, mas neste caso os fungos nunca se tocam e têm as hifas de crescimento separadas por uma distância superior a 0,2cm. Devido ao facto de não haver contacto físico entre os fungos, é possível excluir um mecanismo de parasitismo por contacto (Musetti *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010). e assumir que o modo de ação inibidora destes fungos é maioritariamente pela produção de metabolitos inibidores para o fungo patogénico.

Pela observação da árvore filogenética que coloca os fungos do género *Epicoccum* muito próximos ao fungo *Phoma exigua* poder-se-ia esperar algumas semelhanças no tipo de antagonismo destes fungos. Todavia os resultados mostram comportamentos diferentes entre eles, com semelhança apenas com o fungo *E. nigrum 2*, em termos de interação com o fungo patogénico e capacidade de inibir o crescimento deste.

Os fungos do género *Alternaria* mostram também diferenças entre si na capacidade antagonista contra *G. bidwellii*, e no tipo de interação que estabelecem com este, como foi acima mencionado.

Schmid *et al.*, (2011) mostraram que o modo de proteção das vinhas tem influência na comunidade microbiológica associada às videiras, como também foi possível constatar neste estudo. Esta influência não é só ao nível do número e diversidade de fungos, mas também ao nível do papel que estes possam desempenhar. Estes autores verificaram que os fungos isolados de plantas em modo de proteção biológica possuem um caráter mais antagonista contra agentes patogénicos do que os fungos isolados de plantas em modo de proteção integrada. Isto está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho em que se verificou que os fungos com maior capacidade antagonista e inibição do crescimento de *G. bidwellii*, nomeadamente *Botrytis cinerea 1*, *Botrytis cinerea 2* e

Gibberella pulicaris, foram isolados de plantas de videira em modo de proteção biológico.

Como já foi referido anteriormente, o mecanismo subjacente ao antagonismo dos microrganismos endofíticos em relação a agentes fitopatogénicos e consequente controlo das doenças por estes causadas pode envolver várias formas. Muitas das vezes associado à competição pelo espaço e pelos nutrientes os microrganismos endofíticos têm a capacidade de produzir metabolitos que são eficazes na supressão dos agentes patogénicos (Alabouvette *et al.*, 2006; Heydari & Pessaraki, 2010). Desta forma, compreender o mecanismo de ação destes microrganismos é importante no sentido em que pode dar muita informação útil para se determinar a implementação do controlo biológico das doenças das plantas.

A análise dos compostos voláteis produzidos por fungos é referenciada e descrita em vários estudos de controlo de agentes patogénicos por microrganismos endofíticos, em particular fungos (Ajith & Lakshmidhevi, 2010; Dolatabadi *et al.*, 2012; Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Thakkar & Meenu, 2015; Landum *et al.*, 2016;).

Neste teste todos os fungos, com exceção de *Botrytis cinerea* 1 e *Botrytis cinerea* 2, tiveram a capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii*, indicando que houve a libertação de compostos voláteis com propriedades antimicrobianas, embora a atividade antifúngica dos metabolitos voláteis tenha sido variável. De facto, 94% dos fungos endofíticos estudados neste trabalho pertencem à Divisão Ascomycota, cujos fungos são conhecidos como ativos produtores de metabolitos secundários com propriedades antimicrobianas (Gunatilaka, 2006). As espécies do género *Alternaria* e *Epicoccum* são largamente descritas pela produção de metabolitos que exibem uma variedade de atividades biológicas, nomeadamente, antimicrobianas (Lou *et al.*, 2013; Fatima *et al.*, 2016).

Ao contrário do que se verificou no teste de antagonismo direto, onde a partir de determinado dia todos os fungos endofíticos conseguiram inibir o crescimento do patogénio, no teste dos compostos voláteis os fungos *Botrytis cinerea* 1 e 2, não tiveram capacidade de inibir o crescimento de *G. bidwellii*, tendo esta crescido até aos limites da placa de Petri, ocupando todo o espaço desta.

A comparação da percentagem de inibição obtida nos testes de antagonismo direto e dos compostos voláteis (figura 31), calculada para cada fungo endofítico permite constatar que todos os valores obtidos são mais baixos no teste dos compostos voláteis, com exceção do fungo *Alternaria tenuissima*, para todos os fungos endofíticos estudados.

Embora os fungos tenham conseguido inibir o crescimento do fungo patogénico, (com as exceções de *Botrytis cinerea* 1 e 2), a inibição por emissão de compostos voláteis, de um modo geral, foi menos eficaz do que a inibição por antagonismo direto.

É interessante verificar que os fungos como *Botrytis cinerea* 1 e *Botrytis cinerea* 2, que se apresentaram como melhores antagonistas no teste de inibição direta, conseguindo inibir o crescimento de *G. bidwellii* até cerca de 80%, são aqueles que não tem qualquer capacidade de produzir compostos voláteis capazes de impedir o crescimento do fungo patogénico. Por outro lado o fungo *Alternaria tenuissima* foi um dos menos eficazes na inibição do crescimento de *G. bidwellii* por antagonismo direto e no teste dos compostos voláteis apresentou uma das mais elevadas taxas de inibição. Estes resultados sugerem que, embora os fungos possam ter várias estratégias de competição, para alguns deles parece existir uma que é dominante.

Os compostos orgânicos voláteis produzidos pelos fungos endofíticos foram estudados por GC-MS e verificou-se que a maior parte dos compostos prováveis identificados são produzidos por fungos durante o seu metabolismo primário e/ou secundário e que alguns deles têm propriedades antimicrobianas, tais como o benzaldeído, 1,8-cineole, acetato de 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e derivados de ácido propanóico (Morath *et al.*, 2012; Suciati Mih & Rahmansyah, 2013; Landum *et al.*, 2016) Foi possível verificar que todos os fungos produziram algum dos compostos acima descritos (anexo II). No entanto, as diferenças que se observam na capacidade de inibição de cada fungo mesmo produzindo compostos voláteis com propriedades antimicrobianas pode dever-se à quantidade de composto produzida por cada um. Neste estudo não se procedeu à quantificação dos compostos orgânicos voláteis, identificando-se apenas se os fungos endofíticos produziram metabolitos voláteis com propriedades antimicrobianas.

Por isso, apesar dos fungos *Botrytis cinera* 1 e 2 terem uma composição volátil onde se encontram substâncias descritas como antimicrobianas como por exemplo o benzaldeído, 3-metil-1-butanol e derivados de ácido propanóico, a quantidade produzida poderá não ser suficiente para inibir o crescimento de *G. bidwellii*, o que se verificou, uma vez que estes fungos não tiveram a capacidade de inibir o crescimento do fungo patogénico. Morath *et al.*, (2012) referem que o efeito antifúngico é conseguido pela mistura de vários compostos orgânicos voláteis e quando estes são usados separadamente o efeito antifúngico não se verifica. A sinergia dos compostos voláteis identificados pode ter influência na inibição do crescimento do patogénio.

O composto 1,8-cineole é descrito por Morath *et al.* (2012) como antifúngico e foi detetado na amostra de *E. nigrum* 2. Apesar de não ser o fungo com a maior percentagem de inibição do crescimento de *G. bidwellii*, este têm a capacidade de inibir o crescimento desta no teste dos compostos voláteis. O tipo de interação deste fungo com o patogénio foi classificado como do tipo D, sugerindo que este fungo pode ter capacidade antagonista por competição, mas o facto de nunca se tocarem e de ter sido detetado este composto antifúngico na amostra de *E. nigrum* 2, mostra que a produção de metabolitos voláteis também contribui para a inibição de *G. bidwellii*.

O composto acetato de 3-metil-1-butanol é também referido como tendo propriedades antifúngicas (Morath *et al.*, 2012) e apenas foi detetado na amostra do fungo *Athelia bombacina*, pelo que o mecanismo de ação deste fungo e a capacidade de inibir o crescimento do patogénio desde o 5º dia do teste de antagonismo direto pode ser devido à produção deste composto. Este fungo é o que apresenta a composição volátil mais variada de todos os fungos endofíticos. Foram detetados na amostra compostos terpénicos que não foram detetados em nenhuma outra amostra, assim como outras moléculas que são exclusivamente produzidas por este fungo. As diferenças nos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Athelia bombacina* em relação aos fungos endofíticos podem dever-se ao facto deste fungo ser o único da Divisão Basidiomycota. Heye & Andrews (1983) referem que contrariamente a outros fungos antagonistas desta Divisão, cujo mecanismo de ação se caracteriza por parasitismo, *Athelia bombacina* atua maioritariamente por competição e antibiose, tal como se verifica no antagonismo contra *G. bidwellii*.

Os fungos da espécie *E. nigrum* apresentam diferenças entre si no que diz respeito à composição volátil de cada um, valorizando que apesar de serem da mesma espécie, a variabilidade genética faz com que tenham diferenças, que se traduzem na sua morfologia, assim como no seu carater antagonista.

Para além dos compostos orgânicos voláteis, durante o metabolismo dos fungos são produzidos outros metabolitos secundários que englobam um conjunto diversificado de produtos de baixo peso molecular, mas que ainda assim tem pesos moleculares superiores aos compostos orgânicos voláteis. A inibição do crescimento de *G. bidwellii* por produção de metabolitos secundários foi verificada no teste dos compostos não voláteis.

Constatou-se que os metabolitos secundários não voláteis dos fungos endofíticos mostraram-se menos eficazes na supressão do crescimento de *G. bidwellii* do que os

compostos voláteis, uma vez que dos 16 fungos testados apenas 6 conseguiram inibir o crescimento do fungo patogénico através destes compostos, *Epicoccum* sp.2, *Alternaria* sp. 2, *A. tenuissima*, *A. carthami*, *Athelia bombacina* e *Gibberella pulicaris*. Nos restantes fungos não houve qualquer tipo de inibição, com o fungo patogénico a crescer até aos orifícios com o meio líquido onde o fungo endofítico cresceu, tal como no controlo (apenas com meio de cultura PDB).

Os fungos com maiores percentagens de inibição no teste dos não voláteis foram *Alternaria tenuissima* e *Gibberella pulicaris*, com 17,27% e 16,06%, respetivamente e para o maior volume de solução de fungo utilizada (200µl). Mais uma vez foi visível por este teste que *Alternaria tenuissima*, pôde não ter a maior capacidade de inibição de *G. bidwellii* quando confrontada diretamente no teste de antagonismo direto, mas foi capaz de produzir metabolitos voláteis e não voláteis com capacidade de inibir o crescimento desta. O fungo *Gibberella pulicaris*, pelo contrário apresenta capacidade de inibir o crescimento em todos os testes permitindo especular sobre o seu maior potencial como antagonista de agentes patogénicos. Uma vez que apenas se encontrou um trabalho com a identificação desta espécie como endofítico da videira, seria interessante poder explorar a sua presença em plantas de vinhas com diferentes localizações, clima e idades e avaliar a capacidade antagonista deste fungo contra outros agentes patogénicos. Também o fungo *Athelia bombacina* apresenta resultados interessantes, uma vez que conseguiu inibir o crescimento de *G. bidwellii* em todos os testes.

Dos 4 isolados de fungos endofíticos do género *Alternaria*, 3 deles foram eficazes na inibição de *G. bidwellii* por produzirem metabolitos secundários com atividade antifúngica, o que está de acordo com recentes estudos que mostram que fungos deste género produzem vários metabolitos com esta capacidade (Lou *et al.*, 2013).

Apesar de se reportar que os fungos do género *Epicoccum* são também uma fonte de metabolitos secundários bioativos (Fatima *et al.*, 2016), neste teste apenas o fungo *Epicoccum* sp. 2 produziu compostos que inibiram o crescimento do patogénio. Contudo no teste dos compostos voláteis todos os fungos deste género tiveram a capacidade de produzir metabolitos voláteis e inibiram o crescimento de *G. bidwellii*.

A falta de resultados nos outros fungos endofíticos testados pode ser devido à não produção de metabolitos secundários com atividade antimicrobiana em geral ou em particular contra o fungo *G. bidwellii*. Tal como se verifica com os compostos orgânicos voláteis, também pode acontecer que os metabolitos secundários não sejam produzidos em quantidade suficiente para inibir o crescimento do patogénio.

As diferentes quantidades de suspensões de fungos utilizadas traduziram-se em diferentes percentagens de inibição, verificando-se que com o aumento do volume de solução de fungo aplicada houve um aumento da percentagem de inibição, exceto para o fungo *Athelia bombacina*, onde a percentagem se manteve igual, tanto com o volume de 100µl como 200µl e no fungo *Gibberella pulicaris* onde houve mesmo uma pequena diminuição de inibição do volume de 100µl para o volume de 200µl.

Analisando o conjunto dos resultados em geral pode se afirmar que os mecanismos de ação dos fungos endofíticos como antagonistas de fungos patogénicos, não são isolados, mas acontecem de uma forma conjunta, por competição e produção de metabolitos voláteis e/ou não voláteis. Assim para melhorar a eficácia do controlo biológico seria útil associar diferentes microrganismos, para assegurar diversos modos de ação.



6 – CONCLUSÃO

Os fungos patogénicos causam sérios problemas a nível mundial em culturas economicamente muito importantes e são usualmente controlados pelo uso de fungicidas químicos. Contudo o uso excessivo destes tem causado uma deterioração da saúde humana, poluição do meio ambiente e desenvolvimento de resistências dos organismos patogénicos aos fungicidas. Por causa destes problemas é necessária uma pesquisa para identificar métodos alternativos para a proteção das plantas que sejam menos dependentes de produtos químicos e mais seguros para o ambiente e saúde. Desta forma o controlo biológico mostra-se ser uma estratégia, uma vez que visa manter um balanço nos agro-sistemas, através da ação antagonista dos microrganismos contra os patogénios das plantas hospedeiras.

Os fungos endofíticos caracterizam-se por colonizarem inter e intracelularmente os tecidos internos das plantas, durante o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causarem sintomas aparentes de doença no hospedeiro. Estes fungos têm despertado o interesse da comunidade científica por representarem um grupo vasto de microrganismos com a capacidade de controlar outros fungos patogénicos causadores de doenças nas plantas, quer pelo seu caráter antagonista e eficácia na competição pelo espaço e nutrientes disponíveis, quer pela produção de compostos bioativos, com propriedades antibióticas e antifúngicas.

Este trabalho permitiu avaliar a diversidade de fungos endofíticos na videira e verificar as diferenças e/ou semelhanças da comunidade endofítica entre plantas cultivadas em modo de proteção integrada e plantas cultivadas em modo biológico. Permitiu ainda avaliar a capacidade antagonista dos fungos endofíticos isolados contra o agente causador da podridão negra da videira, o fungo *Guignardia bidwellii*.

Com os resultados obtidos foi possível concluir que a videira apresenta uma grande diversidade de fungos endofíticos e que nas plantas em modo de proteção integrada esta diversidade é menor do que nas plantas em modo biológico, sugerindo que o uso continuado de produtos químicos de síntese nos tratamentos fitossanitários tem influência na comunidade microbiana das plantas.

Todos os fungos endofíticos apresentaram atividade antagonista contra o fungo patogénico, impedindo o seu crescimento. Esta inibição verificou-se por competição de nutrientes e espaço entre os dois fungos e também pela produção de metabolitos com propriedades antimicrobianas por parte dos fungos endofíticos. Assim os resultados obtidos evidenciam o potencial antimicrobiano de espécies fúngicas endofíticas da videira no controlo do fungo fitopatogénico *G. bidwellii*.

A aplicação de microrganismos endofíticos para o controlo de fungos patogénios das plantas apresenta resultados promissores, contudo a interferência de fatores externos, tais como as condições ambientais verificadas em diferentes regiões, as interações com outras plantas e espécies microbianas, os modos de ação dos microrganismos endofíticos e a interação com a planta hospedeira são fatores ainda limitantes na aplicação dos microrganismos endofíticos no controlo biológico e são necessários mais estudos de forma a ultrapassar estas limitações e para o desenvolvimento de métodos para a efetiva aplicação no campo.



REFERÊNCIAS

Agrios G, 2005, Plant Pathology, 5ª Edição, Department of Plant Pathology, University of Florida, USA.

Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C., 2006, Biological control of plant diseases: the European situation, *European Journal of Plant Pathology*, 114:329-341.

Aldrich T.J., Rolshausen P.E., Roper M.C., Reader J.M., Steinhaus M.J., Rasicavoli J., Vosburg D.A., Maloney K.N., 2015, Radicin from *Cochliobolus* sp. inhibits *Xylella fastidiosa*, the causal agent of Pierce's Disease of grapevine, *Phytochemistry*, 116:130-137.

Aly A., Debbab A., Proksvch P., 2011, Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:1829-1845.

Ajith P.S. & Lakshmidhevi, 2010, Effect of volatile and Non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers, *Nature and Science*, 8(9).

Arnold A.E., Mejia L.C, Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A., 2003, Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 15649-15654.

Aveskamp M.M., De Gruyter J., Crous P.W., 2008, Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance, *Fungal Diversity*, 31: 1-18.

Azevedo J., Maccheroni W. Jr., Pereira J., Araújo W., 2000, Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants, *Electronic Journal of Biotechnology*, vol.3, nº1.

Beremand M.N., Desjardins A.E., Hohn T.M. VanMiddlesworth F.L., Survey of *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) for Mating Type Trichothecene Production, and Other Selected Traits, *Phytopathology*, 81:1452-1458.

Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C., Fontaine F., 2013, Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood, *Plant Pathology*, 62:243-265.

Cabral A., Prates A., Rego C., Natividade J., Maior J., Cavaco M., Reis P., Correia R., Nascimento T., Black rot – A Podridão Negra da Videira, *Cadernos Técnicos nº1, 2ª Edição*, Sustainia – Agricultura Sustentável, Lda.

Casieri L, Hofstetter V, Viret O, Gindro K., 2009, Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants, *Phytopathologia Mediterranea*, 48:73-83.

CVRA, 2016, Comissão Vitivinícola Regional Alentejana, <http://www.vinhosdoalentejo.pt>.

DGADR, 2016, Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, <http://www.dgadr.mamaot.pt>.

Delgado, R., 2010, 'Black rot' da videira e soluções Syngenta.

Demirci, E., Elif Dane, E., Eken, C., 2012, In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*, Turkish Journal of Biology, 35:457–462.

Dharmaputra, O., 2003. Antagonistic effect of three fungal isolates to aflatoxin-producing *Spergillum* spp., Biotropia, 21, 19–31.

Dennis C., Webster J., 1971, Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphal interaction, Transactions of the British Mycological Society, 57:363-369.

Dubos B, 1999, Maladies cryptogamiques de la vigne, Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne, Ed. Féret, Bordeaux, 174 pp.

Elmer, P.A.G. & Reglinski T., 2006, Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes, Plant Pathology, 55:155-177.

FAO, 2016, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/statistics/en/>.

Félix A., Cavaco M., 2009, Manual de Proteção Fitossanitária para Proteção Integrada e Agricultura Biológica da Vinha, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural.

Fischer M. & Kassemeyer H.-H., 2003, Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany, Vitis 42, 3:109-116.

Garrido J., Mota T., Pereira M.J. e Moura F., 2004, Manual Técnico, Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, Porto.

González V. & Tello M., 2011, The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain, Fungal Diversity, 47:29-42.

Gunatilaka A., 2006, Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence, Journal of Natural Products, 69, 509-526.

Harms M., Holz B., Hoffmann C., Lipps H.-P., Silvanus W. 2005, Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal agent of Black Rot on grapevine, in the vine growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany, In *International Symposium on Introduction and Spread of Invasive Species*, 9-11 June, Humboldt University, Berlin, Germany.

Hartley S.E & Gange A.C., 2009 Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context, *Annual Review of Entomology*, 54: 323-342.

Heydari A. & Pessarakli M., 2010, A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists, *Journal of Biological Sciences*, 10(4):273-290.

Heye C.C., Andrews J.H., 1983, Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*, *Phytopathology*, 73:650-654.

Historiaschistoria, 2016, Histórias com História, <http://historiaschistoria.blogspot.pt/>.

Hoffman L.E., Wilcox W.F., Gadoury D.M., Seem R.C., 2002, Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length, *Phytopathology*, 92: 1068-1076.

Hung R., Lee S., Bennett J.W., 2015, Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:3395-3405.

INE, 2011, Estatísticas Agrícolas 2010, Instituto Nacional de Estatística.

Infovini, 2016, O portal do vinho português, <http://www.infovini.com>.

IVV, 2014, Vinhos e Aguardentes de Portugal, Anuário 2014, Instituto da Vinha e do Vinho, IP.

IVV, 2016, Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., <http://www.ivv.min-agricultura.pt>.

Jaspers M.V., Seyb A.M., Trought M.C.T., Balasubramaniam R., 2013, Overwintering grapevine debris as an important source of *Botrytis cinerea* inoculum, *Plant Pathology*, 62:130-138.

Kalinák M., Barátová V., Gallová E., Ondrusová Z., Hudecová D., 2013, Secondary metabolite production of *Epicoccum* sp. isolated from lignite, *Acta Chimica Slovaca*, 6: 42-48.

Kogel K-H, Franken P., Huckelhoven R., 2006, Endophyte or parasite – What decides?, *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 358-363.

Kortekamp A., 1997, *Epicoccum nigrum* Link: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk.et Curt.) Berl.et De Toni?, *Vitis*, 36:215-216.

Landum M, Alho J, Rei F, Félix M, Varanda C, 2016, Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*, *Microbiological Research*, 183:100-108.

Larran S., Simón M.R., Moreno M.V., Santamarina Siurana M.P., Perelló A., 2016, Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease, *Biological Control*, 92:17-23.

Luo Z-P., Lin H-Y., Ding W-B., He H-L., Li Y-Z., 2015, Phylogenetic Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Tephrosia purpurea*, *Mycobiology*, 43:435-443.

Machowicz-Stefaniak Z. & Król E., 2007, Characterization of *Phoma negriana* Thüm., a new species from grapevine canes, *Acta Mycologica*, 42:113-117.

Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F., Osler R., 2009, DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*, *Plant Disease*, 93:993-998.

Martínez F.D, Santos M., Carretero F., Marín F., 2015, *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent, *Journal of the Science of Food Agriculture*.

Morath S.U., Hung R., Bennett J.W., 2012, Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potencial, *Fungal biology reviews*, 26:73-83.

Moricca S., Ragazzi A., 2008, Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*, *Phytopathology*, 98: 380-386.

Moricca S., Ginetti B., Ragazzi A., 2012, Species and organ specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks, *Phytopathologia Mediterranea*, 51: 587-598.

Musetti R., Vecchione A., Stringher L., Borselli S., Zulini L., Marzani C., D'Ambrosio M., Sanità di Toppi L., Pertot I., 2006, Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*, *Phytopathology*, 96:689-698.

Nighat F., Tariq I., Syed Aun M., Muniba J., Safia A., Saira A., Amara M., 2016, *Epicoccum* sp. an emerging source of unique bioactive metabolites, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 73:13-21.

Núñez-Trujillo G., Cabrera R., Burgos-Reyes R., Da Silva E., Giménez C., Andreea C., Nélide B., 2012, Endophytic fungi from *Vitis vinífera* L. isolated in Canary Islands and Azores as potential biocontrol agents of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16:1-6.

Oliveira A., Barata A., Prates A., Mendes F., Bento F., Cavaco M., 2014, *Proteção Integrada das Culturas*, Volume I – Conceitos e princípios, Ministério da Agricultura e do Mar, Direção-Geral de Alimentação e Veterinária.

OIV, 2015, State of the vitiviculture world market, International Organisation of Vine and Wine.

OIV, 2016, International Organisation of Vine and Wine, <http://www.oiv.int/>.

Pancher M., Ceol M., Corneo E., Longa C., Yousaf S., Pertot I., Campisano A., 2012, Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management, *Applied and Environmental Microbiology*, 78:4308-4317.

Penn State Extension, 2016, Fungicide Resistance, College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University.

Pezet, R. & Jermini, M., 1989, Le Black Rot de la vigne: Symptomes, epidemiologie et lute. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture* 67: 1378-1381.

Pearson R., & Goheen A., 1990, *Compendium of Grape Diseases*, APS Press, The American Phytopathological Society, USA.

Polizzotto R., Andersen B., Martini M., Grisan S., Assante G., Musetti R., 2012, A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines, *Journal of Microbiological Methods*, 88:162-171.

Rahmansyah S, Rahmansyah M., 2013, Endophytic Fungi Isolated from Mangrove Plant and have Antagonism Role Against Fusarium Wilt, *Journal of Agricultural & Biological Science*, 8:251-7.

Rego, C. & Oliveira, H., 2007, 'Black Rot' da videira causado por *Guignardia bidwellii*, Atas do 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora, 107-114.

Reynier A, 1986, *Manual de Viticultura*, 2º Edição, Publicações Europa-América.

Rodriguez R., Redman R., 2008, More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis, *Journal of Experimental Botany*, 59:1109-1114.

Rodriguez R, White J, Arnold A, Redman R, 2009, Fungal endophytes: diversity and functional roles, *New Phytologist*, 182:314-330.

Royse D. & Ries S., 1977, The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*, *Pythopathology*, 68:603-7.

Saikkonen K., Wäli P., Helander M., Faeth S.H., 2004, Evolution of endophyte-plant symbioses, *Trends in Plant Science*, 9:275-280.

Saikkonen K., 2007, Forest structure and fungal endophytes, *Fungal Biology Reviews*, 21: 67-74.

Schulz B., & Boyle C., 2006, *What are Endophytes?*, *Soil Biology*, Volume 9, *Microbial Root Endophytes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Schmid F, Moser G, Muller H, Berg G, 2011, Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents, *Applied and Environmental Microbiology*, 77:2188-2191.

Sofia J., Neves M., 2012, Resumos da “Jornada Técnica sobre Podridão Negra da Videira”, Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território, Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro.

Sosnowski M.R., Emmett R.W., Wilcox W.F., Wicks T.J., 2012, Eradication of black rot (*Guignardia bidwellii*) from grapevines by drastic pruning, *Plant Pathology*, 61: 1093-1102.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013, MEGA :6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2726.

Thakkar A. & Meenu S, 2015, Role of Volatile Metabolites from *T. citrinoviride* in Biocontrol of Phytopathogens, *International Journal of Research in Chemistry an Environment*, 5:86-95.

Torres M., & White J., 2012, Endophytic Fungi, Chapter 12, *Encyclopedia of Science & Technology*, Publisher: McGraw-Hill Education.

Wicht B., Petrini O., Jermini M., Gessler C., Broggin G., 2012, Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification, *Mycologia*, 104 (5).

Wilson D., 1995, Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition, *Oikos*, 73: 274-276.

White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MAG, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. Eds editor. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. p. 315–22.

Van Der Aa H.A, 1973, *Studies in Phyllosticta I*, *Studies in Mycology* 5: 1-110.

Viniportugal, 2016, <http://www.viniportugal.pt/>.



ANEXOS

ANEXOS I – Sequências dos produtos de amplificação da região ITS.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Alternariasp 2	ACAGCCTTGCTGAAATTATTCACCCCTTGTC	TTTTGCGTACTTCTTGTTTCTTGGTGGG	TTC	----	GCCACCACTAGGACA	A	ACATAAACCTTTTGTA			
Alternariasp 1
Alternariacarthami
Alternariatenuissima
Botrytis cinerea 2	GTGTA.TA.T.	T....TGC..TG.CGAGCTGCC..CGGGCC.T.TA.	----	T.G.G..T..CA....TC...T..					
Botrytis cinerea 1	TGTA.TA.T.A.T.	TGC..TG.CGAGCTGCC.CCGGGCC.T.TA.	----	T.G.G..T..CA....TC...T..					
Epicoccumsp 1		T...A.....A...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Epicoccumsp 2		.A.....A...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Epicoccumnigrum 4	C...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Epicoccumnigrum 5		C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..					
Epicoccumnigrum 3	G.CTGCT.CCTC.T...	A.....A...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Epicoccumnigrum 1	A...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Epicoccumnigrum 2	C...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....C.TTC.....C.....C..						
Gibberella pulvicaris	GTG.CATAC.TTTA...	TGCC.CG.CGGA..AGC.CCGT.CCTC..AACG	----	G..G	C.GG.C..C....TC.G.T..					
Phomaexigua	A...C..C.....C..C.....C..	----	G..GA.T.....	..T....C.....					
Athelia bombacina	.G.CT..C..CTT.AC.AG.GGAT...	AAGC...ACG.AAG.GC..G.T.CTACATA...TCAG.T.T.TGTT.CAT...C.CTTTAT...ACA...A.							

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Alternariasp 2	ATTGCAATCAGCGTCAGTAACAA	----	ATTAATAAT-TACAACCTTTCACCAACGGATCCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCGATA							
Alternariasp 1
Alternariacarthami
Alternariatenuissima
Botrytis cinerea 2	T.AATGT-C.TC.G...	CT.	----	TA.....G...A.....						
Botrytis cinerea 1	T.AATGT-C.TC.G...	CT.	----	TA.....G...A.....						
Epicoccumsp 1	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumsp 2	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumnigrum 4	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumnigrum 5	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumnigrum 3	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumnigrum 1	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Epicoccumnigrum 2	G.....T.A.A.	----	CA.....G.....							
Gibberella pulvicaris	T.A.TGGAACCTTC.G....A..AA	CAA.TA...C.A.....A.....								
Phomaexigua	...A.....T.G.A.	----	CA.....G.....							
Athelia bombacina	TG.TTGT.T.CT.GTT....GACCTC.A.....A.....T.G.....C..C.....									

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Alternariasp 2	AGTAGTGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAA	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCCTGTCGAGCGTCATTGTGTA								
Alternariasp 1
Alternariacarthami
Alternariatenuissima

```

Botrytis cinerea 2      ....A.....C.....GGG.....CA.
Botrytis cinerea 1      ....A.....C.....GGG.....CA.
Epicoccum sp 1          .....C.....TG.....
Epicoccum sp 2          .....C.....TG.....
Epicoccum nigrum 4      .....C.....TG.....
Epicoccum nigrum 5      .....C.....TG.....
Epicoccum nigrum 3      .....C.....TG.....
Epicoccum nigrum 1      .....C.....TG.....
Epicoccum nigrum 2      .....C.....TG.....
Gibberella pulvicaris  ....A.....GCCA.....TGGC.....CA.
Phoma exigua            .....C.....TG.....
Athelia bombacina      ....A.....C.....T.....G.....A.....T.....T.....AA.

```

```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400

```

```

Alternaria sp 2      CCCTCAAGCTTTGGTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGC-TGGAGA-----CTCGCCTTAAAGTAATTGG
Alternaria sp 1      .....
Alternaria carthami  .....
Alternaria tenuissima .....
Botrytis cinerea 2      .....A.....A.....A.TC-G.....AG.....AAT.G.....AG..TC.....A.C.G...
Botrytis cinerea 1      .....A.....A.....A.TC-A.....AG.....AAT.G.....AG..TC.....A.C.G...
Epicoccum sp 1        ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum sp 2        ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum nigrum 4    ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum nigrum 5    ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum nigrum 3    ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum nigrum 1    ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Epicoccum nigrum 2    ..T.....C.....T.....GC..C..G..T.....AC.....
Gibberella pulvicaris .....CCA.....A.C.....GT.....C T.....A.T..CC...TAC....
Phoma exigua          ..T.....C.....T.....GC.....G..T.....AC.....
Athelia bombacina     TT.....C..C.A..C...T...C.AC.GA...TAG...GC...GACTTG...GGCTGCCGGCATCTGTAAAAAGAAGTCAG...CT...AGT...A.

```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500

```

```

Alternaria sp 2      CAGCCGCC--TACTGGTTTCGGAGCGCAGCA-----CAAGTC--GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCT--AGCATCCATTAAGCCTTTT
Alternaria sp 1      .....
Alternaria carthami  .....
Alternaria tenuissima .....
Botrytis cinerea 2    .G...C.G-CTGG.-.C.T..A..T..T.AT--ATCTC...TTACAGG.TCTC.GTGT.C.TC--T..CA--AACCCAAA...
Botrytis cinerea 1    .G...C.G-CTGG.-.C.T..A..T..T.AT--ATCTC...TTACAGG.TCTC.GTGT.C.TC--T..CA--AACCCAAA...
Epicoccum sp 1        .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...
Epicoccum sp 2        .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...
Epicoccum nigrum 4    .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...
Epicoccum nigrum 5    .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...
Epicoccum nigrum 3    .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...
Epicoccum nigrum 1    .....G...T..A.....T.....TC...G..T.GC.CTCAT..C.AC--GA.G...AA.GTA.A...

```

```

Epicoccumnigrum 2      .....G--..T..A.....T-----..TC..---..G..T.GC.CTCAT..C.AC---GA.G...AA.GTA.A...-----
Gibberellapulicaris  .G.T-CA.G--.CGA.C..C.AT...T..T.ATT-TA..CA..---TTACTGG..ATC.TCGC..C.A-C..CGTT.AACCC.AAC...-----
Phomaexigua           .....G--..T..A.....T-----..TC..---..G..T.GC.CTCAT..C.AC---GA.G...AA...TAC...-----
Atheliabombacina     ...TAACTAGA..ACT...C.TTGAT.TGAT.ATTATCT.C...TTG.TCAATGGA.ATCATT.TAACG.TAT..T..T.ACTGT.TG..AACTCAGACT

```

```

                    510      520      530      540      550      560      570
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...
Alternariasp 2      .....TTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT---
Alternariasp 1      .....CATA
Alternariacarthami  .....CTA
Alternariatenuissima  .....CA
Botrytis cinerea 2  ...CT..TGG.....CA
Botrytis cinerea 1  ...CT..TGG.....CAA
Epicoccumsp 1      ...A...C.....CAA
Epicoccumsp 2      ...A...C.....CAAT
Epicoccumnigrum 4  ...A...C.....C
Epicoccumnigrum 5  ...A...C.....CAT
Epicoccumnigrum 3  ...A...C.....CAAA
Epicoccumnigrum 1  ...A...C.....CAAT
Epicoccumnigrum 2  ...A...C.....CAAA
Gibberellapulicaris  ...C.GA..TG.....A.....C
Phomaexigua        ...A...C.....CAAT
Atheliabombacina  GTTTGCTTGTCAAACA..ATG..C.....AA.....AC.....

```

ANEXOS II – Compostos voláteis identificados por GC-MS

Compostos prováveis	MW	Iões m/z	<i>E. nigrum</i> 1	<i>E. nigrum</i> 2	<i>E. nigrum</i> 3	<i>E. nigrum</i> 4	<i>E. nigrum</i> 5	<i>Epicoccum</i> sp. 1	<i>Epicoccum</i> sp. 2	<i>Alternaria</i> sp. 1	<i>Alternaria</i> sp. 2	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria carthami</i>	<i>Botrytis cinerea</i> 1	<i>Botrytis cinerea</i> 2	<i>Athelia bombacina</i>	<i>Phoma exigua</i>	<i>G. pulicaris</i>
3-metil-pentano	86	42, 41	X		X		X	X	X					X	X	X	X	
Acetato de etilo	88	43, 61, 70			X		X		X		X				X	X	X	
Clorofórmio	118	83, 85, 47	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-etil-1-hexanol	130	57, 41, 70	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Benzaldeído	106	77, 105, 106		X	X									X	X	X	X	
2-metil-1-propanol	74	41, 43, 42	X		X	X	X			X	X					X		X
3-metil-1-butanol	88	55, 41, 42, 70	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Ácido acético	60	43, 45, 60		X	X	X	X											
Fenol	94	94, 66, 65	X	X		X		X	X	X	X			X			X	X
Triclorometano	118	83, 85, 47		X														
1,2-propanediol	76	45	X		X	X	X	X	X		X						X	X
Oxime-metoxifenil	151	133, 151, 135										X						
1,8-Cineole	154	43, 81, 93		X														
3-hidroxi-2-butanona	88	45, 43		X	X	X			X							X	X	

2-butoxi-etanol	118	57, 41, 45		X														
2-butanona	72	43, 57, 72												X				X
Isobutil vinil éter	100	41, 57, 56																X
1,2,4-trimetil benzeno	120	105, 120, 77																X
Benzoato de etilo	150	105, 77, 122			X											X		
Ácido acético, 2-hidroxi, metil ester	90	45, 43																X
5-etil,4-metil,3-heptanona	156	57, 86, 41																X
Acetato de 3-metil-1-butanol	130	43, 55, 70														X		
4-metil, 2-(2-metilprop-1-enil) oxano	154	139, 69, 83															X	
Nonanal	142	57, 41, 56															X	
3,7-dimetil-2,6-octadienal	152	41, 69, 67															X	
Derivados de ácido propanoico		71, 43, 89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

