



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Pesquisa de fungos endofíticos presentes em
videira (*Vitis vinifera* L.) com capacidade
antagonista contra os principais agentes
causadores da doença do lenho da videira no
Alentejo**

Rute Emanuel Pita Pimenta

Orientação:

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Pesquisa de fungos endofíticos presentes em videira (*Vitis vinifera* L.) com capacidade antagonista contra os principais agentes causadores da doença do lenho da videira no Alentejo

Rute Emanuel Pita Pimenta

Orientação:

Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix
Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Viticultura e Enologia
Dissertação

Évora, 2018

Esta tese foi cofinanciada por:



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



GAFAPROTECT - ALT20-03-0145-FEDER-028263

TOMVIRPROTECT - ALT20-03-0145-FEDER-028266

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Todos os agradecimentos não serão suficientes nem alcançarão todos os que ao longo deste mestrado me ajudaram, de forma, ou não, direta a alcançar esta meta, e sem os quais não teria sido possível. Assim, deixo poucas palavras, mas um profundo sentimento de agradecimento.

Quero agradecer à Professora Rosário Félix e à Doutora Carla Varanda por terem aceite orientar-me neste trabalho, agradeço por tudo o que me ensinaram, por os conhecimentos transmitidos, quero também agradecer a motivação e a disponibilidade. Ao Patrick, agradeço pela ajuda na análise estatística, e toda a ajuda com a parte informática. Aos restantes elementos do laboratório o meu agradecimento pela sempre boa receção e disponibilidade.

Quero agradecer, ao Dr. Henrique Granadeiro, e ao seu filho Dr. Henrique Granadeiro Júnior, por toda a disponibilidade para que este trabalho chegasse a bom porto. À Engenheira Solange Fortunato e a todos os meus colegas de trabalho um muito obrigado pelo apoio, ajuda e incentivo.

Agradeço aos meus pais e agradeço à minha tia, que desde o primeiro minuto apoiaram incondicionalmente a minha decisão de dar mais um passo na vida académica, e desde esse momento foram fonte de incentivo e paciência.

Agradeço ao Duarte, que durante todo este percurso foi um pilar, agradeço o alento, o encorajamento, o estímulo, a ajuda que sempre esteve pronto a prestar e, também, por último mas não menos importante, toda a paciência.

Às minhas amigas e colegas Marisa Furão, Marisa Caeiro e Sofia Aldeano, que conheci no início deste mestrado e que sem o seu apoio esta caminhada teria sido muito mais difícil.

Também às minhas amigas de sempre, por todo o apoio e incentivo dado ao longo deste percurso académico, motivando quando a vontade era menor.

Este trabalho foi financiado pelo projeto “Controle da antracnose da oliveira através de silenciamento e expressão de genes utilizando um vírus de planta como vector” com a referência ALT20-03-0145-FEDER-028263 e pelo projeto “Desenvolvimento de um vetor para proteção de plantas de tomate contra TSWV” com a referência ALT20-03-0145-

FEDER-028266, cofinanciados pela União Europeia através do Fundo de Desenvolvimento Regional Europeu, ALENTEJO2020 (Programa Regional Operacional do Alentejo), ALGARVE2020 (Programa Regional Operacional do Algarve) e através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, na sua componente nacional.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo testar o potencial antagonista de fungos presentes em videiras do Alentejo, contra fungos patogénicos responsáveis por doenças do lenho.

Foram identificados 14 isolados provenientes de ramos de videiras aparentemente saudáveis, 12 dos quais pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Epicoccum* e *Cladosporium*, sendo considerados fungos endofíticos, dos quais foi testada a capacidade antagonista, e dois identificados como *Botryosphaeria dothidea* e *Phomopsis viticola*, fungos patogénicos responsáveis por doenças do lenho.

Todos os isolados apresentaram capacidade antagonista contra *B. dothidea* nos três testes realizados. No caso de *P. viticola* todos os fungos apresentaram capacidade antagonista no teste de antagonismo direto e compostos voláteis, enquanto que no teste de compostos não voláteis apenas um não apresentou capacidade antagonista.

Os resultados apresentados mostram o potencial antagonista dos fungos endofíticos como agentes de luta biológica.

PALAVRAS-CHAVE: doenças do lenho, fungos endofíticos, antagonista, vinha, controlo biológico.

ABSTRACT

Antagonistic activity of endophytic fungi of *Vitis vinifera* L. against the most important grapevine trunk diseases in Alentejo

The objective of this work was to test the potential antagonism of fungi present in Alentejo vines against pathogenic fungi responsible for trunk diseases. 14 isolates from apparently healthy grapevines were identified, 12 were considered endophytic fungi belonging to the genera *Alternaria*, *Epicoccum* and *Cladosporium*, and two were identified as *Botryosphaeria dothidea* and *Phomopsis viticola*, pathogenic fungi responsible for trunk diseases.

All the isolates presented antagonistic capacity against to *B. dothidea*, in the direct antagonism test, the volatile compounds test and the non-volatile compounds test. In the case of *P. viticola* all fungi in the test of direct antagonism and volatile compounds presented antagonistic capacity, whereas in the test of non-volatile compounds only one did not present antagonistic capacity.

The results presented show the potential antagonism of endophytic fungi as biological control agents.

KEY-WORDS: trunk diseases, endophytic fungi, antagonism, grapevine, biological control.

ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

g – aceleração da gravidade

rpm – rotações por minuto

cm – centímetro

mm – milímetro

mL – mililitro

μL – microlitro

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

sp. – espécie

spp. – espécies

CN – Controlo negativo

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE QUADROS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fungos Endofíticos	2
1.1.1. Definição e Ecologia	2
1.1.2. Importância de Fungos Endofíticos na Proteção de Plantas	3
1.2. Doenças da vinha	5
1.2.1. Doenças do Lenho	8
1.2.2. Meios de Luta contra Doenças do Lenho	18
2. OBJETIVO	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Obtenção dos isolados de fungos e extração de dna	23
3.2. Cultura e manuseamento dos isolados de fungos	23
3.3. Identificação Molecular dos isolados de fungos	23
3.4. Testes de Antagonismo	24
3.4.1. Testes de Antagonismo Direto	24
3.4.2. Teste dos Compostos Voláteis	25
3.4.3. Teste dos Compostos Não Voláteis	26
3.5. Análise Estatística	28
	vii

4. RESULTADOS	29
4.1. Manutenção dos isolados de fungos, Análises das sequências e identificação Molecular	30
4.2. Testes de Antagonismo	32
4.2.1. Teste de Antagonismo Direto	32
4.2.2. Teste dos Compostos Voláteis	46
4.2.3. Teste dos Compostos Não Voláteis	54
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatologia de três doenças do lenho em corte transversal dos ramos de videira (Almeida, 2007).	16
Figura 2. Representação esquemática do teste de antagonismo direto.	25
Figura 3. Representação esquemática do teste de compostos voláteis.	25
Figura 4. Crescimento dos fungos em meio de cultura líquido, em ambiente controlado.	26
Figura 5. Crescimento de fungos endofíticos, após 12 dias em meio líquido e ambiente de incubação controlado.	27
Figura 6. Representação esquemática do teste de compostos não voláteis.	28
Figura 7. 1- Placa de <i>Petri</i> com <i>B. dothidea</i> ; 2- Placa de <i>Petri</i> com <i>P. viticola</i> .	31
Figura 8. Fungos Endofíticos utilizados durante o ensaio.	31
Figura 9. Placa de <i>Petri</i> no dia zero do teste de antagonismo direto. Fungo patogénico, à esquerda, e fungo endofítico, à direita. Inoculação diametralmente oposta.	32
Figura 10. Valores do raio de crescimento de <i>B. dothidea</i> durante os 15 dias de ensaio de antagonismo direto.	34
Figura 11. Valores do raio de crescimento de <i>P. viticola</i> durante os 15 dias de ensaio de antagonismo direto.	34
Figura 12. 1- Placa de teste de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 2, ao 15º dia de ensaio; 2- Placa de teste de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Cladosporium</i> sp., ao 15º dia de ensaio. Em ambos os casos o agente patogénico se encontra à esquerda da fotografia.	35
Figura 13. Placa de teste de <i>P. viticola</i> quando em confronto com o antagonista <i>Cladosporium</i> sp., ao 15º dia de ensaio; O agente patogénico encontra-se à esquerda da figura.	36

Figura 14. Valores do raio de crescimento de <i>B. dothidea</i> (cm) ($rB. dothidea \pm SE$), na presença dos diferentes fungos endofíticos, aos 2, 5, 10 e 15 dias de teste de antagonismo direto.	39
Figura 15. Valores do raio de crescimento de <i>P. viticola</i> (cm) ($rP. viticola \pm SE$), na presença dos diferentes fungos endofíticos, aos 2, 5, 10 e 15 dias de teste de antagonismo direto.	39
Figura 16. Tipo de interação A entre <i>B. dothidea</i> e: 1- <i>Cladosporium</i> sp.; 2- <i>Alternaria</i> sp. 7. Em ambos os casos o fungo patogénico se encontra à esquerda.	42
Figura 17. Tipo de interação B entre <i>B. dothidea</i> e: 1- <i>Alternaria</i> sp. 2; 2- <i>Alternaria</i> sp. 3. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.	42
Figura 18. Tipo de interação C entre <i>B. dothidea</i> e: 1- <i>Epicoccum</i> sp. 3; 2- <i>Epicoccum</i> sp. 4. Em ambos os casos <i>B. dothidea</i> encontra-se à esquerda na placa de <i>Petri</i> .	43
Figura 19. Tipo de interação D entre <i>B. dothidea</i> e: 1- <i>Epicoccum</i> sp. 1; 2- <i>Epicoccum</i> sp. 2. Em ambos os casos o <i>B. dothidea</i> encontra-se à esquerda da placa.	43
Figura 20. Tipo de interação A entre <i>P. viticola</i> e: 1- <i>Cladosporium</i> sp.; 2- <i>Alternaria</i> sp. 3. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.	44
Figura 21. Tipo de interação C entre <i>P. viticola</i> e: 1- <i>Alternaria</i> sp. 1; 2- <i>Alternaria</i> sp. 5. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.	45
Figura 22. Tipo de interação D entre <i>P. viticola</i> e: 1- <i>Epicoccum</i> sp. 1; 2- <i>Epicoccum</i> sp. 2; 3- <i>Epicoccum</i> sp. 3; 4- <i>Epicoccum</i> sp. 4. Nas 4 figuras o agente patogénico encontra-se à esquerda.	45
Figura 23. Exemplo do teste dos compostos voláteis	46
Figura 24. Controlo Negativo do teste de compostos voláteis.	46
Figura 25. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>B. dothidea</i> em função do tempo no teste dos compostos voláteis.	49

Figura 26. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>P. viticola</i> em função do tempo no teste dos compostos voláteis.	49
Figura 27. Placa de teste de compostos voláteis de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 1, ao 12º dia de ensaio.	50
Figura 28. 1. Placa de teste de <i>P. viticola</i> de compostos voláteis quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 3, ao 12º dia de ensaio; 2. Placa de teste de <i>P. viticola</i> de compostos voláteis quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 7, ao 12º dia de ensaio;	50
Figura 29. Comparação das percentagens de inibição do crescimento de <i>B. dothidea</i> no teste de antagonismo direto e no dos compostos voláteis.	53
Figura 30. Comparação das percentagens de inibição do crescimento de <i>P. viticola</i> no teste de antagonismo direto e no dos compostos voláteis.	53
Figura 31. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>B. dothidea</i> em função do tempo no teste de compostos não voláteis.	55
Figura 32. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de <i>P. viticola</i> em função do tempo no teste de compostos não voláteis.	56
Figura 33. 1- Placa de teste de compostos não voláteis de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 2, ao 7º dia de ensaio; 2 - Placa de teste compostos não voláteis de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 4, ao 7º dia de ensaio; 3 - Placa de teste compostos não voláteis de <i>B. dothidea</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 7, ao 7º dia de ensaio. Volumes de meio com fungo endofítico na mesma posição da figura 6 do ponto 3.4.3..	57
Figura 34. 1- Placa de teste de compostos não voláteis de <i>P. viticola</i> quando em confronto com o antagonista <i>Alternaria</i> sp. 2, ao 7º dia de ensaio; 2- Placa de teste de compostos não voláteis de <i>P. viticola</i> quando em confronto com o antagonista <i>Epicoccum</i> sp. 1, ao 7º dia de ensaio;	57

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Comparação sintomatológica entre as diferentes doenças em diferentes partes da planta.	17
Quadro 2. Identificação de cada um dos fungos endofíticos isolados com correspondência à casta e ao tipo de uva.	30
Quadro 3. Valores do raio de crescimento de <i>B. dothidea</i> (cm) ($rB. dothidea \pm SE$) quando em confronto com os fungos endofíticos, e valores de controlo, ao longo dos 15 dias de ensaio. Foram realizadas três replicas por cada ensaio.	33
Quadro 4. Valores do raio de crescimento de <i>P. viticola</i> (cm) ($rP. viticola \pm SE$) quando em confronto com os fungos endofíticos, e valores de controlo, ao longo dos 15 dias de ensaio. Foram realizadas três replicas por cada ensaio.	33
Quadro 5. Percentagem de inibição do crescimento de <i>B. dothidea</i> , pelos diferentes fungos endofíticos, ao 15º dia do teste de teste de antagonismo direto.	40
Quadro 6. Percentagem de inibição do crescimento de <i>P. viticola</i> , pelos diferentes fungos endofíticos, ao 15º dia do teste de teste de antagonismo direto.	41
Quadro 7. Diferentes tipos de interação dos isolados endofíticos com <i>B. dothidea</i> .	41
Quadro 8. Diferentes tipos de interação dos isolados endofíticos com <i>P. viticola</i> .	44
Quadro 9. Valores do raio de crescimento de $rB. dothidea \pm SE$ (cm) na presença dos diferentes fungos endofíticos, durante o ensaio de compostos voláteis.	48
Quadro 10. Valores do raio de crescimento de $rP. viticola \pm SE$ (cm) na presença dos diferentes fungos endofíticos, durante o ensaio de compostos voláteis.	48
Quadro 11. Percentagem de inibição do crescimento de <i>B. dothidea</i> aos 12 dias do teste de compostos voláteis.	51

Quadro 12. Percentagem de inibição do crescimento de <i>P. viticola</i> aos 12 dias do teste de compostos voláteis.	51
Quadro 13. Valores do raio de crescimento de <i>rB. dothidea</i> (cm) na presença dos diferentes fungos, durante o ensaio de compostos não voláteis.	54
Quadro 14. Valores do raio de crescimento de <i>rP. viticola</i> \pm SE (cm) na presença dos diferentes fungos, durante o ensaio de compostos não voláteis.	55
Quadro 15. Percentagem de inibição do crescimento de <i>B. dothidea</i> , pelos fungos endofíticos nos diferentes volumes do teste dos compostos não voláteis.	58
Quadro 16. Percentagem de inibição do crescimento de <i>P. viticola</i> , pelos fungos endofíticos que apresentaram capacidade antagonista, nos diferentes volumes do teste dos compostos não voláteis.	59



1. INTRODUÇÃO

1.1. FUNGOS ENDOFÍTICOS

1.1.1. DEFINIÇÃO E ECOLOGIA

Endofítico é um simbiótico mutualista, em que parte ou a totalidade do seu ciclo ocorre em tecidos de plantas, raízes, caules e/ou folhas, recebendo a nutrição inerente à planta. Estes fungos vivem nos tecidos vegetais sem causar nenhum sintoma aparente de doença, sendo que ocorre comunicação bioquímica e/ou genética que permite aos mutualistas conferir benefícios fisiológicos aos hospedeiros. (Varanda *et al.*, 2016; Larran *et al.*, 2016; Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Redman *et al.*, 2001).

Todas as espécies de plantas examinadas até hoje abrigam fungos endofíticos dentro dos seus tecidos, quer intercelularmente ou intracelularmente, de modo que os fungos endofíticos representam um componente onipresente, ainda que críptico, das comunidades de plantas (Arnold *et al.*, 2003; Saikkonen *et al.*, 1998).

As simbioses planta/fungo bem sucedidas envolvem pelo menos três etapas: a penetração do fungo nos tecidos vegetais, a colonização dos tecidos vegetais pelo fungo invasor e a expressão de um estilo de vida simbiótico (Redman *et al.*, 2001). Um dos aspectos mais empolgantes e desafiadores da ecologia endofítica reside na compreensão desses custos e benefícios da relação endofítico/hospedeiro (Arnold A. , 2007).

O papel da comunidade endofítica nas associações endofítico/planta tem sido intensamente discutido (Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Varanda, *et al.*, 2016; Larran *et al.*, 2016). Os fungos endofíticos interagem, e sobrepõem-se a outros grupos microbianos que colonizam tecido vegetal, como agentes patogênicos. Alguns fungos endofíticos afetam a resposta das plantas a agentes bióticos e abióticos (Larran *et al.* 2016). Por outro lado, os fungos endofíticos beneficiam da proteção e nutrição dos seus hospedeiros e, em alguns casos, reproduzem-se de forma sexuada em tecidos mortos da planta hospedeira (Varanda *et al.*, 2016). Maioritariamente, os fungos endofíticos são transmitidos horizontalmente através de reprodução assexuada, pela transmissão de esporos. Mas, os fungos endofíticos de plantas podem também ser transmitidos verticalmente e internamente, já tendo sido encontrados em diferentes partes da mesma planta (Saikkonen *et al.*, 1998).

Há muito tempo que se reconhece que os resultados das interações endofítico/planta podem ser influenciados pela diversidade genética destes organismos, pela capacidade de colonizar os hospedeiros e pelas interações com estes (Arnold A., 2007).

Embora o papel ecológico desses fungos endofíticos varie de antagonista a mutualista, durante a fase assintomática do ciclo de vida, todos esses fungos são comumente referidos como endofíticos (Saikkonen *et al*, 2004). Mesmo que um determinado fungo endofítico seja capaz de infetar várias espécies hospedeiras, as interações podem demonstrar especificidade funcional ou ecológica: um fungo endófito de uma espécie hospedeira, embora capaz de colonizar um segundo, pode não interagir com ambos os hospedeiros de maneira semelhante. A patologia vegetal mostra que fungos patogênicos com ciclos de vida complexos colonizam diferentes espécies hospedeiras em diferentes estágios da vida, e que suas interações com esses hospedeiros diferem acentuadamente (Arnold A., 2007).

1.1.2. IMPORTÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NA PROTEÇÃO DE PLANTAS

Nas últimas quatro décadas, a forma como os fungos endofíticos sobrevivem aliada à sua importância ecológica, frequentemente negligenciada, inspiraram crescente entusiasmo. Desde os anos 90, um número cada vez maior de estudos, mostram interesse na contribuição de endofíticos na sistemática dos fungos, plantas e ecologia de fungos, biologia evolucionária e pesquisa aplicada que vão desde o controle biológico à bioprospecção (Arnold A. , 2007). Os mecanismos capazes de prevenir e/ou restringir o desenvolvimento de agentes fitopatogênicos têm sido estudados em alguns fungos endófitos e são: indução da resistência sistêmica e expressão de genes de defesa contra o ataque de certos organismos patogênicos nos seus hospedeiros; a produção de metabólitos secundários que inibem o crescimento de outros fungos e a competição com fungos fitopatogênicos por espaço e nutrientes dentro do hospedeiro (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012).

No entanto, o equilíbrio endofítico/hospedeiro não pode ser garantido de forma contínua, seja devido a uma diminuição na defesa das plantas ou um aumento na patogenicidade dos fungos, uma vez que alguns endófitos podem alterar a sua forma de sobrevivência de mutualista para parasítico, devido a fatores como o ambiente, a composição da comunidade de fungos, o estado sanitário do hospedeiro e interação

genótipo do endofítico/genótipo do hospedeiro. Isto significa que alguns fungos patogénicos podem viver como simbióticos durante parte de sua vida, o que é um desafio interessante para a patologia das plantas descobrir e entender quais são as principais diferenças para ambos os estilos de vida endofíticos e patogénicos. Isto é particularmente importante na videira, onde os agentes conhecidos por causar algumas das mais importantes doenças do lenho, Escoriose, Doença de Petri ou Esca, foram isolados dentro dos tecidos vegetais de plantas sintomáticas e assintomáticas (Varanda *et al.*, 2016). Em 2000, por Mostert *et al.*, analisaram o comportamento de *Phomopsis viticola*, agente causador da escoriose americana da videira, em vários tecidos da planta e os resultados demonstraram que alguns dos isolados de *P. viticola* se comportaram como agentes patogénicos primários, enquanto outros como verdadeiros endofíticos. A atual falta de produtos fitossanitários eficazes e sem prejuízo do ambiente, aumentou o esforço de desenvolver métodos de controlo de doenças alternativos. Os microorganismos antagonistas podem ser usados como agentes de controlo biológico, sendo ferramentas importantes para alcançar uma agricultura produtiva e sustentável (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012).

O conhecimento da diversidade, distribuição e influência de fungos endofíticos no desenvolvimento e/ou prevenção de certas doenças causadas por fungos ainda é incompleto. A busca de fungos endofíticos antagonistas de fungos fitopatogénicos em videiras pode contribuir para o entendimento das interações que ocorrem entre endofíticos/patogénicos no sistema vegetal (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012).

Atualmente, o controlo biológico de doenças das plantas com microorganismos com capacidade antagonista é praticado de forma bastante limitada. O primeiro controlo deste tipo foi obtido em 1963, onde pinheiros recém-cortados foram inoculados com esporos de um fungo não-patogénico, *Phlebiopsis gigantea*, este protegeu da infecção pelo fungo *Heterobasidion annosum*, causador de podridão radicular (Agrios, 2005).

Alguns fungos endofíticos da videira, mostraram alguns efeitos benéficos, tais como propriedades antagonistas contra alguns agentes patogénicos importantes (Varanda *et al.*, 2016). No caso da vinha, tem sido relatado que algumas categorias de fungos endofíticos podem potencialmente conferir o controlo de doenças importantes, como é o caso de fungos pertencentes ao género *Alternaria* que inibiram completamente a esporulação de *Plasmopara viticola* em folhas de videira em câmaras de humidade e em

plantas mantidas em casa de vegetação, produzindo metabólitos secundários (Polizzoto *et al.* 2012). Outros autores investigaram a capacidade antagonista do *Epicoccum nigrum*, comumente considerado um saprófita ou um agente de controlo biológico contra fungos patogénicos da videira, como *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* e *Phaeomoniella chlamydospora*, tendo sido este capaz de inibir o seu crescimento (Varanda *et al.*, 2016; Tello, Gaforio, & Pastor, 2009). Os fungos endofíticos também já foram utilizados com sucesso como agentes de biocontrolo contra agentes patogénios na pós-colheita (Varanda *et al.*, 2016). Assim, percebe-se que o estudo de comunidades endofíticas da videira é essencial tanto para determinar os tratamentos futuros de doenças quanto para produzir produtos de alta qualidade (Varanda *et al.*, 2016).

1.2. DOENÇAS DA VINHA

Doenças infecciosas de plantas são aquelas que resultam da infeção de uma planta por um agente patogénico. Com esta tipologia de doença, o agente patogénico pode crescer e multiplicar-se rapidamente nas plantas doentes, pode disseminar-se de plantas doentes para plantas saudáveis e pode causar doenças adicionais, levando assim ao desenvolvimento de uma epidemia (Agrios, 2005).

Os agentes patogénicos que atacam as plantas pertencem aos mesmos grupos de organismos que causam doenças em humanos e animais. Com exceção de alguns agentes fitopatogénicos transmitidos por insetos, nenhuma das espécies patogénicas para as plantas é conhecida por infetar humanos ou animais (Agrios, 2005).

A história da fitossanidade da viticultura europeia pode ser dividida em três períodos críticos: o oídio, depois a filoxera e, finalmente, o míldio (Gessler *et al.*, 2011). As vinhas da Europa, sofreram vários ataques desde a segunda metade do século XIX, um problema conhecido das videiras americanas, foi observado na Europa, o oídio, causado pelo fungo *Erysiphe necator*. No início da década de 1860, o segundo período de adversidade assolou a Europa com as videiras compradas para retanchar. Estas videiras trouxeram consigo outra calamidade para a indústria vitivinícola europeia que foi muito mais desastrosa do que o oídio. As videiras afetadas produziram pouco ou nenhum fruto e no ano seguinte morriam. As folhas mortas e secas davam nome a esta condição, filoxera. Era uma doença de disseminação lenta, mas, com resultados devastadores. Através de uma nova enxertia com porta-enxertos americanos as vinhas europeias

voltaram a regenerar significativamente ao longo do tempo. No entanto, o terceiro período de adversidade atingiu os campos de vinhas em 1878; com o míldio. O míldio espalhou-se rapidamente entre as vinhas e reduziu significativamente a produtividade e a qualidade das uvas, tendo provocado a morte de plantas jovens (Agrios, 2005). Os anos seguintes caracterizaram-se pela busca de soluções para esses problemas e por um período de uso intensivo de produtos químicos (Gessler *et al.*, 2011).

Principais doenças da vinha:

- **Míldio:** causado pelo pseudo-fungo *Plasmopara viticola*, passa o inverno sob a forma de oósporos nas folhas mortas caídas no solo, uma vez maduros e logo que se verifique uma temperatura superior a 10 °C, e precipitação de 10 mm, são libertados os zoósporos capazes de se deslocar na água, responsáveis pela contaminação primária (Agrios, 2005; Neves, 2000).

As folhas atacadas apresentam na página superior uma coloração amarelada – mancha de óleo, enquanto que na página inferior aparece uma pulverulência branca, que corresponde a frutificações assexuadas do fungo, responsáveis pela disseminação da doença. Nos pâmpanos, regra geral, só surgem sintomas em casos de ataque intenso, e caracterizam-se pelo encurvamento da extremidade, se o ataque ocorrer na fase de pleno crescimento, ocorre um consequente acastanhamento da zona atacada, podendo em condições favoráveis cobrir-se de pulverulência branca (Neves, 2000).

- **Oídio:** o oídio é causado por um fungo ectoparasita obrigatório, o *Erysiphe necator*. A manutenção do fungo de um ciclo para o outro pode realizar-se por via assexuada, sob a forma de micélio contido no interior dos gomos; ou por via sexuada, sob a forma de cleistotecas nos sarmentos (Neves, 2000).

Após abrolhamento das plantas, com temperaturas superiores a 15°C e humidade relativa superior a 25 % o micélio hibernante dos gomos inicia o seu desenvolvimento, originando uma cobertura pulverulenta de aspeto aveludado e de cor branca-acinzentada (Andrade, 2013; Neves, 2000). Nas folhas, observam-se manchas cloróticas, um pouco brilhantes, às quais correspondem na página inferior manchas castanhas. Sobre os pâmpanos observa-se a presença do micélio acinzentado, e as inflorescências e bagos cobrem-se da pulverulência branco-cinza, característico do ataque do fungo. Sendo esta doença causada por um fungo de superfície, este leva à morte dos tecidos superficiais dos órgãos que ataca. No caso dos bagos verdes, leva à paragem de

crecimentos e posterior rachamento, já após o pintor o parasita dá preferência aos órgãos herbáceos (Andrade, 2013).

- Podridão Cinzenta: o agente causal é a *Botrytis cinerea*, fungo polífago, que se alimenta de resíduos orgânicos, provocando grandes perdas qualitativas e quantitativas nas vinhas onde se instala (Neves, 2000).

O fungo hiberna nos sarmentos sob a forma de esclerotos, ou na forma de micélio também nos sarmentos ou nos gomos, embora esta forma ocorra em muito menor quantidade (Neves, 2000).

Aquando da presença de água ou elevados teores de humidade relativa, 90 %, e temperatura entre os 15 e os 20 °C são produzidos conidióforos que libertam conídios, espalhados com a ajuda do vento. Os conídios infetam a planta através de feridas, levando a formação de micélio no interior dos tecidos e podendo levar à sua morte (Neves, 2000).

A podridão cinzenta pode atacar todos os órgãos da videira, quando ataca gomos ou jovens rebentos estes apresentam necroses e acabam por morrer. Nas folhas e nos jovens pâmpanos aparecem manchas acastanhadas. As inflorescências podem ser atacadas em fases muito precoces, que dependendo do estado em que se encontram pode levar à sua morte parcial ou total. Também durante a floração, a podridão pode-se instalar nas peças florais podendo provocar a destruição parcial do cacho. Do vingamento ao pintor, os bagos são menos sensíveis ao fungo responsável pela podridão cinzenta, enquanto que após esta fase perante períodos húmidos e existência de feridas diversas, mesmo que microfissuras, a podridão desenvolve-se com grande facilidade (Neves, 2000).

- Podridão Negra: doença da videira que causa estragos em folhas, pecíolos, pâmpanos e cachos, causada pelo fungo *Guignardia bidwellii* (Rego *et al.*, 2012). Não afeta a estrutura principal da videira, mas em regiões de clima quente e húmido pode causar perdas de 100% da produção (Mugnai, 2012).

O fungo hiberna sob a forma de peritecas, formadas em órgãos atacados no ano anterior. Na Primavera, as peritecas atingem a maturidade e com as chuvas libertam os ascósporos, estes transportados pelo vento infetam gomos e jovens folhas, constituindo a fonte de infeção primária. Os ascósporos germinam na presença de água ou humidade relativa maior que 90%, penetrando nos tecidos foliares. Os primeiros sintomas surgem

após um período de incubação de 3 a 4 semanas, dependendo do número de horas de humidade e temperatura (Pearson & Goheen, 1990).

Nas folhas, os sintomas manifestam-se por pequenas manchas circulares a poligonais, inicialmente acinzentadas, tornando-se castanhas-claras, rodeadas de um halo castanho-escuro. Sobre as manchas são visíveis, a olho nu, pequenas pontuações negras características que correspondem às frutificações do fungo, os picnídios, de onde se libertam os esporos responsáveis pelas infeções. Em pâmpanos, a doença manifesta-se pelo aparecimento de manchas alongadas, acastanhadas, rodeadas de um castanho-escuro e com as mesmas pontuações típicas negras que correspondem aos picnídios. Nas vinhas em produção, os prejuízos são fundamentalmente ao nível dos cachos, onde os bagos atacados, mumificam com pontuações negras (Andrade, 2013).

1.2.1. DOENÇAS DO LENHO

O declínio das videiras jovens constitui um tema atual em todo o mundo vitícola, pelos prejuízos que origina e pela falta de meios de luta eficientes no combate aos agentes que o originam. Nos casos de manifestação severa, determina mortalidade de um elevado número de plantas, logo após a plantação, obrigando a retanchas sucessivas ou ao arranque total da vinha. Em situações de menor severidade, as plantas revelam debilidade, atraso no desenvolvimento, entrenós curtos, clorose ou avermelhamento da folhagem, com reflexos na quantidade e qualidade da produção e na longevidade das videiras (Oliveira *et al.* 2007).

A progressão das doenças do lenho na videira, representa uma grande ameaça à vitivinicultura, atualmente considerado um dos maiores desafios. Estas doenças são destrutivas, causando vários danos a cada ano, que leva a perdas económicas significativas para a indústria do vinho. A diminuição da produtividade é devida a sintomas externos e o declínio precoce resultante das plantas no campo leva a uma perda de tipicidade do vinho (Levasseur-Garcia *et al.*, 2016; Fuente *et al.*, 2016).

As doenças do lenho, ocorrem em muitos dos países vitivinícolas do mundo, como França, Espanha, Itália, Portugal, África do Sul, Austrália, Chile, EUA. Os agentes causais são vários fungos, principalmente *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diaporthe ampelina*, *Cylindrocarpon* spp. e *Botryosphaeria* spp. (Bruez *et al.*, 2017).

Os fungos patogénicos, causadores de doenças do lenho da videira, estão presentes na superfície dos lançamentos e, parecem infectar o material vegetal durante a imersão e estratificação dos bacelos nos viveiros, e, posteriormente, durante o manejo da vinha (Levasseur-Garcia *et al.*, 2016). Estes microorganismos, libertam os seus esporos durante os períodos de humidade e são disseminados pela chuva e pelo vento (Newsome, 2012; Díaz & Latorre, 2013). Os esporos infectam as videiras através das feridas de poda durante a estação latente (Díaz & Latorre, 2013).

Após a infeção, estes fungos, atacam os órgãos perenes, levando a uma extensa necrose interna no tronco e nos braços da videira. Os sintomas da doença podem aparecer vários anos após a primeira infeção (Levasseur-Garcia *et al.*, 2016). Embora, as doenças do lenho das videiras sejam mais frequentemente encontradas em vinhas com mais de sete anos de idade, as videiras jovens continuam em declínio constante até à morte, por vezes ocorre um colapso rápido de toda a planta, e esta morre de repente (Díaz & Latorre, 2013).

As espécies de fungos, referidas anteriormente, têm em comum um crescimento lento e induzem uma expressão de sintomas extremamente complexa e variável, tornando difícil de diagnosticar a doença no campo. Os métodos atuais para classificar as espécies de fungos dependem de características morfológicas como, em particular, estruturas reprodutivas (Levasseur-Garcia *et al.*, 2016).

As doenças do lenho resultam da colonização do lenho da videira por um ou vários agentes fitopatogénicos, o que diminui a capacidade de adsorção de água e nutrientes pela planta. Os sintomas resultantes vão desde manchas em algumas folhas, seca dos novos rebentos, morte dos troncos e braços, e a eventual morte das videiras devido a uma necrose progressiva da madeira e à deterioração do tecido vegetal (Andolfi *et al.*, 2011; Grenet & Mercier, 2007). Além de causar vários tipos de necrose e decaimento da madeira, a maioria dessas doenças também produz sintomas foliares, que incluem clorose, necrose e deformação (Andolfi *et al.*, 2011).

O *International Organisation of Vine and Wine* (OIV) afirma em 2015, que nas últimas três décadas, as doenças do lenho são consideradas as mais destrutivas e são de crescente preocupação em todos os países produtores de vinho. As doenças do lenho da videira, tornaram-se um problema real durante os últimos anos, causando a curto ou longo prazo a morte das videiras e também, significando um custo económico

substancial para a sua substituição. Pode-se dizer que quase 20% das vinhas são afetadas por essas doenças em todo o mundo. Por este motivo, o OIV, declarou que os seus membros devem fazer um esforço real para prevenir e monitorizar adequadamente as taxas de evolução das doenças do lenho da videira (percentagem de danos, tipo de agente patogénico, etc.) em todo o mundo vitícola e, finalmente, ter em conta o seu impacto em todo o setor vitivinícola. (OIV, 2015).

Existe uma grande dificuldade em compreender as causas das perdas económicas devidas às doenças do lenho porque os sintomas observados são muitas vezes confundidos com outras doenças, pragas ocasionais, défices nutricionais e hídricos (Sofia *et al.*, 2013). Em Portugal, as doenças do lenho estão amplamente espalhadas por toda a região vitivinícola, mais notoriamente nas regiões dos Vinhos Verdes, Douro, Dão e Alentejo. A escoriose europeia e a esca são as principais doenças das videiras adultas, causando danos consideráveis e perdas económicas, no entanto, a incidência de eutipiose é baixa quando comparada com outros países vizinhos. Estudos sobre o declínio de videiras jovens mostraram que, no porta-enxerto, a doença do Pé Negro e a doença de Petri foram dominantes, mas outras doenças da madeira, como a escoriose europeia, também estão presentes (Fuente *et al.*, 2016). Nos porta-enxertos, *Botryosphaeria* spp. foi o tipo de fungo predominante nos tecidos acima da união do enxerto, embora os agentes patogénicos causadores de doença do Pé Negro e de doença de Petri também se tenham encontrado nas plantas (Fuente *et al.*, 2016).

Embora o fracasso e o declínio das vinhas recentemente plantadas possam ser atribuídos a vários fatores, incluindo stresses abióticos, fungos associados à doença do Pé Negro e de Petri são considerados os principais agentes de declínio das videiras jovens (Cardoso *et al.*, 2013).

- **PÉ NEGRO DA VIDEIRA**

O Pé Negro da videira é uma doença importante associada ao declínio de vinhas jovens, afetando principalmente vinhas até aos 10 anos de idade, videiras jovens logo após a plantação e plantas de viveiro (Cardoso *et al.*, 2013).

A doença do Pé Negro é causada por um complexo de fungos, sendo que os mais amplamente relatados são *Campylocarpon fasciculare*, *Campylocarpon pseudofasciculare* e *Cylindrocarpon pauciseptatum* (Cardoso *et al.*, 2013).

A infecção do material de propagação por agentes patogénicos causados pelo pé negro tem sido atribuída principalmente ao inóculo do solo, que infecta as raízes e a extremidade basal dos porta-enxertos, durante o estágio de enraizamento nos viveiros. Para além dos fungos patogénicos causadores da doença de Pé Negro, o material de propagação da videira é frequentemente infetado por outros fungos, como *Phaemoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp., os causadores da doença de Petri. Também *Botryosphaeria* spp. e *Phomopsis* spp. estão entre os fungos mais frequentemente isolados deste material vegetal, e contribuem para o aumento da suscetibilidade de estacas de porta-enxertos ou plantas enxertadas durante o processo de enraizamento em viveiros (Cardoso *et al.*, 2013).

Os sintomas desta doença incluem crescimento atrofiado, redução do vigor, abrolhamento retardado ou ausente, entrenós curtos, folhagem esparsa e clorótica com margens necróticas e murchamento, conduzindo ao declínio e morte das plantas (quadro 1) (Cardoso *et al.*, 2013; Agustí-Brisach *et al.*, 2013). As necroses internas da madeira são reveladas em seções transversais das áreas afetadas, mas quando se observa através de seções longitudinais as necroses aparecem como listas vasculares escuras (Cardoso *et al.*, 2013).

- **DOENÇA DE PETRI**

A doença de Petri é causada por *Phaemoniella chlamydospora*, e numerosas espécies do género *Phaeoacremonium*, as plantas podem ser infetadas por inóculo aéreo, infetando a planta através das feridas de poda, e feridas produzidas durante o processo de propagação da videira (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). No entanto, em 2013, Agustí-Brisach *et al.* demonstraram que as plantas também podem ser inoculadas com os agentes patogénicos causadores da doença de Petri através do solo.

A sintomatologia apresentada pelas videiras, associada à doença de Petri é difícil de distinguir da observada na doença de Pé Negro da videira. No entanto, as videiras afetadas pela doença de Petri mostram uma descoloração preta típica dos vasos do xilema, que é resultado de tiloses, gomas e compostos fenólicos formados dentro desses vasos pelo hospedeiro em resposta ao crescimento do fungo em torno dos vasos do xilema (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). No lenho, em corte transversal, são visíveis pontuações castanhas (claras e/ou escuras) dispersas ou a formar um círculo em redor da medula, com exsudação de goma. Também se podem observar necroses castanhas,

duras, em posição central (figura 1). Em corte longitudinal, as pontuações castanhas aparecem como estrias. Nas raízes, em corte transversal, também podem estar presentes pontuações necróticas (Chicau, 2006).

As plantas afetadas com a doença de Petri sofrem um atraso no desenvolvimento vegetativo, têm menor vigor, entrenós curtos, atempamento irregular das varas e folhas com cloroses e necroses idênticas às causadas pela esca (quadro 1), existe ainda a seca de porta-enxertos, enxertos-prontos que morrem no ano seguinte à plantação, mau pagamento à enxertia, morte após alguma rebentação (Chicau, 2006).

- **ESCORIOSE AMERICANA**

Doença causada por *Phomopsis viticola*, extremamente prejudicial na maioria das variedades de videira (Jailloux *et al.*, 1987). Este fungo hiberna durante o inverno, sob a forma de picnídios, formados no outono, sobre madeira necrosada e continua o seu desenvolvimento ao longo do ciclo vegetativo, os sintomas ficam mais visíveis, e infeta novos gomos formados nos pâmpanos (Neves, 2000).

Na Primavera e início do verão, é fácil identificar esta condição através do aparecimento de pequenas necroses nos entrenós da base dos pâmpanos, e fissuras na casca. Pode-se ainda identificar a doença no outono, através do branqueamento da área de superfície dos bastões. Nas folhas, os sintomas observados podem ser confundidos com sintomas causados por ácaros, já que se observam pontuações negras com auréola amarela. O aumento do tamanho das manchas necróticas, leva ao emurchecimento e morte das folhas, ao desavinho e morte da totalidade dos cachos (Neves, 2000; DRAPN/Estação de Avisos do Douro, 2008).

Os piores estragos são o fácil desprendimento de pâmpanos, através da ação do vento, devido à frágil ligação com a vara que os sustenta, com o consequente alongamento da poda no ano seguinte (Neves, 2000; Neto, 2014).

A escoriose é uma doença da vinha capaz de provocar importantes quebras de produção, tanto devido à quebra de pâmpanos e sarmentos como ao deficiente abrolhamento dos gomos da base, e que pode afetar a cultura desde a fase inicial do ciclo vegetativo. Também os lançamentos atacados pela doença têm desenvolvimento deficiente. Como os gomos da base das varas e dos talões sofrem uma grande destruição a poda torna-se problemática (quadro 1). A infeção, por *P. viticola*, pode levar ao atraso de crescimento da videira, redução do abrolhamento e infeção de frutos maduros,

levando à diminuição do cacho, que resulta em perdas de rendimento (DRAPN/Estação de Avisos do Douro, 2008; Merrin *et al.*, 1995).

- **ESCORIOSE EUROPEIA**

À escoriose europeia, são associadas diferentes espécies de fungos do género *Botryosphaeria*. Tal como as restantes doenças do lenho da videira, a escoriose europeia conduz a importantes perdas económicas, tendo grande impacto na longevidade das vinhas. Os fungos causadores desta doença penetram na planta através das feridas de poda ou de outras lesões. As espécies do género *Botryosphaeria* podem hibernar de duas formas através de picnídios formados sobre a madeira esbranquiçada ou necrosada dos sarmentos ou através do micélio que hiberna nos gomos dormentes dos sarmentos (Dias & Rego, 2018).

Com o início da Primavera, são libertados esporos dos picnídios, estes são disseminados através do vento e da chuva, infetando os jovens pâmpanos. São os longos períodos de humidade, a elevada humidade relativa que favorecem a produção de esporos e posterior germinação assim como o desenvolvimento do micélio hibernante nos gomos dormentes dos sarmentos, à superfície dos pâmpanos, acompanhando o seu crescimento (Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, 2017).

A escoriose europeia, é uma doença que provoca cloroses entre as nervuras, que se transformam em necroses, de coloração uniforme em toda a sua superfície (Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, 2017).

Os sintomas da morte da madeira estão associados a faixas castanhas no xilema. A descoloração aparece como uma cor laranja/castanha na direção longitudinal logo abaixo da casca e pode se estender do tronco até ao porta-enxerto e às varas anuais (quadro 1). As faixas castanhas estão sempre associadas a sintomas foliares (Abou-Mansour *et al.*, 2015).

- **ESCA**

Esca, doença causada por fungos, inicialmente atribuída a um acidente fisiológico designado *follette*, prevalece principalmente em vinhas no hemisfério norte. Em 1922, o termo esca foi introduzido para designar esta doença caracterizada pela presença de uma podridão branca (Larignon *et al.*, 2009). Estudos verificaram que os ascomicetes *Phaeoacremonium spp.*, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Fomitiporia mediterranea*

estão associados a esta doença (Bruno & Sparapano, 2007; Cloete *et al.*, 2014). Na América do Sul e na África do Sul, outros basidiomicetes diferentes, de espécies do género *Fomitiporia*, também foram descritos associados a esta doença (Cloete *et al.*, 2014). A esca é causada por vários fungos que habitam no xilema em associação com outros fungos que atuam em concordância e complementaridade (Almeida, 2007).

A contaminação pode ser feita a partir basidiosporos ou de micélios dos fungos que penetram por feridas de poda ou outras. À medida que se dirigem para o cilindro central da planta os tecidos vão morrendo pela ação de uma enzima segregada pelo fungo que a celulose e a lenhina são degradadas pelo micélio, aparecendo uma zona amarela (figura 1) que posteriormente adquire uma cor escura (Neves, 2000).

Os sintomas de esca são enfraquecimento da madeira, clorose e manchas necróticas tigradas nas folhas e manchas castanhas nos bagos. Os sintomas na madeira são necrose central, necrose pontual preta, necrose setorial e uma listra de xilema descorada e podridão branca, que é o sintoma mais comum e específico de Esca. Nos casos mais graves, os sintomas resultam na morte da planta (Haidar *et al.*, 2016).

A doença pode assumir duas formas, a apoplexia e a forma lenta, e tradicionalmente são divididos, dependendo da gravidade e da rapidez com que aparecem. A apoplexia, caracteriza-se pela rápida murchidão da planta. Normalmente esta sintomatologia observa-se a meio do Verão, afetando toda a videira. As folhas, mantêm o forma normal, mas a sua coloração passa a verde mais claro ou cinzento-esverdeado e, em poucos dias murcham e secam. Os cachos também secam, permanecendo pendurados nas varas. A forma apoplética é favorecida por Verões quentes, particularmente aquando de precipitação seguida de tempo seco e temperaturas elevadas (Lecomte *et al.*, 2012; Chicau, 2006). A forma lenta, ocorre no final da primavera ou no verão, pode afetar apenas algumas partes da planta. Observam-se sintomas nas folhas, no tronco, nas varas e nos cachos. Os sintomas nas folhas manifestam-se no período de junho a setembro, não sendo estes específicos da doença. A sintomatologia foliar é caracterizada por necrose das margens das folhas estendendo-se para o centro, entre as nervuras aparecem manchas, amareladas e avermelhadas nas castas brancas e tintas, respetivamente, que posteriormente dão origem a uma mancha alongada. As necroses nas folhas observadas na forma lenta podem ser confundidas com problemas

fisiológicos, como a carência de magnésio ou o stress hídrico extremo (quadro 1) (Chicau, 2006).

- **Eutipiose**

A eutipiose, causada pelo fungo *Eutypa lata*, é uma doença grave da videira que ataca na maioria das regiões vitícolas de todo o mundo (Halleen *et al.*, 2010; Ayres *et al.*, 2017).

A disseminação da doença é assegurada por ascósporos desenvolvidos sobre madeira morta, espalhados pelo respingo da chuva e pelo vento. Os esporos penetram na videira através das feridas de poda ou de feridas acidentais recentes, germinam nos vasos do xilema e colonizam os cordões e tronco da videira (Neves, 2000; Ayres *et al.*, 2017). O fungo produz metabólitos tóxicos, que são transferidos para outras zonas da planta, levando ao aparecimento da sintomatologia característica (quadro 1) (Ayres *et al.*, 2017).

A eutipiose é comumente associada a sintomas como crescimento atrofiado de ramos em ziguezague, morte de braços ou até mesmo de vinhas inteiras (Halleen *et al.*, 2010). As cepas atacadas apresentam sintomas semelhantes aos do nó curto, os jovens pâmpanos desenvolvidos a partir de um sarmento infetado têm um aspeto anão, tufoso, deformado e com entrenós curtos, esta sintomatologia pode ocorrer em todos os ramos das videiras ou apenas em um. As folhas são mais pequenas que o normal, cloróticas, enroladas, deformadas com um aspeto esfarrapado, enquanto que nos casos mais graves podem apresentar necroses marginais, secando completamente e motivando uma precoce desfoliação. Durante o verão, geralmente, os cachos de tamanho reduzido e maturação irregular dos bagos secam (Neves, 2000; Ayres *et al.*, 2017). Um braço afetado apresenta uma ou várias necroses, na forma de cunha interna de tecido morto bem delimitada, característica sintomatologia da doença, de consistência dura e de coloração castanho acinzentado (figura 1) (Ayres *et al.*, 2017; Neves, 2000). É frequente o aparecimento de ladrões e de rebentos em madeira velha próxima do solo, zonas ainda não afetadas pelo fungo (Neves, 2000).

Este fungo causa a redução de produtividade devido a um número reduzido de cachos por planta. A qualidade do vinho, também pode ser afetada devido à desigual maturidade das videiras infetadas (Halleen *et al.*, 2010; Ayres *et al.*, 2017).

A eutipiose é uma doença de evolução lenta, a gravidade dos sintomas aumenta de ano para ano, a morte do braço atacado ou da cepa sobrevivem após três a cinco anos do aparecimento dos primeiros sintomas (Neves, 2000). Esta infecção e posterior morte da planta, pode ser controlada protegendo-se as feridas de poda (Ayres *et al.*, 2017).

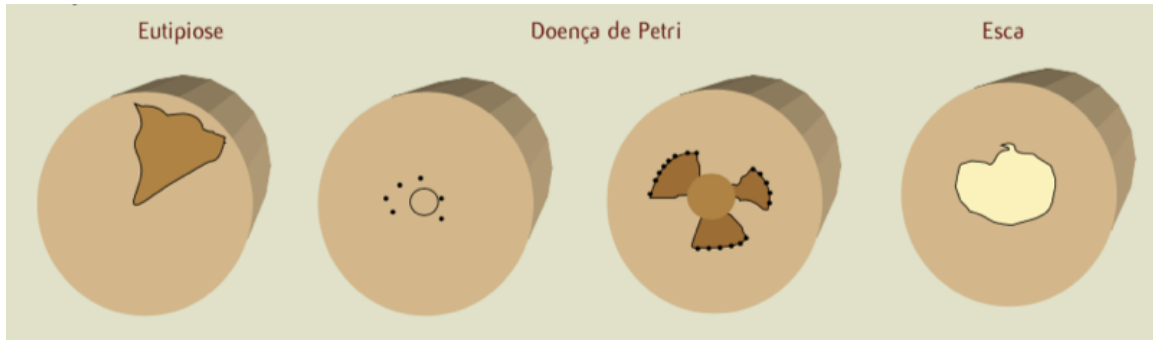


Figura 1. Sintomatologia de três doenças do lenho em corte transversal dos ramos de videira (Almeida, 2007).

Quadro 1: Comparação sintomatológica entre as diferentes doenças em diferentes partes da planta.

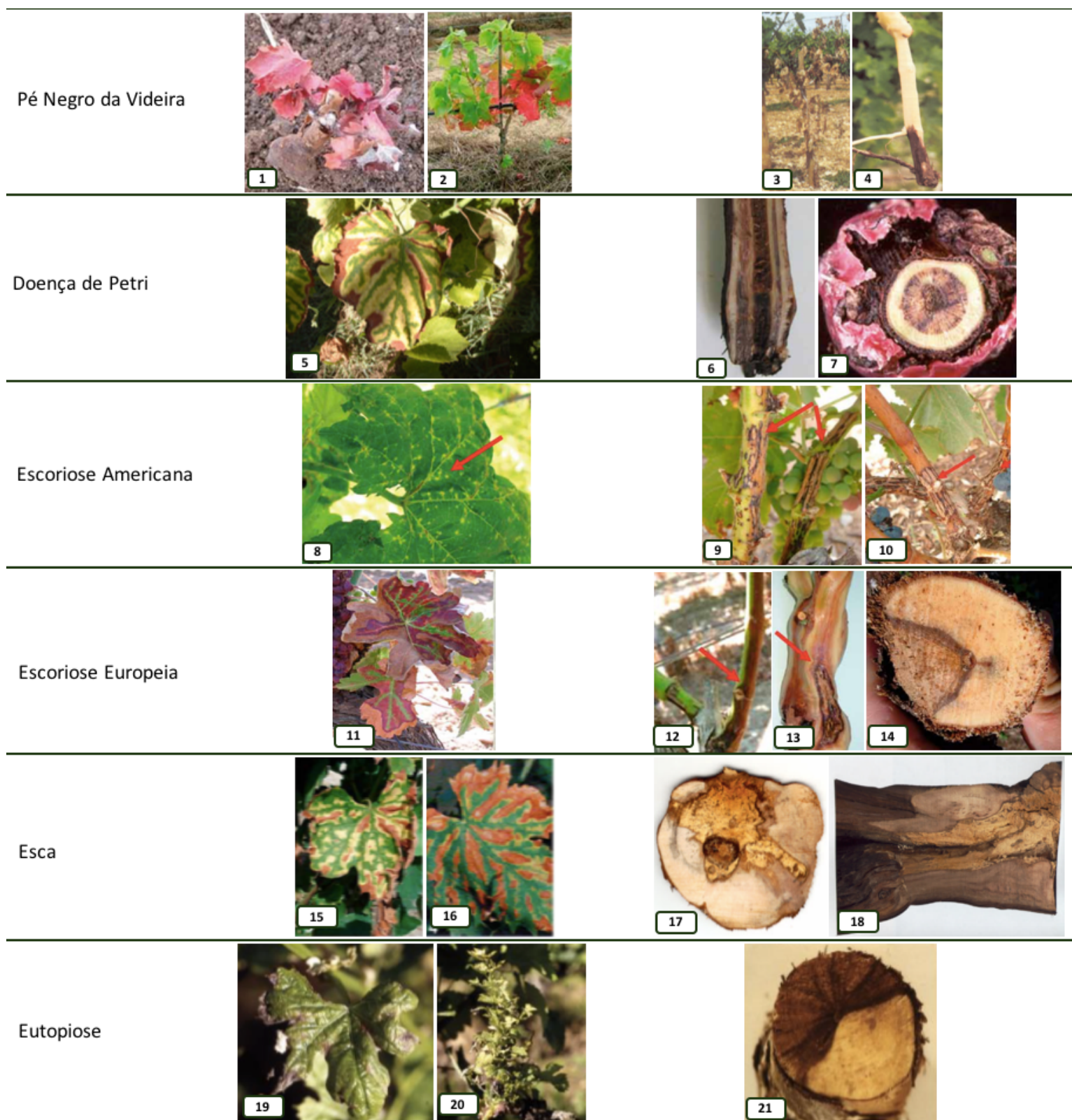


Foto 1 e 2: Avermelhamento da folhagem - perspectiva lateral e de cima (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 3: Definhamento (<http://www.winetwork-data.eu/pt/default.asp>);

Foto 4: Necrose na base do porta-enxerto (<http://www.winetwork-data.eu/pt/default.asp>);

Foto 5: Folhas com cloroses e necroses (<http://www.winetwork-data.eu/pt/default.asp>);

Foto 6: Sintomas (acastanhamento) na região basal de bacelo (corte longitudinal) (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 7: Sintomas (necroses) na zona de enxertia em enxerto pronto (corte transversal) (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 8: Sintomas em folha da base, as setas apontam para as pontuações cloróticas típicas da doença (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 9 e 10: Sintomas na vara ainda verde, em duas fases distintas de desenvolvimento - botões florais separados e início de pintor. Setas mostram em pormenor as manchas esbranquiçadas das varas, salpicadas de picnídios (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>; Syngenta, 2018);

Foto 11: Sintomas em folha (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 12: Sintomas na vara antes do atempamento, manchas castanhas alongadas e em depressão, cancos, como indicados pela seta (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 13: Necrose do tronco depois de removido o ritidoma, ou vulgarmente denominado de casca, como a seta indica (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 14: Sintomas em madeira (corte transversal) (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 15 e 16: Sintomas de Esca em folha de casta branca e tinta, respetivamente (<http://www.drapc.min-agricultura.pt/>);

Foto 17 e 18: Sintomas de Esca em madeira, corte transversal e longitudinal, respetivamente (<http://www.winetwork-data.eu/pt/default.asp>).

Foto 19 e 20: Sintomas de Eutopiose em folhas (<http://www.advid.pt/>);

Foto 21: Sintomas de Eutopiose em madeira, corte transversal (<http://www.advid.pt/>);

1.2.2. MEIOS DE LUTA CONTRA DOENÇAS DO LENHO

As doenças do lenho da videira não são recentes, mas causaram poucos problemas devido à utilização de arsenito de sódio nas vinhas (Grenet & Mercier, 2007). O uso de arsenito de sódio, o único produto químico capaz de reduzir tais doenças das vinhas, foi proibido em 2003 na Europa, devido ao seu caráter altamente cancerígeno e à sua toxicidade para o meio ambiente (Grenet & Mercier, 2007; Bruez *et al.*, 2017). Desde então, vários tratamentos foram testados, com sucesso variável, para controlar as doenças do lenho das vinhas (Bruez *et al.*, 2017). Aquando da proibição do arsenito de sódio, houve uma progressão preocupante destas doenças nas vinhas em todo o mundo, o que levou a uma preocupação dos produtores, uma vez que não existem métodos de controle de substituição satisfatórios até hoje (Ammad *et al.*, 2018). A dificuldade em encontrar um produto curativo, está em encontrar no lenho, os agentes patogénicos responsáveis, o que requer o uso de produtos penetrantes e duradouros (Grenet & Mercier, 2007). Para além disso, o uso de tais produtos está cada vez mais restrito devido aos efeitos nocivos na saúde humana e no meio ambiente (Ammad *et al.*, 2018). Os métodos de controle disponíveis são profiláticos (Ammad *et al.*, 2018), não existe cura eficaz para as doenças do lenho, mas algumas práticas corretivas nas videiras

afetadas são possíveis; estas incluem a remoção e queima de partes, ou a totalidade da planta morta e re-enxertia das videiras afetadas (Andolfi *et al.*, 2011; Chicau, 2006). É aconselhado ainda que a poda seja realizada o mais tarde possível, com tempo seco e não ventoso, evitando feridas de grande superfície. As tesouras de poda deveriam conter um depósito para calda fungicida, o que permite simultaneamente descontaminar a lâmina da tesoura, e a ferida de poda, deixando sempre que possível as plantas doentes para o fim (Chicau, 2006).

Além disso, a aplicação de protetores químicos e biológicos em feridas de poda tem sido recomendada para reduzir a disseminação destas doenças (Andolfi *et al.*, 2011).

É aconselhado praticar-se um programa de proteção integrada, como tratamentos com água quente ao material de propagação da videira, e a aplicação de pesticidas químicos e/ou agentes de biocontrole em diferentes etapas do crescimento de novas videiras, estas aplicações mostraram alguns resultados interessantes no controle dessas doenças (Andolfi *et al.*, 2011).

Conhecem-se há muito tempo microrganismos capazes de controlar fungos patogênicos. A ideia de utilizar estes microrganismos para controlar as doenças do lenho da videira é muito natural, visto que, caso se desenvolvam no lenho são capazes de atingir os agentes patogênicos *in situ* (Grenet & Mercier, 2007). O biocontrole, pode ser feito tratando ferimentos com *Trichoderma harzianum*, o que reduz significativamente o desenvolvimento dos fungos patogênicos *Botryosphaeria* spp, *Phaeomoniella* spp e *Phaeoacremonium* spp (Ammad *et al.*, 2018).



2.OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade antagonista de 12 fungos endofíticos isolados de vinhas do Alentejo, com produção de uva de mesa e uva para vinho, contra fungos responsáveis por doenças do lenho no Alentejo, *Botryosphaeria dothidea* e *Phomopsis viticola*.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS E EXTRAÇÃO DE DNA

Neste trabalho foram utilizados 12 fungos endofíticos e dois fungos causadores de doenças do lenho, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Micologia, da Universidade de Évora/Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM). Tanto os fungos patogénicos, *Botryosphaeria dothidea* e *Phomopsis viticola*, como todos os isolados, dos quais se pretende avaliar a sua capacidade antagonista, foram originalmente isolados de vinhas do Alentejo.

3.2. CULTURA E MANUSEAMENTO DOS ISOLADOS DE FUNGOS

Todos os trabalhos de manuseamento para repicagem dos fungos utilizados foram realizados na câmara de fluxo laminar, provida de lâmpada ultravioleta. As operações foram sempre realizadas perto de um bico de *Busen*, para que se mantenham as condições de assepsia e se reduzam as probabilidades de contaminação.

Todo o material utilizado durante os procedimentos, foi previamente esterilizado em autoclave (Uniclave 88 A.J. Costa), numa temperatura de 120 °C, durante 20 minutos.

A repicagem dos fungos foi realizada retirando micélio da margem das colónias de fungos para placas de *Petri* de 60 mm, contendo *Potato Dextrose Agar* (PDA) (*Himedia*), com a proporção de 39 g para um 1 L de água destilada. As placas foram incubadas a 25±3°C, durante sete dias.

3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE FUNGOS

Os fungos endofíticos utilizados neste trabalho foram identificados a partir das suas sequências nucleotídicas, com base na sequência obtida da região ITS. A sequência nucleotídicas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Micologia.

A procura de sequências homólogas para possível identificação dos fungos foi feita com recurso à base de dados *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.4. TESTES DE ANTAGONISMO

3.4.1. TESTES DE ANTAGONISMO DIRETO

A capacidade antagonista dos 12 fungos endofíticos contra *B. dothidea* e *P. viticola* foi avaliada utilizando o método de confronto direto (Dennis & Webster, 1971). Neste método foram utilizadas placas de *Petri* de 90 mm, com meio PDA.

Durante a montagem do ensaio foi colocada uma pequena porção de micélio de cada um dos diferentes fungos endofíticos a cerca de 1 cm da parede da placa de *Petri* e na posição diametralmente oposta foi colocado micélio de cada um dos fungos patogénicos, *B. dothidea* e *P. viticola* (figura 2). Foram realizados tripletos para cada um dos endofíticos testado e as placas foram incubadas a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. De forma a avaliar o comportamento do patogénico utilizou-se um controlo negativo, numa placa de 90 mm, foi colocado apenas micélio dos fungos patogénicos, também este a 1 cm da parede da placa de *Petri*.

Aos dias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 e 15 após a montagem do ensaio o raio de crescimento dos agentes patogénicos foi medido com uma régua, desde o ponto de colocação do micélio até ao limite da cultura. A medição das placas controlo foi realizada do mesmo modo.

Após a medição foi calculada a percentagem de inibição, utilizando a fórmula de Royse & Ries (1977):

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

Em que:

I: Percentagem de inibição

R1: raio da colónia de fungo na placa de controlo

R2: raio da colónia de fungo na placa de teste

A avaliação da interação entre fungos patogénicos e fungos endofíticos foi realizada com base numa escala de A a D (Dharmaputra, 2003; Demirci *et al.*, 2012; Landum *et al.*, 2016). Em que, **A**, representa a inibição do crescimento de *B. dothidea* e *P. viticola* em contacto com o fungo antagonista; **B**, ocorre quando existe um sobrepor mútuo por ambos os fungos, tanto o fungo patogénico como o fungo antagonista crescem lentamente, mesmo que a uma taxa de crescimento diferente; o tipo de interação **C**,

ocorre quando existe uma inibição mútua de crescimento de ambos os fungos, com uma distância espacial entre as hifas de crescimento $< 0,2$ cm; a interação classificada como **D**, é semelhante à referida anteriormente, embora nestes casos o espaço criado pelas hifas de crescimento na inibição mútua seja $> 0,2$ cm.

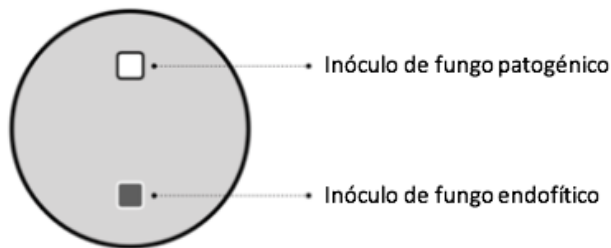


Figura 2. Representação esquemática do teste de antagonismo direto.

3.4.2. TESTE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

O teste dos compostos voláteis (Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Landum *et al*, 2016), foi realizado para avaliar a possível produção de compostos voláteis, e perceber se estes poderiam ter alguma influência no crescimento de *B. dothidea* e de *P. viticola*.

Os fungos endofíticos foram incubados em placas de *Petri*, de 90 mm, como descrito anteriormente, durante cinco dias; enquanto que, os fungos fitopatogénicos foram incubados em placas de *Petri* de 60 mm, mas apenas por dois dias.

Após ambos os períodos, e determinando assim o dia 0 do ensaio, as placas de 60 mm contendo os fungos patogénicos foram colocadas invertidas em cima de cada uma das placas de 90 mm contendo os fungos endofíticos (figura 3). O topo das placas de *Petri* foi selado com parafilme para não existir a difusão dos compostos voláteis.

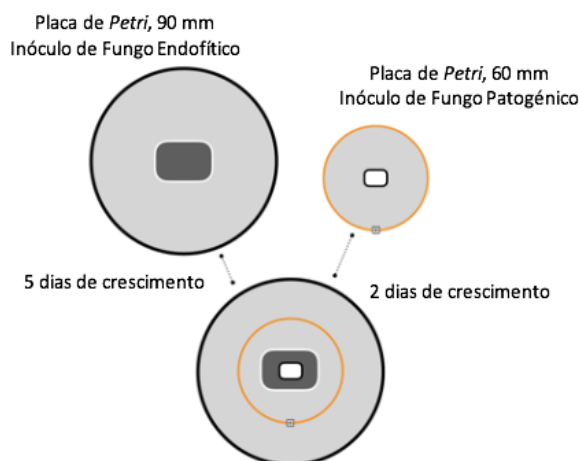


Figura 3. Representação esquemática do teste de compostos voláteis.

Foram realizadas três réplicas por cada fungo endofítico e, o crescimento de cada uma das placas foi comparado com o controlo negativo, que consistiu em uma placa de 60 mm invertida em cima de uma placa de 90 mm apenas com meio PDA, sem qualquer fungo. Realizaram-se também três réplicas do controlo negativo.

A primeira medição do raio de crescimento do agente patogénico foi realizada imediatamente antes da inversão das placas, e este foi considerado o dia zero do ensaio, como anteriormente referido. As medições foram repetidas ao fim de cinco, e de 10 dias de incubação, a $25\pm 3^\circ\text{C}$. A percentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula supra apresentada.

3.4.3. TESTE DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

A capacidade antagonista dos fungos endofíticos contra fungos patogénicos, foi também avaliada através da produção de compostos não voláteis através de métodos descritos anteriormente (Landum *et al*, 2016; Rahmansyah & Rahmansyah, 2013).

Em *erlenmeyers* de 250 mL, foram colocados 150 mL de meio *Potato Dextrose Broth* (PDB) (*Fluka*), numa proporção de 24 g de para 1 L de água destilada. Em cada um dos fracos foi inoculado 5 mm de micélio, retirado das margens da colónia de cada um dos diferentes fungos endofíticos a partir das placas de Petri com PDA. Os *erlenmeyers* foram colocados numa incubadora (IKA® KA 4000) por 12 dias, à temperatura controlada de $25\pm 2^\circ\text{C}$, numa agitação constante de 150 rpm (figura 4).

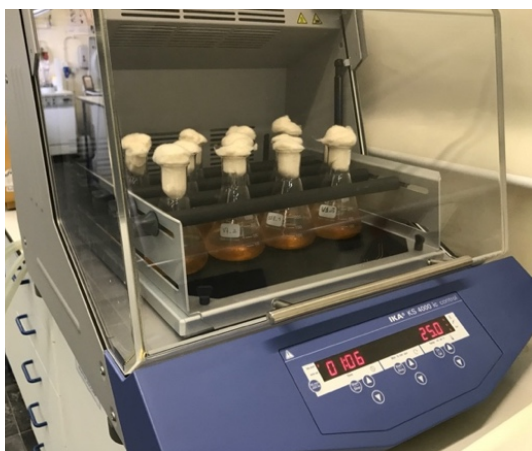


Figura 4. Crescimento dos fungos em meio de cultura líquido, em ambiente controlado.

Passados os 12 dias (figura 5), as soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 10 000 g, e de seguida filtradas em papel *Whatman* de 150 mm, para que fossem removidos esporos e outras estruturas de fungos.



Figura 5. Crescimento de fungos endofíticos, após 12 dias em meio líquido e ambiente de incubação controlado.

Na segunda etapa em cada placa do ensaio, placas de 90 mm com meio PDA, foram criados 4 orifícios, com aproximadamente 1 cm de diâmetro. Os orifícios foram feitos o mais perto exequível das paredes da placa e em posições opostas (figura 6). Os fungos patogénicos, *B. dothidea* e *P. viticola*, foram inoculados nas placas onde haviam sido criados os poços. Os fungos patogénicos foram incubados por dois dias, e após o crescimento, nos diferentes orifícios foram colocados diferentes volumes, 75, 100 e 200 μL , do sobrenadante do meio PDB onde os fungos endofíticos cresceram. O sobrenadante foi previamente filtrado. O quarto poço foi cheio com 75 μL de meio PDB, para servir como controlo.

O raio de crescimento de *B. dothidea* e de *P. viticola* foi medido ao segundo dia de crescimento, ou seja, imediatamente antes do preenchimento dos orifícios com os diferentes volumes de sobrenadante filtrado do fungos endofíticos e meio PDB, e este foi considerado o dia zero do ensaio. A medição do raio de crescimento de ambos os fungos patogénicos foi feita ao fim de cinco dias.

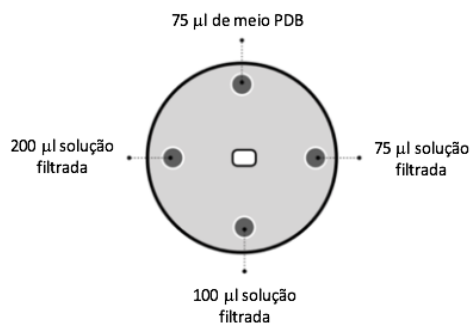


Figura 6. Representação esquemática do teste de compostos não voláteis.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na apreciação estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), esta foi realizada em relação às diferenças entre fungos antagonistas em diferentes dias de cada um dos testes de antagonismo. A análise estatística foi executada com recurso ao *software* IBM SPSS v.20. O teste *Turkey HSD* foi o utilizado para as comparações múltiplas, e os conjuntos de dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS, ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Durante o estudo foram isolados 12 fungos endofíticos, cinco dos quais provenientes de videiras para produção de vinho, e sete de videiras com produção de uva de mesa (quadro 2). Dos cinco fungos isolados a partir de plantas produtoras de vinho, dois pertencem à casta Aragonez, dois a Cabernet Sauvignon e um a Verdelho. Dos fungos obtidos a partir de plantas produtoras de uva de mesa, seis foram isolados da casta Vitória e um da casta Cardinal.

Durante a pesquisa, foram isolados dois fungos causadores de doenças do lenho, *Botryosphaeria dothidea* e *Phomopsis viticola*, tendo o primeiro sido isolado da casta Cardinal, de plantas de uva para mesa, e o segundo de Cabernet Sauvignon, videiras com uva para vinho (figura 7).

Os 14 fungos, endofíticos e patogênicos, foram identificados com base na sequência obtida da região ITS incluem um isolado de *Cladosporium* sp., sete isolados de *Alternaria* sp. e quatro isolados de *Epicoccum* sp. (quadro 2, figura 8).

Quadro 2. Identificação de cada um dos fungos endofíticos isolados com correspondência à casta e ao tipo de uva.

TIPO DE PRODUÇÃO	CASTA	FUNGO
Vinho	Aragonez	<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Alternaria</i> sp. 1
	Cabernet Sauvignon	<i>Alternaria</i> sp. 3
		<i>Epicoccum</i> sp. 3
	Verdelho	<i>Epicoccum</i> sp. 4
Mesa	Cardinal	<i>Alternaria</i> sp. 2
		<i>Alternaria</i> sp. 4
	Vitoria	<i>Alternaria</i> sp. 5
		<i>Alternaria</i> sp. 6
		<i>Alternaria</i> sp. 7
		<i>Epicoccum</i> sp. 1
		<i>Epicoccum</i> sp. 2

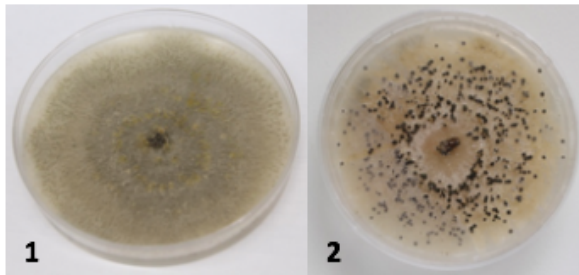


Figura 7. 1- Placa de *Petri* com *B. dothidea*; 2- Placa de *Petri* com *P. viticola*.

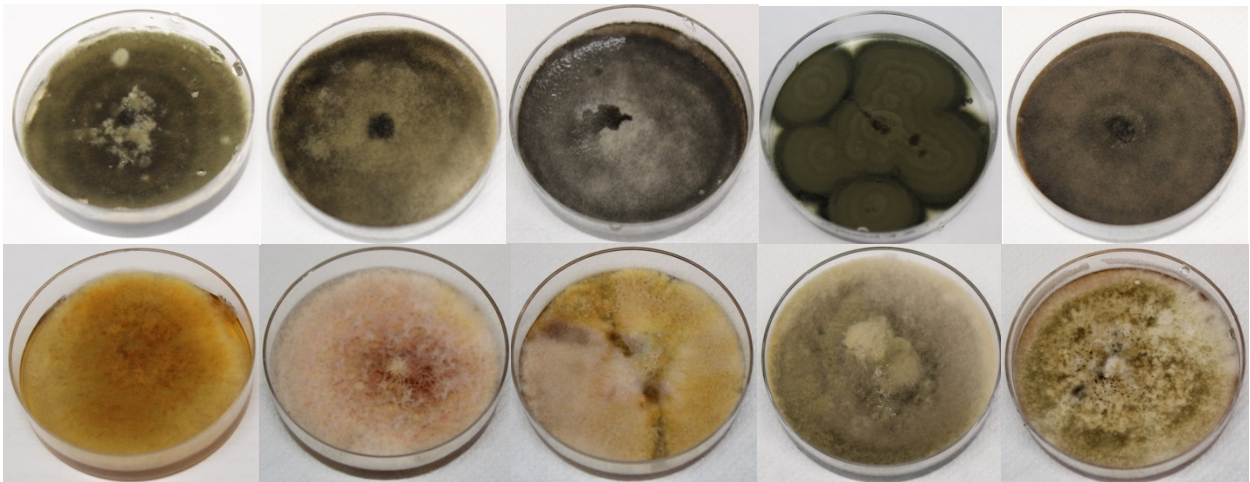


Figura 8. Fungos Endofíticos utilizados durante o ensaio.

4.2. TESTES DE ANTAGONISMO

4.2.1. TESTE DE ANTAGONISMO DIRETO

A primeira avaliação da atividade antagonista dos isolados endofíticos contra os patogênicos de doenças do lenho foi através de testes de antagonismo direto.

No dia zero do teste de antagonismo direto as placas de *Petri* foram inoculadas com discos de micélio de fungo patogênico e fungo endofítico, estes foram colocados em posições opostas da placa (figura 9).

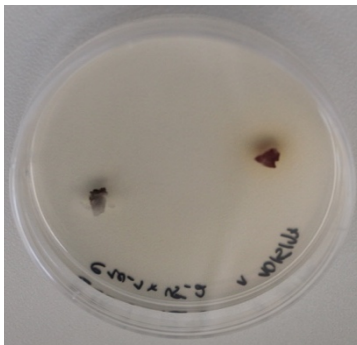


Figura 9. Placa de *Petri* no dia zero do teste de antagonismo direto. Fungo patogênico, à esquerda, e fungo endofítico, à direita. Inoculação diametralmente oposta.

Todos os fungos em teste conseguiram inibir o crescimento de ambos os fungos patogênicos (quadros 3 e 4, figuras 10 e 11), mesmo que em diferentes proporções, pois em nenhum dos casos o valor se aproximou do valor do controle após 15 dias de teste. A partir do quinto dia do teste é possível, reparar num abrandamento geral do crescimento de *B. dothidea* quando na presença de fungos endofíticos enquanto que no caso de *P. viticola*, esta discrepância só começa a ser notada ao décimo dia de ensaio. Este abrandamento ocorre na presença de todos os isolados endofíticos testados, o que mostra que todos eles possuem uma ação inibitória no crescimento de *B. dothidea* e *P. viticola*.

Quadro 3. Valores do raio de crescimento de *B. dothidea* (cm) ($rB. dothidea \pm SE$) quando em confronto com os fungos endofíticos, e valores de controlo, ao longo dos 15 dias de ensaio. Foram realizadas três replicas por cada ensaio.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 10	DIA 12	DIA 15
<i>Cladosporium</i> sp.	1.20±0.27	1.23±0.25	1.23±0.25	1.23±0.25	1.37±0.32	1.37±0.32	1.37±0.32	1.37±0.32	1.37±0.32
<i>Alternaria</i> sp. 1	1.17±0.38	1.23±0.25	1.63±0,35	1.97±0.15	1.97±0.15	1.97±0.15	1.97±0.15	2.05±0.07	2.05±0.07
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.60±0.10	1.33±0.06	1.50±0.00	2.20±0.17	2.40±0.10	2.40±0.10	2.40±0.10	2.40±0.10	3.10±0.40
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.87±0.06	1.33±0.21	2.33±0.15	2.33±0.15	2.33±0.15	2.33±0.15	2.33±0.15	2.33±0.15	2.33±0.15
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.70±0.10	1.43±0.06	1.47±0.06	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.67±0.06	1.07±0.06	1.63±0.12	1.63±0.12	1.63±0.12	1.63±0.12	1.83±0.15	1.83±0.15	1.83±0.15
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.37±0.12	0.80±0.17	1,33±0,29	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.60±0.17	1.27±0.06	2.30±0,27	2.40±0.00	2.50±0.00	2.50±0.00	2.50±0.00	2.50±0.00	2.50±0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.67±0.15	1.30±0.10	1.93±0.12	2.10±0.36	2.20±0.53	2.20±0.53	2.20±0.53	2.23±0.49	2.43±0.32
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.60±0.00	1.13±0.06	1.70±0.10	2.10±0.20	2.10±0.20	2.20±0.17	2.20±0.17	2.20±0.17	2.20±0.17
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.43±0.06	1.17±0.06	1.87±0.06	2.03±0.06	2.03±0.06	2.05±0.07	2.07±0.06	2.07±0.06	2.13±0.15
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.50±0.00	1.10±0.17	1.60±0.14	2.10±0.10	2.20±0.00	2.20±0.00	2.20±0.00	2.20±0.00	2.20±0.00
Controlo Negativo	0.57±0.12	1.33±0.15	2.10±0.17	4.10±0.00	4.90±0.00	5.50±0.00	6.00±0.00	6.80±0.00	7.00±0.00

Quadro 4. Valores do raio de crescimento de *P. viticola* (cm) ($rP. viticola \pm SE$) quando em confronto com os fungos endofíticos, e valores de controlo, ao longo dos 15 dias de ensaio. Foram realizadas três replicas por cada ensaio.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 10	DIA 12	DIA 15
<i>Cladosporium</i> sp.	0.40±0.17	0.97±0.06	1.00±0.00	1.67±0.58	2.17±0.29	2.33±0.29	2.57±0.60	2.57±0.60	2.63±0.61
<i>Alternaria</i> sp. 1	0.30±0.00	0.60±0.17	1.07±0.12	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.58±0.10	1.58±0.10	1.63±0.06
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.40±0.17	0.97±0.06	1.03±0.15	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.33±0.06	0.73±0.06	1.00±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00	1.70±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.30±0.00	0.73±0.06	1.10±0.36	1.50±0.10	1.50±0.10	1.50±0.10	1.60±0.00	1.60±0.00	1.60±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.40±0.10	0.63±0.06	1.17±0.15	1.55±0.07	1.60±0.00	1.60±0.00	1.60±0.00	1.60±0.00	1.60±0.00
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.43±0.12	0.97±0.06	1.53±0.06	2.25±0.25	2.30±0.28	2.30±0.28	2.30±0.20	2.30±0.20	2.30±0.20
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.23±0.06	0.50±0.00	0.87±0.06	1.65±0.07	1.70±0.05	1.80±0.14	1.90±0.00	1.95±0.07	1.97±0.06
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.20±0.00	0.93±0.06	1.27±0.06	1.35±0.05	1.50±0.00	1.60±0.14	1.70±0.10	1.75±0.05	1.75±0.05
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.27±0.12	0.57±0.12	1.13±0.15	1.50±0.00	1.60±0.10	1.60±0.10	1.63±0.06	1.67±0.12	1.67±0.12
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.30±0.00	0.73±0.12	0.87±0.06	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00	1.50±0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.37±0.15	0.70±0.00	1.00±0.00	1.75±0.05	1.75±0.05	1.80±0.00	1.80±0.00	1.80±0.00	1.80±0.00
Controlo Negativo	0.53±0.12	0.90±0.10	1.33±0.15	1.60±0.26	1.90±0.52	2.03±0.58	2.97±0.84	4.50±0.20	6.47±0.15

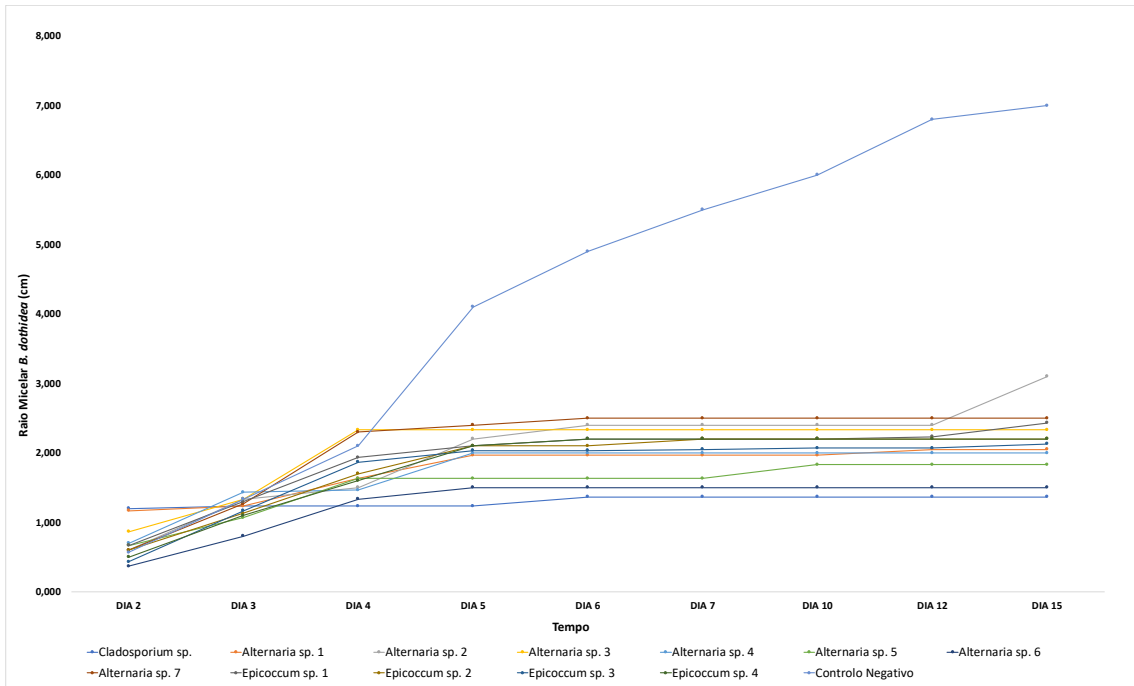


Figura 10. Valores do raio de crescimento de *B. dothidea* durante os 15 dias de ensaio de antagonismo direto.

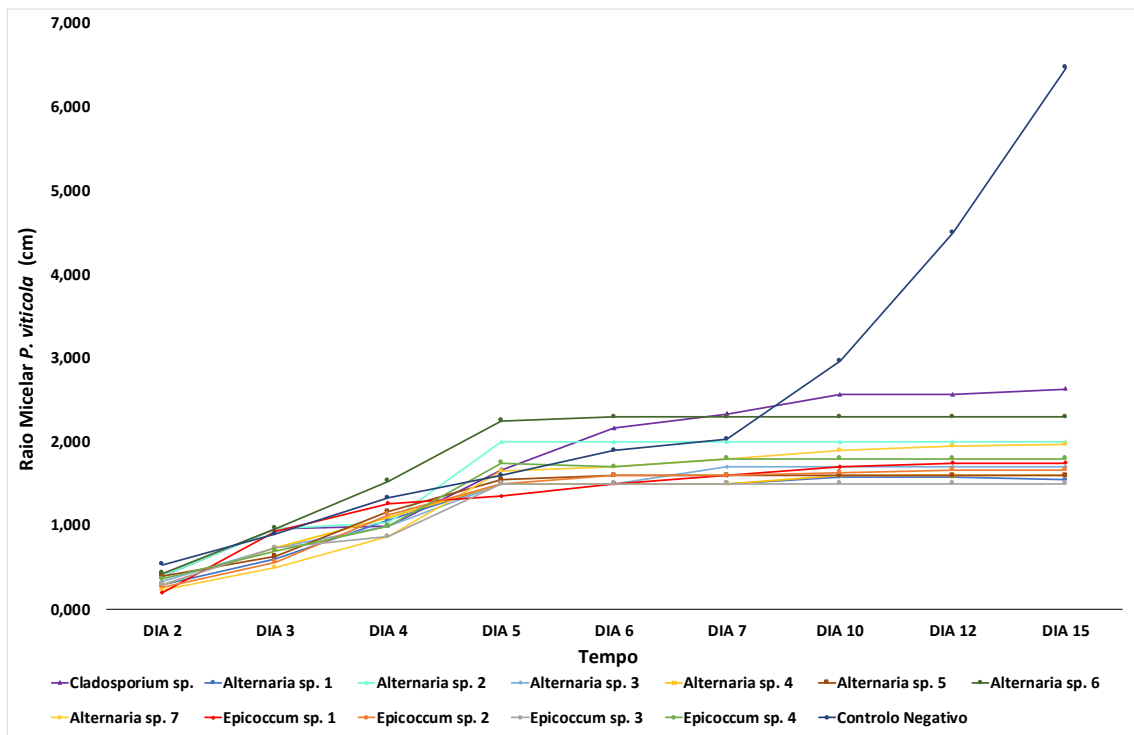


Figura 11. Valores do raio de crescimento de *P. viticola* durante os 15 dias de ensaio de antagonismo direto.

No caso da *Alternaria* sp. 2, o efeito antagonista contra *B. dothidea* não é tão elevado como nos restantes casos, permitindo ao agente patogénico atingir um valor superior de crescimento, obtendo um valor de 3.10 ± 0.40 cm, sendo mesmo assim diferente de 7.00 ± 0.00 cm obtidos no controlo (quadro 3, figuras 10 e 12.1).

Por sua vez, no caso do teste com o fungo endofítico *Cladosporium* sp., pode-se observar a sua capacidade antagonista contra *B. dothidea* logo partir do terceiro dia de ensaio, mantendo-se constante do sexto dia de ensaio até ao final. O fungo endofítico *Cladosporium* sp. foi o que no último dia de ensaio apresentou o menor valor de crescimento do raio de *B. dothidea*, e consequentemente maiores valores de inibição (quadro 3, figuras 10 e 12.2).

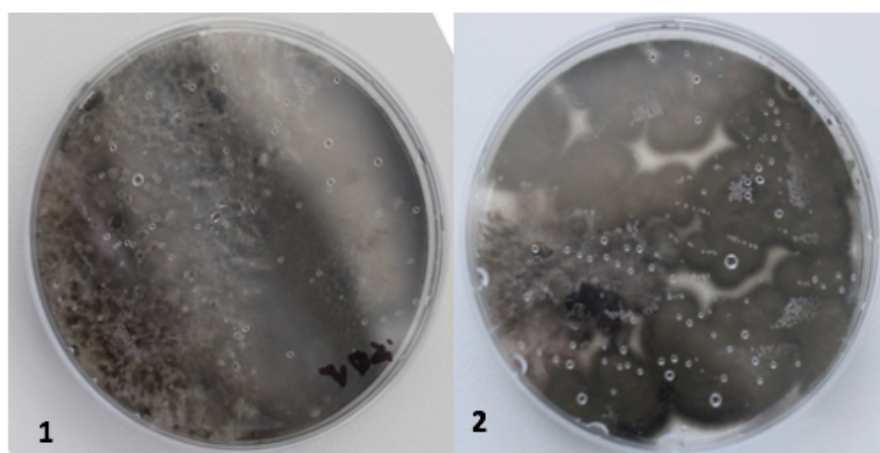


Figura 12. 1- Placa de teste de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 2, ao 15º dia de ensaio; 2- Placa de teste de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Cladosporium* sp., ao 15º dia de ensaio.

Em ambos os casos o agente patogénico se encontra à esquerda da fotografia.

A *Alternaria* sp. 6, também apresentou antagonismo elevado uma vez que ao segundo dia de teste apresentou o valor mais baixo de crescimento de *B. dothidea*. Do quinto dia até ao final do ensaio o valor de crescimento manteve-se constante, tendo inibido desde este dia o crescimento do fungo patogénico (quadro 3, figura 10).

No caso de *P. viticola* vs *Cladosporium* sp., o resultado é o oposto ao obtido quando este fungo endofítico foi colocado em confronto com *B. dothidea*. O crescimento de *P. viticola* foi contínuo, não tendo aumentado de tamanho apenas entre os dias 10 e 12, tendo sido na presença deste fungo endofítico que o raio de crescimento de *P. viticola* obteve a maior taxa de crescimento, exceto o controlo (quadro 4, figuras 11 e 13). De

seguida, a placa onde existiu o segundo maior crescimento do raio de *P. viticola* foi em confronto com a *Alternaria* sp. 6, porém neste caso o agente patogénico desenvolveu-se apenas até ao sexto dia de teste. O desenvolvimento de *P. viticola* na presença de *Alternaria* sp. 6 foi mais rápido que o controlo até ao sétimo dia de ensaio, mas desde o sexto dia que o crescimento do agente patogénico foi bloqueado mantendo-se constante até ao décimo quinto dia de ensaio (quadro 4, figura 11).

Aquando do confronto direto entre *P. viticola* com *Epicoccum* sp. 3 foi obtido o valor mais elevado de antagonismo, obteve-se o menor raio de crescimento do fungo patogénico *P. viticola*, ao longo de praticamente todo o ensaio, este crescimento manteve-se constante desde o dia cinco até ao final do ensaio (quadro 4, figura 11).

Nos ensaios de *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4 e *Alternaria* sp. 5 vs *P. viticola*, também foram obtidos valores elevados de inibição.

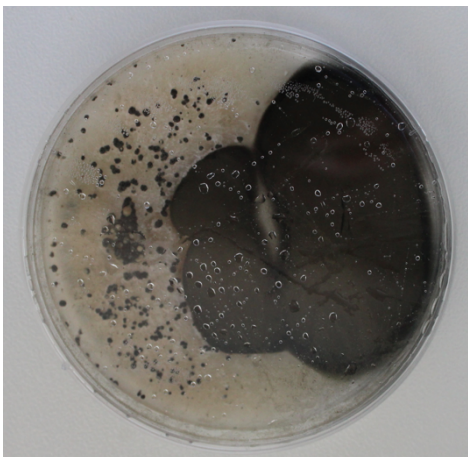


Figura 13. Placa de teste de *P. viticola* quando em confronto com o antagonista *Cladosporium* sp., ao 15º dia de ensaio; O agente patogénico encontra-se à esquerda da figura.

No dia dois, o crescimento de *B. dothidea* na presença do antagonista *Cladosporium* sp., apresentou um crescimento de 1.20 ± 0.27 cm que foi significativamente maior ($p < 0.05$) em comparação com a maioria dos outros fungos endofíticos, com exceção de *Alternaria* sp. 1 e *Alternaria* sp. 3, onde não existiram diferenças significativas ($p > 0.05$). Na presença do fungo antagonista *Alternaria* sp. 6, *B. dothidea* apresentou o menor valor de crescimento radial, 0.37 ± 0.12 cm, que foi significativamente menor ($p < 0.05$) do que os valores obtidos na presença da maioria dos restantes fungos endofíticos, a diferença não foi significativa ($p > 0.05$) na presença de *Alternaria* sp. 7, *Epicoccum* sp. 3 e *Epicoccum* sp. 4 (figura 14).

No dia cinco, o crescimento de *B. dothidea* na presença de *Cladosporium* sp. foi de 1.23 ± 0.25 cm, e contrariamente ao que ocorreu no dia dois, passou a ser o menor valor de crescimento do raio, apresentando diferenças significativas de crescimento ($p < 0.05$) com a maioria dos outros fungos endofíticos, à exceção de *Alternaria* sp. 5 e *Alternaria* sp. 6, onde não ocorreram diferenças significativas ($p > 0.05$). O maior crescimento ao quinto dia de teste foi apresentado na placa do controlo negativo, existindo diferenças significativas ($p < 0.05$) no valor de crescimento do raio para com todas as outras placas do ensaio, onde *B. dothidea* está na presença de fungos endofíticos (figura 14).

Ao 10º dia de ensaio, o menor valor de crescimento do agente patogénico foi novamente apresentado quando na presença do *Cladosporium* sp., tendo havido diferenças significativas ($p < 0.05$) com a presença da maioria dos outros fungos endofíticos, à exceção das placas onde *B. dothidea* se encontra em confronto com *Alternaria* sp. 5, *Alternaria* sp. 6 e *Epicoccum* sp. 1. O maior crescimento é do controlo, que apresenta diferenças significativas ($p < 0.05$) com todas as placas onde *B. dothidea* se inoculou em confronto com fungos endofíticos (figura 14).

Novamente, ao dia 15 de ensaio, o menor valor de crescimento radial do fungo patogénico ocorre na presença de *Cladosporium* sp., 1.37 ± 0.32 cm, e o maior é obtido por controlo negativo, 7.00 ± 0.00 cm. As diferenças são significativas ($p < 0.05$) entre a presença de *Cladosporium* sp. e as restantes placas de teste, com exceção de *Alternaria* sp. 5 e *Alternaria* sp. 6 onde as diferenças não são significativas ($p > 0.05$). Todas as placas do ensaio apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$) comparativamente ao controlo (figura 14).

Ao segundo dia, o menor crescimento de *P. viticola* ocorreu na presença do fungo endofítico *Epicoccum* sp. 1, 0.20 ± 0.00 , tendo este obtido diferenças significativas ($p < 0.05$) com os ensaios em que o agente patogénico se encontra na presença de *Alternaria* sp. 3, *Alternaria* sp. 5, *Alternaria* sp. 6 e com o controlo negativo. Quando o valor de *Epicoccum* sp. 1 é comparado com os restantes ensaios os resultados não são significativos ($p > 0.05$). O maior valor de crescimento foi obtido na placa usada como controlo, 0.53 ± 0.12 cm, tendo esta obtido diferenças significativas ($p < 0.05$) das placas do teste onde *P. viticola* se inoculou em confronto com *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4, *Alternaria* sp. 7, *Epicoccum* sp. 1, *Epicoccum* sp. 2, *Epicoccum* sp. 3, dos restantes ensaio as diferenças não foram significativas ($p > 0.05$) (figura 15).

No quinto dia do teste de antagonismo direto, o menor crescimento micelar de *P. viticola* ocorreu em confronto com *Epicoccum* sp. 1, ao comparar com *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4 e com o controle as diferenças não foram significativas ($p > 0.05$), enquanto que com as restantes placas em teste os resultados foram significativos ($p < 0.05$). O maior raio de crescimento foi obtido na presença de *Alternaria* sp. 6, tendo-se obtido diferenças significativas ($p < 0.05$) com a maior parte dos restantes testes, exceto quando na presença de *Cladosporium* sp. e de *Alternaria* sp. 2, onde as diferenças não são significativas ($p > 0.05$) (figura 15).

Tanto ao décimo, como ao décimo quinto dia o maior crescimento radial do fungo patogénico *P. viticola* foi obtido na placa de controlo e o menor valor foi obtido na placa de *P. viticola* vs *Epicoccum* sp. 3. No dia dez, foram obtidas diferenças significativas ($p < 0.05$) das placas de crescimento de *Epicoccum* sp. 3 com *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp.6, *Epicoccum* sp. 1 e *Epicoccum* sp. 3, com as restantes placas as diferenças não foram significativas ($p > 0.05$). Enquanto que o controlo no décimo dia, tendo sido o maior crescimento radial, 2.97 ± 0.84 cm, obteve diferenças significativas ($p < 0.05$) com *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 3, *Alternaria* sp. 4, *Alternaria* sp. 5, *Epicoccum* sp. 1, *Epicoccum* sp. 2 e *Epicoccum* sp. 3, com as restantes as diferenças não foram significativas ($p > 0.05$) (figura 15).

Ao décimo quinto dia, *Epicoccum* sp. 3, obteve diferenças significativas ($p < 0.05$) com a maioria das restantes placas, com exceção de *Alternaria* sp. 1 com a qual as diferenças foram significativas ($p > 0.05$). O controlo obteve diferenças significativas ($p < 0.05$) com todas as placas em teste (figura 15).

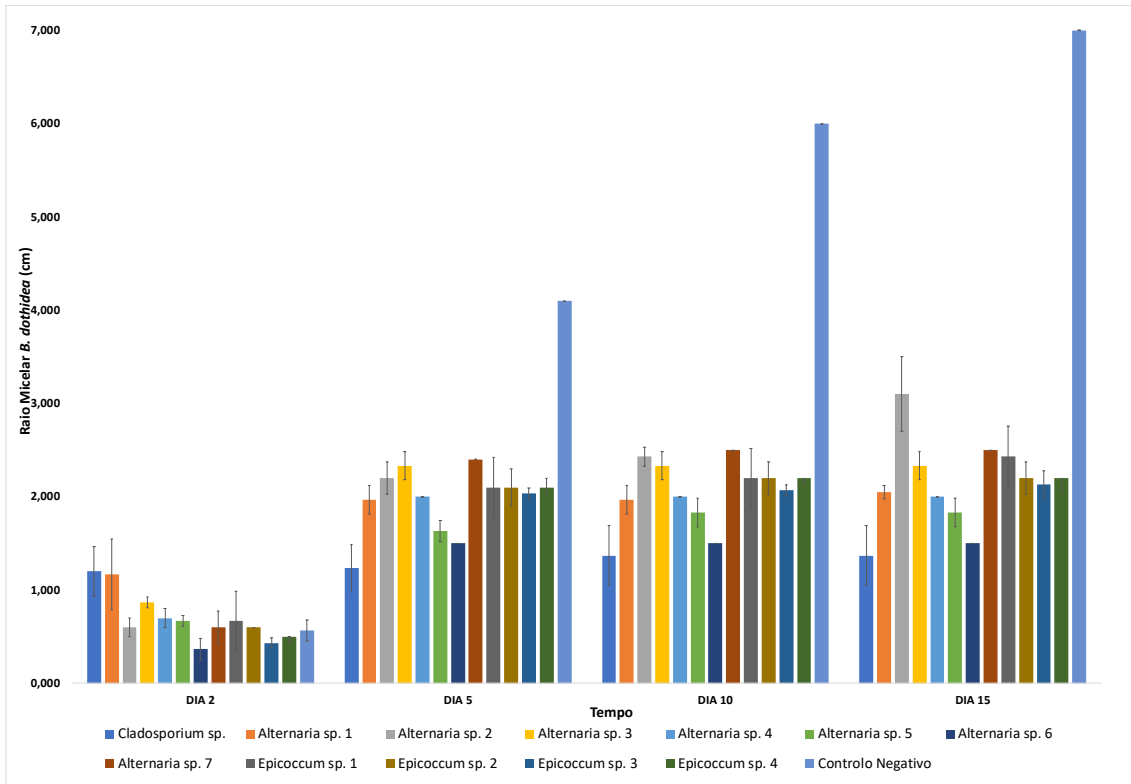


Figura 14. Valores do raio de crescimento de *B. dothidea* (cm) ($rB. dothidea \pm SE$), na presença dos diferentes fungos endofíticos, aos 2, 5, 10 e 15 dias de teste de antagonismo direto.

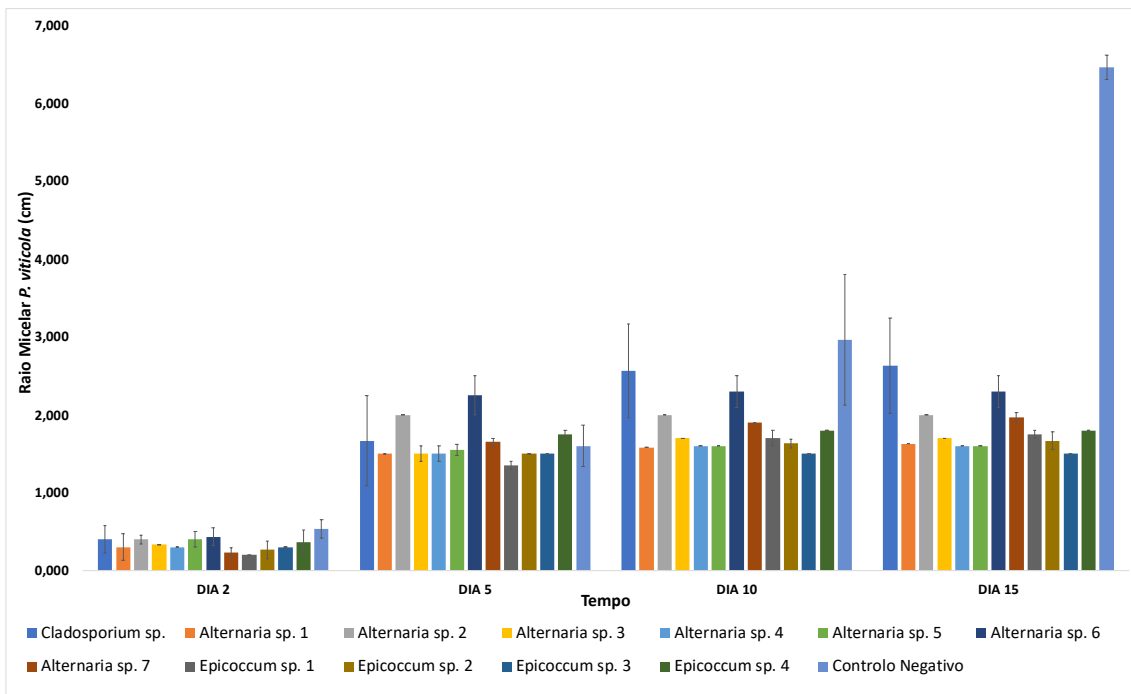


Figura 15. Valores do raio de crescimento de *P. viticola* (cm) ($rP. viticola \pm SE$), na presença dos diferentes fungos endofíticos, aos 2, 5, 10 e 15 dias de teste de antagonismo direto.

O fungo endofítico que mais inibiu o crescimento de *B. dothidea*, foi o *Cladosporium* sp., com uma taxa de inibição de 80.5%, seguido da *Alternaria* sp. 6, com taxa de inibição de 78.6% (quadro 5). As menores percentagens de inibição do crescimento de *B. dothidea* foram originadas por *Alternaria* sp. 2, com o valor de 55.7%. Os valores de inibição dos diferentes *Epicoccum*, não variaram muito entre si, tendo obtido uma inibição entre 65.2% a 70.7% (quadro 5).

No teste de antagonismo direto contra *P. viticola*, o fungo endofítico com menor taxa de inibição foi o *Cladosporium* sp., com uma percentagem de 59.3%. A segunda menor taxa de inibição para *P. viticola* foi obtida por *Alternaria* sp. 6, corroborando os resultados anteriores (quadro 4 e figura 11). A maior percentagem de inibição foi obtida na presença de *Epicoccum* sp. 3, com 76.8% de inibição.

No teste de antagonismo direto utilizando o agente patogénico *P. viticola*, a variação da taxa de inibição entre as espécies de *Alternaria*, foi de 64.4 a 76.0%, enquanto que no caso de *Epicoccum* sp, a variação é menor, estando num intervalo de 72.2 a 76.8% (quadro 6).

Quadro 5. Percentagem de inibição do crescimento de *B. dothidea*, pelos diferentes fungos endofíticos, ao 15º dia do teste de teste de antagonismo direto.

Fungo Endofítico	% Inibição
<i>Cladosporium</i> sp.	80.50
<i>Alternaria</i> sp. 1	70.70
<i>Alternaria</i> sp. 2	55.70
<i>Alternaria</i> sp. 3	66.70
<i>Alternaria</i> sp. 4	71.40
<i>Alternaria</i> sp. 5	73.80
<i>Alternaria</i> sp. 6	78.60
<i>Alternaria</i> sp. 7	64.30
<i>Epicoccum</i> sp. 1	65.20
<i>Epicoccum</i> sp. 2	68.60
<i>Epicoccum</i> sp. 3	70.70
<i>Epicoccum</i> sp. 4	68.60

Quadro 6. Percentagem de inibição do crescimento de *P. viticola*, pelos diferentes fungos endofíticos, ao 15º dia do teste de teste de antagonismo direto.

Fungo Endofítico	% Inibição
<i>Cladosporium</i> sp.	59.30
<i>Alternaria</i> sp. 1	76.00
<i>Alternaria</i> sp. 2	69.10
<i>Alternaria</i> sp. 3	73.70
<i>Alternaria</i> sp. 4	75.30
<i>Alternaria</i> sp. 5	75.30
<i>Alternaria</i> sp. 6	64.40
<i>Alternaria</i> sp. 7	69.80
<i>Epicoccum</i> sp. 1	72.90
<i>Epicoccum</i> sp. 2	74.20
<i>Epicoccum</i> sp. 3	76.80
<i>Epicoccum</i> sp. 4	72.20

Com base no crescimento dos fungos endofíticos e agentes patogénicos, foi compreendida a interação entre eles, utilizando a escala referida no ponto 3.4.1.. No confronto entre *B. dothidea* e os fungos endofíticos foram obtidos os quatro tipos de interação (quadro 7).

Quadro 7. Diferentes tipos de interação dos isolados endofíticos com *B. dothidea*.

Fungo Endofítico	Tipo de Interação
<i>Cladosporium</i> sp.	A
<i>Alternaria</i> sp. 7	
<i>Alternaria</i> sp. 2	
<i>Alternaria</i> sp. 3	B
<i>Alternaria</i> sp. 5	
<i>Alternaria</i> sp. 1	
<i>Alternaria</i> sp. 4	
<i>Alternaria</i> sp. 6	C
<i>Epicoccum</i> sp. 3	
<i>Epicoccum</i> sp. 4	
<i>Epicoccum</i> sp. 1	D
<i>Epicoccum</i> sp. 2	

Aquando do confronto entre *B. dothidea* e *Cladosporium* sp. e entre *B. dothidea* e *Alternaria* sp. 7, a zona de sobreposição de crescimento do fungo antagonista sobre o patogénico é clara (figura 16). Tanto *Cladosporium* sp. como *Alternaria* sp. 7 continuaram o seu crescimento após o contacto com o agente patogénico, havendo uma sobreposição a este, inibindo-lhe assim o crescimento, tipo de interação A (quadro 7).

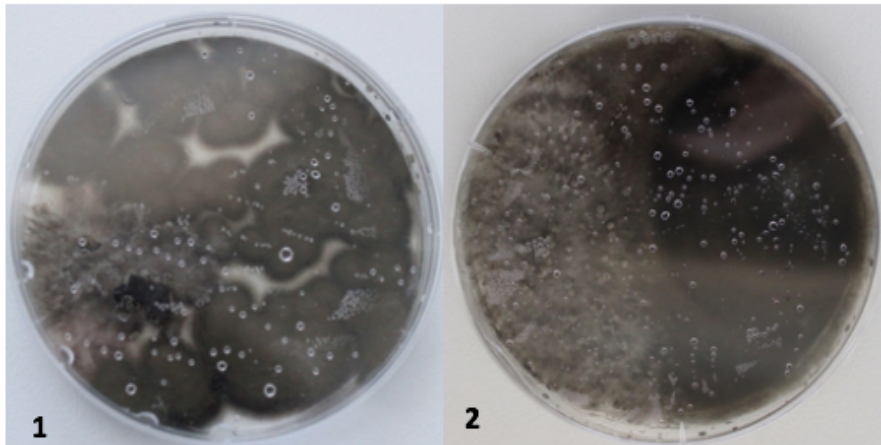


Figura 16. Tipo de interação A entre *B. dothidea* e: 1- *Cladosporium* sp.; 2- *Alternaria* sp. 7. Em ambos os casos o fungo patogénico se encontra à esquerda.

Os fungos endofíticos identificados como *Alternaria* sp. 2, *Alternaria* sp. 3 e *Alternaria* sp. 5 têm uma interação do tipo B com o agente patogénico *B. dothidea* (quadro 7). Neste tipo de interação existe uma sobreposição mútua, tanto o agente patogénico como o fungo antagonista crescem lentamente um sobre o outro (figura 17).

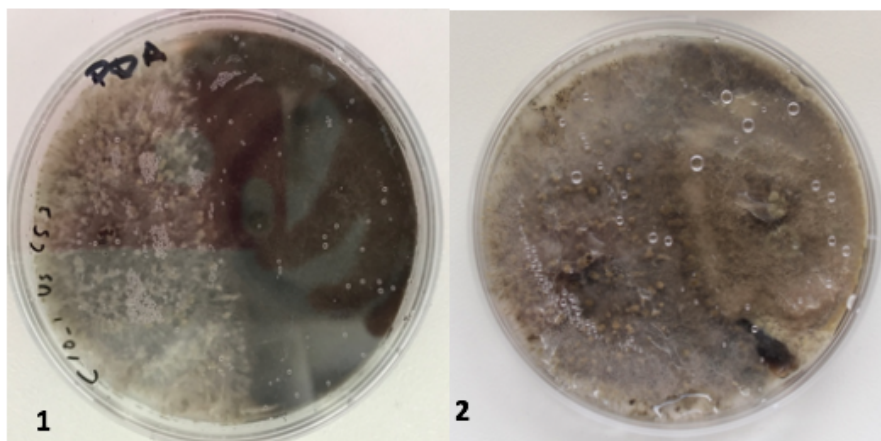


Figura 17. Tipo de interação B entre *B. dothidea* e: 1- *Alternaria* sp. 2; 2- *Alternaria* sp. 3. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.

O tipo de interação C, foi detetado entre *B. dothidea* e *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4, *Alternaria* sp. 6, *Epicoccum* sp. 3 e *Epicoccum* sp. 4 (quadro 7, figura 18).

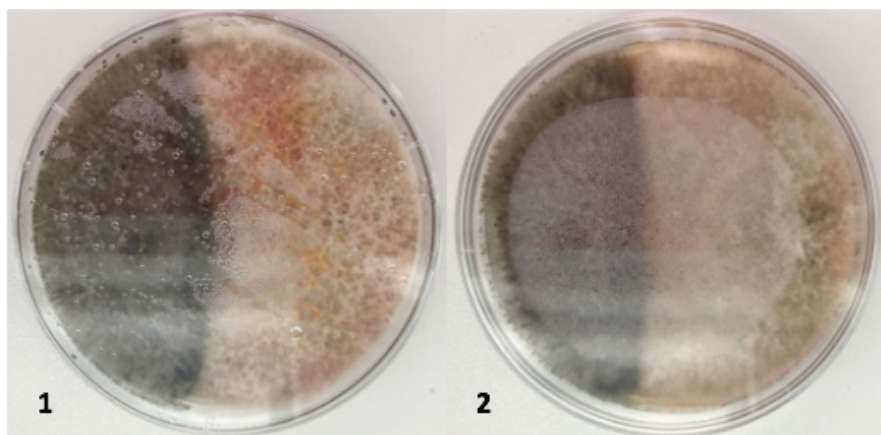


Figura 18. Tipo de interação C entre *B. dothidea* e: **1-** *Epicoccum* sp. 3; **2-** *Epicoccum* sp. 4. Em ambos os casos *B. dothidea* encontra-se à esquerda na placa de Petri.

O tipo de interação D, foi obtido entre *B. dothidea* *Epicoccum* sp. 1 e *B. dothidea* *Epicoccum* sp. 2 (quadro 7, figura 19).

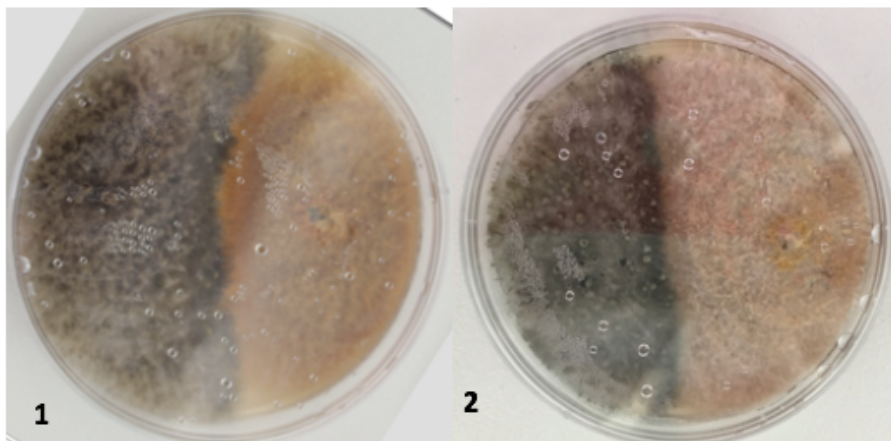


Figura 19. Tipo de interação D entre *B. dothidea* e: **1-** *Epicoccum* sp. 1; **2-** *Epicoccum* sp. 2. Em ambos os casos o *B. dothidea* encontra-se à esquerda da placa.

No teste de antagonismo direto entre *P. viticola* e os fungos endofíticos, foram obtidas apenas interações de três tipos, A, C e D (quadro 8).

Quadro 8. Diferentes tipos de interação dos isolados endofíticos com *P. viticola*.

Fungo Endofítico	Tipo de Interação
<i>Cladosporium</i> sp.	A
<i>Alternaria</i> sp. 3	
<i>Alternaria</i> sp. 1	C
<i>Alternaria</i> sp. 4	
<i>Alternaria</i> sp. 5	
<i>Alternaria</i> sp. 6	
<i>Alternaria</i> sp. 7	D
<i>Alternaria</i> sp. 2	
<i>Epicoccum</i> sp. 1	
<i>Epicoccum</i> sp. 2	
<i>Epicoccum</i> sp. 3	
<i>Epicoccum</i> sp. 4	

Foi obtida uma interação do tipo A, ao confrontar *P. viticola* com *Cladosporium* sp. e com *Alternaria* sp. 3 (quadro 8, figura 20).

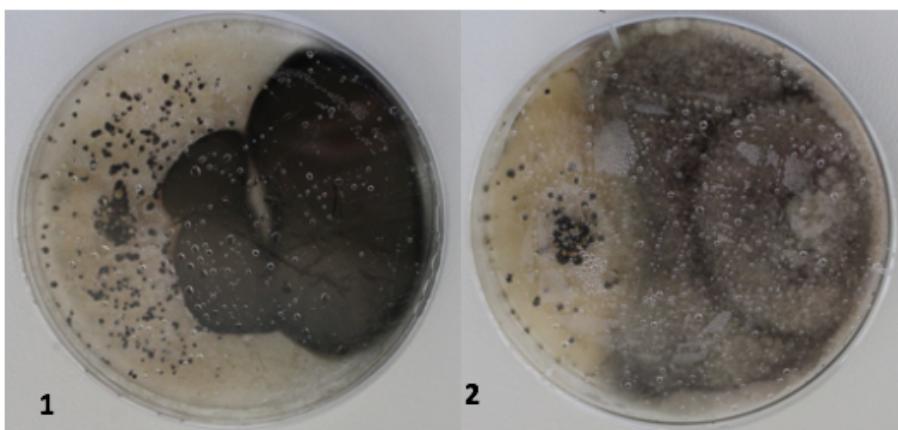


Figura 20. Tipo de interação A entre *P. viticola* e: 1- *Cladosporium* sp.; 2- *Alternaria* sp. 3. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.

A interação do tipo C, ocorreu aquando do confronto entre *P. viticola* e *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4, *Alternaria* sp. 5, *Alternaria* sp. 6 e *Alternaria* sp. 7 (quadro 8, figura 21).

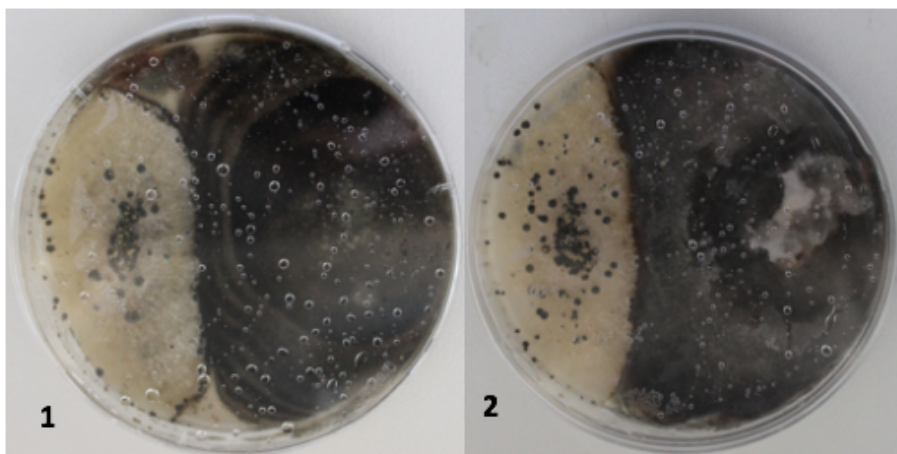


Figura 21. Tipo de interação C entre *P. viticola* e: **1-** *Alternaria* sp. 1; **2-** *Alternaria* sp. 5. Em ambos os casos o fungo patogénico encontra-se à esquerda.

Todos os isolados do género *Epicoccum* utilizados no presente trabalho, conseguiram a mesma interação quando em confronto com *P. viticola*, interação do tipo D (quadro 8, figura 22). A interação do tipo D, também foi obtida quando se confronta *P. viticola* com *Alternaria* sp. 2 (quadro 8).

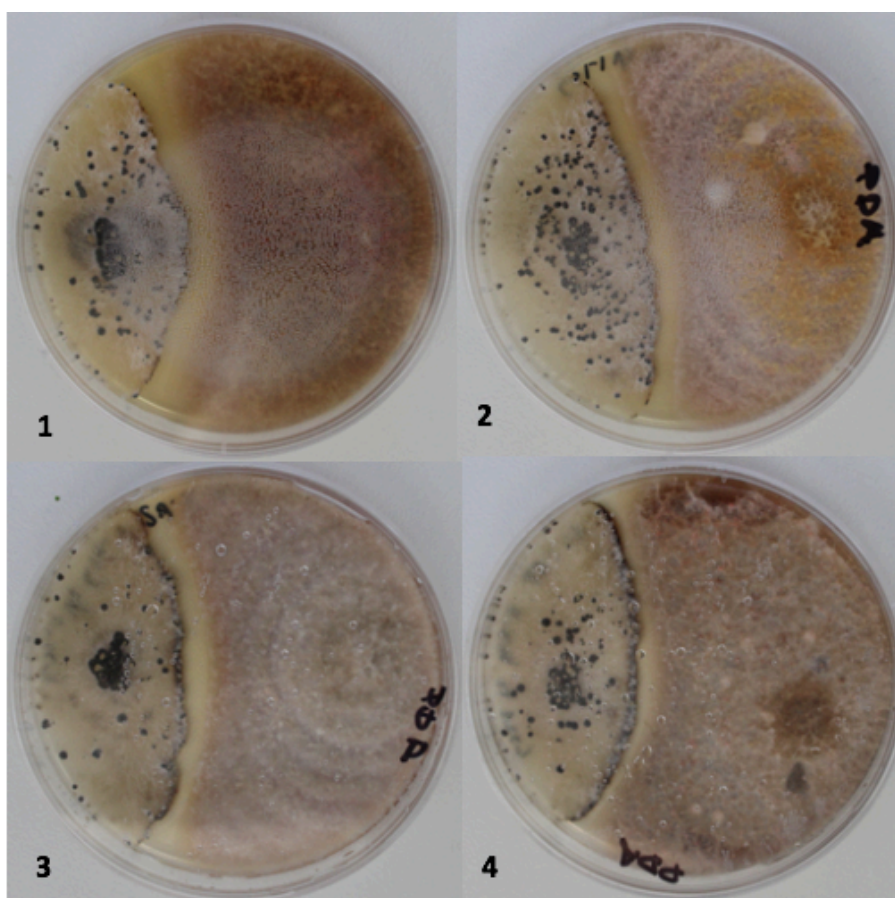


Figura 22. Tipo de interação D entre *P. viticola* e: **1-** *Epicoccum* sp. 1; **2-** *Epicoccum* sp. 2; **3-** *Epicoccum* sp. 3; **4-** *Epicoccum* sp. 4. Nas 4 figuras o agente patogénico encontra-se à esquerda.

4.2.2. TESTE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Para a realização deste teste, os fungos endofíticos isolados cresceram por cinco dias em placas de *Petri* de 90 mm, com o meio de cultura PDA, passados três dias foram inoculados os fungos patogénicos em placas de 60 mm, estes últimos ficaram a crescer durante dois dias. Passados dois dias, procedeu-se à montagem do ensaio: as placas de 60 mm contendo isolados dos fungos patogénicos foram invertidas nas placas de 90 mm, contendo micélio de fungos endofíticos (figura 23).

Uma vez que à data da montagem do teste os isolados de fungos patogénicos já tinham dois dias de crescimento, o primeiro dia do teste foi considerado o dia dois, que foi quando foi efetuada a primeira medição. Após cinco dias (dia sete do teste) e após dez (dia doze do teste), foram novamente realizadas medições do raio de crescimento do fungo patogénico.

Para controlo, foi invertida uma placa de *Petri*, de 60 mm, com micélio de cada fungo patogénico sobre uma placa de *Petri* de 90 mm, apenas com meio PDA (figura 24).

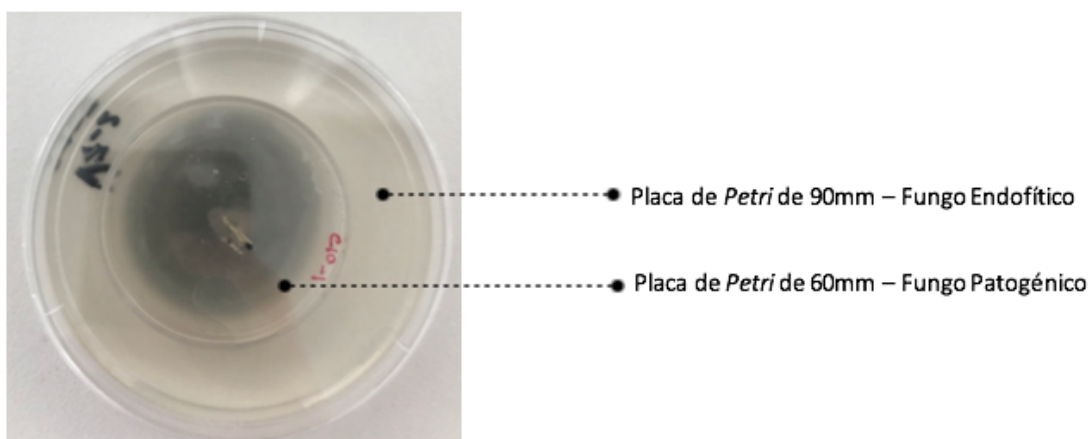


Figura 23. Exemplo do teste dos compostos voláteis

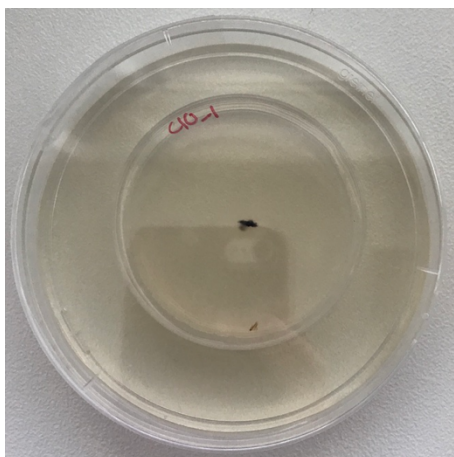


Figura 24. Controlo Negativo do teste de compostos voláteis.

Em primeira análise, avaliando os valores de crescimento do raio de *B. dothidea*, sete dos 12 dos fungos endofíticos sofreram alteração de crescimento do raio do dia sete para o dia 12 do ensaio (quadro 9, figura 25). No caso de *P. viticola*, apenas quando em confronto com dois endofíticos o raio de crescimento aumentou do dia sete para o dia 12 (quadro 10, figura 26).

Em todos os casos o valor de crescimento de *B. dothidea* é menor quando na presença de fungos endofíticos do que na placa utilizada para controlo. O raio de crescimento do fungo patogénico na placa de teste utilizada como controlo manteve um crescimento continuo ao longo de todo o ensaio, o mesmo ocorreu com *P. viticola* (quadros 9 e 10, figuras 25 e 26). Como tal, pode-se referir que todos os isolados de endofíticos têm capacidade antagonista contra com *B. dothidea* e *P. viticola* já que tanto no dia sete como no dia doze do ensaio, os valores do crescimento na presença de fungos endofíticos não se aproximam do valor de crescimento do controlo (quadros 9 e 10, figuras 25 e 26).

Os valores mais baixos do raio de crescimento de *B. dothidea* foram obtidos na presença de *Alternaria* sp. 1 (figura 27) e *Alternaria* sp. 7, ao décimo segundo dia de ensaio (quadro 9, figura 25). Na presença de *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. 2, *Alternaria* sp. 5, *Epicoccum* sp. 1 e *Epicoccum* sp. 3, o valor do raio de crescimento de *B. dothidea* mantém-se desde o dia sete até ao final do ensaio (quadro 9, figura 25).

Os valores mais baixos do raio de crescimento de *P. viticola* foram obtidos na presença de *Epicoccum* sp. 2, seguido de *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. 5. Apenas na presença de *Alternaria* sp. 3 (figura 28.1) e *Alternaria* sp. 5, o valor de crescimento de *P. viticola* se alterou do dia sete para o dia 12 (quadro 10, figura 26). No caso da *Alternaria* sp. 7, o agente patogénico nunca se conseguiu desenvolver, o crescimento manteve-se o igual desde o inicio ao final do ensaio (figura 28.2).

Quadro 9. Valores do raio de crescimento de *rB. dothidea* \pm SE (cm) na presença dos diferentes fungos endofíticos, durante o ensaio de compostos voláteis.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 7	DIA 12
<i>Cladosporium</i> sp.	0.83 \pm 0.06	1.50 \pm 0.00	1.50 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 1	0.50 \pm 0.00	0.83 \pm 0.12	1.00 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.30 \pm 0.00	1.05 \pm 0.07	1.05 \pm 0.07
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.90 \pm 0.00	1.80 \pm 0.00	2.00 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.50 \pm 0.00	1.55 \pm 0.07	2.00 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.43 \pm 0.12	1.55 \pm 0.07	1.55 \pm 0.07
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.50 \pm 0.00	2.10 \pm 0.00	2.20 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.50 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.35 \pm 0.07	1.05 \pm 0.07	1.05 \pm 0.07
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.40 \pm 0.14	0.90 \pm 0.00	1.30 \pm 0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.87 \pm 0.12	1.70 \pm 0.17	1.70 \pm 0.17
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.80 \pm 0.00	1.50 \pm 0.00	1.57 \pm 0.12
Controlo Negativo	0.30 \pm 0.00	2.43 \pm 0.06	2.93 \pm 0.06

Quadro 10. Valores do raio de crescimento de *rP. viticola* \pm SE (cm) na presença dos diferentes fungos endofíticos, durante o ensaio de compostos voláteis.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 7	DIA 12
<i>Cladosporium</i> sp.	0.20 \pm 0.00	0.37 \pm 0.12	0.37 \pm 0.12
<i>Alternaria</i> sp. 1	0.23 \pm 0.12	0.43 \pm 0.12	0.43 \pm 0.12
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.10 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.20 \pm 0.00	1.50 \pm 0.00	1.80 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.10 \pm 0.00	0.85 \pm 0.07	0.85 \pm 0.07
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.10 \pm 0.00	0.30 \pm 0.00	0.37 \pm 0.12
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.10 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00	0.40 \pm 0.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.10 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00	0.60 \pm 0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.10 \pm 0.00	0.30 \pm 0.00	0.30 \pm 0.00
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.20 \pm 0.00	1.17 \pm 0.29	1.17 \pm 0.29
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.20 \pm 0.00	0.80 \pm 0.10	0.80 \pm 0.10
Controlo Negativo	0.10 \pm 0.00	1.47 \pm 0.06	2.33 \pm 0.15

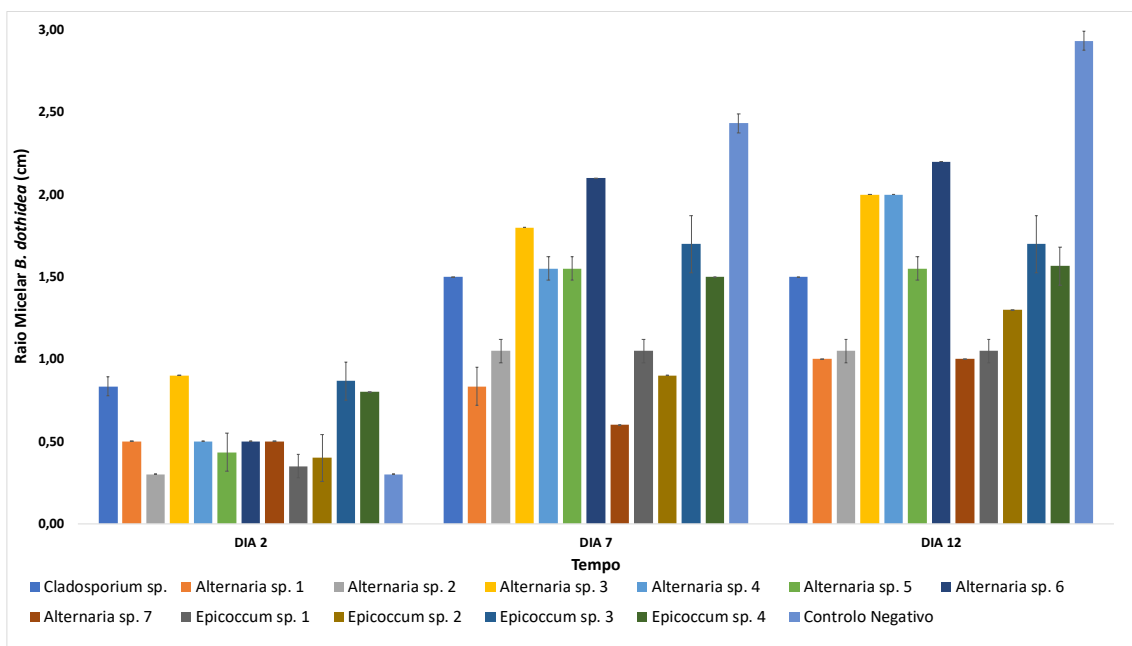


Figura 25. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *B. dothidea* em função do tempo no teste dos compostos voláteis.

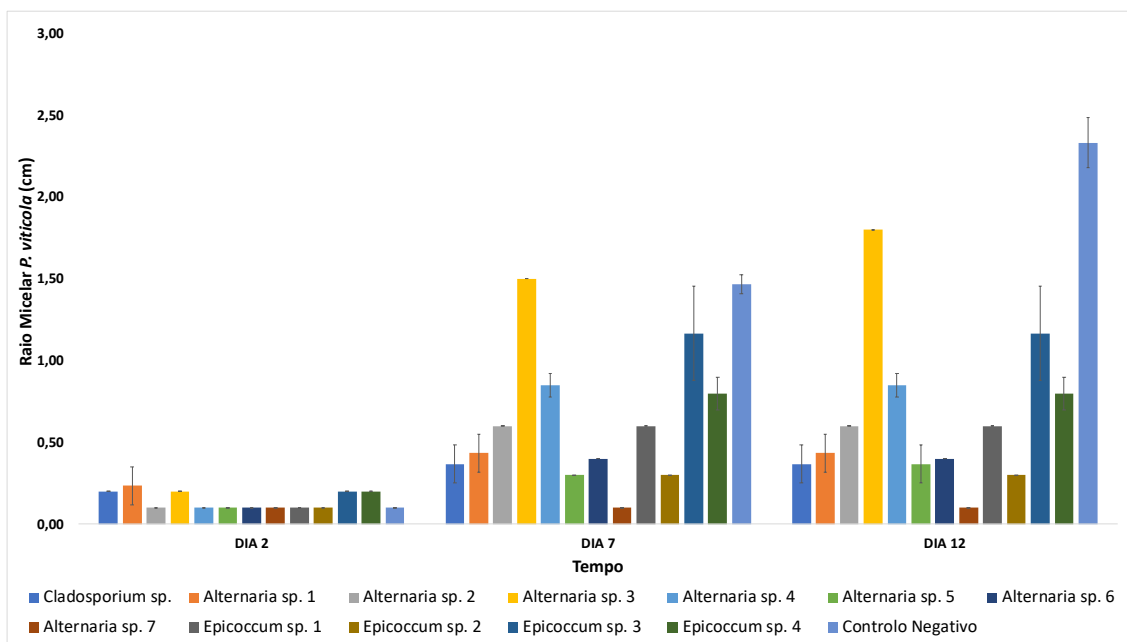


Figura 26. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *P. viticola* em função do tempo no teste dos compostos voláteis.

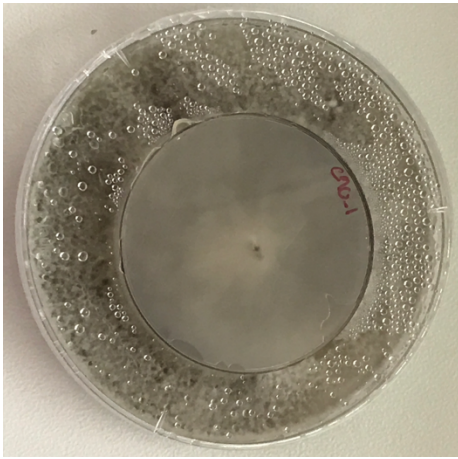


Figura 27. Placa de teste de compostos voláteis de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 1, ao 12º dia de ensaio.

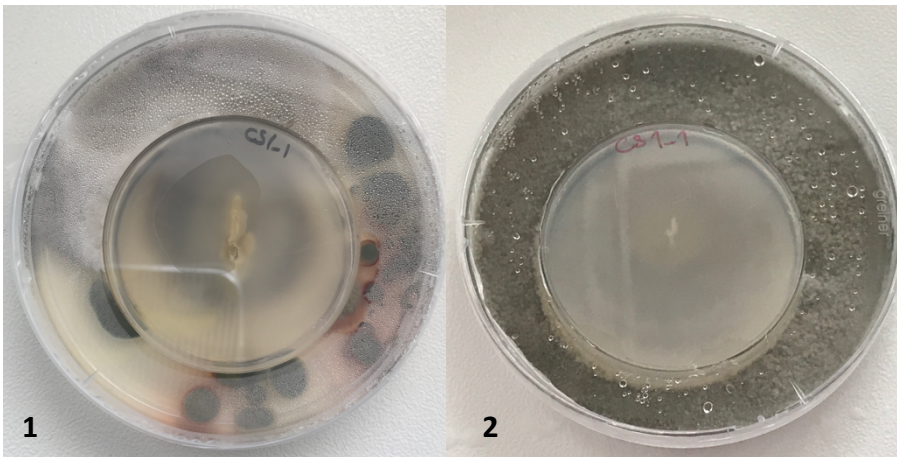


Figura 28. 1. Placa de teste de *P. viticola* de compostos voláteis quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 3, ao 12º dia de ensaio; **2.** Placa de teste de *P. viticola* de compostos voláteis quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 7, ao 12º dia de ensaio;

Aos dias sete e 12 do ensaio, as placas utilizadas como controlo mostraram os maiores crescimentos de *B. dothidea* havendo diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação a todas as restantes placas em teste, onde *B. dothidea* se encontra na presença dos fungos endofíticos.

Ao sétimo dia de teste, o maior crescimento de *P. viticola* foi verificado quando em confronto com *Alternaria* sp. 3, com um crescimento de 1.50 ± 0.00 cm, seguido do valor do teste com *Epicoccum* sp. 3, 1.17 ± 0.29 cm, ambos não apresentando diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação ao controlo, onde o valor obtido de crescimento foi de 1.47 ± 0.06 cm. Todos os restantes fungos endofíticos mostraram diferenças significativas com o controlo ($p < 0.05$).

No dia 12, todos os fungos mostraram uma diferença significativa ($p < 0.05$) do crescimento de *P. viticola* em relação ao controlo.

A percentagem de inibição foi determinada utilizando os valores do 12º dia do teste de compostos voláteis (quadro 11 e quadro 12).

Quadro 11. Percentagem de inibição do crescimento de *B. dothidea* aos 12 dias do teste de compostos voláteis.

Fungo Endofítico	% Inibição
<i>Cladosporium</i> sp.	48.90
<i>Alternaria</i> sp. 1	65.90
<i>Alternaria</i> sp. 2	64.20
<i>Alternaria</i> sp. 3	31.80
<i>Alternaria</i> sp. 4	31.80
<i>Alternaria</i> sp. 5	47.20
<i>Alternaria</i> sp. 6	25.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	65.90
<i>Epicoccum</i> sp. 1	64.20
<i>Epicoccum</i> sp. 2	55.70
<i>Epicoccum</i> sp. 3	42.00
<i>Epicoccum</i> sp. 4	46.60

Quadro 12. Percentagem de inibição do crescimento de *P. viticola* aos 12 dias do teste de compostos voláteis.

Fungo Endofítico	% Inibição
<i>Cladosporium</i> sp.	84.30
<i>Alternaria</i> sp. 1	81.40
<i>Alternaria</i> sp. 2	74.30
<i>Alternaria</i> sp. 3	22.90
<i>Alternaria</i> sp. 4	63.60
<i>Alternaria</i> sp. 5	84.30
<i>Alternaria</i> sp. 6	82.90
<i>Alternaria</i> sp. 7	95.70
<i>Epicoccum</i> sp. 1	74.30
<i>Epicoccum</i> sp. 2	87.10
<i>Epicoccum</i> sp. 3	50.00
<i>Epicoccum</i> sp. 4	65.70

As percentagens de inibição do crescimento de *B. dothidea* por emissão de compostos voláteis (quadro 11) foram variáveis sendo o maior valor de 65.90% quando na presença de *Alternaria* sp. 1 e *Alternaria* sp. 7 como expectável através da avaliação dos resultados do crescimento; seguido da *Alternaria* sp. 2 e do *Epicoccum* sp. 1, com 64.20%, fungos endofíticos referidos anteriormente por inibirem o crescimento de *B. dothidea*. As percentagens de inibição mais baixas foram obtidas na presença de *Alternaria* sp. 3, *Alternaria* sp. 4, sendo a mais baixa (25%) obtida quando em confronto com a *Alternaria* sp. 6, ou seja, a capacidade inibitória por parte dos compostos voláteis é inferior mas ocorre (quadro 11).

A menor taxa de inibição dos fungos endofíticos para *P. viticola* foi obtida por *Alternaria* sp. 3, com apenas 22.9%, seguido de *Epicoccum* sp. 3 com uma taxa de inibição de 50.0% (quadro 12). Os maiores resultados de inibição para com *P. viticola* foram obtidos por *Alternaria* sp. 7, com 95.7%; *Epicoccum* sp. 2, com 87.1% de inibição, e *Alternaria* sp. 5 e *Cladosporium* sp. com 84.3% de inibição (quadro 12).

Na maioria dos casos a percentagem de inibição dos fungos endofíticos contra *B. dothidea* no teste do antagonismo direto foi muito superior à percentagem de inibição no teste dos compostos voláteis (figura 29). Apenas quando na presença de *Alternaria* sp. 2 e *Alternaria* sp. 7, a percentagem de inibição no teste dos compostos voláteis foi superior à do teste de antagonismo direto, embora neste último tenha sido muito semelhante nos dois testes, assim como na presença de *Alternaria* sp. 1 e *Epicoccum* sp. 1 (figura 29). No caso do agente patogénico *P. viticola*, apenas na presença de *Alternaria* sp. 3, *Alternaria* sp. 4, *Epicoccum* sp. 3 e *Epicoccum* sp. 4 as taxas de inibição do teste de antagonismo direto foram superiores às taxas de inibição de crescimento no teste dos compostos voláteis (figura 30). Nos restantes oito casos as taxas de inibição do teste dos compostos voláteis foram superiores às taxas de inibição obtidas no teste de

antagonismo direto, embora *Alternaria* sp. 1, a *Alternaria* sp. 2 e o *Epicoccum* sp. 1 apresentem valores de inibição semelhantes nos dois testes (figura 30).

O valor de inibição pela *Alternaria* sp. 3 no teste de antagonismo direto contra *P. viticola* foi bastante superior ao obtido no teste dos compostos voláteis (figura 30).

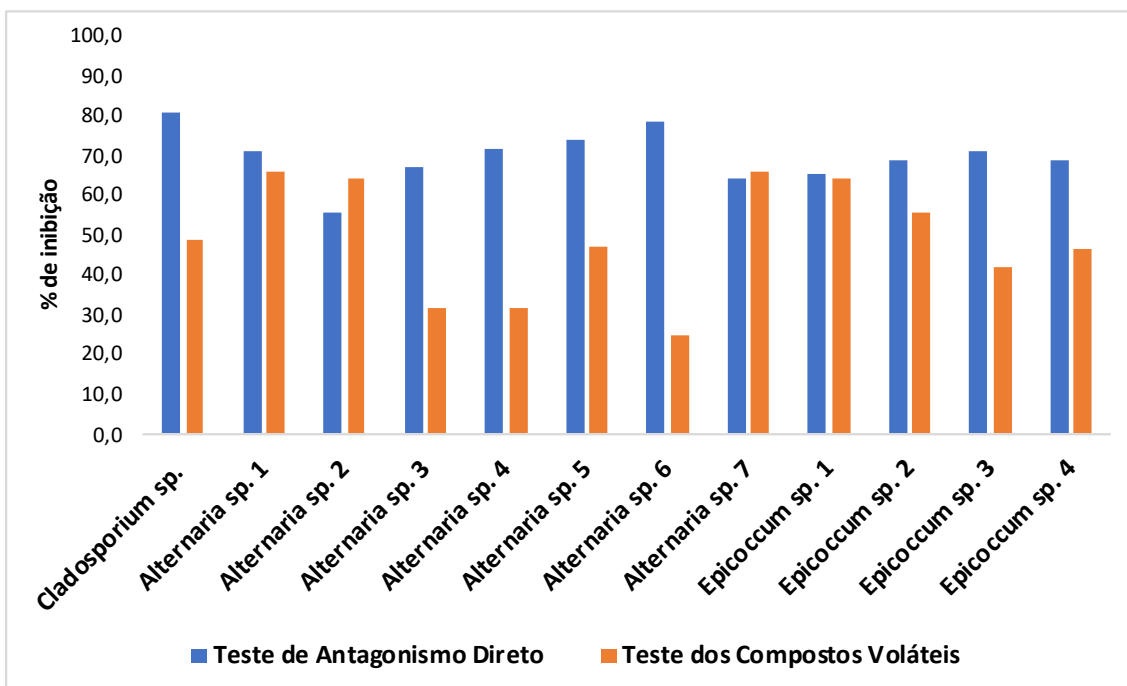


Figura 29. Comparação das percentagens de inibição do crescimento de *B. dothidea* no teste de antagonismo direto e no dos compostos voláteis.

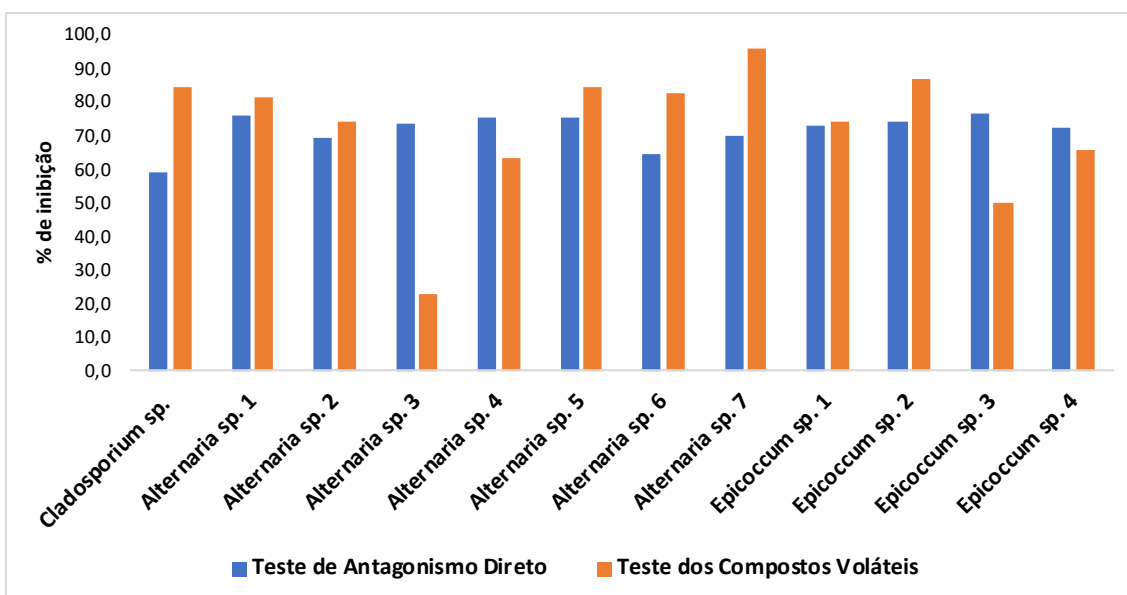


Figura 30. Comparação das percentagens de inibição do crescimento de *P. viticola* no teste de antagonismo direto e no dos compostos voláteis.

4.2.3. TESTE DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Por último foi avaliada a capacidade antagonista dos fungos endofíticos para com *B. dothidea* e *P. viticola* através da produção de compostos não voláteis.

Os resultados apresentados são as medições feitas ao dia dois de crescimento do agente patogénico, imediatamente antes de colocar a suspensão de fungo nos quatro poços diametralmente opostos, e aos sete dias de crescimento, ou seja, cinco dias após a colocação da suspensão de fungo (quadro 13 e 14, figura 31 e 32).

Quadro 13. Valores do raio de crescimento de *rB. dothidea* (cm) na presença dos diferentes fungos, durante o ensaio de compostos não voláteis.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 7			
		75 µL - CN	75 µL	100 µL	200 µL
<i>Cladosporium</i> sp.	0.43	4.50	4,30	4.20	4.00
<i>Alternaria</i> sp. 1	0.53	4.20	4.20	3.80	3.50
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.50	3.50	2.60	2.20	2.00
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.43	4.00	3.70	3.00	2.50
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.50	3.50	2.00	2.00	1.90
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.50	3.80	3.30	3.00	2.50
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.50	3.50	3.30	3.10	3.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.57	3.50	2.70	2.40	2.20
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.53	3.70	3.00	2.90	2.50
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.50	4.00	3.50	3.00	2.70
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.43	4.00	3.50	3.20	3.00
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.47	3.30	3.00	2.90	2.60

Quadro 14. Valores do raio de crescimento de *rP. viticola* ± SE (cm) na presença dos diferentes fungos, durante o ensaio de compostos não voláteis.

Fungo Endofítico	DIA 2	DIA 7			
		75 µL - CN	75 µL	100 µL	200 µL
<i>Cladosporium</i> sp.	0.27	3.00	2.80	2.50	2.20
<i>Alternaria</i> sp. 1	0.27	2.20	2.00	1.90	1.70
<i>Alternaria</i> sp. 2	0.27	2.00	1.70	1.60	1.30
<i>Alternaria</i> sp. 3	0.20	3.90	2.80	2.70	2.40
<i>Alternaria</i> sp. 4	0.27	2.00	1.90	1.70	1.50
<i>Alternaria</i> sp. 5	0.47	1.60	1.50	1.30	1.10
<i>Alternaria</i> sp. 6	0.27	2.40	2.00	1.90	1.80
<i>Alternaria</i> sp. 7	0.30	3.50	3.00	2.70	2.50
<i>Epicoccum</i> sp. 1	0.27	2.90	2.50	2.20	2.00
<i>Epicoccum</i> sp. 2	0.20	3.20	3.00	2.80	2.50
<i>Epicoccum</i> sp. 3	0.20	2.80	2.70	2.00	2.30
<i>Epicoccum</i> sp. 4	0.20	2.50	2.30	2.00	1.70

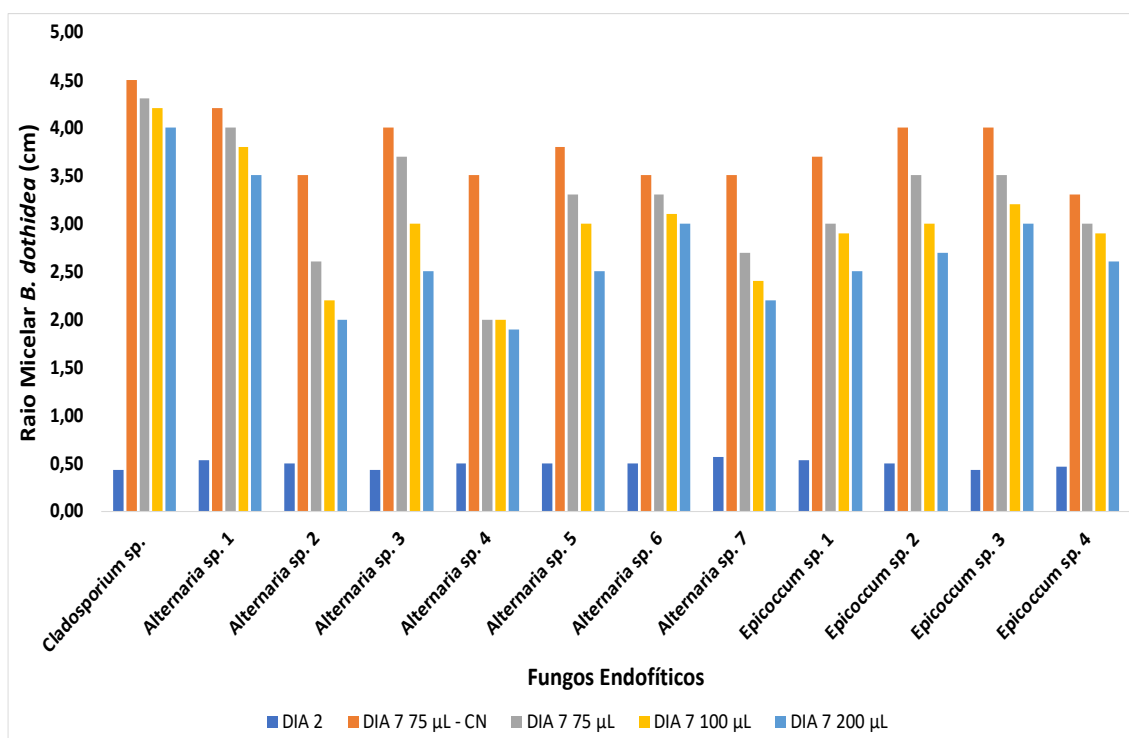


Figura 31. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *B. dothidea* em função do tempo no teste de compostos não voláteis.

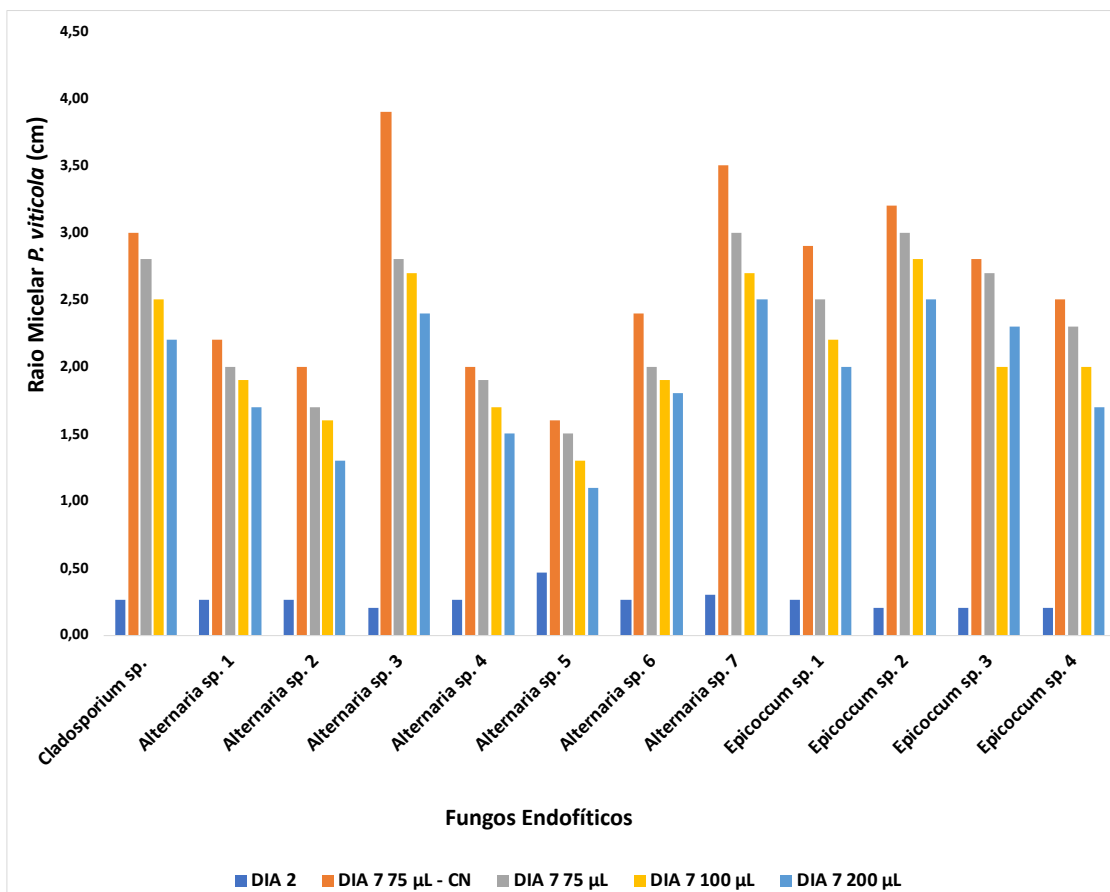


Figura 32. Representação gráfica dos valores do raio de crescimento de *P. viticola* em função do tempo no teste de compostos não voláteis.

Todos os fungos endofíticos mostraram capacidade antagonista através da produção de metabolitos secundários não voláteis contra *B. dothidea*, na presença de todos os fungos endofíticos obteve-se uma diminuição de crescimento com o aumento de volume (quadro 13, figuras 31 e 33). 4. No caso da *Alternaria sp. 4* com o aumento de volume de 75 µL para 100 µL não existiu nenhuma alteração do raio de crescimento do fungo patogénico mas quando aplicados 200 µL, o raio sofreu diminuição, embora ao comparar o crescimento do fungo patogénico nos orifícios com o controlo, seja perceptível que ocorreu inibição com todas as concentrações.

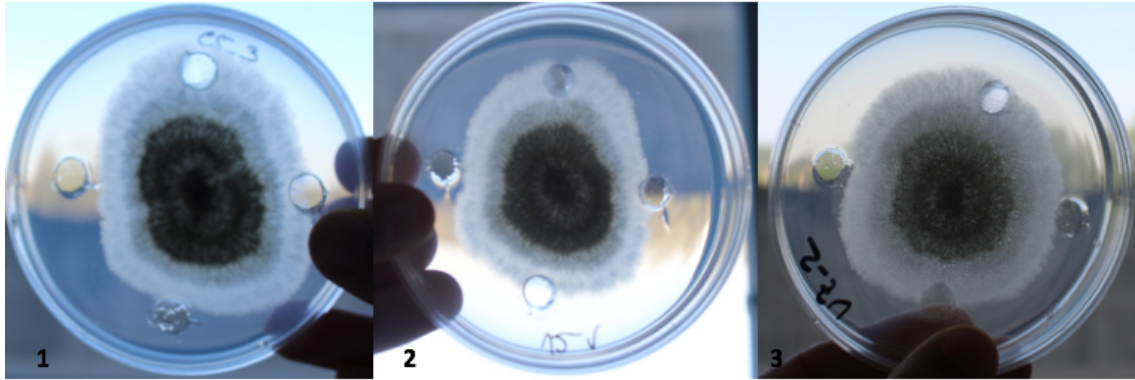


Figura 33. 1- Placa de teste de compostos não voláteis de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 2, ao 7º dia de ensaio; 2 - Placa de teste compostos não voláteis de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 4, ao 7º dia de ensaio; 3 - Placa de teste compostos não voláteis de *B. dothidea* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 7, ao 7º dia de ensaio.

Volumes de meio com fungo endofítico na mesma posição da figura 6 do ponto 3.4.3..

No teste dos compostos não voláteis com o agente patogénico *P. viticola*, é possível afirmar que o raio de crescimento diminui com o aumentar do volume utilizado de cada fungo (quadro 14, figuras 32 e 34), exceto com *Epicoccum* sp. 3, no qual na presença de 200 µL o valor de crescimento do raio de crescimento foi superior ao valor de crescimento na presença de 100 µL (quadro 14, figura 32).

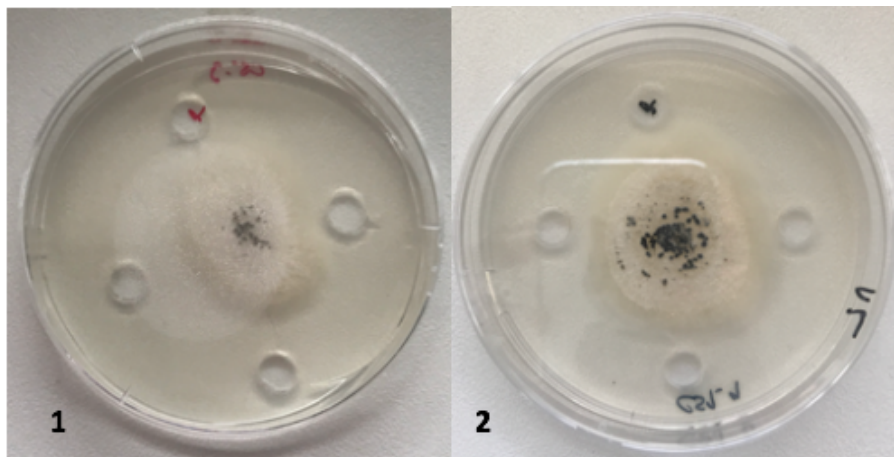


Figura 34. 1- Placa de teste de compostos não voláteis de *P. viticola* quando em confronto com o antagonista *Alternaria* sp. 2, ao 7º dia de ensaio; 2- Placa de teste de compostos não voláteis de *P. viticola* quando em confronto com o antagonista *Epicoccum* sp. 1, ao 7º dia de ensaio;

A percentagem de inibição foi obtida usando os valores de crescimento do raio do dia sete do teste de compostos não voláteis (quadro 15, quadro 16).

O fungo endofítico que apresentou uma maior percentagem de inibição de crescimento do agente patogénico de *B. dothidea* foi *Alternaria* sp. 4 (figura 33.2), com o volume de 200 µL, quando comparado com o controlo, com uma inibição de 45.7%. Em todos os casos a percentagem de inibição aumenta com aumento do volume, exceto na *Alternaria* sp. 4, uma vez que a inibição entre os 75 e os 100 µL, não se altera por não haver alteração de crescimento (quadro 15).

Quando em confronto com o agente patogénico *P. viticola*, o fungo endofítico que apresenta uma maior percentagem de inibição é a *Alternaria* sp. 3, com uma percentagem de 38.50%, seguido da *Alternaria* sp. 2 (figura 34.1), *Epicoccum* sp. 4, *Alternaria* sp. 5 e *Epicoccum* sp. 1 (quadro 16).

Quadro 15. Percentagem de inibição do crescimento de *B. dothidea*, pelos fungos endofíticos nos diferentes volumes do teste dos compostos não voláteis.

Fungo Endofítico	% Inibição		
	75 µl	100 µl	200 µl
<i>Cladosporium</i> sp.	4,40	6,67	11,11
<i>Alternaria</i> sp. 1	4,76	9,52	16,67
<i>Alternaria</i> sp. 2	25,71	37,14	42,86
<i>Alternaria</i> sp. 3	7,50	25,00	37,50
<i>Alternaria</i> sp. 4	42,86	42,86	45,71
<i>Alternaria</i> sp. 5	13,16	21,05	34,21
<i>Alternaria</i> sp. 6	5,71	11,43	14,29
<i>Alternaria</i> sp. 7	22,86	31,43	37,14
<i>Epicoccum</i> sp. 1	18,92	21,62	32,43
<i>Epicoccum</i> sp. 2	12,50	25,00	32,50
<i>Epicoccum</i> sp. 3	12,50	20,00	25,00
<i>Epicoccum</i> sp. 4	9,09	12,12	21,21

Quadro 16. Percentagem de inibição do crescimento de *P. viticola*, pelos fungos endofíticos que apresentaram capacidade antagonista, nos diferentes volumes do teste dos compostos não voláteis.

Fungo Endofítico	% Inibição		
	75 µl	100 µl	200 µl
<i>Cladosporium</i> sp.	6.70	16.70	26.70
<i>Alternaria</i> sp. 1	9.10	13.60	22.70
<i>Alternaria</i> sp. 2	15.00	20.00	35.00
<i>Alternaria</i> sp. 3	28.20	30.80	38.50
<i>Alternaria</i> sp. 4	5.00	15.00	25.00
<i>Alternaria</i> sp. 5	6.30	18.80	31.30
<i>Alternaria</i> sp. 6	16.70	20.80	25.00
<i>Alternaria</i> sp. 7	14.30	22.9	28.60
<i>Epicoccum</i> sp. 1	13.80	24.10	31.00
<i>Epicoccum</i> sp. 2	6.30	12.50	21.90
<i>Epicoccum</i> sp. 4	8.00	20.00	32.00



5. DISCUSSÃO

Todas as espécies de plantas examinadas até hoje abrigam fungos endofíticos dentro dos seus tecidos aéreos assintomáticos, de modo que os fungos endófitos representam um componente sempre presente das comunidades de plantas terrestres. Os fungos endofíticos são simbioses mutualistas que toda, ou apenas parte do seu ciclo de vida ocorreu em tecidos saudáveis de plantas, estes conferem condições favoráveis às plantas hospedeiras já que competem poderosamente pela colonização do espaço e para obter o alimento, fazendo com que estas tenham uma maior resistência contra agentes patogénicos. Os fungos endofíticos também produzem substâncias ativas utilizadas como agentes de controlo biológico/antimicrobianos, que estimulam a defesa do hospedeiro contra vários agentes patogénicos (Rahmansyah & Rahmansyah, 2013; Arnold *et al.*, 2003). A cultura de *Vitis vinifera* está amplamente disseminada e é de grande importância, hospedando naturalmente um reservatório de microrganismos. Portanto, um levantamento dos fungos endófitos da videira sob condições naturais é de extrema importância, já que a produção e a qualidade da uva podem ser afetadas pela comunidade microbiana ativa da vinha (Dissanayake *et al.*, 2018). Os fungos patogénicos podem levar, no extremo, à total perda das vinhas e da sua produção.

O uso de fungos endofíticos, naturalmente presentes nas vinhas, como antagonistas de fungos causadores das doenças do lenho permite responder à demanda da sociedade por alimentos saudáveis com menos resíduos químicos e uma grande preocupação com a preservação do meio ambiente.

A capacidade antagonista dos microrganismos que atuam como agentes de controlo biológico são baseadas na ativação de múltiplos mecanismos. Eles podem controlar os agentes patogénicos competindo por nutrientes e espaço, por micoparasitismo, antibiose ou produção de metabólitos, seja afetando o agente patogénico como promovendo o crescimento das plantas e mecanismos de defesa (Landum *et al.*, 2016). Neste trabalho, pretendeu-se perceber através de três métodos *in vitro* distintos, confronto direto, produção de compostos voláteis e não voláteis, de que maneira o controlo biológico com fungos endofíticos ajuda a controlar a ação de agentes patogénicos responsáveis por doenças do lenho. Tanto os fungos endofíticos como os agentes patogénicos foram isolados de videiras do Alentejo, aparentemente saudáveis, de uva para vinho, e para produção de uva de mesa, embora se percebesse mais tarde que possuíam agentes patogénicos responsáveis por doenças do lenho. Como tal este

trabalho tentou ajudar a perceber se os fungos endofíticos contribuíam para o não desenvolvimento de doenças do lenho já que algumas plantas desenvolvem a doença e outras não, mesmo com a presença do agente patogénico.

Pode-se referir que em ambos os tipos de videira utilizados para pesquisa de fungos endofíticos, vinhas para vinicultura e vinhas produtoras de uva de mesa, os fungos endofíticos encontrados são predominantemente dos géneros *Alternaria* e *Epicoccum*. Tendo havido apenas um isolado de género diferente, *Cladosporium*, este foi isolado de videiras para produção de vinho.

Os resultados de identificação dos isolados endofíticos, mostraram que 58.00% pertencem ao género *Alternaria* e 33.00% pertencem ao género *Epicoccum*. Durante o trabalho não foi possível identificar a espécie entre os diferentes sete isolados atribuídos ao género *Alternaria*, e aos quatro fungos do género *Epicoccum*. Estes dois géneros pertencem à grande maioria de fungos utilizados durante o trabalho, corroborando com estudos anteriores que os referem como os géneros identificados com maior frequência em videiras (González & Tello, 2011; Pancher *et al.*, 2012; Varanda *et al.*, 2016). Os fungos pertencentes ao género *Alternaria* encontram-se largamente disseminados no solo e em matéria orgânica em decomposição (Polizzoto *et al.*, 2012), daí a sua larga distribuição, tal também ocorre graças ao seu estilo de vida particular, capazes de resistir e crescer sob intensas radiações UV (Varanda *et al.*, 2016).

Nas castas para produção de vinho, casta Aragonez, foram isolados dois géneros diferentes *Cladosporium* e *Alternaria*, na casta *C. Sauvignon*, *Alternaria* e *Epicoccum*, na casta Verdelho, apenas *Epicoccum*. Nas castas de uva de mesa isolaram-se, na casta Cardinal, *Alternaria*, e na casta Vitoria, *Alternaria* e *Epicoccum*. Saikkonen, referiu em 2007, que as diferenças das comunidades endofíticas entre castas pode ser justificada uma vez que os fungos endofíticos apresentam especificidade para determinadas plantas, devido ao microhabitat e microclima criado, bem como às características de própria casta, teor de açúcar, pH, acidez total e compostos fenólicos.

Neste trabalho foram utilizados maioritariamente os géneros *Alternaria* e *Epicoccum*, o que faz todo o sentido uma vez que são os fungos endofíticos com maior incidência em videiras, tendo já a sua eficiência antagonista contra doenças desta cultura sido comprovada. *Alternaria* já provou a sua eficiência antagonista para com *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* (Varanda *et al.*, 2016), havendo também estudos que

comprovam a capacidade de isolados de fungos do género *Epicoccum*, para com as mesmas doenças (Varanda *et al.*, 2016). Fungos pertencentes ao género *Cladosporium*, foram também anteriormente isolados de videiras (Dissanayake *et al.*, 2018), estes estão associados à podridão do cacho, causada por *Botrytis cinerea* (Kecskeméti *et al.*, 2016).

B. dothidea e *P. viticola*, foram os dois fungos utilizados como agentes patogénicos neste trabalho, ambos associados às doenças do lenho e isolados de vinhas do Alentejo, o primeiro de videira de uva de mesa e o segundo de videiras para vinicultura.

Na avaliação de capacidade antagonista contra o fungo *B. dothidea*, responsável pela escoriose europeia, durante o teste de antagonismo direto o melhor resultado foi obtido quando na presença de *Cladosporium* sp. sendo este o que mostrou uma maior capacidade antagonista ao longo dos dias de confronto direto. No último dia de ensaio o valor de crescimento do agente patogénico na presença de *Cladosporium* é o menor, existindo grandes diferenças de crescimento entre este e o controlo.

Ao comparar a inibição conseguida no teste de antagonismo direto com o teste com formação de compostos voláteis, consegue-se perceber que o *Cladosporium* sp. tendo tido uma grande capacidade inibitória quando na luta por nutrientes e espaço, o mesmo não ocorreu com a formação de compostos voláteis, tendo passado de uma taxa de inibição de 80.50 para 48.90%. Na presença de *Alternaria* sp. 1 e *Alternaria* sp.7, obtiveram-se os menores raio de crescimento de *B. dothidea*, no teste de compostos voláteis, com inibição de 65.90%.

Ao comparar as percentagens inibitórias calculadas nos testes de antagonismo direto e no teste de compostos voláteis, quando os fungos endofíticos se encontram em confronto com *B. dothidea*, é possível constatar que os resultados são muito inferiores no teste de compostos voláteis em comparação ao de antagonismo direto, apenas a *Alternaria* sp. 2 e *Alternaria* sp. 7 conseguiram maior capacidade antagonista através da formação de compostos voláteis do que quando *B. dothidea* está em luta por nutrientes e espaço com o fungo endofítico.

Ao avaliar os resultados obtidos nos testes de compostos não voláteis, pode-se referir que através da formação de metabolitos secundários não voláteis, foi possível constatar uma menor eficiência na diminuição do crescimento de *B. dothidea* do que através da formação de compostos voláteis. O diminuir da eficiência de inibição de crescimento do

fungo patogénico, pode ocorrer devido à não produção de metabolitos secundários com atividade antifúngica, em particular contra *B. dothidea*. É possível ainda que tanto os compostos voláteis como os compostos não voláteis não sejam produzidos nas proporções necessárias, ou nos tempos do teste para que o crescimento seja inibido.

Ao se avaliar a capacidade antagonista dos mesmos 12 fungos endofíticos contra *P. viticola*, foi perceptível que todos apresentam capacidade antagonista quando em confronto direto com este fungo patogénico. Sendo que em confronto direto, as placas onde se obtiveram um menor raio de crescimento do fungo patogénico ao fim dos 15 dias de teste, foi nas placas que este dividia com *Alternaria* sp. 4 e *Alternaria* sp. 5, sendo que na presença deste último o valor não se alterou desde o sexto dia de ensaio.

Um ponto interessante é que o *Cladosporium* tendo sido o mais inibidor contra *B. dothidea*, foi o que permitiu à *P. viticola* uma maior progressão, quando em confronto direto. Os valores de crescimento entre os testes são muito diferentes, pois a produção de compostos voláteis é diferente dentro das diferentes espécies e géneros, sendo que diferentes agentes patogénicos respondem de forma diferente também. Ao tentar perceber qual a inibição que fungos endofíticos causam em *B. dothidea* através do teste do compostos voláteis, esta foi inferior à taxa obtida no teste do antagonismo direto, mas ao colocar os fungos endofíticos contra *P. viticola* os resultados foram diferentes. No caso da utilização de *P. viticola* a inibição causada pelos endofíticos com formação de compostos voláteis, foi superior na maioria dos casos, do que a inibição que ocorreu no teste de antagonismo direto. Esta inibição pode ter ocorrido pois o crescimento de *P. viticola* é muito lento, e ao segundo dia quando confrontada com os fungos endofíticos estes através da formação de compostos voláteis conseguiram inibir o seu crescimento, podendo a percentagem de metabolitos voláteis libertados pelos fungos endofíticos serem as suficientes para inibir o seu crescimento, o que não ocorreu na presença de *B. dothidea*.

A *Alternaria* sp. 7 conseguiu uma inibição de 95.70% através da formação de compostos voláteis, tendo obtido 69.80% nos compostos voláteis, o que mostra que o patogénico na luta por nutrientes e espaço consegue crescer, e, conseqüentemente, uma vez que neste teste também existe formação de compostos voláteis, o que pode ter ajudado na inibição de crescimento, já que com a libertação de compostos voláteis o fungo endofítico consegue inibir o crescimento do agente patogénico. A inibição por formação

de compostos voláteis nas placas utilizadas para confronto direto não é tão eficiente como no teste de compostos voláteis, pois no primeiro estas não se encontram seladas e há sempre perdas destes compostos. O *Cladosporium* sp. obteve a taxa de inibição seguinte, sendo o caso semelhante ao anteriormente referido.

É possível referir o caso do *Epicoccum* sp. 1, pois a sua capacidade antagonista em ambos os testes contra *P. viticola* é semelhante, 72.90% e 74.30%, no teste de confronto direto e formação de compostos voláteis, respetivamente, o que poderá ter acontecido graças à formação de compostos voláteis e não através da luta por nutrientes, pois *P. viticola* conseguiu o suficiente para crescer.

Ao tentar perceber a contribuição para a inibição do raio de *P. viticola* por formação de compostos não voláteis, apenas o *Epicoccum* sp. 3, não obteve resultados, tendo crescido por cima e dentro dos orifícios onde foi colocada a suspensão de fungo endofítico. A inibição conseguida nas diferentes concentrações não é linear, com o aumentar das mesmas sendo que este diminuiu aos 200 µL, não havendo alterações entre os 75 e 100 µL o que poderá ter sido um erro de manuseamento, e por isso este valor não foi avaliado.

O fungo endofítico com maior capacidade inibitória através da formação de metabolitos secundários foi a *Alternaria* sp. 3 contra *P. viticola* em todas as concentrações. Ao observarmos a capacidade do *Cladosporium*, esta diminui na formação de metabolitos secundários ainda que consiga ter capacidade inibitória e esta seja perceptível com o aumentar dos volumes aplicados nos orifícios, o mesmo ocorre com a *Alternaria* sp. 7, tendo a capacidade diminuído em relação aos dois testes anteriormente falados, mas perceptível a alteração de raio, quando ao encontro dos diferentes poços com diferentes concentrações.

No teste de antagonismo direto tanto contra *B. dothidea* como como *P. viticola*, o fungo endofítico *Cladosporium* sp. apresentou uma interação do tipo A, enquanto que *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 4 e *Alternaria* sp. 6 apresentam interação do tipo C, e, *Epicoccum* sp. 1 e *Epicoccum* sp. 2 apresentam também em ambos os confrontos, interação do tipo C. A interação entre os fungos endofíticos e os agentes patogénicos apresentam as mesmas características o que nos permite referir que a sua luta por nutrientes e interação com outros fungos ocorreu de forma semelhante.

Ao analisar de forma geral os três testes, para cada um dos fungos patogénicos, é possível constatar que cada endofítico no papel de antagonista tem um efeito diferente sobre os agentes patogénicos. Em cada teste, cada fungo endofítico tem uma maior capacidade antagonista, e quando em confronto com diferentes agentes patogénicos a sua capacidade de inibição também se altera, como se pode constatar, endofíticos com elevada capacidade antagonista por luta direta e baixa capacidade na formação de voláteis e não voláteis. Como tal, o efeito antagonista deve ser explorado a nível do controlo biológico não de forma isolada mas sim conjunta, ou seja misturando a competição direta com a produção de compostos voláteis e não voláteis. Também é importante que no caso dos fungos endofíticos em que a capacidade inibitória foi alta por compostos voláteis estes sejam identificados, para que possam ser testados em proteção de plantas.

Com este estudo contribui-se para o conhecimento do efeito antagonista sobre dois fungos patogénicos responsáveis por doenças dos lenho, dos quais a sua sintomatologia associada está a devastar vinhas. Sendo assim possível perceber que microrganismos omnipresentes nas plantas podem ser e como podem ser, utilizados de forma a minimizar os estragos causados.



6. CONCLUSÃO

As doenças da videira, são um problema a nível mundial desde há muitos anos, principalmente a nível económico, tanto pela perda que estas causam como pelos custos dos dispendiosos tratamentos, nem sempre eficazes e não prejudiciais ao ambiente. Atualmente, os principais meios de controlo de fungos patogénicos causadores de doenças são os fungicidas químicos. O custo destes que leva à busca de novas soluções, tanto menos dispendiosas como mais eficazes, e principalmente que não sejam prejudiciais nem ao ser humano nem ao meio ambiente.

O controlo biológico é visto como uma possibilidade em expansão, e a pesquisa por meios eficazes é cada vez mais recorrente. É importante perceber que o uso de inibidores biológicos no crescimento de agentes patogénicos é uma estratégia mais segura tanto a nível da saúde humana, como da fauna e flora envolvente às culturas.

As doenças do lenho da videira, causadas por várias espécies de fungos patogénicos, são cada vez mais um flagelo da viticultura atual, estando a matar por completo vinhas jovens e adultas. Este cenário piorou aquando da proibição do uso de arsenito de sódio, pelo que é urgente encontrar uma solução eficaz para o controlo destas doenças de tão fácil disseminação.

As plantas são habitadas por fungos endofíticos, estes colonizam o hospedeiro, numa relação mutualista não desenvolvendo sintomas de doença. Graças a estas características, e ao competirem por espaço e nutrientes com os restantes microrganismos, têm sido cada vez mais vistos como possíveis repressores de doenças. Para o trabalho realizado foram escolhidos alguns dos fungos endofíticos mais encontrados em videiras. Os endofíticos foram isolados tanto de vinhas de uva de mesa como de vinhas para produção de vinho. Os fungos patogénicos utilizados foram *Botryosphaeria dothidea* e *Phomopsis viticola*, fungos causadores de doenças do lenho, escoriose europeia e escoriose americana, respetivamente. Tendo sido estes últimos também isolados de vinhas aparentemente saudáveis.

Durante o trabalho os isolados endofíticos em teste foram colocados em confronto com os isolados patogénicos de forma a avaliar a sua capacidade antagonista.

A capacidade antagonista foi registada para todos os endofíticos em confronto direto com ambos os patogénicos, verificando-se que o crescimento de *B. dothidea* e *P. viticola*, na presença dos endofíticos foi inferior do que quando estes cresciam de forma isolada. A inibição de crescimento ocorreu quer devido à competição por espaço como

por nutrientes, quer pela produção de compostos voláteis, segundo teste realizado durante o estudo. Já no terceiro e último teste, avaliação da taxa de inibição pela produção de metabolitos secundários, os resultados obtidos também foram bons uma vez que todos os fungos endofíticos apresentaram capacidade antagonista contra o agente patogénico. No caso da *P. viticola*, apenas um fungo endofítico não apresentou capacidade antagonista através da produção de metabólitos secundários.

Como tal, é possível referir que as espécies endofíticas com maior percentagem de colonização das videiras, demonstraram potencial inibitório contra os agentes patogénicos usados.

O desenvolver deste tipo de estudos é necessário, uma vez que a utilização de endofíticos como controlo biológico pode ser uma estratégia futura para o combate a este tipo de doenças.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dharmaputra, O. (2003). Antagonistic effect of three fungal isolates to aflatoxin-producing *Spergillum*/HS/JavHS. *Biotropia*, 19-31.
- Abou-Mansour, E., Débieux, J.-L., Ramírez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., . . . Fontaine, F. (2015). Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of *Botryosphaeria dieback* of grapevine. *Phytochemistry*, pp. 2-9.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology - Fifth Edition*. USA: Elsevier Academic Press.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. *Plant Soil*, pp. 5-13.
- Almeida, F. (2007). Cadernos Técnicos da ADVID nº4. pp. 1-16.
- Ammad, F., Moumen, O., Gasem, A., Othmane, S., Hisashi, K.-N., Zebib, B., & Merah, O. (2018). The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. *Comptes Rendus Biologies*, 97-101.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., & Evidente, A. (2011). Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *toxins*, 1569-1605.
- Andrade, A. (2013). *Manual Prático de Materiais Vitícolas*. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro.
- Arnold, A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, pp. 51-66.
- Arnold, A., Mejiia, L., Kyllö, D., Rokas, E., Maynard, Z., & Robbins, N. (23 de december de 2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100, 15649 - 15654.
- Ayres, M., Wicks, T., Scott, E., & Sosnowski, M. (2017). Developing pruning wound protection strategies for managing *Eutypa dieback*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, pp. 102-111.
- Bruez, E., Larignon, P., Compant, S., & Rey, P. (2017). Investigating the durable effect of the hot water treatment used in nurseries on pathogenic fungi inhabiting grapevine wood and involved in Grapevine Trunk Diseases. *Crop Protection*, 203-210.

Cardoso, M., Diniz, I., Cabral, A., Rego, C., & Oliveira, H. (2013). Unveiling inoculum sources of black foot pathogens in a commercial grapevine nursery. *Phytopathologia Mediterranea*, pp. 298-312.

Chicau, G. *WINEWORK*

Obtido de <http://www.winetwork-data.eu/pt/default.asp>;

Chicau, G. (outubro de 2006). *Ficha Técnica 55 actualizada - Esca na Videira*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas - DRAEDM.

Chicau, G. (2006). *Ficha Técnica 113 - Doença de Petri e Pé Negro da Videira*. DRAEDM Direção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho.

Demirci, E., Elif Dane, E., & Eken, C. (2012). *n vitro* antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 457-462.

Dennis, C., & Webster, J. (december de 1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, Hyphal Interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 363-369.

Dias, A., & Rego, C. (2018). *Escoriose Europeia*. Obtido de Syngenta Portugal: <https://www.syngenta.pt/escoriose-europeia>

Díaz, G. A., & Latorre, B. A. (2013). Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*, 106-112.

Dissanayake, A., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K., Zhang, W., Xu, H., . . . Yan, J. (2018). Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*.

DRAPN/Estação de Avisos do Douro. (2008). ESCORIOSE da Videira . *Fichas Fitossanitárias EAD*, pp. 1-2.

Fuente, M., Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z., . . . Corio-Costet, M.-F. (may de 2016). Grapevine Trunk Diseases. A review. *OIV publications, 1st Edition*.

Gessler, C., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, pp. 3-44.

- González, V., & Tello, M. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, pp. 29-42.
- Grenet, M., & Mercier, M. (2007). Doenças do Lenho da Videira: impactos e Soluções. *Revista Internet de Viticultura e Enologia - infowine.com*, 1-5.
- Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M., Corio-Costet, M., Fert, M., . . . Deschamps, A. (2016). Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research*, 172-184.
- Halleen, F., Fourie, P., & Lombard, P. (2010). Protection of Grapevine Pruning Wounds against *Eulypa lata* by Biological and Chemical Methods. *South African Journal for Enology and Viticulture*, pp. 125-132.
- Jailloux, F., Bugaret, Y., & Froidefond, G. (1987). Inhibition of sporulation of *Phomopsis viticola* Sacc., cause of dead arm disease of vines, by fosetyl-Al under field conditions. *CROP PROTECTION*, pp. 148-152.
- Kecskeméti, E., Berkelmann, B., & Reineke, A. (2016). Are Epiphytic Microbial Communities in the Carposphere of Ripening Grape Clusters (*Vitis vinifera* L.) Different between Conventional, Organic, and Biodynamic Grapes? *PLoS ONE 11(8): e0160852. doi:10.1371/journal.pone.0160852*.
- Landum, M., Alho, J., Rei, F., Félix, M., & Varanda, C. (2016). Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research*, 100-108.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clement, C., & Bertsch, C. (2009). Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies*, pp. 765-783.
- Larran, S., Simon, M., Moreno, M., Siurana, M., & Perello, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, pp. 17-23.
- Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.-M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.-J., . . . Fermaud, M. (2012). New Insights into Esca of Grapevine: The Development of Foliar Symptoms and Their Association with Xylem Discoloration. *Plant Disease 96*, 924-934.

- Levasseur-Garcia, C., Malaurie, H., & Mailhac, N. (2016). An infrared diagnostic system to detect causal agents of grapevine trunk diseases. *Journal of Microbiological Methods*, 1-6.
- Merrin, S., Mair, N., & Tarran, J. (1995). Variation in Phomopsis recorded on grapevine in Australia and its taxonomic and biological implications. *Australasian Plant Pathology*, pp. 44-56.
- Mostert, L., Crous, P., & Petri, O. (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex . *Sydowia*, pp. 46-58.
- Mugnai, L. (2012). Black rot. *Podridão Negra da Videira - Jornada Técnica* (pp. 9-11). Viseu: DRAP - Direção Regional de Agricultura e Pescas Centro.
- Núñez-Trujillo , G., Cabrera, R., Burgos-Reyes , R., Da Silva, E., Giménez, C., Cosoveanu, A., & Brito, N. (2012). Endophytic fungi from *Vitis vinifera* L. isolated in Canary Islands and Azores as potential biocontrol agents of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, pp. 1-6.
- Neto, E. (2014). Ficha de Divulgação nº2 - Escoriose Americana. *Direção Regional de Agricultura e Pescas do Algarve - Estação de Avisos Agrícolas do Algarve* , pp. 1-3.
- Neves, M. (2000). *Pragas e Doenças da Vinha*. DRABL - Direção Regional da Agricultura da Beira Litoral.
- Newsome, J. (2012). Grapevine Trunk Disease - A Review. 1-20.
- Norte, D. R. (2017). *Escoriose da Videira - Avisos Agrícolas*. Régua: Serviço Nacional dos Avisos Agrícolas.
- OIV. (2015). *Grapevine trunk diseases. A real problem*. Document elaborated by the OIV Secretariat general.
- Oliveira, H., Rego, C., Santos , M., Nascimento, T., & Cabral A. (2007). Declínio das vinhas jovens: novos desenvolvimentos. *7º Simpósio de Viticultura do Alentejo*, (pp. 75-85). Évora.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P., Longo, C., Yousaf, S., Perçot, O., & Campisano, A. (2012). Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, 4308-4317.
- Pearson, R., & Goheen, A. (1990). *Compendium of Grape Diseases*. APS Press.

Polizzoto, 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*, 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*, 251-257.

Redman, R., Dunigan, D., & Rodriguez, R. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, pp. 705-716.

Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., & Reis, P. (2012). Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade de isolados de *Guignardia bidwellii*. *PODRIDÃO NEGRA DA VIDEIRA - JORNADA TÉCNICA Sintomas* (pp. 11-14). Viseu: Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro.

Royse, D. J., & Ries, S. M. (1977). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 603-607.

Saikkonen, K., Faeth, S., Helander, M., & Sullivan, T. (1998). FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, pp. 319-343.

Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M., & Faeth, S. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *TRENDS in Plant Science*, pp. 275-280.

Sofia, J., & Rego, C. (s.d.). *DRAP CENTRO DIREÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA E PESCAS DO CENTRO*. Obtido de <http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/folheto.pdf>.

Sofia, J., Nascimento, T., Gonçalves, M., & Rego, C. (2013). Contribution for a better understanding of grapevine fungal trunk diseases in the Portuguese Dão wine region. *Phytopathologia Mediterranea*, 324-334.

Syngenta, P. (2018). *Syngenta*. Obtido de <https://www.syngenta.pt/escoriose-europeia>

Tello, M.-L., Gaforio, L., & Pastor, S. (2009). Semi-selective media for the isolation of *Phaeomoniella chlamydospora* from soil and vine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 11-19.

Varanda, C., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M., & Felix, M. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, pp. 1525-1536.

WineWork. (maio de 2018). *Advid-Associação Desenvolvimento Da Viticultura Duriense*.
Obtido de Projecto financiado ao abrigo do Programa de Investigação e Inovação da
União Europeia “Horizonte 2020”, sob o acordo de subvenção N° 652601:
<http://www.advid.pt/imagens/outros/15163680505071.pdf>