

Micobiota do lenho da videira: interações fúngicas

Tatiana Ferreira Santos

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biologia Funcional**

Orientador: Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira

Júri:

Presidente: Doutora Maria Leonor Mota Morais Cecílio, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Ricardo Manuel Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

- Doutora Maria Helena Mendes da Costa Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, por me ter dado a oportunidade de realizar e concluir este trabalho. Lâmpada para os meus pés é a tua palavra, e luz para o meu caminho (Salmo 119:105). À minha mãe, pelo incentivo, apoio e credibilidade e à minha irmã Alessandra pelo apoio.

À Professora Doutora Helena Oliveira um agradecimento especial pelo acompanhamento, incentivo, paciência, otimismo, empatia, amizade, apoio e ensinamentos, e pela disponibilidade ao longo do tempo para a realização deste trabalho.

À Engenheira Teresa Nascimento e Doutora Ana Cabral, os meus agradecimentos, pela ajuda e disponibilidade que dispensaram para a execução deste trabalho.

Os meus agradecimentos ao Professor Arlindo Lima, à Engenheira Filomena Caetano, Professora Paula Ramos, pelo incentivo, apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Engenheiro Pedro Reis, o meu agradecimento pelos conhecimentos transmitidos, apoio, amizade, e ajuda na realização deste trabalho. Às Engenheiras Marta Rocha e Sara.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Vegetal (LPPVA e DCBE), em especial Olga Nogueira, à Amélia Marques e Joaquim Antunes, pelo apoio nos trabalhos de laboratório realizados ao longo deste trabalho.

A todos os colegas que de alguma forma contribuíram para este trabalho e que fizeram parte do percurso ao longo de todos esses anos, Tatiana Seixas, Pedro, Rita, Filipa, Andreia, Ana.

RESUMO

Avaliou-se uma coleção de endófitos de videira do género *Epicoccum* (Epic 1 a 16), com o objetivo de determinar a respetiva composição específica e avaliar a sua atividade antimicrobiana contra fungos do lenho de videira. Com base em características culturais e moleculares, todos os isolados foram agrupados em *Epicoccum nigrum*, que revelou ser um complexo de espécies. A coleção foi testada contra "*Botryosphaeria*" sp., um fungo do lenho de crescimento rápido, tendo o isolado Epic 2 surgido no grupo dos que revelaram maior atividade antagonista ($\alpha = 0,05$). Epic 2 inibiu também significativamente o crescimento micelial dos fungos causadores do "complexo da esca", *Phaeoconiella chlamydospora* (45,8%), *Fomitiporia mediterranea* (42,7%) e, em menor grau, *Phaeoacremonium aleophilum* (18,8%). Adicionalmente, avaliaram-se interações entre os fungos causadores da doença de Petri/"complexo da esca" e do pé negro da videira, *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, tendo os últimos sido significativamente favorecidos por *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*. Por sua vez, o fungo *F. mediterranea*, inicialmente favorecido por *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, foi posteriormente inibido por *Pm. aleophilum*, mas não por *Pa. chlamydospora*. Discute-se a relação complexa entre fungos causadores do "complexo da esca", bem como o potencial apresentado por Epic 2 como antagonista.

Palavras-chave: fungos endófitos, *Epicoccum* sp., *Vitis vinifera*, doenças do lenho da videira, esca.

ABSTRACT

A collection of *Epicoccum* grapevine endophytes (Epic 1-16) was evaluated to unravel its species composition and its antimicrobial activity against grapevine wood (GW) fungi. Based on cultural and molecular characteristics, all isolates clustered with *Epicoccum nigrum*, which revealed to be a species complex. The Epic collection was screened against “*Botryosphaeria*” sp., a fast growing GW pathogen, and the results revealed significant differences among isolates ($\alpha=0.05$), in which Epic 2 grouped with those with greatest antagonistic activity. Epic 2 also inhibited significantly the mycelial growth of the causative agents of the “esca complex”, *Phaeoconiella chlamydospora* (45.8%), *Fomitiporia mediterranea* (42.7%) and, to a lesser extent, *Phaeoacremonium aleophilum* (18.8%). In addition, the interactions between the endophytic fungi *Pa. chlamydospora* and *Pm. aleophilum* (Petri disease pathogens) were evaluated against *Ilyonectria liriodendri* and *Dactylonectria macrodidyma* (black foot pathogens), and *F. mediterranea* (“esca complex”). *I. liriodendri* and *D. macrodidyma* were significantly favoured by *Pa. chlamydospora* and *Pm. aleophilum*, while *F. mediterranea*, initially favoured by *Pa. chlamydospora* and *Pm. aleophilum*, was later inhibited by *Pm. aleophilum*, but not by *Pa. chlamydospora*. The complex relationships between fungi causing the “esca complex” as well as the potential presented by Epic 2 as antagonist against GW fungi are discussed.

Key-words: fungal endophytes, *Epicoccum* sp., *Vitis vinifera*, grapevine trunk diseases, esca.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE QUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PRINCIPAIS DOENÇAS DO LENHO DA VIDEIRA	3
1.1.1. Complexo da Esca	3
1.1.2. Pé negro da videira	8
1.1.3. Botriosferiose	9
1.2. FUNGOS ENDÓFITOS	11
1.2.1. Biodiversidade e Interação Endófito-Hospedeiro-Ambiente	11
1.2.2. Comunicação Endófito-Hospedeiro e Endófito-Endófito	15
1.2.3. Fungos Endófitos de Videira	16
1.3. INTERAÇÕES FUNGO-FUNGO	17
1.3.1. Principais mecanismos de Interação	19
1.3.2. Fatores que Afetam a Resposta das Interações Fungo-Fungo	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. CARACTERIZAÇÃO DE ENDÓFITOS DA VIDEIRA DO GÉNERO <i>EPICOCCUM</i>	24
3.1.1. Obtenção de isolados de <i>Epicoccum</i> e caracterização cultural	24
3.1.2. Caracterização molecular dos isolados de <i>Epicoccum sp.</i>	26
3.1.2.1. Extração e quantificação de DNA	27
3.1.2.2. Quantificação do DNA genómico	27
3.1.2.3. Amplificação de parte do gene da β -tubulina e sequenciação	28
3.2. INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS PATOGÉNICOS DO LENHO DA VIDEIRA	29
3.2.1. Isolados e condições de cultura	29
3.2.2. Testes de interação pelo método de culturas pareadas	29
3.2.2.1. Interação <i>Epicoccum versus Botryosphaeriaceae</i>	30
3.2.2.2. Interação <i>Epicoccum versus</i> fungos responsáveis pela esca da videira	30
3.2.2.3. Interação entre fungos responsáveis pela esca da videira	30
3.2.2.4. Interação entre fungos responsáveis pela doença de Petri e o pé negro da videira	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. CARACTERIZAÇÃO DE ENDÓFITOS DA VIDEIRA DO GÉNERO <i>EPICOCCUM</i>	31
4.1.1. Caracterização cultural dos isolados de <i>Epicoccum</i>	31
4.1.2. Caracterização molecular dos isolados de <i>Epicoccum sp.</i>	42

4.2. INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ISOLADOS DO LENHO DA VIDEIRA	45
4.2.1. Interação <i>Epicoccum</i> versus BOTRYOSPHAERIACEAE	45
4.2.2. Interação <i>Epicoccum</i> versus fungos responsáveis pela esca da videira	45
4.2.3. Interação entre fungos responsáveis pela esca da videira	48
4.2.4. Interação entre fungos responsáveis pela doença de Petri e o pé negro da videira	52
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS	55
6. REFERÊNCIAS	57
ANEXO A - Tipos de interações entre duas colónias fúngicas adaptado de Dharmaputra et al., 2003	70
ANEXO B - Ensaio de crescimento micelial de uma coleção de fungos do género <i>Epicoccum</i> em diferentes meios de cultura (diâmetro das colónias, cm)	72
ANEXO C - Interação entre fungos patogénicos do lenho da videira	77
ANEXO D - Composição dos meios de cultura usados para a caracterização cultural dos isolados do género <i>Epicoccum</i>	85

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.3. Terminologia proposta para interações interespecíficas não-nutritivas entre duas espécies fúngicas, respectivas respostas e exemplos de mecanismos (adaptado de Tuininga 2005)	18
Quadro 3.1. Isolados de <i>Epicoccum</i> sp. em estudo: data de obtenção, casta, local de colheita e obtentor	26
Quadro 3.2. Dados de passaporte de isolados de referência de <i>Epicoccum</i> spp.: referência da cultura, espécie, hospedeiro, País	26
Quadro 4.1. Características culturais de 16 isolados de <i>Epicoccum</i> spp. (Epic.) em PDA (meio gelosado de batata dextrosada), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C	32 / 33
Quadro 4.2. Características culturais de 16 isolados de <i>Epicoccum</i> spp. (Epic.) em meio gelosado Czapeck-Dox, ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C	34 / 35
Quadro 4.3. Características culturais de 16 isolados de <i>Epicoccum</i> spp. (Epic.) em meio gelosado de aveia (Oatmeal agar), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C	36 / 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais sintomas das doenças do Complexo da Esca: sintomas vasculares (A) e (B), e sintomas foliares (C) (Fonte: Andolfi <i>et al.</i> , 2012; https://www.oekolandbau.de/).	5
Figura 1.1.1. Sintomas da doença de Petri no lenho da videira, corte transversal (A) e corte longitudinal (B) (Fonte: Gramaje & Armengol, 2011).	8
Figura 1.1.2. Sintomas vasculares de pé negro no lenho da videira, corte transversal (A) e corte longitudinal (B) (Fonte: Agustí-Brisach & Armengol, 2013).	9
Figura 1.1.3. Sintomas de Botriosferiose em videira, cultivar Cabernet Sauvignon. Sintomas foliares (A) e sintomas vasculares caracterizados por estrias necrosadas que se estendem desde a zona de enxertia ao longo do tronco e braço afetados (B) (Fonte: Bertsch <i>et al.</i> , 2012).	10
Figura 1.2. Hipótese do Balanço do Antagonismo: equilíbrio entre fatores de virulência de endófitos e mecanismos de defesa das plantas, no qual resulta na colonização assintomática do hospedeiro (adaptado de Schulz & Boyle, 2006).	13
Figura 3.1. Esquema dos ensaios de interação entre dois (A) e três fungos (B).	29
Figura 4.1. Culturas de <i>Epicoccum</i> spp. (Epic), em meio de PDA, MEA, Czapeck-Dox e OA; ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C. Devido a contaminação em OA, a cultura Epic 14 não consta da figura acima.	38 / 39
Figura 4.2. Crescimento micelial de 16 isolados do género <i>Epicoccum</i> , isolados de videira, em diferentes meios de cultura, após 12 dias de incubação na obscuridade, à temperatura de 28 °C. Para cada meio de cultura, colunas seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).	41
Figura 4.3. Uma de duas mais parcimoniosas árvores obtidas do alinhamento das sequências de β -tubulina dos 16 isolados em estudo, bem como das sequências <i>Epicoccum</i> spp obtidas do GenBank. A árvore foi “rooted” utilizando dois isolados de <i>Epicoccum sorghinum</i> . Os valores de suporte de “bootstrap” estão indicados junto de cada nó. Os isolados de <i>Epicoccum</i> em estudo estão representados a negrito, e os isolados tipo (“ex-type strains”) estão sublinhados. A escala representa 2 alterações.	43
Figura 4.4. Efeito de fungos do género <i>Epicoccum</i> (Epic 1-16) na inibição do crescimento micelial de “ <i>Botryosphaeria</i> ”, após incubação durante 72 h, na obscuridade, à temperatura de 24 °C, em meio de cultura PDA (colunas seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si para $\alpha = 0,05$, teste de Tukey).	45
Figura 4.5. Inibição do crescimento micelial de <i>Fomitiporia mediterranea</i> , <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> e <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> , em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com Epic 2. As culturas cresceram durante 7 e 14 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).	46
Figura 4.6. Inibição do crescimento micelial de <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> , <i>Fomitiporia mediterranea</i> e <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> , em cultura pareada, ao fim de 14 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C.	48

Figura 4.7. Interação de fungos envolvidos na esca da videira, ao fim de 14 dias de incubação em meio de cultura PDA, à temperatura de 25 °C, na obscuridade. Em cada gráfico, colunas afetadas pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).51

Figura 4.8. Inibição do crescimento micelial de *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com ele mesmo, com outra espécie causadora de pé negro e com fungos responsáveis pela doença de Petri, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*. As culturas cresceram durante 11 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).53

Figura 4.9. Inibição do crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, em cultura pareada com *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, decorridos 11 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade, à temperatura de 24 °C. Para cada um dos fungos, letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).53

Figura 4.10. Exemplos de interações entre fungos do lenho da videira (A1 (frente) - A2 (verso), *Phaeomoniella chlamydospora* x *Pa. chlamydospora*; B1 (frente) - B2 (verso), *Phaeoacremonium aleophilum* x *Pm. aleophilum*; C1 (frente) - C2 (verso), *Fomitiporia mediterranea* x *F. mediterranea*; D1 (frente) - D2 (verso), *Ilyonectria liriodendri* x *I. liriodendri*; E1 (frente) - E2 (verso), *Dactylonectria macrodidyma* x *D. macrodidyma*; F1 (frente) - F2 (verso), *Pm. aleophilum* x *Pa. chlamydospora*; G1 (frente) - G2 (verso), *F. mediterranea* x *Pa. chlamydospora*; H1 (frente) - H2 (verso), *F. mediterranea* x *Pm. aleophilum* l; I1 (frente) - I2 (verso), *F. mediterranea* x *Pm. aleophilum* x *Pa. chlamydospora*; J1 (frente) - J2 (verso), *I. liriodendri* x *Pa. chlamydospora*; K1 (frente) - K2 (verso), *I. liriodendri* x *Pm. aleophilum*; L1 (frente) - L2 (verso), *I. liriodendri* x *D. macrodidyma*; M1 (frente) - M2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pa. chlamydospora*; N1 (frente) - N2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pm. aleophilum*.54

LISTA DE ABREVIATURAS

CBS - Fungal Biodiversity Centre

DI - dias de incubação

MEA - gelose de extrato de malte

OA - gelose de aveia

PDA - gelose de batata dextrosada

ROS - espécies reativas de oxigénio

gene *tub2* – gene da β -tubulina

1. INTRODUÇÃO

As doenças do lenho da videira (Grapevine Trunk Diseases - GTDs) são causadas por fungos patogénicos que deterioram os órgãos perenes da videira (*Vitis vinifera* L. e *Vitis* spp.) (Magnin-Robert *et al.*, 2014). Dentre as diversas doenças do lenho descritas na literatura destacam-se, pela sua importância mundial, a esca, a doença de Petri, a botriosferiose e a eutipiose (Hofstetter *et al.*, 2012), bem como o pé negro da videira (Rego, 2004; Cabral, 2011; Gramaje & Armengol, 2011). Também a escoriose da videira é atualmente considerada uma verdadeira doença do lenho da videira, capaz de causar cancrios (Úrbez-Torres *et al.*, 2013), embora não seja abordada no presente estudo, tal como a eutipiose.

Uma grande diversidade de fungos estão envolvidos nas doenças do lenho da videira, designadamente, *Botryosphaeria dothidea*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Diplodia corticola*, *Dothiorella iberica*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Neofusicoccum viticlavatum*, associados a botriosferiose e incluídos na família *BOTRYOSPHAERIACEAE* (Phillips *et al.*, 2013); *Phaeoacremonium (Pm.) aleophilum*, *Pm. angustius*, *Pm. mertoniae*, *Pm. viticola*, *Pm. parasiticum*, *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora* (Rolshausen *et al.*, 2010), *Fomitiporia* spp., *Fomitiporella* spp., *Inocutis* spp., *Cadophora luteo-olivacea* (Gramaje & Armengol, 2011; Travadon *et al.*, 2014), entre outros, envolvidos no complexo da esca; complexo “*Cylindrocarpon*”, *Campylocarpon* spp. e *Cylindrocladiella* spp., o primeiro dos quais englobando espécies incluídas nos géneros *Dactylonectria*, *Ilyonectria* e *Neonectria* spp., envolvidos na doença do pé negro da videira (Gramaje & Armengol, 2011); *Eutypa lata*, *E. leptoplaca*, *Cryptovalsa ampelina*, *Cryptosphaeria pullmanensis* e diversas outras espécies, associadas à eutipiose da videira e, ainda, o complexo *Diaporthe/Phomopsis*, envolvido na escoriose (Andolfi *et al.*, 2011).

Alguns destes fungos afetam plantas-mãe de porta-enxerto, plantas provenientes de viveiros vitícolas (Gramaje & Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Gramaje 2016), videiras jovens (até 8-10 anos de idade) e videiras adultas (com idade superior a 10 anos), cultivadas em todo o mundo. São responsáveis por prejuízos muito significativos na indústria de vinhos (Gubler *et al.*, 2005) e na viticultura, devido à redução da produtividade, do vigor e da longevidade das vinhas, bem como da qualidade das uvas (Newsome, 2012). Em França, de 72% das vinhas que expressaram sintomas de doenças do lenho, 12% tornaram-se improdutivas (Pierron *et al.*, 2016). Estima-se que os custos de replantação, para substituição de videiras mortas, atinjam mais de 1,5 milhão de milhões de dólares por ano (Hofstetter *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2015). Também, em vinhas afetadas por doenças do lenho, os custos de produção aumentam devido a um maior investimento na aplicação de fungicidas e de práticas culturais, visando a prevenção e o combate a estas doenças (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2013). As doenças do lenho constituem pois uma ameaça para a viticultura a nível mundial (Úrbez-Torres *et al.*, 2006), com impactos económicos elevados.

Os fungos patogénicos associados às doenças do lenho geralmente colonizam as estruturas lenhosas das videiras, principalmente através das feridas resultantes da atividade de poda, período de maior risco de infeção (Travadon *et al.*, 2013). As feridas não lenhificadas e expostas ao ambiente, uma vez em contato com os esporos (sexuados e assexuados) aéreos ou presentes nos solos (arrastados pela chuva) são infetadas, com a conseqüente colonização dos tecidos lenhosos devido ao crescimento micelial dos fungos patogénicos. As feridas podem permanecer susceptíveis às infeções causadas por esses agentes patogénicos por várias semanas; e uma mesma videira pode ser infetada múltiplas vezes por um ou vários fungos (Rolshausen *et al.*, 2010). A infeção normalmente evolui e causa uma série de alterações metabólicas e fisiológicas na videira que culminam na expressão de sintomas. Apesar de serem variáveis e inconstantes, os sintomas das doenças do lenho geralmente caracterizam-se por necroses na madeira e cloroses nas folhas, redução do crescimento da videiras e/ou de vinhas já estabelecidas, declínio lento e morte das videiras (em casos muito severos) (Newsome, 2012).

Uma videira portadora da doença do lenho abriga no seu interior um complexo de fungos patogénicos que podem atuar simultaneamente ou de forma sequencial, podendo haver um agente patogénico dominante (Rego *et al.*, 2012). As interações patogénio-patogénio e patogénio-ambiente na videira são bastante complexas e por vezes específicas para as espécies de fungos que colonizam os tecidos, assim como a sua localização geográfica e o tipo de stresse ambiental ao qual são submetidas (Newsome, 2012). O stresse ambiental parece desempenhar um papel muito importante na expressão dos sintomas das doenças do lenho (Rego *et al.*, 2012), além de ser um potencial fator de ativação de infeções latentes (Newsome, 2012).

Fatores edafo-climáticos (clima, localização, características do solo, entre outros), bem como o porta-enxerto, a idade da vinha e principalmente o genótipo da videira influenciam a incidência das doenças do lenho (Surico *et al.*, 2006; Hofstetter *et al.*, 2012; Spagnolo *et al.*, 2014). Hofstetter *et al.* (2012) sugerem que os fungos patogénicos associados a essas doenças são um pré-requisito para a expressão dos sintomas, embora nem sempre sejam os responsáveis pela expressão dos mesmos. Os sintomas expressos pelos bagos e pelas folhas da videira são frequentemente causados por compostos extracelulares produzidos pelos fungos, designadamente toxinas, que provocam diferentes descolorações na madeira. Esses compostos geralmente são translocados para as folhas via xilema, justificando o fato de ainda não se terem isolado fungos patogénicos, a partir de folhas de plantas infetadas (Letousey *et al.*, 2010; Bertsch *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2012).

Até ao momento não se conhece nenhum táxon de videira cultivada ou selvagem que seja resistente às doenças do lenho, embora algumas cultivares apresentem uma maior susceptibilidade a estas doenças do que outras, designadamente no que se refere à sensibilidade para expressarem sintomas foliares (Lorrain *et al.*, 2012). Diversos autores indicam que a cultivar 'Chardonnay' é menos susceptível à botriosferiose e à esca,

relativamente às cultivares `Gewurztraminer` e `Mourvèdre` (Spagnolo *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2015; Guan *et al.*, 2015). Borgo *et al.* (2016) confirmaram a menor suscetibilidade de castas tintas de videira, particularmente as ricas em polifenóis, à esca. Por sua vez, Guan *et al.* (2015) verificaram que várias acessões de *Vitis vinifera* subespécie *sylvestris*, ancestral de *Vitis vinifera*, são mais resistentes, quando inoculadas artificialmente com fungos *Botryosphaeriaceae*, do que as cultivares `Chardonnay` e `Gewürztraminer`. A suscetibilidade de *Vitis vinifera* às doenças causadas pelos fungos do lenho varia de acordo com o tipo de cultivar e é controlada por fatores genéticos (Bruez *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2015; Pierron *et al.*, 2016), como no caso da botriosferiose (Guan *et al.*, 2015).

Metabólitos secundários, como os flavonóides, podem contribuir para a resistência das cultivares às doenças do lenho (Guan *et al.*, 2015). Por sua vez, Pouzoulet *et al.* (2014) relacionam o diâmetro dos vasos xilémicos com a susceptibilidade de três cultivares comerciais de *Vitis vinifera* à esca. O diâmetro dos vasos pode desempenhar um papel importante na compartimentação dos agentes patogénicos e, ao mesmo tempo, influenciar a sensibilidade da videira à seca (Guan *et al.*, 2015). O facto de não existirem cultivares resistentes às doenças do lenho, associado à elevada taxa de videiras assintomáticas presentes em vinhas contaminadas com esca e/ou botriosferiose (Larignon *et al.*, 2009), e a ausência de medidas curativas e de controlo, eficientes e eficazes contra essas doenças, têm contribuído para o aumento considerável da incidência das doenças do lenho a nível mundial.

Na sequência da proibição da aplicação do brometo de metilo no combate às doenças do lenho na Europa (Bertsch *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2015), várias estratégias têm vindo a ser implementadas no sentido de prevenir e controlar tais doenças, bem como minimizar os seus efeitos devastadores nas vinhas. Para o sucesso da implementação de tais estratégias, é crucial a melhor compreensão das comunidades fúngicas e bacterianas que habitam o lenho da videira, a sua evolução espaço-temporal, e as possíveis interações entre microrganismos não patogénicos e patogénicos que habitam o lenho da videira, numa altura em que a comunidade científica se interroga, por exemplo, sobre a verdadeira etiologia da esca e se a mesma será, na verdade, causada por fungos (Hofstetter *et al.*, 2012).

1.1. PRINCIPAIS DOENÇAS DO LENHO DA VIDEIRA

1.1.1. Complexo da Esca

A “esca”, também conhecida na literatura anglo-saxónica como “black-measles” (sarampo preto), é uma doença de carácter destrutivo, que ocorre principalmente em vinhas localizadas na Austrália, Califórnia, Canadá, África do Sul e Europa (Larignon & Dubos, 1997; Edwards *et al.*, 2003; Surico *et al.*, 2008; Mundy & Manning, 2010). A incidência da doença tem vindo a aumentar à escala mundial ao longo dos últimos anos, sendo muito evidente em regiões vitivinícolas do Mediterrâneo; onde é conhecida há mais de 100 anos (Fischer & Kassemeyer, 2003). Em Portugal estima-se que a incidência da doença seja de 20% (Lima *et al.*, 2010).

Os primeiros estudos sobre a “esca” foram realizados em França, em 1905-06, por Ravaz, onde a doença era conhecida por “apoplexia” ou “folletage”; caracterizada pela seca e morte súbita das videiras e a podridão branca no tronco (Surico, 2009). Durante muitos anos a doença foi atribuída a fungos basidiomicetas, mas a identificação dos fungos endófitos *Pa. chlamydospora* e *Phaeoacremonium* spp. associados à doença veio levantar questões sobre a sua verdadeira etiologia e colocar a hipótese de se tratar de um complexo de doenças (Mugnai *et al.*, 1999).

O conceito de “esca” foi entretanto evoluindo e atualmente é aceite tratar-se de um complexo de duas doenças que podem ocorrer em simultâneo na mesma videira: podridão branca e doença vascular (Surico, 2009; Andolfi *et al.*, 2011). A podridão branca, “white-rot” ou “amadou” (também chamada simplesmente esca) é causada por fungos basidiomicetas, *Fomitiporia mediterranea* M. Fisher, *Fomitiporia punctata* (P. Karst) Murril (anteriormente identificado como *Phellinus punctatus*), *Phellinus igniarius* (L.) Quel e *Stereum hirsutum* (Willd.: Fr.) Pers (Úrbez-Torres *et al.*, 2014), enquanto a doença vascular, que inclui três síndromas, tem essencialmente a intervenção dos seguintes fungos: *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl. (anamorfo: *Phaeoacremonium* (*Pm.*) *aleophilum* W. Gams, P.W. Crous, M.J. Wingfield & L. Mugnai, outras espécies de *Phaeoacremonium* e *Phaeomoniella* (*Pa.*) *chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingfield & L. Mugnai) P.W. Crous & W. Gams.

As três síndromas vasculares são: (1) estrias negras no lenho (“Brown Wood Streaking”), referente a descolorações no lenho e necrose dos vasos em materiais de viveiro vitícola (2) doença de Petri (“Petri disease”), respeitante ao declínio de videiras jovens, em que as plantas exibem perda de vigor, clorose das folhas e, internamente, estrias negras na madeira, e (3) doença das folhas estriadas (“Leaf Stripe Disease”), anteriormente conhecida como esca de vinhas jovens (“young esca”) (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009; Andolfi *et al.*, 2011). Os sintomas da “Leaf Stripe Disease” incluem necroses no lenho de cor vermelha-acastanhada (mas ausência de podridão branca), necrose vascular com exsudado de goma negra e sintomas foliares muito característicos, que incluem necrose entre nervuras, rodeadas por margens amarelas ou avermelhadas, permanecendo verde a área imediatamente em torno das nervuras principais, o que confere à folha um padrão típico de listras de tigre (“tiger-stripes”) (Andolfi *et al.*, 2011). Nos cachos e bagos, observa-se um atraso na maturação e pontuações negras ou acinzentadas (“black measles”), que se transformam em necroses. Estes sintomas podem coexistir ou não com a podridão branca e, quando surgem em conjunto, a literatura refere estas doenças como “Esca Proper” (Surico, 2009), embora esta designação esteja em desuso. Na Figura 1.1., documentam-se os principais sintomas das doenças do complexo da esca.

Phaeomoniella chlamydospora é um fungo comum em regiões vitícolas de todo mundo, enquanto *Pm. aleophilum* está menos difundido, tal como outras espécies de *Phaeoacremonium* (Surico *et al.*, 2008). São endófitos do lenho da videira que, em determinadas condições, ou em parte do seu ciclo de vida, poderão induzir doença (Mugnai *et*

al., 1999; Graniti *et al.*, 2000; Slippers & Wingfield, 2007; Hofstetter *et al.*, 2012; Block *et al.*, 2013). O basidiomiceta *F. mediterranea* é principalmente comum na Europa (Edwards & Pascoe, 2004; Surico *et al.*, 2008; Bertsch *et al.*, 2012).

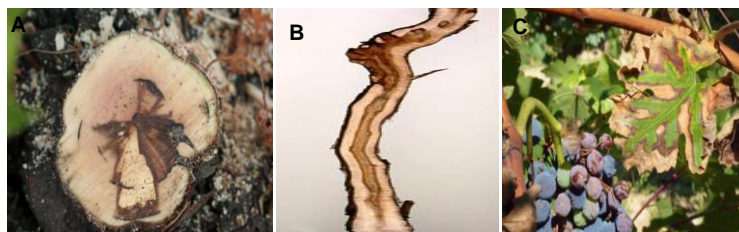


Figura 1.1. Principais sintomas das doenças do Complexo da Esca: sintomas vasculares (A) e (B), e sintomas foliares (C) (Fonte: Andolfi *et al.*, 2012; <https://www.oekolandbau.de/>).

Em videiras afetadas pelo complexo da esca, admite-se que estas sejam colonizadas por fungos primários ou precursores, *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, os quais abrem caminho para a atuação dos “fungos de degradação final da madeira”, os basidiomicetas dos gêneros *Fomitiporia* e *Stereum*. Outros fungos podem ser isolados de videiras infetadas com os fungos da esca (*E. lata*, outras espécies de *Phaeoacremonium*, fungos *Botryosphaeriaceae*, fungos do complexo “*Cylindrocarpon*”, *P. viticola*) os quais podem estar associados à doença, embora não se conheça o tipo de interação existente entre eles (Graniti *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2002; Fisher & Kassemeyer, 2003; Bruez *et al.*, 2016).

A principal via para uma potencial transmissão de *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* ocorre durante o processo de enxertia da videira (Aroca *et al.*, 2010; Gramaje & Armengol, 2011; Hofstetter *et al.*, 2012). *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* permanecem em estado de latência na madeira atacada e a disseminação dos esporos é feita através do vento (Rego *et al.*, 2012; Bertsch *et al.*, 2012), penetrando no interior do lenho a partir de feridas de podas e/ou raízes e rebentos, podendo até mesmo ser observado alguns conídios no interior do xilema (Rego *et al.*, 2012). Em videiras, *Pm. aleophilum* foi localizado nos vasos xilêmicos, fibras e medula; enquanto *Pa. chlamydospora* foi identificado principalmente nos vasos xilêmicos e fibras circundantes (Valtaud *et al.*, 2009; Fleurat-Lessard *et al.*, 2013; Pierron *et al.*, 2016).

Phaeoacremonium aleophilum secreta enzimas extracelulares, tal como xilanases, exo- e endo- β -1,4-glucanase e β -glucosidase, para modificar preferencialmente a celulose e a hemicelulose da parede celular da planta, onde a lenhina é pouco degradada, enquanto *F. mediterranea* secreta lacases, enzimas que oxidam e degradam a lenhina. As enzimas oxidativas são importantes devido à sua capacidade de catalisar a oxidação de fenóis em quinonas fitotóxicas e inativar proteínas e hormonas das plantas (Bertsch *et al.*, 2012).

No processo de infecção causada por *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora*, verifica-se a formação de gomas e tiloses, que provocam oclusão dos vasos xilêmicos (Valtaud *et al.*, 2009). Para Bertsch *et al.* (2012), as tiloses sintetizadas pelas plantas são resultantes das feridas e

não da resposta de defesa das videiras contra os agentes patogénicos. Esta pode estar relacionada com a síntese de exopolissacáridos e compostos fenólicos produzidos em resposta à infeção (Landi *et al.*, 2009).

Phaeoacremonium aleophilum e *Pa. chlamydospora* compartilham o mesmo nicho ecológico, atuando sinergicamente: *Pa. chlamydospora* secreta toxinas que reduzem as defesas da planta e favorecem a atividade de *Pm. aleophilum* (Luini *et al.*, 2010; Magnin-Robert *et al.*, 2014; Pierron *et al.*, 2016). Dados genómicos recentes revelam que *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* possuem baixa virulência quando comparados com outros fungos patogénicos, sugerindo que eles possam interagir com outros fungos associados ao lenho da videira (Blanco-Ulate *et al.*, 2013; Antonielli *et al.*, 2014; Pierron *et al.*, 2016).

Admite-se que os sintomas causados pelos fungos envolvidos no complexo da esca, em particular os sintomas foliares, se devam a (i) toxinas fúngicas (Andolfi *et al.*, 2011; Hofstetter *et al.*, 2012) secretadas pelos fungos no tronco, que se difundem através do xilema durante a transpiração e são transportadas para as folhas, onde se acumulam, e a (ii) stresse hídrico causado pelo rompimento ou obstrução dos vasos (Bruno *et al.*, 2007; Letousey *et al.*, 2010; Lecomte *et al.*, 2012; Pouzoulet *et al.*, 2014; Pierron *et al.*, 2016). Por sua vez, Hofstetter *et al.* (2012) acreditam que a manifestação de sintomas se deva ao aumento da proliferação dos agentes patogénicos causadores da doença, resultando num impacto na comunidade fúngica associada ao lenho da videira.

A etiologia da esca é complexa e ainda não está totalmente compreendida. Supõe-se que, além da presença dos agentes patogénicos, outros fatores possam influenciar o desenvolvimento da doença, tais como: idade da vinha, susceptibilidade da cultivar, zona e tempo de infeção, resposta de defesa da videira (Valtaud *et al.*, 2009), bem como variações climáticas, tipo de solo (solos profundos e ricos parecem ser mais susceptíveis à esca), sistema de condução e tipo de poda utilizado pelos agricultores (Valtaud *et al.*, 2009; Fleurat-Lessard, *et al.*, 2010; Pierron *et al.*, 2016). Fleurat-Lessard *et al.* (2010) consideram a esca uma doença insidiosa, pois as videiras podem estar infetadas e expressar os primeiros sintomas foliares visíveis somente 3 a 5 anos após terem sido plantadas. Outra característica marcante da esca é a descontinuidade da expressão dos sintomas da doença, pois a extensão dos sintomas varia no interior da vinha e na mesma videira de um ano para o outro (Edwards *et al.*, 2003; Fleurat-Lessard, *et al.*, 2010; Bertsch *et al.*, 2012). Essa descontinuidade pode ser explicada pela variação da concentração de toxinas produzidas por *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora* ao longo do tempo (Bruno *et al.*, 2007).

A sintomatologia da doença de Petri assemelha-se muito à do pé negro da videira (*vd.* 1.1.2.) (Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Gramaje, 2016), tornando o diagnóstico de difícil realização, quando baseado apenas em observações no campo (Rego *et al.*, 2000; Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Os sintomas podem variar de ano para ano, dependendo da idade das videiras, da intensidade do ataque e de vários fatores ambientais e do estado de stresse da planta (Gramaje & Armengol, 2011). Inicialmente designada por

“black-goo”, “declínio das videiras jovens” e “esca das videiras jovens”, a doença de Petri é uma doença vascular, distinta da esca, mas que com ela pode coexistir em videiras adultas (Surico *et al.*, 2008; Surico, 2009). Juntamente com a doença do pé negro formam o complexo do declínio das vinhas jovens (young vine decline complex – YVD) (Úrbez-Torres *et al.*, 2014). A doença de Petri causa prejuízos significativos em todo o mundo (Essakhi *et al.*, 2008; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Cerca de 50% das vinhas recém-plantadas foram afetadas pela doença (Gramaje *et al.*, 2015); a qual se traduz no declínio e morte de videiras muito jovens (idade compreendida entre 1-5 anos) (Dubos & Larignon, 1988; Oliveira *et al.*, 2004; Rego, 2004). Afeta de um modo geral, as videiras destinadas à produção de vinho e/ou uva de mesa, podendo levar à morte das plantas doentes (Edwards *et al.*, 2003; Pinto, 2010). A doença é responsável pelo deficiente estabelecimento das vinhas jovens, e afeta vinhedos em todo o mundo (Europa, América do Norte e do Sul, Oceania, Próximo Oriente e África do Sul) (Úrbez-Torres *et al.*, 2014), comprometendo a sustentabilidade da indústria vitivinícola (Edwards & Pascoe, 2004). A doença de Petri predomina sobre a esca em vinhas na Austrália (Edwards & Pascoe, 2004) e o aumento da incidência da doença pode ter coincidido com a replantação massiva de vinhas, devido a infestação por filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) (Gramaje *et al.*, 2010).

As videiras afetadas por doença de Petri, apresentam no lenho, em corte transversal, pontuações castanhas (claras e/ou escuras ou negras) dispersas ou a formar um círculo ao redor da medula (anel), com exsudação de goma viscosa negra (“black goo”) e necroses castanhas duras na posição central. Em corte longitudinal, as pontuações castanhas ou negras surgem como estrias (Figura 1.1.1.) (Edwards *et al.*, 2003; Bruno *et al.*, 2007; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2010; Pinto, 2010; Andolfi *et al.*, 2011; Bertsh *et al.*, 2012; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). O escurecimento dos tecidos xilémicos deve-se à exsudação de seiva negra, a qual é resultante da síntese de gomas e compostos fenólicos, em resposta à infecção (Edwards *et al.*, 2003; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009; Gramaje *et al.*, 2010; Andolfi *et al.*, 2011; Gramaje & Armengol, 2011; Bertsch *et al.*, 2012; Mohammadi *et al.*, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2014).

A etiologia da doença é atribuída a *Pa. chlamydospora*, a espécie mais frequente, e a mais de 24 espécies do género *Phaeoacremonium*, com maior relevância para *Pm. aleophilum* (Mugnai *et al.*, 1999; Edwards & Pascoe, 2004; Surico *et al.*, 2008, Gramaje *et al.*, 2010; Gramaje & Armengol, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2014). Alguns investigadores sugerem que o fungo *Cadophora luteo-olivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew possa estar também associado à doença de Petri (Gramaje *et al.*, 2010; Gramaje & Armengol, 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013; Travadon *et al.*, 2014). Em simultâneo, ou posteriormente, as videiras jovens podem ser infetadas e colonizadas por outros fungos como os do complexo “*Cylindrocarpon*” spp., BOTRYOSPHAERIACEAE spp., *P. viticola*, *E. lata* (Fleurat-Lessard *et al.*, 2010; Mundy & Manning, 2010; Newsome, 2012), *F. punctata*, *S. hirsutum*, podendo mais tarde vir a desenvolver os sintomas de esca (Surico *et al.*, 2006; Gramaje *et al.*, 2015;). Ainda não é claro se o desenvolvimento da doença de Petri e, posteriormente da “Leaf Stripe Disease” e da “esca

proper” é devida aos diferentes fungos que atuam em conjunto ou em sucessão, ou até a um agente causal desconhecido. *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* têm sido isolados com incidência variável de plantas de viveiro (Casieri *et al.*, 2009), de vinhas-mãe de porta-enxertos (Aroca *et al.*, 2010; Gramaje & Armengol, 2011), bem como de videiras jovens e adultas aparentemente saudáveis (Gonzáles & Tello, 2010); concluindo-se que estes fungos possam surgir como endófitos da videira.

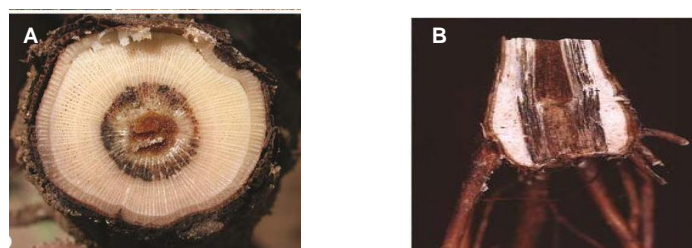


Figura 1.1.1. Sintomas da doença de Petri no lenho da videira, corte transversal (A) e corte longitudinal (B) (Fonte: Gramaje & Armengol, 2011).

1.1.2. Pé negro da videira

O pé negro da videira esteve inicialmente associado a fungos do solo do gênero *Neonectria* e seu anamorfo “*Cylindrocarpon*”, em particular às espécies “*C.* *destructans*” e “*C.* *obtusisporum*” (Rego, 1994; Scheck *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004; Rego, 2004; Halleen *et al.*, 2006). Para além daquelas espécies, foram igualmente considerados agentes causais da doença, “*C.* *liriodendri*”, “*C.* *macrodidymum*”, “*C.* *obtusisporum*”, “*C.* *pauciseptatum*”, *Campylocarpon fasciculare* e *C. pseudofasciculare* (Agustí-Brisach & Armengol, 2013), e posteriormente de *Cylindrocladiella parva* e *C. peruviana* (Úrbez-Torres *et al.*, 2014).

No entanto, *Neonectria*“*Cylindrocarpon*” revelou-se um complexo de gêneros e atualmente inclui, para além de *Neonectria*, os gêneros *Ilyonectria*, *Rugonectria*, *Thelonectria* e *Campylocarpon* (gênero anamórfico) (Chaverri *et al.*, 2011). Posteriormente, Lombard *et al.* (2014) erigiram, a partir de *Ilyonectria*, o gênero *Dactylonectria*. Com a alteração da designação dos gêneros, proliferaram também novas combinações específicas, a par do surgimento e reclassificação de novas espécies (ex., Cabral *et al.*, 2012a, 2012b), compiladas na revisão efetuada por Agustí-Brisach & Armengol (2013) sobre o pé negro da videira, e com designações atualizadas, no que aos gêneros *Ilyonectria* e *Dactylonectria* diz respeito, em Lombard *et al.* (2014).

O pé negro da videira afeta sobretudo materiais de propagação vegetativa de videira, viveiros vitícolas e videiras jovens, originando, em casos severos, o declínio e morte das plantas. Os sintomas característicos da doença incluem lesões necróticas nas raízes e redução da biomassa radicular, bem como necroses internas no lenho, com maior incidência na base do porta-enxerto (Figura 1.1.2.). Em consequência, as plantas apresentam atraso no desenvolvimento, crescimento raquítico, vigor reduzido, entrenós curtos e clorose ou necrose

foliar (Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2006; Cardoso, 2011; Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

Os sintomas causados pelos agentes do pé negro, em videira, são frequentemente indistinguíveis dos provocados pelos fungos envolvidos na doença de Petri, e as duas doenças e respetivos agentes causais podem coexistir numa mesma planta (Rego *et al.*, 2000). Por outro lado, os fungos responsáveis quer pelo pé negro quer pela doença de Petri podem surgir em associação, entre outros, com fungos *Botryosphaeriaceae* e *Phomopsis* spp. formando complexos de doenças (Oliveira *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2007). Ainda assim, não estão esclarecidas as interações que estes fungos estabelecem entre si, salvo raras exceções para os fungos do complexo da esca (Sparapano *et al.*, 2000c).

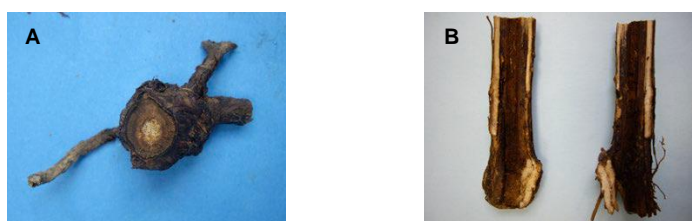


Figura 1.1.2. Sintomas vasculares de pé negro no lenho da videira, corte transversal (A) e corte longitudinal (B) (Fonte: Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

A maioria dos fungos causadores do pé negro da videira podem ocorrer como saprófitas no solo, ou atuar como parasitas de fraqueza, infetando plantas hospedeiras (vasta gama), a partir de feridas existentes nas raízes e caules. A capacidade que muitas espécies possuem de formar esporos de resistência, os clamidósporos, permite-lhes sobreviver durante largos períodos de tempo no solo (Halleen *et al.*, 2007; Agustí-Brisach & Armengol, 2013).

1.1.3. Botriosferiose

A botriosferiose, também conhecida como “grapevine dieback”, “black-dead arm”, “bot-canker”; foi descrita pela primeira vez na Hungria em 1974 por Lehoczky, associada ao fungo *Diplodia mutila* Fr. Apud Mont. (teleomorfo *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker) (Bertsch *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2015). De então para cá, dezenas de espécies na família BOTRYOSPHAERIACEAE foram descritas como importantes agentes causais de botriosferiose da videira (Larignon *et al.*, 2001; Niekerk *et al.*, 2006; Larignon *et al.*, 2009; Kuntzmann *et al.*, 2010; Úrbez-Torres, 2011; Bertsch *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2013). Tal como *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, os fungos BOTRYOSPHAERIACEAE podem apresentar-se como endófitos, patogénicos e saprófitas (Niekerk *et al.*, 2006; Slippers & Wingfield, 2007; Mundy & Manning, 2010;). Estes fungos podem afetar videiras de qualquer idade, originando, entre outros sintomas, necroses castanhas a negras no lenho ao longo do tronco e braços, que se expandem e formam setores necróticos e necroses negras ao redor da medula, para além de cancrios, “dieback”, morte dos

gomos, má soldadura da região de enxertia. Em videiras já estabelecidas, surgem sintomas foliares semelhantes ao padrão “listas de tigre”, típicos de “Leaf Stripe Disease” e “esca proper” (Figura 1.1.3.), bem como o sintoma de apoplexia (Larignon *et al.*, 2001; Larignon & Dubos, 2001; Larignon *et al.*, 2009; Bertsch *et al.*, 2012; Kuntzmann *et al.*, 2010; Lecomte *et al.*, 2012; Úrbez-Torres, 2011).

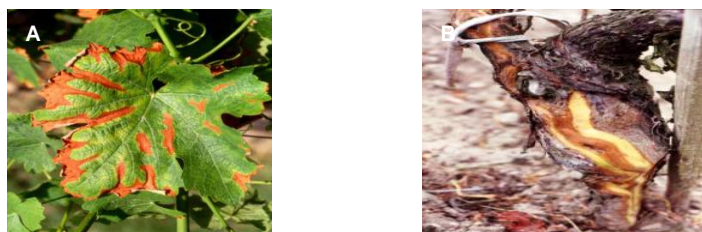


Figura 1.1.3. Sintomas de Botriosferiose em videira, cultivar Cabernet Sauvignon. Sintomas foliares (A) e sintomas vasculares caracterizados por estrias necrosadas que se estendem desde a zona de enxertia ao longo do tronco e braço afetados (B) (Fonte: Bertsch *et al.*, 2012).

Tem-se colocado a hipótese dos agentes causais da botriosferiose não serem apenas fungos BOTRYOSPHAERIACEAE, mas provavelmente um complexo de vários fungos, incluindo os fungos do complexo da esca (Úrbez-Torres, 2011). Embora a semelhança entre os sintomas foliares da botriosferiose e do complexo da esca seja evidente, acredita-se que seja possível distinguir estas doenças entre si; principalmente quando se observa a necrose que originam no lenho das videiras, a qual é caracterizada por uma banda ou estria acastanhada, com 2-3 cm de largura, visível quando se destaca o ritidoma da videira e que se desenvolve ao longo do tronco e dos braços afetados (Rego *et al.*, 2012). Quanto aos sintomas foliares da botriosferiose e da esca, Lecomte *et al.* (2012) são de opinião que deveriam ser considerados como uma única categoria de sintoma foliar, “botriosferiose-esca” (Lecomte *et al.*, 2012).

A via de infecção mais comum para fungos BOTRYOSPHAERIACEAE é através das feridas resultantes da poda, as quais geralmente são colonizadas pelos esporos produzidos nos picnídios ou peritecas presentes no ritidoma das varas, nos cancrios e em madeira abandonada nas vinhas. A disseminação dos esporos dá-se através da chuva (Rego *et al.*, 2012). Os fungos BOTRYOSPHAERIACEAE não apresentam especificidade relativamente aos hospedeiros (são polípagos) nem aos tecidos, e podem infetar diferentes tipos de tecidos (inclusive o tecido reprodutor) de *V. vinifera*, durante a estação de crescimento da planta (Wunderlich *et al.*, 2011). As infecções geralmente são favorecidas por fatores que reduzem o vigor das vinhas: feridas (Mundy & Manning, 2010), stresse (geadas, nutrição pobre, temperaturas elevadas), podas mal conduzidas, abundância de inóculo; bem como fatores que induzam o excesso de vigor (Rego *et al.*, 2012). Quanto à susceptibilidade à botriosferiose, algumas castas como Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc apresentam uma maior susceptibilidade, em relação às castas Merlot e Sémillon (Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Larignon *et al.*, 2009;). Atualmente não existe nenhum meio de luta eficiente no controlo desta doença, embora resultados promissores

estejam a ser obtidos pela aplicação de espécies de *Trichoderma* na proteção das feridas de poda (Niekerk *et al.*, 2006; Mutawila *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2016).

1.2. FUNGOS ENDÓFITOS

Todas as plantas no seu habitat natural, geralmente encontram-se associadas a microrganismos endófitos, essencialmente bactérias e fungos (Pancher *et al.*, 2012), sendo estes considerados como onnipresentes no reino Plantae. Segundo Radić & Strukelj (2012), a estimativa de espécies de fungos existentes é de 1,5 milhões, e a de espécies de fungos endófitos pode chegar a 1 milhão. O termo endófito foi utilizado pela primeira vez em 1886 pelo fitopatologista Anton de Bary, para descrever os microrganismos que colonizavam os tecidos internos dos caules e das folhas das plantas. Posteriormente, verificou-se que os endófitos poderiam também colonizar raízes e rebentos, causando infeções assintomáticas e que durante o seu ciclo de vida poderiam deixar de vir a exercer o papel de endófito (Porras-Alfaro & Bayman, 2011) e passar a atuar como agentes patogénicos durante o processo de senescência do hospedeiro (Aly *et al.*, 2011).

Os endófitos, podem ter surgido aquando o aparecimento das plantas superiores no planeta e co-evoluído com estas (Kusari *et al.*, 2012), estabelecendo diferentes tipos de interações com o hospedeiro, desde mutualismo, comensalismo, a patogenicidade latente, saprofitismo latente e estados iniciais de colonização (Shulz & Boyle, 2006; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Essas interações apresentam uma elevada plasticidade fenotípica, em função do genótipo, estágio de desenvolvimento e estado nutricional do hospedeiro e de fatores ambientais (Shulz & Boyle, 2006). Acredita-se que o endofitismo seja a única interação entre plantas e microrganismos do tipo custo-benefício, e para que seja bem-sucedida é necessário ultrapassar as barreiras físicas e químicas existentes entre os fungos e as plantas (Kusari *et al.*, 2012).

Os fungos endófitos são transmitidos horizontalmente (por via não-sistémica) através de esporos aéreos e tendem a ser mais antagonistas ao hospedeiro. Sobretudo em gramíneas, podem também ser transmitidos verticalmente (por via sistémica) através de sementes, onde predomina a interação mutualística (Arnold, 2005; Aly *et al.* 2011; Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

1.2.1. Biodiversidade e Interação Endófito-Hospedeiro-Ambiente

Os fungos endófitos constituem um grupo polifilético de microrganismos com elevada diversidade, que podem desenvolver-se assintomaticamente dentro dos tecidos das plantas localizadas à superfície do solo, bem como abaixo da superfície, incluindo caules, folhas e/ou raízes; colonizando praticamente todos os órgãos das plantas (Kumar & Hyde, 2004; Arnold 2005; Kusari *et al.*, 2012). Os endófitos que se transmitem horizontalmente podem apresentar uma fase epifítica, dando início ao seu crescimento na superfície vegetal antes de penetrarem

no hospedeiro. Também podem colonizar os tecidos internamente, ajudando a proteger a planta contra agressões do meio em que se encontram (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

A comunidade de fungos endófitos em muitas plantas é geralmente composta maioritariamente por fungos ASCOMYCOTA, embora também sejam conhecidos em ZIGOMYCOTA e BASIDIOMYCOTA (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Todas as espécies de plantas possuem uma comunidade endofítica que difere entre si, podendo haver espécies/isolados dominantes. Para o mesmo hospedeiro, a composição da comunidade endofítica pode diferir significativamente para cada tipo de célula, tecido ou órgão da planta (Arnold, 2005; Schulz & Boyle, 2006; Aly *et al.*, 2011; Porras-Alfaro & Bayman, 2011;). Também a especificidade endófito-hospedeiro requer uma adaptação entre ambos, sugerindo que haja uma influência mútua decorrente de relações de coabitação e coevolução. A longo prazo, essa associação torna-se permanentemente gravada na constituição genética de ambas as espécies; que desenvolveram sistemas genéticos complementares.

A preferência pelo hospedeiro é um fenómeno difuso tanto para o antagonismo como para a simbiose mutualística, residindo na interface entre a ecologia e a evolução (Aly *et al.*, 2011). Eaton *et al.* (2011) referem que a transição entre um modo de vida mutualístico e patogénico dos fungos endófitos provavelmente permitiu a diversificação das espécies e a especificidade existente entre algumas delas e seus respetivos hospedeiros. Alguns endófitos, pertencentes aos géneros *Phomopsis*, *Phoma*, *Colletotrichum* e *Phyllostica*, não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro e portanto colonizam várias plantas hospedeiras, sendo que muitas delas não apresentam relação taxonómica. Outros, pelo contrário, possuem um hospedeiro específico (Aly *et al.*, 2011).

Admite-se que na interação mutualística, os microrganismos endófitos coevoluíram com as plantas. Estas relações são vistas como um equilíbrio entre o ambiente, as condições fisiológicas e o controlo genético; e resultam em benefícios de “fitness” para ambos os parceiros (Kogel *et al.*, 2006; Aly *et al.* 2011). Tais benefícios contribuem para a adaptação da planta ao stresse biótico e abiótico, aumentando a resistência à secura e ao stresse hídrico, bem como conferindo um aumento da tolerância a temperaturas elevadas e salinidade; graças à ação dos metabolitos produzidos pelos fungos (Aly *et al.*, 2011).

Por sua vez, as plantas fornecem aos endófitos uma estrutura espacial, proteção contra dessecação, nutrientes e, no caso dos endófitos transmitidos verticalmente, disseminação para a próxima geração de plantas hospedeiras. As plantas podem também fornecer compostos que são essenciais para a conclusão do ciclo de vida do endófito, ou que sejam necessários para o seu crescimento ou autodefesa. Visto que a capacidade de crescimento e reprodução do fungo (“fitness”) depende em grande parte da planta hospedeira, pode dizer-se que esta última exerce um elevado controlo na interação fungo-planta hospedeira (Aly *et al.*, 2011).

A entrada dos endófitos nos tecidos vegetais dá-se principalmente através de feridas e raízes secundárias laterais emergentes, podendo também penetrar via estomas, lentículas e

hidátodos. Por sua vez, os fungos endófitos são capazes de produzir enzimas tais como pectinases, xilanases, lipases, proteases, celulases, hemicelulases e fenoloxidases; as quais são necessárias para penetrar e colonizar as plantas hospedeiras (Chandra, 2012; Rajesh & Rai, 2013). Inicialmente as enzimas são usadas para possibilitar a entrada do fungo na célula vegetal e permitir que este viva simbioticamente com a planta, porém tais enzimas têm a capacidade de induzir mecanismos de defesa da planta hospedeira contra agentes patogênicos (Rajesh & Rai, 2013). Tal como as enzimas, também oligossacáridos derivados da parede celular dos fungos (ex. quitina) podem induzir defesas na planta hospedeira (Heydari & Pessarakli, 2010).

Uma vez no interior do hospedeiro, os fungos endófitos entram em estado de latência, no qual podem permanecer por um longo período ou por quase todo o tempo de vida do hospedeiro, dependendo das condições ambientais existentes (Aly *et al.*, 2011). Alterações no hospedeiro e/ou no ambiente podem desencadear a patogenicidade num endófito que anteriormente apresentava um caráter assintomático e avirulento. Segundo Kusari *et al.* (2012), a colonização assintomática é um estado de equilíbrio entre a virulência do fungo e o mecanismo de defesa das plantas. Esse equilíbrio antagônico pode ser desestabilizado por fatores bióticos e abióticos, que ativam os fatores de virulência dos fungos levando à patogenicidade, caso a defesa da planta diminua ou a virulência do fungo aumente, tal como é ilustrado na Fig. 1.2. (Schulz & Boyle 2006; Chandra, 2012; Kusari *et al.*, 2012).

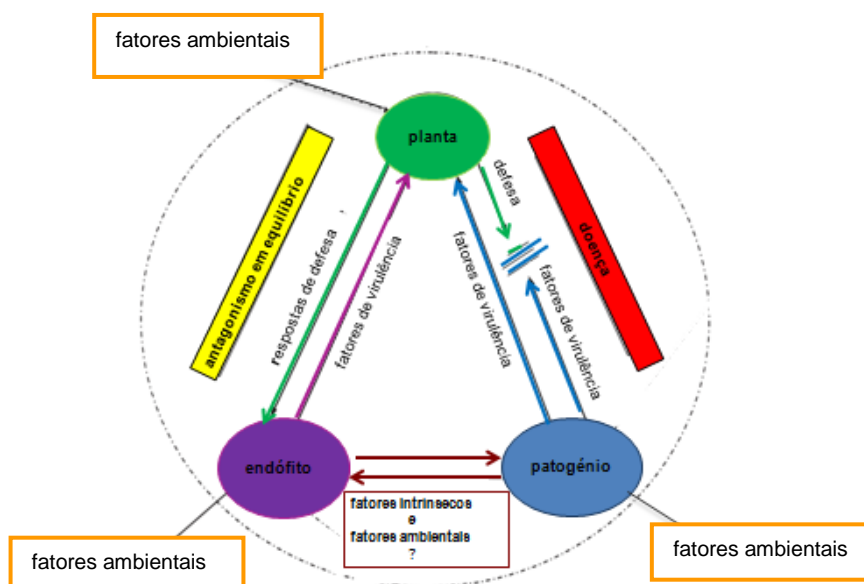


Figura 1.2. Hipótese do Balanço do Antagonismo: equilíbrio entre fatores de virulência de endófitos e mecanismos de defesa das plantas, no qual resulta na colonização assintomática do hospedeiro (adaptado de Schulz & Boyle, 2006).

Vários endófitos apresentam uma relação muito próxima com os agentes patogênicos e isso tem dificultado a distinção entre ambos os microrganismos. Na maioria dos casos, a comparação morfológica não é suficiente para os distinguir entre si, e muitos investigadores têm recorrido a análise de múltiplas sequências génicas para identificação de tipos de microrganismos; como por exemplo a sequenciação dos genes que codificam as enzimas feniltransferases (Li, 2009) e enzimas da família das hidrolases glicosídicas (Parrent *et al.*, 2009).

Segundo Porras-Alfaro & Bayman (2011) alguns endófitos não patogênicos terão sido originados a partir de agentes patogênicos, bem como agentes patogênicos poderão ter evoluído a partir de endófitos. Análises da sequenciação génica de enzimas como celulases e pectinases, presentes em todos os fungos e relativamente bem conservadas através da evolução destes organismos, sugerem que alguns agentes patogênicos têm origem ancestral endofítica (Carrol, 1988). Atualmente, recorrendo-se às técnicas da biologia molecular, é possível transformar uma estirpe patogénica em não-patogénica através da mutação de um único gene; assim como a alterações de fatores externos tais como habitat, estado nutricional ou stresse contribuem para a conversão de um endófito não patogénico, em patogénico. Além disso, determinados fungos endófitos podem atuar como agentes patogênicos, quando são usados para reinfetar plantas hospedeiras (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

A hipótese de que os endófitos podem agir como agentes patogênicos latentes é comprovada através de vários relatos na literatura, onde investigadores afirmam que os fungos envolvidos no complexo da esca em videira (*Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora*) podem viver assintomaticamente parte do seu ciclo de vida na planta, mas em algum momento, modificam o seu comportamento e tornam-se patogênicos (Mugnai *et al.*, 1999; Graniti *et al.*, 2000; Edwards & Pascoe, 2004; Slippers & Wingfield, 2007; Casieri *et al.*, 2009; Hofstetter *et al.*, 2012; Block *et al.*, 2013; Ammad *et al.*, 2014). No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos que desencadeiam a transição do modo de vida endofítico para patogénico e/ou vice-versa, nem quando e como ocorre; mas as condições de stresse estarão certamente envolvidas nesse processo de transição (Ferreira *et al.*, 1999; Gubler *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2009). Para Hofstetter *et al.* (2012), os fungos associados à esca não serão verdadeiramente patogênicos, mas provavelmente endófitos verdadeiros ou saprófitas latentes; ou saprófitas não-específicos que fazem parte de uma comunidade especializada na decomposição de madeiras senescentes ou matéria lenhosa morta.

Os endófitos no ecossistema comportam-se como saprófitas, iniciando a degradação biológica da planta hospedeira morta. Desencadeiam o processo crucial de reciclagem de nutrientes, como colonizadores primários de tecidos de plantas mortas. Uma vez estabelecidos nos tecidos, os endófitos têm acesso imediato aos nutrientes disponíveis durante a senescência da planta, ou de órgãos da planta. Vários grupos de endófitos têm demonstrado atividade metabólica típica de saprófitas, entre outros, espécies do género *Pestalotiopsis* (XYLARIALES, ASCOMYCOTA) que ocorrem numa ampla gama de substratos, incluindo videira, como

patogénico, endófito e saprófita (Wang *et al.*, 2015). A capacidade de degradar um complexo de moléculas orgânicas pode ser vista como uma evidência indireta de saprofitismo latente. Será o caso, por exemplo, do fungo *Phomopsis leptostromiformis*, que pode colonizar *Lupinus* spp. como endófito, mas quando a planta entra em senescência, o fungo cresce extensivamente como saprófita.

Os fungos endófitos podem facilitar o acesso de fungos decompositores nas plantas, revelando dessa forma um papel importante na decomposição. À semelhança da transição endofítia-patogenicidade, também não se conhecem os mecanismos que desencadeiam a transição endofitismo-saprofitismo, em plantas em estado de senescência ou deterioração; bem como até que ponto existe uma sobreposição entre as comunidades saprofíticas e endofíticas. As vias regulatórias que controlam a expressão de enzimas durante a decomposição *versus* colonização endofítica ou patogénica necessitam de ser elucidadas (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

1.2.2. Comunicação Endófito-Hospedeiro e Endófito-Endófito

Estudos recentes sugerem a existência de um complexo sistema de comunicação que envolve um “crosstalk” genético entre endófitos e plantas hospedeiras durante o estabelecimento da interação. Alguns genes de fungos, preferencialmente expressos durante a associação com a planta hospedeira, podem ser responsáveis pela produção de enzimas que auxiliam no crescimento e desenvolvimento do fungo; e também regular a produção de metabolitos secundários envolvidos na atividade antibiótica do fungo. Essa interação resulta na indução de genes da planta que estão envolvidos na resistência ao stresse biótico e abiótico, bem como no seu mecanismo de defesa (Aly *et al.*, 2011). Um exemplo é a síntese de homoserina e asparagina pelas plantas. Esses compostos atuam como molécula sinal para ativar a expressão do gene letal em estirpes virulentas de *Nectria hematococca* (anamorfo *Fusarium solani*). A ocorrência desses processos deve-se provavelmente à transferência horizontal de genes, mecanismo pelo qual os endófitos produzem compostos associados à planta (Kusari *et al.*, 2012).

Admite-se que os endófitos possam atuar como recetores e potenciadores de sinais ambientais, bem como gerar e mediar informações intrínsecas nas plantas; podendo também detetar compostos sintetizados pelas plantas em resposta ao stresse (hipótese de “xenohormesis”), de modo a que os endófitos se possam preparar para condições adversas do ambiente ou do ataque de agentes patogénicos, iniciando a síntese de metabolitos secundários (Kozyrovska, 2013). A “xenohormesis” refere-se ao processo através do qual um organismo beneficia da resposta de stresse de outro organismo, tendo sido inicialmente definida para interações planta-animal (Howitz & Sinclair, 2008).

De acordo com a hipótese de xenohormese, as plantas e os organismos heterotróficos possuem um “cluster” de genes que permaneceram homólogos ao longo do processo evolutivo, os quais podem ser ativados em plantas hospedeiras e endófitos, permitindo que compostos

unicamente produzido pelas plantas, também possam ser biossintetizados por endófitos (Kusari *et al.*, 2012; Kozyrovska, 2013). Um exemplo é a fito-hormona giberelina que pode ser produzida tanto pelas plantas como por exemplo pelo fungo *Fusarium fujikuroi* (Chandra, 2012).

Por sua vez, os endófitos também comunicam entre si, direta ou indiretamente, usando sinais químicos; os quais são responsáveis pelas interações endófito-endófito. A interação entre endófitos geralmente envolve moléculas de sinalização de *quorum sensing* (QS) e outros eliciadores (Kusari *et al.*, 2012; Kozyrovska, 2013). As moléculas de sinalização QS regulam a comunicação célula-célula dentro de uma única população, bem como interações inter-espécies e inter-reinos entre bactérias, fungos e plantas; e podem ativar ou silenciar importantes vias biossintéticas. Os metabolitos secundários podem ser usados como *anti-quorum sensing* (QSI), moléculas capazes de imitar as QS, mas que perturbam e/ou inibem a comunicação entre os endófitos (Kozyrovska, 2013, Rajesh & Rai, 2013). Os fungos usam o mecanismo de modificação pós-traducional de histonas para modular a transcrição de genes envolvidos na produção de metabolitos secundários. Determinados modificadores epigenéticos externos podem reprogramar vias biossintéticas e ativar genes do metabolismo secundário, aumentando a produção de metabolitos (Kozyrovska, 2013).

1.2.3. Fungos Endófitos de Videira

Segundo Casieri *et al.* (2009), a videira abriga no seu interior muito mais fungos endófitos do que se possa imaginar. Esses fungos podem desempenhar um papel importante no equilíbrio da comunidade fúngica na videira, como patogénios latentes ou endófitos de proteção, sendo que alguns podem ser usados como agente de controlo biológico (BCA). Num estudo mais recente, Pancher *et al.* (2012) compararam o micobioma do lenho de duas castas de videira “Chasselas” e “Merlot”, em modo de proteção integrada e biológica. Os endófitos mais frequentes, nos dois sistemas de produção foram *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum* e *Aureobasidium pullulans*. Fungos como *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, *Truncatella angustata*, *Neofusicoccum parvum*, *Phoma herbarum* e *Davidiella tassiana*, considerados patogénicos para a videira, foram isolados de videiras aparentemente sãs, mas apenas em vinhas sujeitas a modo de proteção integrada. Os mesmos autores admitem que os fungicidas utilizados em modo de proteção integrada, designadamente os fungicidas sistémicos, podem estar a moldar as populações microbianas no sentido de favorecerem a proliferação de fungos potencialmente patogénicos. Em síntese, as principais diferenças encontradas no micobioma da videira relacionaram-se essencialmente com as estratégias de gestão das vinhas, proteção integrada ou modo de produção biológico, e com os locais de amostragem, e não com as castas de videira.

Num outro estudo realizado a partir do lenho aparentemente são de videiras com e sem sintomas foliares de esca, Bruez *et al.* (2014) identificaram 12 géneros de fungos predominantes: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Bionectria*,

Fusarium, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria*. Ainda assim, não registaram diferenças significativas entre videiras aparentemente sãs e doentes. Os géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia* e *Neofusicoccum* representam fungos potencialmente patogénicos, enquanto a maioria dos restantes são não patogénicos e alguns apresentam potencial como agentes de controlo biológico. Os mesmos autores detetaram ainda a presença de fungos com atividade antagonista, como são os casos de *E. nigrum*, *Alternaria alternata* e *F. oxysporum*, em pelo menos 20% das videiras analisadas. *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* foram detetados apenas numa das datas de amostragem (final do Verão) e *Fomitiporia* e/ou *Stereum* permaneceram ausentes, talvez porque se tratava de madeira aparentemente sã.

Na opinião de Bruez *et al.* (2014) este estudo permitiu verificar que as comunidades fúngicas se alteram ao longo do ciclo cultural, mas que a respetiva composição não parece indicar quebra de equilíbrio entre endófitos potencialmente patogénicos e potencialmente protetores, que possa explicar o desenvolvimento de necroses. Os mesmos autores concluem que fatores bióticos (ex. bactérias) e abióticos poderão ser responsáveis pelo desencadeamento do processo patogénico.

Epicoccum nigrum é uma espécie de fungos altamente robusta e omnipresente, distribuída em vários países do continente europeu, asiático e americano. O fungo coloniza diferentes tipos de solos (e.g. floresta, tundra, dunas, areia salina) e diversas espécies agronómicas e medicinais (<https://en.wikipedia.org>; El Amrani *et al.*, 2014). Pode apresentar um modo de vida saprófita, patogénico ou endófito. Apesar de já ter sido isolado a partir de videiras por diversas vezes, isolado ou combinado com fungos patogénicos, como por exemplo *F. mediterranea*, - *Penicillium* sp. e *Pa. chlamydospora*, -*D. seriata*, não se sabe exatamente qual o papel que *E. nigrum* desempenha na videira (Kuntzmann *et al.*, 2010). Ainda assim, tem demonstrado atividade antagonista e inibidora de diversos fungos e oomicetas fitopatogénicos noutros hospedeiros, nomeadamente em relação a *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium verticillioides*, e *Ceratocystis paradoxa* e *Phytophthora* sp. (Fávaro *et al.*, 2012).

De acordo com a base de dados www.mycobank.org, existem 96 registos associados ao género *Epicoccum*, dentre eles *Epicoccum nigrum* Link, a par de diferentes variantes de *Epicoccum nigrum*, incluindo *E. purpurascens*, *E. diversisporum*, *E. versicolor*, *E. vulgare*, *E. granulatum*, *E. menispermi* e *E. neglectum* (<https://en.wikipedia.org>). Por sua vez, Fávaro *et al.*, (2011) identificaram dois genótipos distintos de *E. nigrum*, indicando a existência de espécies crípticas, sugerindo que *E. nigrum* pudesse englobar mais do que uma espécie fúngica.

1.3. INTERAÇÕES FUNGO-FUNGO

A complexidade e a diversidade morfológica, bem como as alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante as interações entre fungos incluem rápida divisão celular, ramificação, agregação de hifas, crescimento aéreo, autólise, aumento da atividade enzimática, produção de pigmentos, compostos orgânicos voláteis (VOC) (os quais atuam como info-

químicos), compostos difusíveis (DOC), toxinas e metabolitos antifúngicos. As alterações fisiológicas e bioquímicas observadas nas interações determinam o tipo de resposta da interação (Rotheray *et al.*, 2010; Hiscox *et al.*, 2014).

As interações interespecíficas constituem uma componente importante na ecologia dos fungos, os quais vivem em comunidades complexas, e na maioria das vezes competem entre si por espaço ou recursos disponíveis (Arfi *et al.*, 2013). Essas interações desempenham um papel importante no desenvolvimento, na composição e na sucessão da comunidade fúngica, e nos processos de decomposição, alterando a mobilização e translocação de nutrientes e biomassa, evolução da taxa de CO₂ e a taxa de decomposição (Boddy, 2000; Arfi *et al.*, 2013). Segundo a classificação proposta por Tuininga (2005), as interações interespecíficas podem ser nutritivas (biotrófica, necrotrófica e saprófita) e não-nutritivas (comensalismo, mutualismo, antagonismo, co-antagonismo, agonismo e co-habitação) (Quadro 1.3), consoante o fungo receba ou não nutrientes da espécie opositora. Tais interações podem ocorrer simultaneamente, embora os resultados obtidos sejam sempre diferentes. A terminologia utilizada para descrever as interações entre fungos é bastante controversa e diversificada, havendo diferentes definições descritas com base nas respostas dos fungos e/ou no tipo de interação. A dificuldade em descrever as interações interespecíficas deve-se à sua dinâmica e à variabilidade das respostas às alterações temporal, espacial e ambiental (Tuininga 2005).

Quadro 1.3. Terminologia proposta para interações interespecíficas não-nutritivas entre duas espécies fúngicas, respetivas respostas e exemplos de mecanismos (adaptado de Tuininga 2005)

Interação	Resultado	Mecanismo
Co-antagonismo	- / -, morte, redução do crescimento das duas espécies	Lise, vacuolização, alteração do pH, interferência de hifas (co-alelopatia e co-antibiose), inibição física, defesa de território, competição por nutrientes (competição por exploração, captação primária e secundária de recursos), defesa
Antagonismo	- / 0, morte, redução do crescimento de uma das espécies, sem causar prejuízo para a outra	Lise, vacuolização, alteração do pH, interferência de hifas, antibiose, inibição física
Agonismo	- / +, redução do crescimento de uma das espécies e aumento do crescimento da outra espécie	Interferência de hifas (antibiose e alelopatia)
Co-habitação	0 / 0, nenhuma das espécies é afetada (neutralismo)	Entrelaçamento de hifas
Comensalismo	0 / +, aumento do crescimento de uma das espécies, sem prejuízo para a outra	Produção de exsudados e entrelaçamento de hifas
Mutualismo	+ / +, aumento do crescimento de ambas as espécies	Produção de exsudados e entrelaçamento de hifas

0, espécie não afetada pela presença da outra; +, espécie beneficiada pela presença da outra;

- , espécie prejudicada pela presença da outra

As interações antagônicas entre os microrganismos ocorrem naturalmente e podem ser observadas através dos mecanismos de (i) antibiose, inibição de patógenos através da ação de toxinas, antibióticos e biossurfactantes, (ii) parasitismo ou lise onde envolve a produção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular (e.g. quitinases e β -1,3-glucanase), (iii) competição pelo território, nutrientes e minerais (Berg *et al.*, 2005) e, indiretamente, (iv) aumento da resistência do hospedeiro (estimulação da defesa da planta hospedeira e/ou produção de metabolitos tóxicos) (Van Elsas & Costa, 2007; Vujanovic *et al.*, 2012).

O antagonismo é um tipo de interação, onde se verifica a redução do crescimento ou morte de uma determinada espécie de organismo, sem causar prejuízo à outra espécie (- / 0). Nas interações fúngicas em cultura, o antagonismo pode ser verificado quando o fungo A é antagonizado pelo fungo B, e a resposta dada pelo fungo A pode ser traduzida em (i) inibição assimétrica do crescimento somente em direção ao fungo B, (ii) redução de toda a colônia, independentemente da direção ou (iii) aumento do diâmetro da colônia, mas redução do diâmetro das hifas e da densidade do micélio (Tuininga, 2005).

Durante as interações ocorrem uma série de respostas que podem ser observadas, incluindo alterações morfológicas na zona frontal da interação e no metabolismo, produção e secreção de enzimas extracelulares, bem como na acumulação de ROS nas zonas de interação. Existe um aumento da expressão de enzimas oxidativas (lacases, fenoloxidasas e peroxidases) na zona de interação entre antagonistas, que varia dependendo da capacidade da espécie em produzir enzimas inatas, e da combinação entre as espécies interagentes (Hiscox *et al.*, 2010; Arfi *et al.*, 2013). O aumento da atividade da lacase e da peroxidase pode estar envolvido na aquisição de nutrientes, além de poder mediar o stresse oxidativo, removendo H_2O_2 ou produzindo melanina para proteger as hifas. Essas enzimas também podem participar da morfogênese de hifas e estar envolvidas na formação de barreiras de defesa ou cordões de hifas invasivas (Arfi *et al.*, 2013). A atividade enzimática pode diminuir à medida que a distância da zona de interação aumenta (Hiscox *et al.*, 2010).

A competição entre os fungos dá-se através de interações antagônicas, sendo esse o evento mais comum que ocorre dentro da comunidade fúngica, principalmente entre os fungos que decompõem a madeira. De acordo com Hiscox *et al.* (2014) a degradação da madeira é realizada majoritariamente pelas ação de enzimas extracelulares produzidas pelos fungos; e os produtos obtidos (sobretudo os de baixo peso molecular) servem de atuais substratos para o crescimento dos fungos.

Os fungos capturam e defendem os seus recursos através de mecanismos de antagonismo, os quais são variados e podem ser mediados: (i) à distância (antagonismo à distância), (ii) após o estabelecimento de contato ao nível das hifas (interferência de hifas e micoparasitismo) ou (iii) após o contato ao nível do micélio (interferência de micélio) (Dix & Webster, 1995; Boddy, 2000; Woodward & Boddy, 2008; Ujor, 2010; Hiscox *et al.*, 2014). Estes mecanismos de antagonismo podem ocorrer isoladamente ou em simultâneo com outros, como, são os casos

da antibiose e do micoparasitismo, que podem estar envolvidos na competição por nutrientes (Hjeljordand & Tronsmo, 1998).

O “antagonismo à distância” também conhecido como alelopatia e/ou antibiose (Tuininga, 2005) é mediado pela síntese de compostos voláteis e/ou difusíveis, tal como antibióticos, toxinas, enzimas líticas e outros metabolitos antifúngicos (Boddy, 2000; Boddy *et al.*, 2008; Heydari & Pessarakli, 2010; Baptista *et al.*, 2011; Dwivedi & Sangeeta, 2014). Nesse tipo de antagonismo, as reações variam de acordo com as combinações existentes entre as diferentes espécies fúngicas, sugerindo a existência de um intercâmbio recíproco de sinais químicos e reconhecimento à distância. Segundo Boddy *et al.* (2008), quando dois fungos crescem muito próximos, ocorrem alterações na morfologia do micélio de ambos e na composição química dos metabolitos secundários, resultando na formação de uma linha entre eles e na alteração da coloração dos micélios de ambas as espécies. Essas alterações são mediadas pela sobreexpressão de genes envolvidos no antagonismo, e resulta na síntese de compostos relacionados com o stresse, enzimas e metabolitos secundários de baixo peso molecular (Boddy, 2000), tais como álcool, compostos aromáticos e ROS (Arfi *et al.*, 2013). Esses metabolitos podem causar efeitos profundos em espécies vizinhas, mediando o antagonismo à distância ou após o contato, ou levando à atração, estimulação ou inibição do crescimento de outros microrganismos. As reações mais conhecidas estão relacionadas com lise e vacuolização das hifas, ou a sua substituição pelo micélio da espécie invasora, verificando-se uma inibição mútua (Boddy, 2000; Baptista *et al.*, 2011).

A antibiose é o principal modo de ação exibido por muitos microrganismos antagonistas, incluindo bactérias e fungos. Os antagonistas que atuam por antibiose possuem vários mecanismos de ação, os quais são relevantes para garantir um efeito antagônico prolongado e eficaz. A produção de antibióticos e compostos voláteis e não voláteis por parte de fungos antagonistas inibe a ação do agente patogénico e resulta no envenenamento ou morte do mesmo. Este fenómeno tem sido reportado para inúmeros fungos, como são, entre outros, fungos dos géneros *Talaromyces*, *Chaetomonium*, *Minimedusa* e *Verticillium* (Whipps, 2001), *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Elsas *et al.*, 2006). Também fungos saprofíticos do género *Epicoccum*, *E. nigrum*, são conhecidos pela produção de antibióticos, nomeadamente epirodina e flavipina (Alcock *et al.*, 2015). A antibiose tem sido igualmente apontada como um dos principais mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no controlo de *E. lata*, *Pa. chlamydospora* e de fungos BOTRYOSPHAERiaceae (*Neofusicoccum australe* e *N. parvum*) em feridas de poda na videira, através da produção do metabolito secundário 6-pentil- α -pirona (Mutawila *et al.*, 2016).

A “interferência de hifas”, entre fungos, pode provocar alterações celulares (desorganização do protoplasma e perda da integridade das membranas) que levam à morte de uma das hifas (Baptista *et al.*, 2011). Esse mecanismo parece ser a forma menos eficiente de invasão de micélio e precede o micoparasitismo no processo de evolução dos fungos (Boddy *et al.*, 2008; Silar, 2012). Este fenómeno pode ser mediado química ou enzimaticamente numa escala mais

localizada (Woodward & Boddy, 2008), ou pela secreção ativa e passiva de toxinas não enzimáticas, na presença e ausência de espécies confrontantes (Ujor, 2010). A interferência de hifas é comum entre fungos basidiomicetas, sendo esse o mecanismo usado para antagonizar outros fungos (basidiomicetas ou não) no ponto de contato entre as hifas, podendo também ocorrer em ascomicetas (Deacon, 2005).

No micoparasitismo ocorre o ataque direto da hifa do fungo parasita sobre a hifa do fungo parasitado, e pode envolver a produção de enzimas líticas da parede celular, como no caso de *Trichoderma* (Boddy, 2000; Steyaert *et al.*, 2003; Tripathi *et al.*, 2010). O micoparasitismo de *Trichoderma* spp. tem como seu principal mecanismo o antagonismo (Dwivedi & Sangeeta, 2014), o qual é bem conhecido e mediado por compostos químicos ou enzimáticos, e envolve quatro etapas sequenciais: (i) quimiotropismo, (ii) reconhecimento, (iii) ataque e enrolamento de hifas e (iv) penetração e digestão do conteúdo celular do hospedeiro. No quimiotropismo a “hifa parasita” cresce em direção à hifa hospedeira a favor de um gradiente químico de aminoácidos e açúcares. Esse fenômeno não está bem compreendido e parece não ser específico ao hospedeiro. O quimiotropismo geralmente precede o reconhecimento do hospedeiro e pode estar relacionado com o mesmo; e parecer atribuir algumas vantagens ao antagonismo, embora não seja considerado essencial ao micoparasitismo. O reconhecimento é um evento essencial que também precede o antagonismo; e pode ser físico ou químico, sendo que neste último, envolve interações hidrofóbicas ou interações entre moléculas complementares localizadas na superfície do hospedeiro e do “parasita”; nomeadamente as interações lecitina-hidratos de carbono ou aglutinina-hidratos de carbono. Imediatamente a seguir ao reconhecimento, a “hifa parasita” ataca e enrola-se à volta da hifa hospedeira, e dá-se a formação de estruturas em forma de gancho e estruturas tipo apressório que penetram na hifa hospedeira. Uma vez dentro da hifa hospedeira, a “hifa parasita” continua a crescer até ao colapso da hifa hospedeira (Boddy, 2000; Steyaert *et al.*, 2003; Tripathi *et al.*, 2010). A “hifa parasita” obtém os nutrientes a partir do conteúdo celular da hifa hospedeira biotrófica ou necrotroficamente. Os micoparasitas mais estudados incluem *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Coniothyrium minitans*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Talaromyces flavus* e *Laetisaria arvalis* (Stewart *et al.*, 2010).

Trichoderma sp. atua como antagonista de diversos fitopatogénicos de plantas, podendo parasitar por exemplo as hifas dos fungos *Rhizoctonia solani* (Tripathi *et al.*, 2010), *Alternaria alternata* (Gali, 2015). Observações microscópicas da zona de interação entre *T. harzianum* e *A. alternata* demonstraram que este cresce na superfície de *A. alternata*, enrolando-se à volta do seu micélio e posteriormente penetra na sua parede celular diretamente, sem formar apressório. O micélio de *A. alternata* é desintegrado por ação enzimática de quitinases e glucanases (Gali, 2015). Alguns fungos que deterioram a madeira utilizam o mecanismo de micoparasitismo para facilitar a ocupação de um território anteriormente ocupado pelo hospedeiro e não como principal via de nutrição. É o caso do fungo *Pseudotrampetes gibbosa* que substitui o território ocupado por *Bjerkandera adusta* em troncos de faia (*Fagus sylvatica*) e do fungo *Lenzites betulina*, que pode substituir o domínio ocupado por *Coriolus versicolor*

parasitando suas hifas (Dix & Webster, 1995). Após ocuparem o território, os fungos passam a obter nutrientes a partir de compostos produzidos pela decomposição da madeira, e interagem agressivamente com outros fungos por meio de “interferência de micélios” (Boddy, 2000).

O mecanismo de “interferência de micélio” ocorre após o estabelecimento de contato entre os micélios de duas espécies fúngicas, resultando em alterações morfológicas nos fungos interagentes; bem como em espécies vizinhas (Woodward & Boddy, 2008). O contato micelial é um mecanismo que predomina em fungos que degradam a madeira (Ujor, 2010) e as alterações morfológicas que ocorrem podem incluir especificamente (i) a formação de micélio denso que constitui uma “barreira” que impeça a invasão do fungo interagente, (ii) a formação de um micélio “invasivo” através da criação de várias frentes de crescimento, (iii) a formação de um micélio com crescimento aéreo e (iv) a formação de cordões miceliais ou de estruturas rizomórficas (Boddy, 2000). Tais alterações variam de acordo com as espécies que interagem e com as suas propriedades antagonistas (Ujor, 2010). Essas alterações geralmente são acompanhadas por uma redistribuição do micélio, que passa a apresentar-se menos denso nas zonas distais à zona de interação, tornando a colônia susceptível ao fungo invasor caso ocorra fragmentação da zona de interação; podendo levar à morte (Boddy, 2000; Silar, 2012). As alterações morfológicas permitem aumentar a resistência à penetração do micélio do fungo invasor ou possibilitar o crescimento micelial sobre ou através da colônia fúngica opositora. Em algumas interações estabelecidas entre fungos que formam cordões miceliais, pode ocorrer a descoloração e a indução de uma resposta lítica, verificada pelo aumento da secreção de feniloxidase num ou em ambos os segmentos dos cordões miceliais. Este tipo de resposta micelial foi designado por alguns autores como “interferência de micélios” devido à sua semelhança com a resposta do mecanismo de “interferência de hifas”; sendo também mediado por enzimas envolvidas em vários processos redox (feniloxidase, lacase, oxidase e peroxidase), toxinas e compostos antifúngicos (Woodward & Boddy, 2008; Baptista *et al.*, 2011).

1.3.2. Fatores que Afetam a Resposta das Interações Fungo-Fungo

Fatores bióticos e abióticos afetam o progresso e a resposta das interações fungo-fungo, tais como (i) fatores abióticos (temperatura, pH, potencial hídrico, CO₂, qualidade do substrato); (ii) estado fisiológico/nutricional das espécies fúngicas; (iii) presença de uma terceira espécie fúngica; (iv) combatividade/agressividade das espécies (Baptista *et al.*, 2011; Hiscox *et al.*, 2016). Para Hiscox *et al.* (2016), os fatores abióticos são modificadores importantes da resposta das interações fúngicas dentro da madeira, e entre os fungos que formam cordões miceliais e os fungos já estabelecidos na madeira. A variabilidade genética intraespecífica é outra variável que pode ser importante no progresso da interação fúngica e na resposta dessa interação (Rotheray *et al.*, 2010).

A temperatura, o pH do substrato, o potencial hídrico, os níveis de CO₂ e O₂ parecem igualmente influenciar a forma e a taxa de crescimento dos fungos, afetando a resposta da interação (Baptista *et al.*, 2011; Hiscox *et al.*, 2016).

A disponibilidade de nutrientes para os fungos interagentes influencia a interação estabelecida, por determinar diretamente o estado nutricional dos mesmos. Geralmente os fungos que ocupam um maior volume de substrato possuem uma maior capacidade combativa em relação aos fungos que ocupam menores volumes. O substrato utilizado para promover o crescimento dos fungos também interfere na interação estabelecida. Para a mesma combinação fúngica, a interação observada em solo nem sempre é idêntica à verificada noutro substrato, como por exemplo em madeira. Por isso, os resultados obtidos em estudos de interação entre espécies fúngicas realizados em condições axénicas nem sempre coincidem com os resultados obtidos em substrato natural. Nas interações antagonistas parece haver translocação de macronutrientes (carbono e fósforo) entre os fungos, bem como uma perda de nutrientes na zona de interação (Baptista *et al.*, 2011).

A presença de uma terceira espécie fúngica pode ainda alterar a resposta da interação, por um efeito indireto da interação ou pela modificação da interação. Por exemplo, em relação a fungos da videira, envolvidos no complexo da esca, *F. punctata*, quando cultivado em meio gelose de malte, cresce sobre *Pa. chlamydospora*, mas é inibido por *Pm. aleophilum*. Quando as três espécies crescem simultaneamente, também se verifica o efeito antagonista de *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora* sobre *F. punctata* e supõe-se que *Pm. aleophilum* protege *Pa. chlamydospora*, permitindo-lhe crescer como uma colónia individual (Sparapano *et al.*, 2000c). O efeito antagónico de *Pm. aleophilum* contra *F. punctata*, deve-se à produção de substâncias produzidas por *Pm. aleophilum*, que são difundidas no meio de cultura e alcançam a colónia de *Fomitiporia* (Sparapano *et al.*, 2001).

Outro fator que influencia a interação entre duas espécies fúngicas é a combatividade/agressividade das espécies interagentes. Acredita-se que esse seja o principal determinante do tipo de interação. Existem fungos que são eficazes no ataque, mas inábeis na defesa de um recurso, enquanto outros, apesar de apresentarem más características para o ataque podem ser excelentes na defesa do recurso que ocupam (Boddy *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2011; Hiscox *et al.*, 2014). Existe uma hierarquia geral na combatividade dos fungos, em que os colonizadores primários (menos combativos) antecedem os colonizadores secundários, seguindo-se os colonizadores secundários tardios (terciários), mas nem sempre essas relações são sequenciais. Os colonizadores primários geralmente são ruderais ou oportunistas especializados, surgem na forma de esporos, e mantêm-se latentes como endófitos dentro do xilema. Geralmente causam uma deterioração limitada na madeira, antes de serem substituídos pelos colonizadores secundários iniciais, que estão na forma de esporos e provocam uma decomposição maior que os primeiros, utilizando os recursos disponíveis. Posteriormente, são substituídos pelos colonizadores secundários tardios (terciários) ou finais, os quais são mais combativos e se apresentam na forma de cordões miceliais (Hiscox *et al.*, 2016).

Para Hiscox *et al.* (2016), as interações antagônicas determinam a composição da comunidade fúngica. Alguns investigadores, sugerem que os fungos que atuam como colonizadores finais e os colonizadores secundários não são combativos, mas são bem-sucedidos em algumas situações por terem a capacidade de tolerar stresses ambientais específicos (Boddy *et al.*, 2000; Hiscox *et al.*, 2014). Conseqüentemente, a ação defensiva ou combativa contra o fungo opositor está geralmente associada a custos de energia, e produz alterações nos níveis de CO₂ (Hiscox *et al.*, 2014). O estudo destas interações para o micobioma da videira carece de estudos mais aprofundados, embora a hipótese de *Pa. chlamydospora*, que coloniza o xilema da videira, atuar como colonizador primário e *F. mediterranea* como colonizador terciário não estar ainda afastada.

2. OBJETIVOS

Com o presente estudo pretende-se contribuir para o melhor esclarecimento das interações entre fungos endófitos da videira e fungos patogênicos envolvidos nas principais doenças do lenho da videira, com ênfase para interações em que intervêm fungos do género *Epicoccum*.

Os objetivos principais são os seguintes:

- Esclarecer a variabilidade de uma coleção de fungos endófitos, hipoteticamente da espécie *Epicoccum nigrum*, obtida a partir do lenho da videira, através da análise de características culturais e moleculares dos isolados;
- Contribuir para a melhor compreensão das interações que se estabelecem *in vitro* entre *Epicoccum* sp(p). e os principais fungos patogênicos que afetam o lenho da videira, com ênfase para os envolvidos no complexo da esca.

Complementarmente avaliam-se interações entre os vários fungos envolvidos no complexo da esca, e entre fungos responsáveis pela doença de Petri e pé negro da videira, no seu conjunto responsáveis pelo declínio de videiras jovens, com o objetivo de esclarecer como se comportam quando ocorrem em simultâneo num mesmo substrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DE ENDÓFITOS DA VIDEIRA DO GÉNERO *EPICOCCUM*

3.1.1. Obtenção de isolados de *Epicoccum* e caracterização cultural

Partiu-se de uma coleção de isolados, identificados como pertencentes ao género *Epicoccum*, provavelmente da espécie *E. nigrum*, que se encontrava conservada em tubos contendo PDA, à temperatura de 4 °C, na obscuridade, pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Patologia Vegetal do ISA (DCEB e LPVVA). Os isolados foram revitalizados por repicagem para placas de Petri de poliestireno (9 mm de diâmetro) contendo 15 mL de gelose de batata dextrosada (PDA – Difco, Detroit, E.U.A), e incubados a 25 °C na obscuridade, durante 10 dias,

para promover o crescimento micelial (pré-inóculo). A esta coleção foi adicionado um outro isolado obtido de varas de videira, aparentemente sãs, da casta Touriga Nacional (vinha do Almotivo, ISA, Lisboa). Para o efeito realizaram-se isolamentos microbiológicos a partir de fragmentos de madeira, desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% (p/v) durante 1 min e submergidos em água destilada durante 1 min, que se transferiram para placas de Petri, contendo 15 mL de PDA suplementado com 250 mg de cloranfenicol por cada litro de meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 °C, sob obscuridade, durante 4 dias, seguido de repicagem das colónias de interesse para placas de Petri contendo PDA. Não se tendo observado esporulação em nenhuma das culturas, estas foram purificadas pelo método da hifa única. Os dados de passaporte referentes aos 16 isolados de *Epicoccum* spp. estudados encontram-se descritos no Quadro 3.1.

A caracterização cultural dos isolados de *Epicoccum* (16) foi realizada em placas de Petri de poliestireno (9 mm de diâmetro) contendo os seguintes meios de cultura sólidos: PDA, gelose de extrato de malte (Malt Extract Agar – MEA, Difco, Detroit, E.U.A.), gelose de Czapeck-Dox (Difco, Detroit, E.U.A) e gelose de aveia (Oatmeal Agar – AO, Difco, Detroit, E.U.A). Com o auxílio de um anel cortante, foram obtidos cilindros de gelose, com aproximadamente 4 mm de diâmetro, retirados da periferia das colónias de cada um dos isolados, que se transferiram para placas de Petri (9 mm de diâmetro), contendo 15 mL do repetivo meio de cultura. As placas foram seladas com Parafilm e incubadas em estufa a 28 °C, na obscuridade, durante 12 dias (Fávaro *et al.*, 2011). Findo este período, foi efetuada a medição do diâmetro de cada uma das colónias, segundo dois eixos ortogonais, e calculada a média aritmética dos valores obtidos para cada isolado e repetição (três repetições por isolado). Para cada meio de cultura, os resultados do crescimento micelial dos 16 isolados de *Epicoccum* foram analisados estatisticamente, através da Análise de Variância (ANOVA) a um fator (isolado) dos diâmetros das colónias, para um nível de significância de 0,05. A comparação das médias do crescimento micelial foi realizada com recurso ao teste de Tukey ($\alpha= 0,05$) no programa Statistica 7.0 (StatSoft).

Decorridos 20 dias de incubação a 28 °C, na obscuridade, as colónias de *Epicoccum* foram fotografadas e descritas (frente e verso), quanto às seguintes características: aspeto cultural, densidade da colónia, coloração, frente de crescimento, aspeto à transparência e zonagem. A coloração das colónias foi determinada por comparação com as constantes da carta de cores de Rayner (1970).

Com o objetivo de avaliar as características morfológicas de *Epicoccum* sp.(p.), designadamente de estruturas reprodutivas, e porque se observou que nenhuma das culturas esporulava nos meios de cultura testados, fez-se a tentativa de induzir a esporulação das culturas em meio de água de ágar a 2% (p/v), suplementado com agulhas de pinheiro autoclavadas, um meio frequentemente indicado para induzir a esporulação de fungos BOTRYOSPHAERIACEAE (Phillips *et al.*, 2013), bem como pela exposição das culturas a condições naturais de fotoperíodo (laboratório).

Quadro 3.1. Isolados de *Epicoccum* sp(p.) em estudo: data de obtenção, casta, local de colheita e obtentor

Isolado	Data	Casta	Localidade	Obtentor ^a
Epic 1	2010	desconhecida	Torres Vedras	TN
Epic 2	2012	Touriga Nacional	Lisboa (ISA)	TS
Epic 3	2013	Antão Vaz	Montemor-o-Novo	PR
Epic 4	2013	Casta Tinta	Tavira	TN
Epic 5	2013	Boal Espanha	Tavira	TN
Epic 6	2013	Deliciosa	Tavira	TN
Epic 7	2013	Gouveio	Tavira	TN
Epic 8	2013	Boal Branco	Tavira	TN
Epic 9	2013	Sauvignan Blanc	Tavira	TN
Epic 10	2013	Mourisco Preto do Algarve	Tavira	TN
Epic 11	2013	Camarate	Tavira	TN
Epic 12	2013	Formosa	Tavira	TN
Epic 13	2013	Almenhaca	Tavira	TN
Epic 14	2013	Boal Preto	Tavira	TN
Epic 15	2013	Montepila	Tavira	TN
Epic 16	2013	Carignan	Tavira	TN

^a TN, Teresa Nascimento; TS, Tatiana Santos; PR, Pedro Reis.

3.1.2. Caracterização molecular dos isolados de *Epicoccum* spp.

O estudo das características dos isolados de *Epicoccum* referidos no Quadro 3.1. foi complementado com estudos moleculares. Os isolados foram previamente repicados para placas de Petri (90 mm) contendo 15 mL de PDA e mantidos em estufa à temperatura de 25 °C, na obscuridade, durante 6 dias de modo a promover o crescimento micelial (pré-inóculo). Para uma melhor identificação dos isolados em estudo, incluíram-se mais três isolados de referência da coleção do CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands (CBS): CBS 173.38, CBS 173.73 e CBS 246.60 (Quadro 3.2.).

Quadro 3.2. Dados de passaporte de isolados de referência de *Epicoccum* spp.: referência da cultura, espécie, hospedeiro, País

Referência	Espécie	Hospedeiro	País
CBS 173.38	<i>Epicoccum nigrum</i> , type <i>Epicoccum mezzetti</i> Goid.)	<i>Populus</i>	Itália
CBS 173.73	<i>Epicoccum nigrum</i> , type <i>Phoma epicoccina</i> Punith., M.C. Tulloch & C.M. Leach	<i>Dactylis glomerata</i>	EUA (Oregon)
CBS 246.60	<i>Epicoccum pimprinum</i> , type <i>Phoma pimprina</i> P. N. Mathur, S. K. Menon & Thirum)	Solo	Índia

3.1.2.1. Extração e quantificação de DNA

O DNA fúngico foi extraído utilizando os protocolos descrito por Cenis (1992) e Nascimento et al. (2001), com modificações. O micélio produzido por cada cultura foi transferido por raspagem para um tubo de microcentrífuga de 1,5 µL, contendo 650 µL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 250 mM EDTA; 0,5% SDS (p/v)), suplementado com 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). O micélio foi esmagado com o auxílio de um "piston pellet", e posteriormente os tubos foram agitados por inversão para homogeneização da mistura. De seguida, foram adicionados 195 µL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e os tubos foram colocados a -20 °C, durante 20 min. Passado este período, os tubos foram centrifugados a 19000 g (Centrífuga Hettich 32R), à temperatura de 4 °C durante 10 min, e o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo. Repetiu-se este passo pelo menos quatro vezes, até total eliminação das partículas sólidas. Ao sobrenadante obtido adicionou-se igual volume de isopropanol frio, para precipitação do DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 5 min e de seguida agitados lentamente, por inversão, até se observar a formação de um "novelo". De seguida, foram centrifugados durante 10 min. (19000 g, 4 °C), seguindo-se a eliminação do sobrenadante e lavagem do "pellet" com 1 mL de etanol a 70% (v/v), frio. Novamente os tubos foram centrifugados durante 5 min, nas condições acima descritas, o sobrenadante foi decantado e o precipitado permaneceu à temperatura ambiente durante 1 hora para secar. Depois do "pellet" seco adicionaram-se 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), para solubilizar os ácidos nucleicos e colocaram-se os tubos de microcentrífuga a 4 °C até à utilização do DNA.

3.1.2.2. Quantificação do DNA genómico

A qualidade e quantificação do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando TBE 0,5X (45 mM Tris-base; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA, pH 8,0) o qual foi preparado de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook *et al.* (1989). De seguida, procedeu-se à aplicação no gel de 2 µL de cada amostra e nos poços centrais foram colocadas concentrações conhecidas (50, 100, 250 e 500 ng/µL) de DNA do fago λ (Amersham Pharmacia).

A eletroforese decorreu numa tina horizontal 20 x 25 cm (largura x comprimento) ("Horizon 20-25, Life Technologies, GibcoBRL, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus") durante 1h 30 min a 80 V, sendo esta corrente gerada pela fonte "Electrophoresis Power Supply - EPS 100, Pharmacia Biotec", tendo-se utilizado como tampão de corrida TBE 0,5X.

No fim da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 10 min. Seguidamente, o gel foi imerso em água destilada, durante 20 min. Os resultados da quantificação foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultra-violeta (312 nm) "BTX 20.M, UVItec Limited" e registados em papel utilizando a impressora térmica "Mitsubishi Model P91E". A quantificação do DNA obtido foi confirmada no aparelho Synergy, Bio-Tek, utilizando o software Gen 5.

3.1.2.3. Amplificação de parte do gene da β -tubulina e sequenciação

Na amplificação de parte do gene da β -tubulina (*tub2*), pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), utilizaram-se os “primers” T1 e T2 de O'Donnell & Cigelnik (1997). As reações de PCR foram preparadas com um volume final de 30 μ L em tubos de microcentrífuga de 200 μ L, contendo a seguinte mistura: 1X de Tampão de PCR, 32 μ M de cada dNTP, 0,16 μ M de cada “primer”, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Dream Taq, Fermentas, Lituania) e 3 μ L de DNA previamente diluído à concentração de 10 ng/ μ L. Como controlo negativo utilizou-se a mesma mistura de amplificação, substituindo o DNA por água miliQ esterilizada. A reação PCR decorreu num termociclador Biometra-T-Gradient com o seguinte programa: pré-desnaturação a 94 °C, durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturação), 30 s a 58 °C (hibridação), 1 min. e 30s a 72 °C (extensão), terminando com um período de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X, na tina horizontal anteriormente referida. Em cada um dos poços das extremidades do gel colocaram-se 6 μ L do marcador GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Thermo Scientific), enquanto que nos restantes poços se procedeu à aplicação das amostras constituídas por 5 μ L dos produtos amplificados. A electroforese decorreu durante 3 horas a 80 V, corrente gerada pela fonte “Electrophoresis Power Supply – EPS 100, Pharmacia Biotec”, em tampão TBE 0,5X. No fim da electroforese o gel foi corado e os resultados visualizados, tal como descrito para a quantificação de DNA.

Os produtos de PCR foram confirmados por electroforese em gel de agarose e sequenciados pela StabVida (Portugal). As sequências foram montadas e editadas para resolver ambiguidades utilizando o módulo SeqMan 5.05 do programa DNASTAR. As sequências dos isolados em estudo, juntamente com outras sequências de β -tubulina de *Epicoccum* spp. obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram alinhadas utilizando o MUSCLE no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) e o alinhamento final foi posteriormente ajustado manualmente.

A análise filogenética foi implementada no MEGA 6.06, utilizando a máxima parcimónia com o algoritmo “subtree-pruning-regrafting”, as “gaps” e os dados em falta foram tratados como “complete deletions”. A robustez da topologia foi avaliada por 1000 replicações de bootstrap (Felsenstein, 1985). Foram também calculadas as medidas da máxima parcimónia tais como o comprimento da árvore (TL), o índice de consistência (CI), o índice de retenção (RI) e o índice de consistência reescalado (RC). A espécie *Epicoccum sorghinum* (CBS 179.80 e CBS 627.68) foi utilizada para “enraizar” a árvore obtida.

3.2. INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS PATOGENICOS DO LENHO DA VIDEIRA

3.2.1. Isolados e condições de cultura

Os fungos do lenho da videira usados no presente estudo encontravam-se conservados em micoteca, no Laboratório Patologia Vegetal (LPVVA e DCEB), em tubos contendo PDA, à temperatura de 4 °C, na obscuridade. Estudaram-se no total seis fungos: “*Botryosphaeria*” sp., *Phaeoacremonium (Pm.) aleophilum*, *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora* (CBS 161.90), *Fomitiporia mediterranea*, *Ilyonectria liriodendri* (Cy68=CBS 117526) e *Dactylonectria macrodydima* (CBS 112615). Os isolados com acrónimo CBS fazem parte da coleção do CBS-KNAW, Holanda, como atrás referido. Todos os ensaios, exceto os devidamente assinalados, foram realizados em placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de PDA, e incubados à temperatura de 25 °C, na obscuridade. Para obtenção dos pré-inóculos, cada um dos fungos foi cultivado, nas condições descritas, durante períodos de incubação variáveis, consoante a taxa de crescimento de cada um.

3.2.2. Testes de interação pelo método de culturas pareadas

Com o auxílio de um anel cortante, retiraram-se discos (4 mm de diâmetro) contendo micélio e/ou conídios de cada um dos isolados fúngicos, a partir de colónias crescidas tal como descrito em 3.2.1., que se posicionaram em locais opostos de placas de Petri contendo 15 mL de meio PDA, afastados entre si cerca de 40 mm e 25 mm do bordo da placa (culturas pareadas). Nos casos em que se confrontou o crescimento de três fungos, os discos miceliais foram dispostos nos vértices de um triângulo com aproximadamente 40 mm de lado (Fig.3.1.). Após inoculação, as placas foram seladas com Parafilm e incubadas durante 3 dias para o caso de “*Botryosphaeria*” sp. (fungo de crescimento rápido), 11 dias para os fungos envolvidos no pé negro da videira, *I. liriodendri* e *D. macrodidyma*, e até 14 dias, para os fungos responsáveis pelo complexo da esca, *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea* (Sparapano *et al.*, 2000c) . O crescimento micelial foi avaliado pela medição de dois raios de cada uma das colónias, um em direção à extremidade da placa (r_1) e outro em direção ao fungo em confronto (r_2) (Figura 3.1.). Para cada combinação fungo X fungo foram realizadas de 2 a 5 repetições, conforme explicitado mais adiante. A inibição do crescimento micelial foi avaliada através da fórmula de Fokemma, $I (\%) = (r_1 - r_2) / r_1 \times 100$ (Dharmaputra *et al.*, 2003).

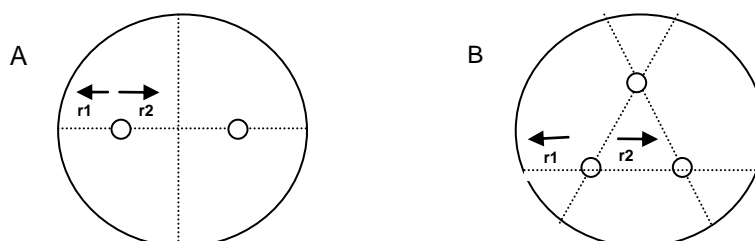


Figura 3.1. Esquema dos ensaios de interação entre dois (A) e três fungos (B).

Os resultados da inibição do crescimento micelial foram analisados estatisticamente, através da ANOVA a um fator para um nível de significância de 0,05, uma vez que não se observaram violações graves ao pressuposto do modelo linear (dados não mostrados). A comparação das médias do crescimento micelial foi realizada com recurso ao teste de Tukey ($\alpha=0,05$) no programa Statistica 7.0 (StatSoft).

Os parâmetros avaliados neste ensaio incluíram ainda observação da alteração da coloração das colónias dos isolados, formação de halo de inibição e desenvolvimento de linha de confronto vegetativo. Os tipos de interações existentes entre dois isolados tiveram como base a classificação de Wheeler & Hocking (1993), adaptado de Magan & Lacey (1984) e descrita em Dharmaputra *et al.* (2003) (anexo A).

3.2.2.1. Interação *Epicoccum* versus BOTRYOSPHAERiaceae

Para a obtenção de pré-inóculos, os isolados de *Epicoccum* (16) e de "*Botryosphaeria*" sp. foram previamente repicados, tal como descrito em 3.2.1, e incubados durante 8 dias. Destas culturas, e com o auxílio de um anel cortante, retiraram-se discos (4 mm de diâmetro) contendo micélio de cada um dos fungos a confrontar, que se transferiram para placas de Petri contendo 15 mL de PDA, tal como ilustrado anteriormente na Figura 3.1.A (cultura pareada). As placas foram seladas com Parafilm e incubadas a 25 °C sob obscuridade, durante 3 dias. Para cada combinação *Botryosphaeria* sp. X *Epicoccum* spp. foram realizadas 2 repetições. O crescimento micelial foi avaliado pela medição de dois raios de cada uma das colónias, um em direção à extremidade da placa (r1) e outro em direção ao fungo em confronto (r2) e a inibição do crescimento micelial de "*Botryosphaeria*" calculada pela fórmula de Fokemma (Dharmaputra *et al.*, 2003). Os dados foram analisados estatisticamente, tal como referido em 3.2.2.

3.2.2.2. Interação *Epicoccum* versus fungos responsáveis pela esca da videira

Para este ensaio selecionou-se um dos isolados do género *Epicoccum* (Epic 2), que se enquadrou no grupo que proporcionou maior poder de inibição sobre "*Botryosphaeria*" sp. Os pré-inóculos de *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea* foram obtidos tal como descrito anteriormente, após um período de incubação de 10 dias. A preparação das culturas pareadas (*Epicoccum* x fungos da esca), o método de inoculação e as condições de incubação foram em tudo iguais às descritas em 3.2.2., exceto a duração do período de incubação, que se prolongou por 14 dias. Realizaram-se cinco repetições de cada uma das combinações (antagonista x fungo da esca) e os resultados foram avaliados e analisados estatisticamente aos 7 e 14 dias de crescimento, tal como descrito anteriormente.

3.2.2.3. Interação entre fungos responsáveis pela esca da videira

Neste ensaio confrontaram-se apenas os fungos envolvidos no complexo da esca, *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea*, na ausência de antagonista. As condições

experimentais foram em tudo idênticas às mencionadas em 3.2.2.2., exceto o número de repetições que, neste caso, foram apenas de quatro. Os resultados da interação foram avaliados ao fim de 14 dias de crescimento, e analisados estatisticamente de acordo com o descrito para os outros ensaios de interação.

3.2.2.4. Interação entre fungos responsáveis pela doença de Petri e o pé negro da videira

Neste ensaio confrontaram-se *Pa. chlamydospora* (CBS 161.90) e *Pm. aleophilum*, agentes causais da doença de Petri, com fungos responsáveis pelo pé negro da videira, *I. liriodendri* (Cy68=CBS 117526) e *D. macrodydima* (CBS 112615). Os procedimentos experimentais seguiram os descritos anteriormente, mas os resultados foram registados após 11 dias de incubação, para evitar que os fungos do pé negro, de crescimento mais rápido do que os da doença de Petri, atingissem o bordo da placa. Para cada modalidade em estudo foram realizadas quatro repetições e os resultados analisados estatisticamente, tal como descrito para os restantes ensaios de interação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DE ENDÓFITOS DA VIDEIRA DO GÉNERO *EPICOCCUM*

As características culturais dos 16 isolados de *Epicoccum* em estudo foram observadas nos meios de cultura PDA, MEA, Czapeck-Dox e OA, após 20 dias de incubação, à temperatura de 28 °C, na obscuridade (Quadro 4.1., Quadro 4.2, Quadro 4.3 e Figura 4.1.). A análise dessas características indica não ser possível agrupar as diferentes culturas em morfotipos, com exceção para os isolados Epic 7 e Epic 8 que apresentaram as mesmas características culturais nos meios PDA e Czapeck-Dox, podendo dessa forma ser inseridos num mesmo grupo.

Em PDA, com exceção de Epic 3, Epic 5, Epic 13, Epic 15 e Epic 16, os demais isolados revelaram aspeto cultural compatível com a espécie *Epicoccum nigrum*, usualmente caracterizada por coloração próxima do alaranjado (frente) e variando de alaranjado a vermelho escuro (verso), além da frente de crescimento irregular e da presença de pigmento difundível no meio de cultura, semelhante às referidas por Bonnell & Levetin (1981) e Fávares *et al.* (2011). Ainda assim, a ausência de esporos nas culturas estudadas, mesmo após a tentativa de indução dos mesmos em meio de ágar a 2% (p/v), contendo agulhas de pinheiro, torna-se um obstáculo à identificação da espécie com base em características morfológicas.

A variabilidade de *E. nigrum* no que respeita à capacidade de esporulação é conhecida, e está dependente dos nutrientes disponíveis no meio de cultura (Bonnell & Levetin, 1981), da luz e de características intrínsecas ao isolado, havendo alguns que são absolutamente dependentes de um período de exposição à luz para iniciarem a esporulação, em particular em meio PDA (Bonnell & Levetin, 1982).

Quadro 4.1. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em PDA (meio gelosado de batata dextrosada), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C

Isolado	Aspeto cultural	Densidade da colónia	Coloração	Frente de crescimento	Aspecto à transparência	Zonagem	Verso	Pigmento
Epic 1	feltroso	Forte	honey/buff/isabelline, com afloramentos honey	regular	homogéneo	concêntrica	idem face superior excepto cor (brown vinaceous)	dark brick
Epic 2	feltroso	Forte	cinnamon/honey	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	honey/cinnamon
Epic 3	feltroso	média/forte	hazel/honey/buff, com gotas de exsudação honey	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	honey/cinnamon
Epic 4	feltroso	média/forte	dark brick/sepia/dark brick, com micélio aéreo brick/cinnamon e gotas de exsudação vinaceous	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick/sepia)	honey/cinnamon
Epic 5	feltroso	Média	isabelline, com afloramentos cotonoso buff e gotas de exsudação brick/vinaceous	irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick)	honey/cinnamon
Epic 6	feltroso	Forte	buff/honey/cinnamon	regular	homogéneo	concêntrica e radial	idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	hazel/honey
Epic 7	feltroso	Forte	honey/buff/honey	regular	homogéneo	concêntrica	idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	honey/hazel
Epic 8	feltroso	Forte	honey/buff /honey	regular	homogéneo	concêntrica	idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	honey/hazel

Quadro 4.1. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em PDA (meio gelosado de batata dextrosada), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C (continuação)

Epic 9	feltroso	Forte	isabelline/cinnamon	regular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	honey/cinnamon
Epic 10	feltroso	Forte	cinnamon/brick/buff, com afloramentos brick/buff	regular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	honey/cinnamon
Epic 11	feltroso	Média/forte	isabelline com exsudação vinaceous; dark brick/sepia/dark brick	irregular dendrítica	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick/sepia)	honey/cinnamon
Epic 12	feltroso	Média	dark brick/sepia/dark brick, com micélio aéreo brick/cinnamon e gotas de exsudação vinaceous	regular	Homogéneo	ausente	Idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	honey/cinnamon
Epic 13	feltroso	Média/forte	isabelline/buff	irregular dendrítica	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick/hazel)	dark brick
Epic 14	feltroso	Média	cinnamon/brick	irregular dendrítica	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	honey/cinnamon
Epic 15	feltroso	Forte	buff/honey	regular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia/dark brick)	honey/hazel
Epic 16	feltroso	Média/forte	isabelline/buff com micélio aéreo buff	irregular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brown vinaceous/hazel)	dark brick

Quadro 4.2. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em meio gelosado Czapeck-Dox, ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C

Isolado	Aspeto cultural	Densidade da colônia	Coloração	Frete de crescimento	Aspecto à transparência	Zonagem	Verso	Pigmento
Epic 1	feltroso	Forte	buff/isabelline, com gotas de exsudação sépia	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brown vinaceous)	isabelline
Epic 2	feltroso	Média	isabelline/honey, com afloramentos buff	Irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sépia/brown vinaceous)	greenish yellow
Epic 3	feltroso	Forte	Isabelline/cinnamon	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brown vinaceous)	cinnamon
Epic 4	feltroso	Forte	citrine green/olivaceous/dark vinaceous, com gotas de exsudação dark vinaceous	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia/brown vinaceous)	honey
Epic 5	feltroso	Média	olivaceous/dark vinaceous, com gotas de exsudação brick/vinaceous	irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia/brown vinaceous)	buff
Epic 6	feltroso	Forte	luteous/hazel	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	cinnamon/honey
Epic 7	feltroso	Forte	luteous/hazel com gotas de exsudação brick/cinnamon	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (cinnamon/sepia)	cinnamon/honey
Epic 8	feltroso	Forte	luteous/hazel, com gotas de exsudação brick/cinnamon	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (cinnamon/sepia)	cinnamon/honey

Quadro 4.2. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em meio gelosado Czapeck-Dox, ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C (continuação)

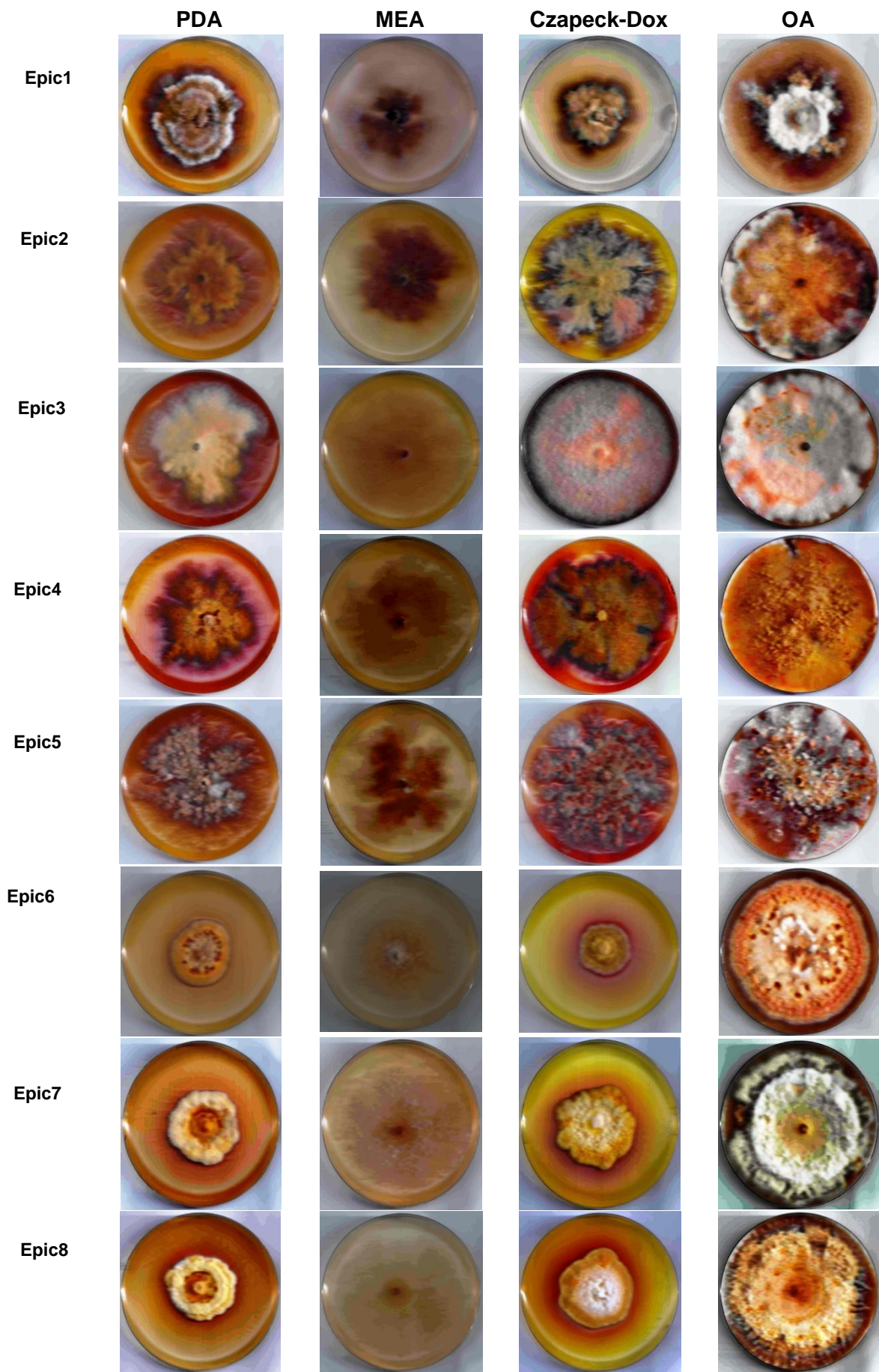
Epic 9	feltroso	Forte	citrine green/olivaceous, com setores buff/olivaceous/sépia	irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia/brown vinaceous)	cinnamon/honey
Epic 10	feltroso	Média	honey, com afloramentos buff	irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (isabelline/honey)	ausente
Epic 11	feltroso	Forte	sepia com afloramentos greenish olivaceous e gotas de exsudação dark vinaceous	irregular dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto na cor (sepia)	honey/cinnamon
Epic 12	feltroso	Forte	isabelline/honey	irregular levemente dendrítica	homogéneo	ausente	Idem face superior excepto cor (hazel/brown vinaceous)	honey
Epic 13	feltroso	Média	isabelline/buff	irregular dendrítica	homogéneo (+ -)	ausente	idem face superior excepto cor (isabelline/buff)	ausente
Epic 14	feltroso	Forte/média	isabelline/hazel	irregular levemente dendrítica	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brown vinaceous)	honey
Epic 15	feltroso	Forte	honey/cinnamon, com gotas de exsudação cinnamon/brick	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	cinnamon/honey
Epic 16	feltroso	Forte	brick/cinnamon, com afloramentos isabelline/dark brick	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sepia)	brick/dark brick

Quadro 4.3. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em meio gelosado de aveia (Oatmeal agar), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C

Isolado	Aspeto cultural	Densidade da colónia	Coloração	Frente de crescimento	Aspecto à transparência	Zonagem	Verso	Pigmento
Epic 1	feltroso	Forte	isabelline/buff, com halo chestnut/hazel	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (sépia/dark brick)	ausente
Epic 2	feltroso	Forte	isabelline/honey/cinnamon/vinaceous/buff	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (cinnamon/dark brick)	hazel
Epic 3	feltroso	Forte	buff/umber, com afloramentos umber	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (honey/dark brick)	honey
Epic 4	feltroso	Forte	hazel/honey	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (hazel) e presença de setores	buff/hazel
Epic 5	feltroso	Média	hazel, com micélio aéreo buff/isabelline e gotas de exsudação brick/cinnamon	irregular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (isabelline)	hazel
Epic 6	feltroso	Forte	buff/honey/cinnamon/buff, com gotas de exsudação cinnamon e afloramentos buff	regular	homogéneo	concêntrica	idem face superior excepto cor (brick) e presença de halo honey	hazel
Epic 7	cotonoso	Forte	buff, com a presença de halo luteous	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (luteous/ochreous)	luteous
Epic 8	feltroso	Forte	buff/honey/cinnamon/buff	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick/cinnamon)	ausente

Quadro 4.3. Características culturais de 16 isolados de *Epicoccum* spp. (Epic.) em meio gelosado de aveia (Oatmeal agar), ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C (continuação)

Epic 9	feltroso	Forte	isabelline/chestnut/honey, com halo luteous e zonagem	regular	Homogéneo	concêntrica	idem face superior excepto cor (umber) e presença de halo luteous e ausência de zonagem	ausente
Epic 10	feltroso	Forte	honey/buff/cinnamon/buff	ligeiramente irregular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brick) e presença de halo luteous	ausente
Epic 11	feltroso	Média/forte	buff, brick, com micélio aéreo honey/brick; honey/sepia	levemente irregular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (cinnamon/sepia)	hazel/buff
Epic 12	feltroso	Média/forte	Isabelline, com afloramentos buff; cinnamon/honey, com gotas de exsudação brick e presença de halo sépia	irregular	Homogéneo	ausente	Idem face superior excepto cor (sepia/cinnamon)	hazel/buff
Epic 13	feltroso	Média	smoke grey/isabelline, com gotas de exsudação brick/cinnamon	regular	homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (isabelline)	ausente
Epic 14	feltroso	Média/fraco	brick/cinnamon/luteous	regular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (cinnamon/luteous)	ausente
Epic 15	feltroso	Forte	Buff/honey/cinnamon/honey, com afloramentos buff	regular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (brick) e presença de halo luteous	ausente
Epic 16	feltroso	Média/forte	buff/honey/buff/isabelline/cinnamon, com afloramentos cotonosos buff	irregular	Homogéneo	ausente	idem face superior excepto cor (dark brick/isabelline/cinnamon)	luteous



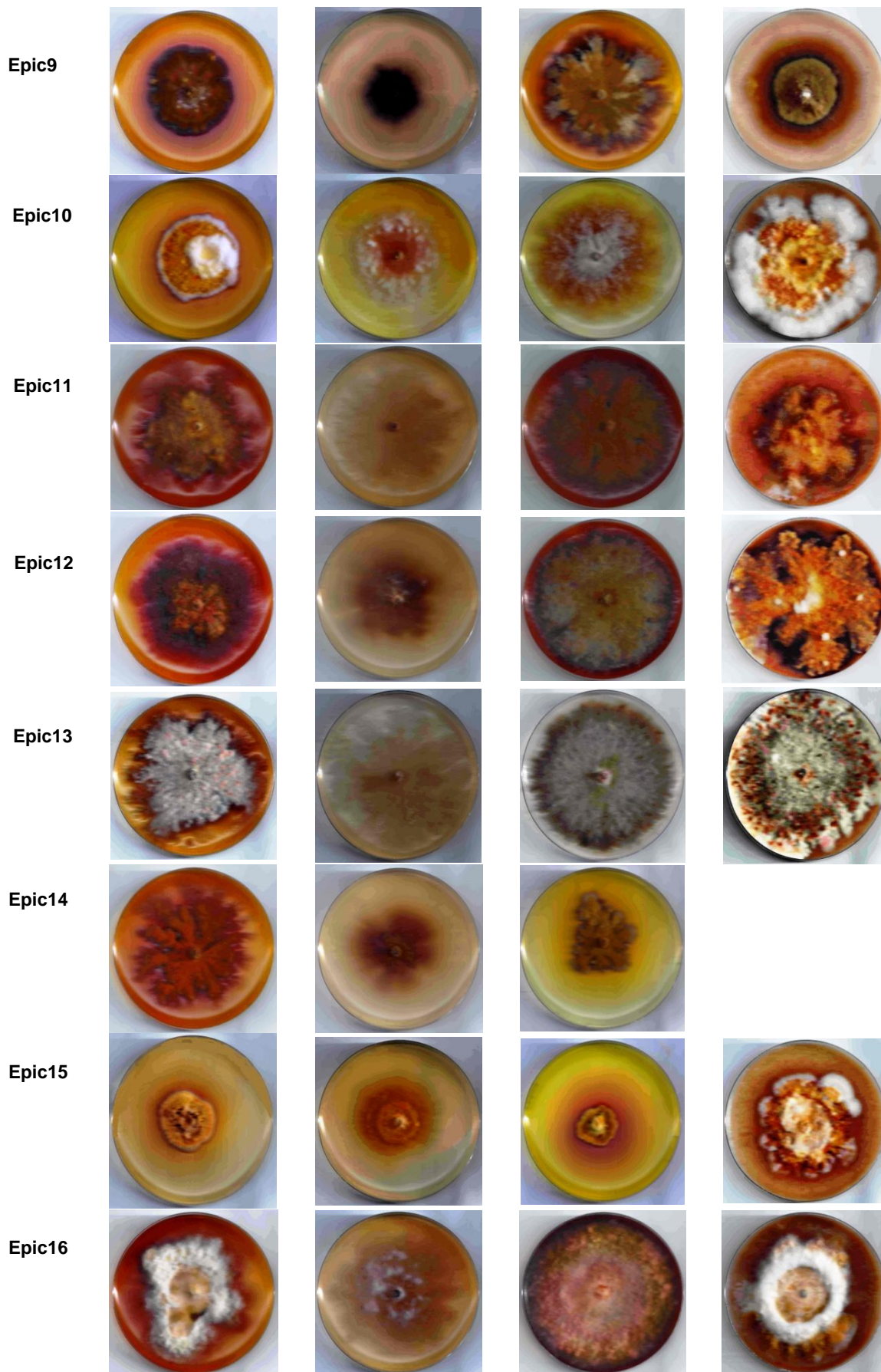


Figura 4.1. Culturas de *Epicoccum* spp. (Epic), em meio de PDA, MEA, Czapeck-Dox e OA; ao fim de 20 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 28 °C. Devido a contaminação em OA, a cultura Epic 14 não consta da figura acima.

Embora o requisito da exposição à luz não tenha sido devidamente explorado no presente trabalho, uma vez que as culturas foram incubadas na obscuridade, por diversas vezes as mesmas foram deixadas em laboratório, sob iluminação natural, sem que se tivesse observado esporulação. Ainda assim, trabalhos futuros a realizar para esta espécie de fungos deverão ter em conta este requisito, sujeitando as culturas a um fotoperíodo desde o início da incubação.

O aspeto cultural dos isolados apresentou-se visivelmente alterado em MEA, variando a densidade da colónia de média a fraca e a coloração entre "buff" a "cinnamon", distinguindo-se os isolados Epic 9 ("chestnut"), Epic 10 ("orange") e Epic 15 ("orange" a "cinnamon") (Figura 4.1.). Por esta razão, não se apresenta o quadro detalhado das descrições das culturas neste meio. O meio utilizado (MEA) difere do utilizado por Fávares *et al.* (2011), meio gelosado de malte, não sendo possível a comparação direta dos resultados. Ainda assim, no presente estudo, o meio MEA revelou-se menos diferenciador das características culturais de *Epicoccum*, comparativamente aos restantes.

Em meio Czapeck-Dox, a coloração dos isolados foi muito variável, entre "buff", "isabelline", "orange", "sepia", "olivaceous" a "brick"; a frente de crescimento apresentou-se maioritariamente irregular, com exceção para Epic 3, Epic 6-8, Epic 15 e Epic 16, e não foi observada zonagem nas culturas. Pela variabilidade observada, este meio não permitiu agrupar isolados, ao contrário do referido por Fávares *et al.* (2011) para o meio Czapeck. Ainda assim, a composição dos dois meios de cultura não é exatamente coincidente.

Todos os isolados apresentaram em meio OA uma densidade da colónia maioritariamente forte, ou média/forte, com exceção do isolado Epic 14; a frente de crescimento foi maioritariamente regular, zonagem ausente, exceto em Epic 6 e Epic 9 e a coloração das culturas foi muito variável (Quadro 4.3; Figura 4.1). Pela variabilidade observada, o meio OA também não se revelou muito adequado para identificar grupos na espécie ou complexo *E. nigrum*.

Para efeitos da caracterização da coleção em estudo, com base no crescimento micelial dos 16 isolados do género *Epicoccum* em diferentes meios de cultura (PDA, MEA, Czapeck-Dox e OA), a ANOVA dos resultados revelou diferenças significativas entre isolados ($P \leq 0,05$), para cada um dos meios de cultura. A comparação das médias do crescimento micelial evidenciou um grupo de isolados com menor crescimento, a diferir significativamente de outro grupo com maior crescimento (Figura 4.2.; Anexo B, Quadros B1-B4). Ainda assim, o mesmo isolado comportou-se de forma distinta, consoante o meio de cultura, com raras exceções que serão salientadas mais à frente.

Em meio de PDA, o diâmetro das colónias de *Epicoccum* variou entre 1,8 cm e 7,3 cm. O meio de PDA foi um dos que permitiu melhor agrupamento dos isolados, com Epic 13 a apresentar maior crescimento micelial, ainda assim a não diferir significativamente de Epic 3 e Epic 5 (Grupo I); enquanto Epic 15 (Grupo III) apresentou a média mais baixa, não diferindo significativamente de Epic 1, Epic 6-8, Epic 10 e Epic 12. Os restantes isolados tiveram comportamento intermédio (Grupo II).

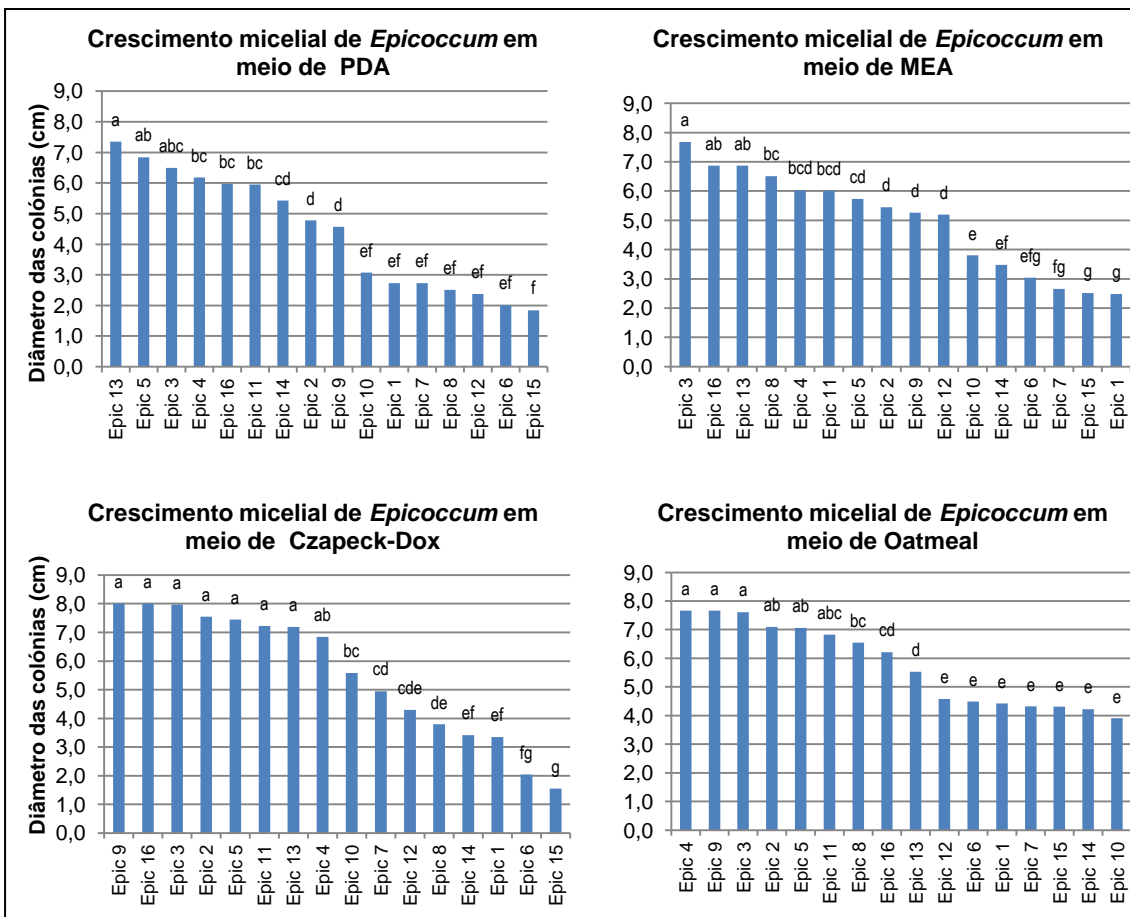


Figura 4.2. Crescimento micelial de 16 isolados do género *Epicoccum*, isolados de videira, em diferentes meios de cultura, após 12 dias de incubação na obscuridade, à temperatura de 28 °C. Para cada meio de cultura, colunas seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

No meio MEA, o diâmetro das colónias variou entre 2,5 cm e 7,7 cm. O isolado Epic 3 foi o que apresentou maior crescimento micelial, não diferindo significativamente de Epic 13 e Epic 16 (Grupo I); ao contrário de Epic 1 e Epic 15, que demonstraram as menores médias para este parâmetro, mas não diferindo significativamente de Epic 6 e Epic7 (Grupo III). Os restantes isolados tiveram comportamento intermédio (Grupo II).

Em OA o crescimento micelial variou entre 3,9 cm e 7,7 cm, sendo que Epic 3, Epic 4 e Epic 9 demonstraram as médias de crescimento mais elevadas, ainda assim não diferindo significativamente das apresentadas pelos isolados Epic 2, Epic 5 e Epic 11 (Grupo I); em oposição, os isolados Epic 1, Epic 6, Epic 7, Epic 10, Epic 12, Epic 14 e Epic 15 revelaram as médias de crescimento mais baixas (Grupo III), diferindo significativamente dos restantes isolados (Grupo II).

No meio Czapeck-Dox, o crescimento dos isolados variou entre 1,5 cm e 8,0 cm, com os isolados Epic 2, Epic 3, Epic 5, Epic 9, Epic 11, Epic 13 e Epic 16 a apresentarem as médias mais elevadas, não diferindo significativamente entre si, nem de Epic 4 (Grupo I); pelo contrário, Epic 15 apresentou o menor crescimento, não diferindo de Epic 6 (Grupo III); os

restantes isolados apresentaram comportamento intermédio, embora com diferenças significativas entre si.

Em resumo, no meio de PDA destacaram-se sete isolados com crescimento reduzido (Epic 1, 6, 7, 8, 10, 12 e 15). Em meio de MEA surgiram seis isolados com idêntico comportamento (Epic 1, 6, 7, 10, 14 e 15) e em meio de OA surgem novamente destacados sete isolados com crescimento reduzido (Epic 1, 6, 7, 10, 12, 14 e 15), que inclui todo o grupo anterior mais o isolado Epic 12, também discriminado em PDA. No que se refere ao meio Czapeck-Dox, destacaram-se sobretudo os isolados com maior crescimento micelial, Epic 2, 3, 5, 9, 11, 13 e 16, a não diferirem significativamente de Epic 4.

A espécie *E. nigrum* é conhecida por apresentar elevada variabilidade morfológica e cultural. Por exemplo, Schol-Shwarz (1959) e Kilpatrick & Chilvers (1981) registaram elevada variabilidade morfológica e fisiológica entre isolados de *Epicoccum* provenientes de diferentes amostras de uma mesma região geográfica. Também num estudo sobre a diversidade da espécie *E. nigrum*, Arenal *et al.* (2002) observaram uma extensa variabilidade e ausência de correlação entre região geográfica e similaridade genética. Sobre a heterogeneidade fenotípica observada entre os isolados em estudo, foi colocada, por aqueles autores, a hipótese de ser devida à expressão diferencial de um ou mais genes e em diferentes células e esporos, afetando o fenótipo do fungo. Essa heterogeneidade pode ser potencialmente importante na ecologia e na biologia dos fungos, conferindo-lhes uma vantagem adaptativa, sobre a qual a seleção natural pode atuar (Arenal *et al.*, 2002), e pode também contribuir para o aumento da competitividade dos fungos nos seus diferentes estádios/estilos de vida (Hewitt *et al.*, 2016). Tais características podem variar com fatores ambientais e condições de cultura, tal como a temperatura e a composição do meio em nutrientes (Bonnell & Levetin, 1981). No entanto, estas diferentes características dos isolados têm sido confundidas com variação intraespecífica (Fávaro *et al.*, 2011), podendo conduzir a erros na identificação de isolados de *E. nigrum*.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram essa variabilidade, nomeadamente entre os isolados de *Epicoccum* (*E. nigrum*) provenientes de um mesmo hospedeiro (*V. vinifera*) e de uma mesma região geográfica (Tavira, Portugal), como é o caso dos isolados Epic 4 a 16. Ainda assim, para inferir se essa variabilidade é de natureza intraespecífica, equivalendo à presença de diferentes genótipos na mesma espécie, ou se é de natureza interespecífica, correspondendo a diferentes espécies em *E. nigrum*, é essencial o uso de uma abordagem polifásica, com recurso a diferentes marcadores, desde morfoculturais, fisiológicos aos moleculares (Fávaro *et al.*, 2011).

4.1.2. Caracterização molecular dos isolados de *Epicoccum*

A análise filogenética das sequências de parte do gene da β -tubulina (*tub2*) dos isolados de *Epicoccum* em estudo, juntamente com sequências do mesmo gene de *Epicoccum* spp. obtidas do GenBank, originou o dendrograma representado na Figura. 4.3.

O alinhamento do gene *tub2* revelou conter 571 caracteres (incluindo “gaps” do alinhamento) de 51 taxa (incluindo os dois “outgroups”). Destes caracteres, 487 são constantes, 56 são informativos por parcimônia e 32 são não informativos por parcimônia. A análise de parcimônia de 286 caracteres resultou em duas árvores mais parcimoniosas (TL = 55 passos; CI = 0.673469; RI = 0.926606; e RC= 0.657048), a primeira das quais é mostrada na Fig. 4.3.

As sequências obtidas do GenBank para isolados classificados como *E. nigrum* agrupam em diversos “clusters”, o que sugere estarmos perante um complexo de espécies. Os 16 isolados de *Epicoccum* em estudo distribuem-se por quatro “clusters”, dentro do complexo *E. nigrum*. O isolado Epic 1 agrupa com o isolado de referência CBS173.38, que é isolado-tipo de *E. mezzettii* Goid., atualmente considerado sinónimo de *E. nigrum*. Os isolados Epic 6 a Epic 9 encontram-se numa posição basal ao “cluster” que contem o isolado de referência CBS 173.73, que é o isolado-tipo *Phoma epicoccina* Punith., M.C. Tulloch & C.M. Leach, atualmente designado *E. nigrum*. Os isolados Epic 2-4, Epic 10-14 e Epic 16 encontram-se agrupados no mesmo “cluster” com um valor de bootstrap de 78%, sendo que o isolado Epic 10 é distinto dos restantes desse “cluster”. O isolado Epic 15 é filogeneticamente próximo dos isolados CE 7; CE 12, CE 24 e CE27 obtidos do GenBank. O “cluster” formado por estes isolados apresenta um valor de bootstrap de apenas 30%. Nenhum dos isolados em estudo agrupou com as espécies *Epicoccum pimprinum* (sin. *Phoma pimprina*) ou *Epicoccum sorghi* (sin. *Phyllosticta sorghina*), as quais, em conjunto, com *E. nigrum* formam o grupo M-*Epicoccum* na família DIDYMELLACEAE (Aveskamp *et al.*, 2010).

A caracterização molecular da coleção de *E. nigrum* obtida de videira, ainda que baseada apenas na sequenciação do gene *tub2*, aponta como hipótese mais plausível que *E. nigrum* seja um complexo de espécies, conforme explicado anteriormente. Também o estudo realizado por Fávoro *et al.* (2011), com isolados de cana-de-açúcar, revelou a presença inequívoca de dois grupos de isolados que, apesar de identificadas como *E. nigrum* no GenBank, corresponderão a duas espécies distintas, a necessitar de resolução/identificação. Para que esta possa ser levada a efeito, serão necessários estudos mais aprofundados, com recurso a uma abordagem polifásica e análise multigénica e não apenas baseada na caracterização cultural e sequenciação de um único gene (*tub2*).

A correta identificação de espécies no complexo *E. nigrum* é muito importante, não por simples curiosidade sistemática, mas porque, englobando distintos isolados com potencial para controlo biológico contra diversas doenças e em diversas culturas (Elmer *et al.*, 2001; Elmer & Reglinski, 2006), é essencial conhecer-se que linhagem, espécie ou espécies apresentam esse potencial (Fávoro *et al.*, 2011). Ainda assim, e porque não se conhece recombinação sexual em *E. nigrum*, é possível encontrar diversidade genética intraespecífica, resultante de vários mecanismos, designadamente heterocariose (Arenal *et al.*, 2002; Fávoro *et al.*, 2011), parassexualidade, aneuploidia, migração e mutações causadas pela ação de elementos transponíveis (Fávoro *et al.*, 2011).

Em videira, é conhecida a ação antagonista de fungos *Epicoccum* em relação a *Botrytis cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006). Também se sabe que fungos do género *Epicoccum* são frequentemente isolados do lenho da videira, admitindo-se que possam atuar como agentes de controlo biológico (Pancher *et al.*, 2012; Bruez *et al.* 2014). Ainda assim, desconhece-se com exatidão o mecanismo de ação e o seu papel na comunidade fúngica que com eles habita

4.2. INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ISOLADOS DO LENHO DA VIDEIRA

4.2.1. Interação *Epicoccum* versus BOTRYOSPHAERIAEAE

Os fungos BOTRYOSPHAERIAEAE são importantes agentes patogénicos da videira e, comparativamente a outros fungos do lenho, têm crescimento micelial muito rápido. Em regra, sobrepõem-se aos restantes fungos do lenho da videira. Neste trabalho admitiu-se que, idealmente, o isolado do género *Epicoccum* a selecionar, contra os fungos envolvidos no complexo da esca, deveria ter igualmente algum poder de inibição sobre BOTRYOSPHAERIAEAE. Para o efeito, antes de selecionar o isolado de *Epicoccum* a testar contra os restantes fungos do lenho, testou-se toda a coleção relativamente a um isolado de "*Botryosphaeria*" sp.

Os resultados apurados permitiram confirmar a existência de diferenças significativas entre isolados de *Epicoccum*, relativamente a "*Botryosphaeria*" sp. ($P \leq 0,05$) (Anexo C – Quadro C1), com evidência de um efeito inibidor mais acentuado, ainda que modesto, para os isolados Epic 2, Epic 3 e Epic 13, que não diferiram significativamente entre si, nem da maioria (Fig. 4.4.).

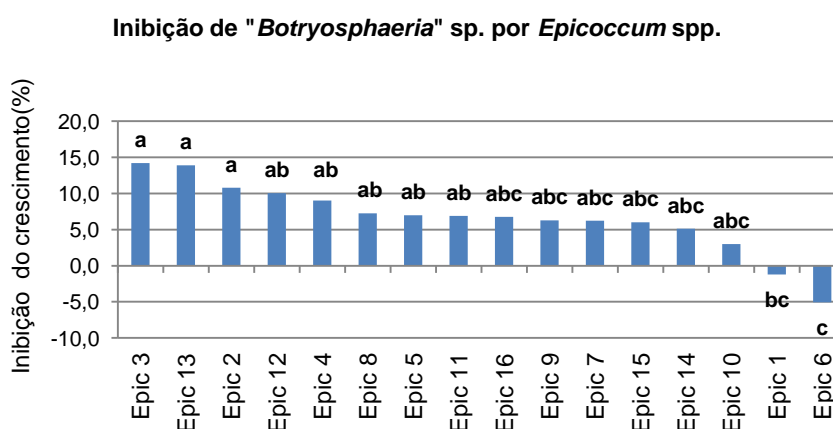


Figura 4.4. Efeito de fungos do género *Epicoccum* (Epic 1-16) na inibição do crescimento micelial de "*Botryosphaeria*", após incubação durante 72 h, na obscuridade, à temperatura de 24 °C, em meio de cultura PDA (colunas seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si para $\alpha = 0,05$, teste de Tukey).

É de notar que os isolados Epic 1 e sobretudo Epic 6 tiveram o pior comportamento, com tendência para favorecerem o crescimento micelial de “*Botryosphaeria*”. O crescimento muito rápido deste fungo, associado ao facto de formar abundante micélio aéreo, dificultou as leituras deste ensaio, aumentando a probabilidade de erro, pelo que as variâncias associadas às médias foram elevadas. Assim se explica que os isolados de *Epicoccum* com comportamento intermédio não tenham diferido significativamente nem dos melhores nem dos piores.

Face aos resultados obtidos e ao facto do isolado Epic 2 ter sido isolado no decurso do presente estudo, na vinha do Almotivo, ISA, seleccionou-se o mesmo para a realização dos restantes ensaios de antagonismo.

4.2.2. Interação *Epicoccum* versus fungos responsáveis pela esca da videira

Os resultados do estudo de interação *Epicoccum* (isolado Epic 2) versus os principais fungos envolvidos no complexo da esca da videira, *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea*, foram registados ao fim de 7 e 14 dias de incubação. Inicialmente (7 d), *Epicoccum* inibiu significativamente o crescimento micelial de *F. mediterranea* (Fig. 4.5.), mas essa inibição não foi significativamente diferente da produzida sobre *Pa. chlamydospora* que, por sua vez, não diferiu da observada relativamente a *Pm. aleophilum* (Anexo C – Quadro C.2.1.). Posteriormente (14 d), os efeitos foram mais evidentes, sendo todos os fungos inibidos por *Epicoccum* (Anexo C – Quadro C.2.2.), ainda assim, com um efeito menos significativo sobre *P. aleophilum* (Fig. 4.5.).

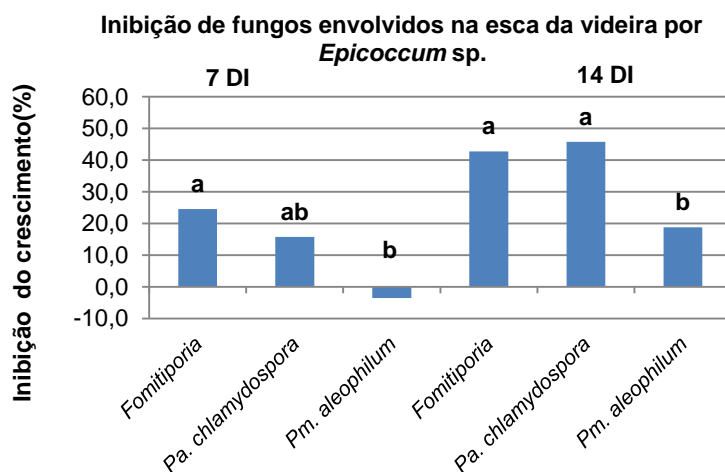


Figura 4.5. Inibição do crescimento micelial de *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com Epic 2. As culturas cresceram durante 7 e 14 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

A inibição de *Pa. chlamydospora* por Epic 2 pode ser devida à produção de metabólitos secundários produzidos por Epic 2 (antibiose), sendo este um dos mecanismos de antagonismo descritos em interações fúngicas envolvendo *Epicoccum*, ou seja, o antagonista não é afetado, mas origina redução de crescimento (ou morte) da espécie antagonizada. Os efeitos de *Epicoccum* sobre *Pa. chlamydospora* parecem mesmo ter afetado a cultura para além da zona de proximidade *Epicoccum*/*Pa. chlamydospora* (r1), uma vez que se observou um halo de inibição em torno deste último fungo. Para confirmar esta hipótese, foi realizada uma ANOVA, comparando o crescimento de *Pa. chlamydospora*, ao fim de 14 dias de incubação, quando confrontado com ele mesmo (controlo) e com *Epicoccum*, o que permitiu verificar que o valor médio de r1, ainda que ligeiramente, diferiu significativamente numa e noutra condição de ensaio ($F=7,2$; $P= 0,02778$), o que comprova que o efeito de inibição se estendeu a toda a colónia (Figura 4.6.).

A inibição de *F. mediterranea* por *Epicoccum* aparenta tratar-se, sobretudo, de um mecanismo de competição pelo espaço e nutrientes, onde Epic 2 parece travar o crescimento de *F. mediterranea* (Figura 4.6.). Ainda assim, a margem de cada um dos fungos não se confronta em toda a sua extensão, havendo a possibilidade de *Epicoccum* estar a exercer alguma ação de antagonismo sobre o fungo patogénico. De salientar que não se verificaram diferenças significativas de crescimento entre os valores de r1 de *Fomitiporia* x *Fomitiporia* (controlo) e os de *Fomitiporia* x *Epicoccum* ($F=0,167$; $P=0,6938$).

Os efeitos de Epic 2 sobre *Pm. aleophilum* são mais complexos. Aparentemente, no início do ensaio (7 dias) o antagonista pareceu favorecer o crescimento de *Pm. aleophilum*, o que não foi comprovado estatisticamente, pois esse ligeiro favorecimento não diferiu significativamente da inibição produzida sobre *Pa. chlamydospora*, ao fim de igual período de incubação, tal como foi evidenciado na Figura 4.5. A circunstância de ambos os fungos patogénicos terem crescimento muito lento explica a dificuldade na determinação do crescimento exato de cada um dos fungos. Decorridos 14 dias de incubação, verificou-se que Epic 2 inibia efetivamente *Pm. aleophilum*, tanto mais que o valor de r1, nestas condições, não diferiu significativamente do valor de r1, quando *Pm. aleophilum* foi confrontado com ele próprio ($F=1,00$; $P=0,3466$). Por conseguinte, a inibição de *Pm. aleophilum*, parece ter resultado de uma conjugação de mecanismos de competição e antibiose (Figura 4.6.)

Inúmeros compostos produzidos por *E. nigrum* encontram-se descritos na literatura como possuindo ação antimicrobiana. Dentre os melhor caracterizados, salientam-se a flavipina e as epicorazina A e B, que têm revelado efeitos positivos no controlo biológico de *Monilinia* spp. e de diversos oomicetas, designadamente pertencentes aos géneros *Pythium* e *Phytophthora*. Por sua vez, a flavipina, para além da ação anti-fúngica, tem demonstrado igualmente ação antagonista contra inúmeras bactérias fitopatogénicas (Madrigal *et al.*, 1991; Fávaro *et al.*, 2012), revelando um amplo espectro de ação e o potencial interesse no controlo biológico de uma ampla gama de organismos fitopatogénicos.

Para além do mecanismo de antibiose, a competição entre *Epicoccum* e fungos patogénicos é igualmente relatada na literatura, entre outros, como no caso de *Botrytis cinerea* em feijoeiro (Hannush & Boland, 1996) ou *Fusarium graminearum* em grãos de trigo e *in vitro* (Jensen *et al.*, 2016).

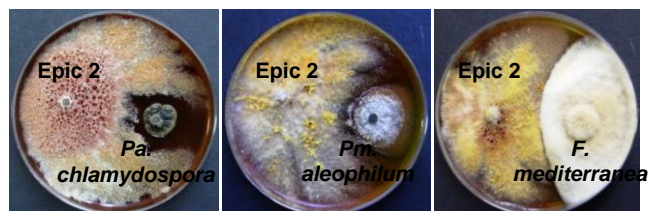


Figura 4.6. Inibição do crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *Phaeoacremonium aleophilum*, em cultura pareada, ao fim de 14 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C.

O efeito antagonista de fungos do género *Epicoccum*, em relação a agentes patogénicos da videira é conhecido, como no caso de *Plasmopara viticola* (Kortekamp, 1997) e no de *Botrytis cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006). Também se encontra relatado o possível efeito de *E. nigrum* (e *Aureobasidium pullulans*) na recuperação natural de castas de videira afetadas pelo fitoplasma causador da Flavescência Dourada (Martini *et al.*, 2009). Relativamente aos fungos do lenho da videira, apesar de espécies do género *Epicoccum* (maioritariamente referidas como *E. nigrum*) serem frequentemente isoladas quer de videiras doentes quer de videiras sãs (Pancher *et al.*, 2012; Bruez *et al.*, 2014), não existem estudos sobre as relações que se estabelecem entre estes endófitos e os agentes causais das doenças do lenho. No decurso do presente estudo foi igualmente isolado *Epicoccum* do lenho da videira, sendo Epic 2 um exemplo de isolado obtido de varas de videira aparentemente sãs.

4.2.3. Interação entre fungos responsáveis pela esca da videira

As relações entre os fungos causadores da esca da videira são complexas e estão ainda mal esclarecidas. Os resultados do estudo de interação entre *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* e *F. mediterranea* encontram-se sintetizados nas Figuras 4.7. e 4.10.

Quando *Fomitiporia mediterranea* é confrontada com ela própria, observa-se uma ligeira inibição do seu crescimento, conforme indicado nas Figuras 4.7 e 4.10 (C1 e C2). Uma das colónias aparenta ter crescido mais do que a outra, e apresenta pigmentação no centro, o mesmo não se verificando na segunda colónia, indicando uma relação de agonismo.

Por sua vez, quando se analisa o crescimento micelial de *F. mediterranea*, face a outros fungos da esca, verifica-se que *Pm. aleophilum* e *Pa. chlamydospora* estimulam o seu crescimento, com efeito mais significativo para *Pa. chlamydospora*, evidenciando um fenómeno de agonismo (Anexo C – Quadro C.3.1.). Ainda assim, tal como se pode observar na Figura 4.10 (H1 e H2),

a margem da colónia de *F. mediterranea* é abruptamente interrompida na proximidade de *Pm. aleophilum*, formando-se uma barreira espessa de cor castanha que impede o posterior crescimento de *F. mediterranea*, indicando um fenómeno de antagonismo exercido por *Pm. aleophilum*, em relação a *F. mediterranea*.

Naquele confronto verifica-se a alteração da cor da colónia de *Pm. aleophilum* (face superior da colónia) e de *F. mediterranea* (face inferior da colónia), provavelmente devido a produção de pigmentos, compostos difusíveis, toxinas e metabolitos. Na interação *F. mediterranea* X *Pa. chlamydospora* (G1 e G2), verifica-se um fenómeno oposto, uma vez que a colónia do primeiro fungo consegue crescer sobre *Pa. chlamydospora*, admitindo-se que a partir de um certo período de tempo de incubação *F. mediterranea* domine sobre esta última.

Quando *Pm. aleophilum* é confrontado com ele próprio, nota-se uma ligeira inibição do seu crescimento, provavelmente uma inibição mútua, sugerindo uma interação tipo co-antagonismo, conforme indicado nas Figuras 4.7 e 4.10 (B1 e B2).

Por sua vez, quando se analisa o crescimento micelial de *Pm. aleophilum* com os demais fungos da esca, verifica-se uma ligeira inibição induzida por *F. mediterranea*, ainda assim não significativa, quando comparada com a própria cultura (controlo) e um ligeiro, mas significativo, efeito de *Pa. chlamydospora* no favorecimento do crescimento de *Pm. aleophilum* (anexo C – Quadro C.3.3), indicando um fenómeno de agonismo (Figura 4.7. e Figura 4.10 (F1 e F2).). Neste confronto, a cor da colónia de *Pm. aleophilum* sofre alterações, que são visíveis na face superior e inferior da mesma.

Phaeomoniella chlamydospora, ao confrontar-se com ele próprio, experimenta um aumento pouco significativo do crescimento, sugerindo a existência de mutualismo, conforme se pode observar na Figura 4.7 e Figura 4.10 (A1 e A2). Contudo, essa interação necessita de estudos mais aprofundados, visto que este fungo é de crescimento lento, e por isso necessita de um maior tempo de incubação para determinar com maior precisão o tipo de interação que exercem entre si.

Já o crescimento micelial de *Pa. chlamydospora* é inibido significativamente por *F. mediterranea* e pouco afetado por *Pm. aleophilum* (Anexo C – Quadro C.3.2.), mas com tendência também para uma interação de agonismo. A alteração da cor da colónia de *Pa. chlamydospora* (face superior da colónia), e de *F. mediterranea* (face inferior da colónia), assim como a formação da linha de confronto levemente acastanhada em torno de *Pa. chlamydospora* são visíveis, e podem ser resultantes das alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante as interações.

Os resultados obtidos são dificilmente comparáveis com os de outros autores, pois a literatura sobre o assunto é escassa e baseia-se essencialmente em avaliações qualitativas. Ainda assim, são comparáveis aos resultados qualitativos obtidos por Sparapano *et al.* (2000b) e Sparapano *et al.* (2001), que verificaram também relações de agonismo entre *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, bem como agonismo inicial na interação *Fomitiporia* X *Pa.*

chlamydospora, seguido de crescimento de *Fomitiporia* sobre o segundo fungo, o qual é considerado um fungo de crescimento lento (Pierron *et al.*, 2016). Também verificaram o efeito antagonista de *Pm. aleophilum* sobre *Fomitiporia*, idêntico ao observado no presente estudo.

Em cultura tripla, resultante do confronto *Fomitiporia* X *Pm. aleophilum* X *Pa. chlamydospora*, (Figura 4.10., I1- I2) pode observar-se de novo o efeito antagonista de *Pm. aleophilum* sobre *Fomitiporia* e, aparentemente, tal como observado por Sparapano *et al.* (2000b), este efeito parece estar a prevenir que o micélio de *Fomitiporia* se sobreponha à cultura de *Pa. chlamydospora*. Sparapano *et al.* (2000b) referem que *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* competem ambos pelo substrato, sem que haja um combate direto, pois que em condições laboratoriais, estes fungos são igualmente agressivos (Pierron *et al.*, 2016). Sparapano *et al.* (2001) afirmam também que *Fomitiporia* pode ser inibida ou reduzida pelos metabolitos secundários biossintetizados por *Pa. chlamydospora* ou *Pm. aleophilum*, quando as culturas crescem em meio ótimo (malte agar-MA). Tais metabolitos não afetam significativamente o crescimento de *Pa. chlamydospora* ou de *Pm. aleophilum*.

As alterações morfológicas observadas podem ser explicadas com base em Boddy *et al.* (2008), que afirmam que, quando dois fungos crescem muito próximos, ocorre alterações na morfologia de ambos os micélios e na composição química dos metabolitos secundários, resultando na formação de uma linha e alteração na coloração dos micélios de ambas as espécies. Essas alterações são mediadas pela sobreexpressão de genes envolvidos no antagonismo, e resulta na síntese de compostos relacionados com o stresse, enzimas e metabolitos secundários de baixo peso molecular (Boddy, 2000), tais como álcool, compostos aromáticos e ROS (Arfi *et al.*, 2013).

As interações que se desenvolvem entre microrganismos são muito complexas e podem ser classificadas de diferente forma, consoante os autores. Por exemplo, Tuininga (2005) classifica-as em nutritivas (biotrófica, necrotrófica e saprófita) e não-nutritivas (comensalismo, mutualismo, antagonismo, co-antagonismo, agonismo e co-habitação), consoante o fungo receba ou não nutrientes da espécie opositora. Estas interações podem ocorrer em simultâneo, embora os resultados obtidos sejam sempre diferentes. O mecanismo mais comum (a par da antibiose) que se verifica, conforme já anteriormente referido, é a competição por nutrientes e espaço, levando geralmente a alterações morfológicas na zona frontal da interação e no metabolismo dos fungos (Arfi *et al.*, 2013; Hiscox *et al.*, 2010).

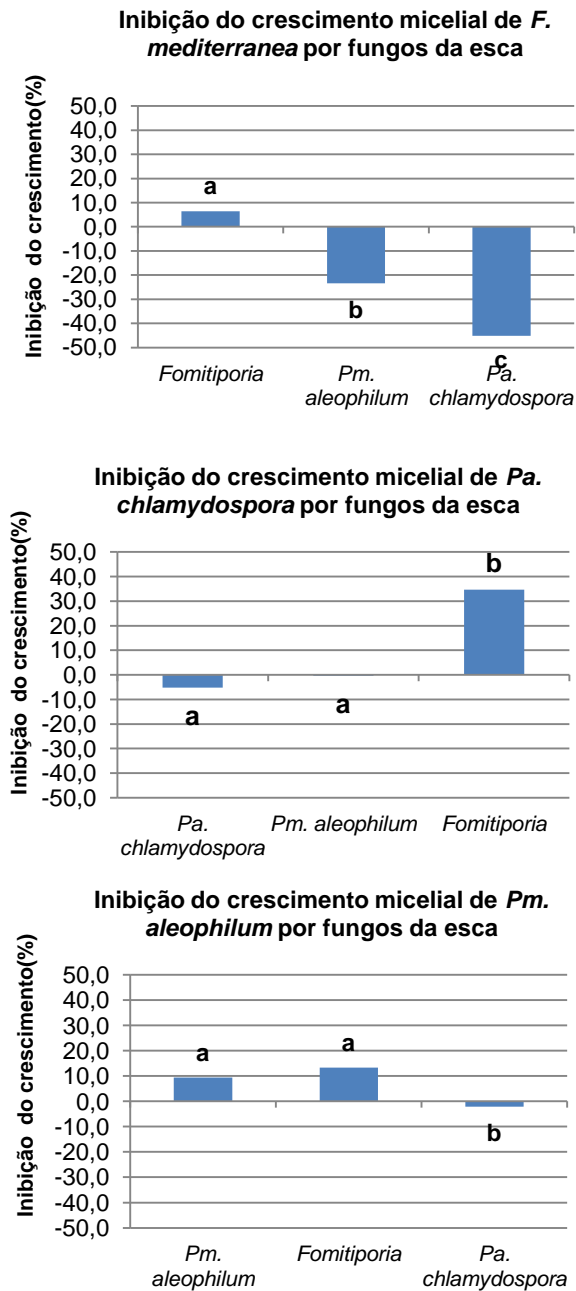


Figura 4.7. Interação de fungos envolvidos na esca da videira, ao fim de 14 dias de incubação em meio de cultura PDA, à temperatura de 25 °C, na obscuridade. Em cada gráfico, colunas afetadas pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

A complexidade e a diversidade morfológica, bem como as alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante as interações entre os fungos incluem rápida divisão celular, ramificações, agregação de hifas, crescimento aéreo, autólise, aumento da atividade enzimática, produção de pigmentos, compostos orgânicos voláteis (VOC) (os quais atuam como info-químicos), compostos difusíveis (DOC), toxinas e metabolitos antifúngicos. As alterações fisiológicas e bioquímicas observadas nas interações determinam o tipo de resposta da interação (Hiscox *et al.*, 2014; Rotheray *et al.*, 2010).

As interações que se estabelecem entre microrganismos constituem uma componente importante na ecologia dos fungos, os quais vivem em comunidades complexas, e na maioria das vezes competem entre si por espaço ou recursos disponíveis (Arfi *et al.*, 2013). Essas interações desempenham um papel importante no desenvolvimento, na composição e na sucessão da comunidade fúngica, e nos processos de decomposição do substrato, alterando a mobilização e translocação de nutrientes e biomassa, evolução da taxa de CO₂ e a taxa de decomposição (Arfi *et al.*, 2013; Boddy 2000).

No caso dos fungos do complexo da esca da videira, ainda está por determinar com rigor como se processa o fenómeno de degradação do lenho da videira, havendo teorias que sugerem o papel dos fungos *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, como agentes primários dessa degradação, a que se seguiria a invasão por fungos de degradação final da madeira, como é o caso de *F. mediterranea* e de outros basidiomicetes (Larignon e Dubos, 1997). Pelo contrário, Sparapano *et al.* (2000a) verificaram que os fungos do género *Fomitiporia* podem comportar-se como agentes primários da degradação do lenho, originando “white-rot”, dois anos após a inoculação das videiras, na ausência dos fungos precursores, *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*. Embora não diretamente relacionado com a sucessão de fungos no lenho da videira, Pierron *et al.* (2016) verificaram *in planta* que *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* parecem partilhar o mesmo nicho ecológico, e que existe uma interação sinérgica entre estes fungos, de modo que as toxinas secretadas por *Pa. chlamydospora* afetam a videira e favorecem a atividade das enzimas sintetizadas por *Pm. aleophilum*, que degradam o lenho.

4.2.4. Interação entre fungos responsáveis pela doença de Petri e o pé negro da videira

Os fungos estudados, causadores do pé negro da videira, designadamente *Ilyonectria liriodendri* (Cy68) e *Dactylonectria macrodidyma* (CBS 112615), foram afetados no seu crescimento pelos fungos *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, agentes causadores da doença de Petri, conforme é evidenciado na Figuras 4.8. e 4.10.

Da análise da Figura 4.8 verifica-se que o crescimento micelial de *I. liriodendri* é ligeiramente inibido quando a cultura é confrontada com ela própria (Figura 4.10 (D1 e D2), sugerindo uma relação de co-antagonismo, mas favorecido quando pareada com *D. macrodidyma*. Relevante ainda é o facto de *Pa. chlamydospora* e, sobretudo, *Pm. aleophilum* favorecerem significativamente o crescimento de *I. liriodendri* (Anexo C – Quadro C.4.1.). Por sua vez, o crescimento de *D. macrodidyma* é ligeiramente inibido por *I. liriodendri* (L1 e L2), indicando agonismo, mas significativamente favorecido pela presença dos agentes causadores da doença de Petri (Anexo C – Quadro C.4.2.).

No confronto entre fungos do pé negro e da doença de Petri verificou-se ainda que o crescimento de *Pa. chlamydospora* era significativamente inibido por *I. liriodendri* (Anexo C – Quadro C.4.3.), evidenciado pelo agonismo, enquanto o de *Pm. aleophilum* era inibido quer pelo isolado de *Ilyonectria* quer pelo de *Dactylonectria* (Anexo C – Quadro C.4.4.), sugerindo uma interação do tipo agonismo (Figuras 4.9. e 4.10, J1- J2, M1- M2, N1-N2).

Com base na literatura revista, este será o primeiro estudo de interação entre fungos causadores do pé negro da videira e os responsáveis pela doença de Petri. Sabendo-se que ambas as doenças afetam severamente materiais de viveiro vitícola e videiras jovens, podendo coexistir na mesma planta (Oliveira *et al.*, 2004), será relevante aprofundar os mecanismos de interação entre estes fungos, tanto *in vitro* como *in planta*.

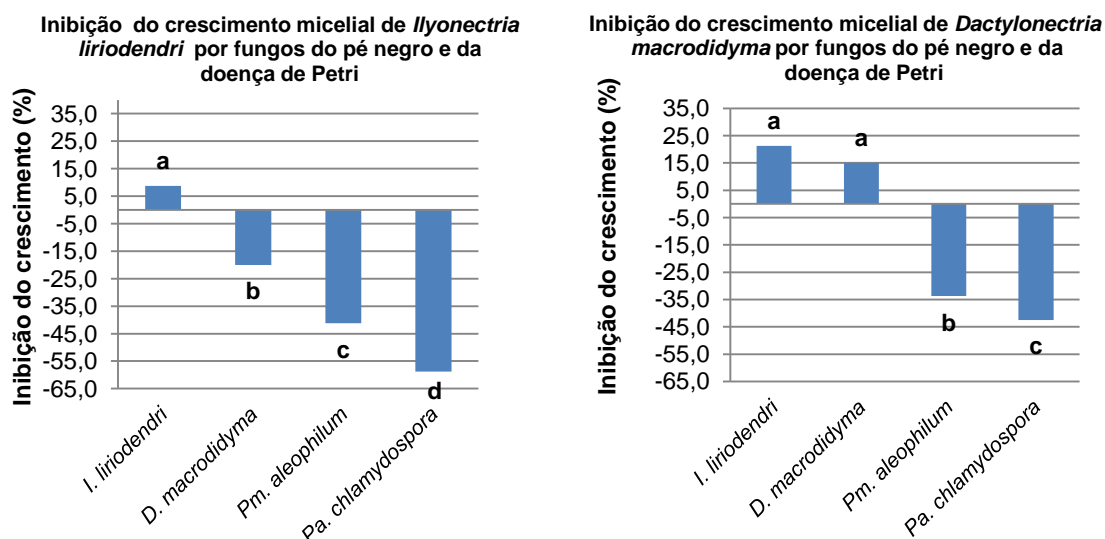


Figura 4.8. Inibição do crescimento micelial de *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com ele mesmo, com outra espécie causadora de pé negro e com fungos responsáveis pela doença de Petri, *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*. As culturas cresceram durante 11 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

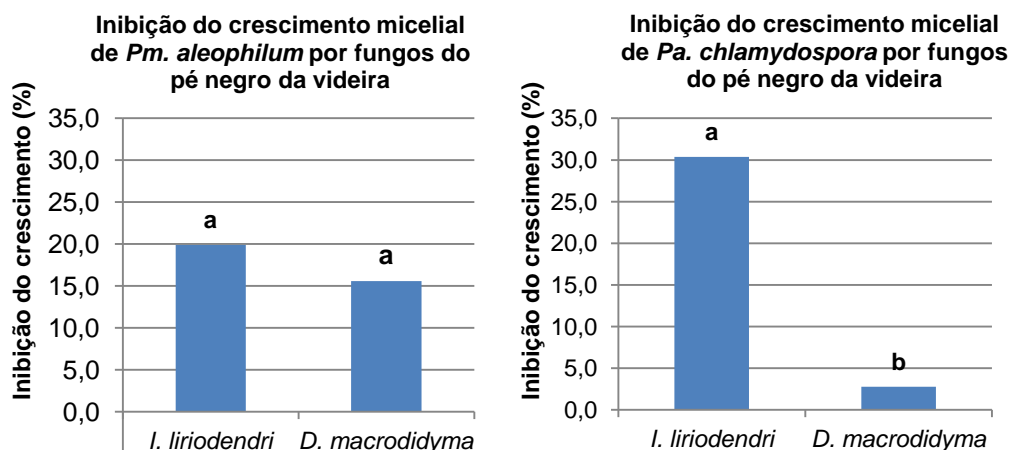


Figura 4.9. Inibição do crescimento micelial de *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, em cultura pareada com *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, decorridos 11 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade, à temperatura de 24 °C. Para cada um dos fungos, letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

Os resultados globais obtidos neste ensaio apontam no sentido do favorecimento do crescimento dos fungos responsáveis pelo pé negro da videira (*Ilyonectria* sp. e *Dactylonectria* sp.), quando presentes os agentes da doença de Petri. Conforme anteriormente referido, a confirmação destes resultados em condições *in planta* deve ser assegurada, tendo em conta a frequência de infeções conjuntas em videira.

Os resultados qualitativos do conjunto de interações observadas no decurso do presente estudo, e que complementam os resultados quantitativos, encontram-se ilustrados na Fig. 4.10 (J1- N2). A discussão dos mecanismos de interação intra- e interespecífica foram abordados ao longo do texto.

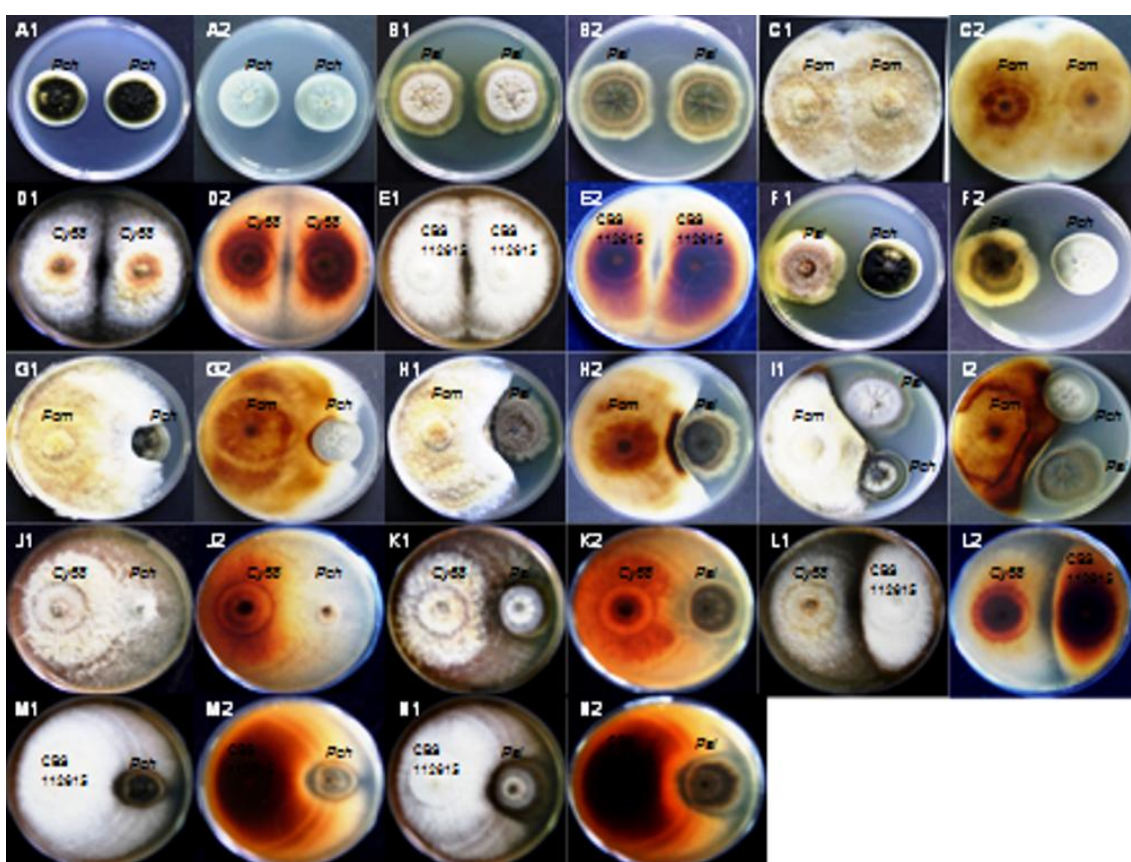


Figura 4.10. Exemplos de interações entre fungos do lenho da videira (A1 (frente) - A2 (verso), *Phaeomoniella chlamydospora* x *Pa. chlamydospora*; B1 (frente) - B2 (verso), *Phaeoacremonium aleophilum* x *Pm. aleophilum*; C1 (frente) - C2 (verso), *Fomitiporia mediterranea* x *F. mediterranea*; D1 (frente) - D2 (verso), *Ilyonectria liriodendri* x *I. liriodendri*; E1 (frente) - E2 (verso), *Dactylonectria macrodidyma* x *D. macrodidyma*; F1 (frente) - F2 (verso), *Pm. aleophilum* x *Pa. chlamydospora*; G1 (frente) - G2 (verso), *F. mediterranea* x *Pa. chlamydospora*; H1 (frente) - H2 (verso), *F. mediterranea* x *Pm. aleophilum* I; I1 (frente) - I2 (verso), *F. mediterranea* x *Pm. aleophilum* x *Pa. chlamydospora*; J1 (frente) - J2 (verso), *I. liriodendri* x *Pa. chlamydospora*; K1 (frente) - K2 (verso), *I. liriodendri* x *Pm. aleophilum*; L1 (frente) - L2 (verso), *I. liriodendri* x *D. macrodidyma*; M1 (frente) - M2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pa. chlamydospora*; N1 (frente) - N2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pm. aleophilum*).

A crescente restrição legal à utilização da luta química no controlo dos inimigos das culturas, por motivos de toxicidade dos produtos para o Homem e para o Ambiente, justifica que se desenvolvam alternativas viáveis aos produtos químicos, baseadas em práticas culturais e também recorrendo a organismos de controlo biológico ou a produtos resultantes do seu metabolismo secundário. Face aos resultados apurados no presente trabalho, os fungos do género *Epicoccum* surgem como promissores agentes de controlo biológico e a merecer estudos mais aprofundados, designadamente a validação *in planta*.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Do presente estudo foi possível extrair as seguintes conclusões principais:

- Os isolados estudados, pertencentes ao género *Epicoccum*, revelaram elevada variabilidade fenotípica e molecular, indicando que, muito provavelmente, *E. nigrum* será um complexo de espécies, com os isolados Epic 6-9 e 15 agrupados de forma distinta dos restantes isolados;
- Alguns dos isolados de *Epicoccum*, em particular Epic 2, 3 e 13 foram capazes de inibir o crescimento micelial de "*Botryosphaeria*" sp., um fungo de crescimento rápido que coloniza o lenho da videira;
- O isolado de *Epicoccum*, Epic 2, inibiu eficazmente o crescimento micelial de *Pa. chlamydospora*, *F. mediterranea* e, em menor extensão o de *Pm. aleophilum*, principais fungos envolvidos no complexo da esca da videira.

Concluiu-se ainda que fungos do género *Ilyonectria* e *Dactylonectria*, agentes causais do pé negro da videira são, aparentemente, favorecidos pela presença de *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum*, responsáveis pelas três síndromes vasculares do complexo da esca, "brown wood streaking", doença de Petri e "leaf stripe disease". Por sua vez, estes últimos fungos, quando interagiram entre si e com *F. mediterranea* revelaram relações complexas, em que numa primeira fase *Pa. chlamydospora* e *Pm. aleophilum* exerceram efeito agonista sobre *F. mediterranea* e, mais tarde, *Pm. aleophilum* veio a comportar-se como antagonista de *F. mediterranea*, o que não aconteceu com *Pa. chlamydospora*.

Tendo em conta as principais conclusões deste estudo, salienta-se a necessidade de estudar mais aprofundadamente o género *Epicoccum*, com o objetivo de identificar novas espécies existentes no complexo *E. nigrum*, o que ajudará a clarificar qual ou quais poderão ser mais úteis como agentes de controlo biológico.

A metodologia usada no presente estudo não permitiu identificar os mecanismos que levam *Epicoccum* sp. a inibir os principais fungos envolvidos no complexo da esca, razão pela qual este estudo deverá ser prosseguido.

Na ausência de meios de luta eficientes para controlar as doenças do complexo da esca, a eventual utilização de *Epicoccum*, ou de metabolitos produzidos por estes fungos, revela-se promissora, mas os efeitos observados deverão ser avaliados *in planta*.

6. REFERÊNCIAS

- Agustí-Brisach, C. & Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* **52**, 245-261.
- Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., Jiménez, J.-G., Armengol, J. (2013). Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **137**, 103-112.
- Alcock, A., Elmer, P., Marsden, R., Parry, F. (2015). Inhibition of *Botrytis cinerea* by epirodin: a secondary metabolite from New Zealand isolates of *Epicoccum nigrum*. *Journal of Phytopathology* **163**, 841-852.
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1829-1845.
- Ammad, F., Benchabane, M., Toumi, M. (2014). Diversity of fungal trunk pathogens associated with grapevine dieback of grapevine in Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences* **7**, 35-39.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* **3**, 1569-1605.
- Antonielli, L., Compant, S., Strauss, J., Sessitsch, A., Berger, H. (2014). Draft genome sequence of *Phaeoconiella chlamydospora* strain RRHG1, a grapevine trunk disease (esca)-related member of the Ascomycota. *Genome Announcements* **2**, 1-2.
- Arenal, F., Platas, G., Martín, J., Asensio, F.J., Salazar, O., Collado, J., Vicente, F., Basilio, A., Ruibal, C., Royo, I., De Pedro, N., Peláez, F. (2002). Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 36-45.
- Arfi, Y., Levasseur, A., Recorda, E. (2013). Differential gene expression in *Pycnoporus coccineus* during interspecific mycelial interactions with different competitors. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 6626-6636.
- Arnold, A.E. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In *Current Trends in Mycological Research*, D. Deshmukh, ed., New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., 49-68.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 165-174.

- Aveskamp, M.M., de Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M., Crous, P.W. (2010). Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* **65**, 1-60.
- Baptista, P., Pereira, E., Tavares, R., Lino-Neto, T. (2011). A importância das interações entre fungos do solo em agroecologia. Actas “*Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*”, Bragança, Portugal, 24 Março 2011, 159-174.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., Smalla, K. (2005). Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4203-4213.
- Bertsch, C., Ramírez-Sueroa, M., Magnin-Robert, M.-M., Larignon, P., Chonga, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., Fontaine, F. (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* **62**, 243–265.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P.E., Cantu, D. (2013). Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. *Genome Announcements* **1**, e00228-13.
- Block, K.L., Rolshausen, P.E., Cantu, D. (2013). In search of solutions to grapevine trunk diseases through “crowd-sourced” science. *Frontiers in Plant Science* **4**, 394.
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 185-194.
- Boddy, L., Frankland, J.C., Van West, P. (eds) (2008). *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Elsevier, Amsterdam.
- Bonnell, B.S. & Levetin, E. (1981). The influence of nutrition on the growth and sporulation of two strains of *Epicoccum nigrum*. *Mycologia* **73**, 238-243.
- Bonnell, B.S. & Levetin, E. (1982). Effect of light on the sporulation of two strains of *Epicoccum nigrum*. *Proceedings of the Oklahoma Academy Science* **62**, 89-90.
- Borgo, M., Pegoraro, G., Sartori, E. (2016). Susceptibility of grape varieties to esca disease. 39th World Congress of Vine and Wine. *Bio Web of Conferences* **7**, 01041.
- Borie, B., Jacquiot, L., Jamaux-Despréaux, I., Larignon, P., Péros, J.P. (2002). Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* **51**, 85-96.
- Bruetz, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teissedre, P.-L., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Meditanea* **52**, 262-275.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS ONE* **9**, e95928.

- Bruez, E., Baumgartner, K., Bastien, Astien, S., Travadon, R., L. Guérin-Dubrana, L., Rey, P. (2016). Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 288-295.
- Bruno, G., Sparapano, L., Graniti, A. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**, 106-124.
- Cabral, A.C.G.P. (2011). *New insights in Ilyonectria black foot disease of grapevine*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa, 255pp.
- Cabral A., J.Z. Groenewald, C. Rego, H. Oliveira and P.W. Crous. (2012a). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress* **11**, 655–688.
- Cabral A., C. Rego, T. Nascimento, H. Oliveira, J.Z. Groenewald and P.W. Crous. (2012b). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology* **116**, 62–80.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea* **48**, 73–83.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves-from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**, 2-9.
- Chandra, S. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**, 47-59.
- Chaverri P., C. Salgado, Y. Hirooka, A.Y. Rossman, G.J. Samuels. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* **68**, 57–78.
- Deacon, J. (2005). Fungal Interactions: Mechanism and Practical Exploitation. *Fungal Biology*. 4th Edição, Blackwell Publishing Ltd., Malden, MA USA, pp 237-255.
- Dharmaputra, O.S., Putri, A.S.R., Retnowati, I., Wati, S. (2003). Effect of three fungal isolates to aflatoxin-producing *Aspergillus* Y/HS/JavHS. *Biotropia* **21**, 19-31.
- Dwivedi, S.K., Sangeeta. (2014). Antagonistic microfungi in management of phytopathogens. In: *Plant Disease Management and Microbes*, Nehra, S. (Ed.). Aavishkar Publishers, Jaipur, 1-41.
- Dix, N.J. & Webster, J. (1995). *Fungal Ecology*. London: Chapman & Hall. 549 p.
- Dubos, B. & Larignon, P. (1988). Esca and black measles: In: *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 34-35.

- Eaton, C.J., Cox, M.P., Scott, B. (2011). What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science* **180**, 190-195.
- Edwards, J., Pascoe, I., Joyce, D., Cottral, E., Taylor, P., Lardner, R., Scott, E., Creaser, M., Sosnowski, M., Wicks, T., Wiechel, T., Cole, M. (2003). Managing grapevine trunk diseases (Petri disease, esca, eutypa dieback and others) that threaten the sustainability of Australian viticulture. Interim Report to Grape and Wine Research and Development Corporation, CRV 99/12.
- Edwards, J. & Pascoe, I.G. (2004). Occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* **33**, 273-279.
- El Amrani, M., Lai, D., Debbab, A., Aly, A.H., Siems, K., Seidel, C., Schneckeburger, M., Gaigneraux, A., Deiderich, M., Feger, D., Wenhan, L., Proksch, P. (2014). Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Natural Products* **77**, 49-56.
- Elmer, P.A.G., Alcock, E.A., Perry, F. (2001). *Epicoccum nigrum* as a biological control and as a source of antimicrobial metabolites. Proceedings of the 13^o Biennial Conference of Australasian Plant Pathology Society, Cairns, p. 339.
- Elmer, P.A.G. & Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**, 155-177.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P. W., Groenewald, J.Z., Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia* **21**, 119-134.
- Fávaro, L.C.L., Melo, F.L., Aguilar-Vildoso, C.I., Araújo, W.L. (2011). Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE* **6**, e14828.
- Fávaro, L.C.L., Sebastianes, F.L.S, Araújo, W.L. (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE* **7**, e36826.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Ferreira, J.H.S., Van Wyk, P.S., Calitz, F.J. (1999). Slow dieback of grapevine in South Africa: Stress-related predisposition of young vines for infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. *South African Journal of Enology and Viticulture* **20**, 43-46.
- Fischer, M. & Kassemeyer, H.H. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* **42**, 109-116.

- Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J.M., Roblin, G. (2010). Diagnosis of grapevine esca disease by immunological detection of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 455-463.
- Fleurat-Lessard, P., Bourbouloux, A., Thibault, F., Ménard, E., Béré, E., Valtaud, C., Roblin, G. (2013). Differential occurrence of suberized sheaths in canes of grapevines suffering from black dead arm, esca or Eutypa dieback. *Trees* **27**, 1087-1100.
- Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A.C., Spagnolo, A. (2015). The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology* **144**, 707-721.
- Gali, Z.I.-E. (2015). Antagonism capability in vitro of *Trichoderma harzianum* against *Alternaria alternata* on *Ceratonia siliqua*. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* **2**, 30-44.
- González, V. & Tello, M.L. (2010). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* **47**, 29-42.
- Gramaje, D., Armengol, J., Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Mostert, L. (2009). Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia* **101**, 920-929.
- Gramaje, D., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2010). Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *American Journal of Enology and Viticulture* **61**, 512-520.
- Gramaje, D. & Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: Potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease* **95**, 1040-1055.
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2015). *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology* **119**, 759-783.
- Gramaje, D. (2016). Uso de la termoterapia con agua caliente para el control de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid. *Vida Rural*, 48-57.
- Graniti, A., Surico, G., Mugnai, L. (2000). Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 16-20.
- Guan, X., Essakhi, S., Laloue, H., Nick, P., Bertsch, C., Chong, J. (2015). Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: a focus on *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *Plant Pathology* **65**, 273-284.
- Gubler, W.D., Thind, T.S., Feliciano, A.J., Eskalen, A., (2004). Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 70-74.

- Gubler, W.D., Rolshausen, P.E., Trouillase, F.P., Úrbez-Torres, J.R., Voegel, T. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery & Vineyard*, 1-9.
- Hewitt, S.K., Foster, D.S., Dyer, P.S., Avery, S.V. (2016). Phenotypic heterogeneity in fungi: Importance and methodology. *Fungal Biology Reviews* **30**, 176-184.
- Heydari, A. & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Science* **10**, 273-290.
- Hiscox, J., Baldrian, P., Rogers, H.J., Boddy, L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 562-571.
- Hiscox, J., Savoury, M., Vaughan, I.P., Müller, C.T., Boddy, L. (2014). Antagonistic fungal interactions influence carbon dioxide evolution from decomposing wood. *Fungal Ecology* **14**, 24-32.
- Hiscox, J., Clarkson, G., Melanie Savoury, M., Georgina Powell, G., Savva, I., Lloyd, M., Shipcott, J., Choimes, A., Cumbriu, X.A., Boddy, L. (2016). Effects of pre-colonisation and temperature on interspecific fungal interactions in wood. *Fungal Ecology* **21**, 32-42.
- Hjeljord, L. & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: An overview. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London: Taylor and Francis Ltd.; Vol. 2, 131-151.
- Hofstetter, V., Bart, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* **54**, 51-67.
- Howitz, K.T. & Sinclair, D.A. (2008). Xenohormesis: Sensing the chemical cues of other species. *Cell* **133**, 387-391.
- Jensen, B.D., Knorr, K., Nicolaisen, M. (2016). In vitro competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoccum nigrum* on media and wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* **146**, 657-670.
- Kilpatrick, J.A. & Chilvers, G.A. (1981). Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. *Transaction of the British Mycological Society* **77**, 497-508.
- Kogel, K.H., Franken, P., Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite-what decides? *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 358-363.
- Kortekamp, A. (1997). *Epicoccum nigrum* Link: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis* **36**: 215–216.
- Kotze, C., Niekerk, J. V., Mostert L., Halleen F., Fourie, P. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, **50**, Supplement, pp. S247–S263.

- Kozyrovskaya, N.O. (2013). Crosstalk between endophytes and a plant host within information processing networks. *Biopolymers and Cell* **29**, 234-243.
- Kumar, D.S.S. & Hyde, K.D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* **17**, 69-90.
- Kuntzmann, P., Villaume, S., Larignon, P., Bertsch, C. (2010). Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis* **49**, 71-76.
- Kusari, S., Hertweck, C., Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* **19**, 792- 798.
- Landi, L., Murolo, S., Romanazzi, G. (2009). Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeoemoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology* **102**, 290-297.
- Larignon, P. & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 147-157.
- Larignon P. & Dubos, B. (2001). The villainy of Black dead arm. *Wines & Vines* **3**, 86-89.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L., Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S336-S342.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C. (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus Biologies* **332**, 765-783.
- Lecomte, P., Darrieutort, D., Liminana, J.-M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F. J., Choueiri, E., Jreijiri, F., Amil, R.E., 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.
- Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M., Vaillant-Gaveau, N., Clément, C., Fontaine, F. (2010). Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology* **100**, 424-431.
- Li, S.M. (2009). Evaluation of aromatic phenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry* **70**, 1746-1757.
- Lima, M.R.M., Felgueira, M.L., Graça, G., Rodrigues, J.E.A., Barros, A., Gil, A.M., Dias, A.C.P. (2010). NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4033-4042.
- Lombard, L., Van Der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2014). Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* **53**, 515-532.

- Lorrain, B., Ky, I., Pasquier, G., Jourdes, M., Dubrana, L.G., Gény, L., Rey, P., Donèche, B., Teissedre, P.L. (2012). Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**, 64-72.
- Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G., Berjeaud, J.-M. (2010). Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 403-411.
- Madrigal, C., Tadeo, J.L., Melgarejo, P. (1991). Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research* **95**, 1375-1381.
- McLean, T., Fourie, P.H., McLeod, A. (2009). Reporter gene transformation of the trunk disease pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* and biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Australasian Plant Pathology* **38**, 153-167.
- Magnin- Robert, M.-M, Spagnolo, A., Alayi, T. D., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., Dorselaer, A. V., Clément, C., Fontaine, F. (2014). Proteomic insights into changes in grapevine wood in response to esca proper and apoplexy. *Phytopathologia Mediterranea* **53**, 168-187.
- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., Osler, R. (2009). DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease* **93**, 993-998.
- Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D., Armengol, J. (2013). Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* **15**, 137-150.
- Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* **83**, 404-418.
- Mundy, D.C. & Manning, M.A. (2010). Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand: a review. *New Zealand Plant Protection* **63**, 160-166.
- Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F., Mostert, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, S264-S276.
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M., Mostert, L. (2016). Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology* **65**, 104–113.
- Newsome, J. (2012). Grapevine Trunk Diseases. http://www.englishwine.com/newsome_trunk_diseases_review_july_2012.pdf.

- Niekerk, J.M.V., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* **45**, S43-S54.
- Oliveira, H., Rego, C., Nascimento, T. (2004). Decline of young grapevine caused by fungi. *Acta Horticulturae* **652**, 295-304.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, S., Pertot, I., Campisano, A. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4308-4317.
- Parrent, J.L., James, T.Y., Vasaitis, R., Taylor, A.F.S. (2009). Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 148.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* **76**, 51-167.
- Pierron, R.J.G., Pouzoulet, J., Couderc, C., Judic, E., Compant, S., Jacques, A. (2016). Variations in early response of grapevine wood depending on wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 268.
- Pinto, P. (2010). Doença de Petri da videira: Avaliação da eficácia de fungicidas na protecção de feridas de poda. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa, 69pp.
- Porras-Alfaro, A. & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review Phytopathology* **49**, 291-315.
- Pouzoulet, J., Pivovarov, A.L., Santiago, L.S., Rolshausen, P.E. (2014). Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutchelm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, **5**(253), 1-11.
- Radíc, N. & Strukelj, B. (2012). Endophytic fungi — The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine* **19**, 1270-1284.
- Rajesh, P.S. & Rai, V.R. (2013). Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2**, 120-124.
- Rego, M. C. (1994). Nova e grave micose da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten. Publ. Lab. Pat. Veg. Veriss. Almeida 67.
- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., Phillips, A., (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 26-34.

- Rego, C. (2004). Estudo e caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal “Verissimo de Almeida” – Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa, 228 pp.
- Rego, C., Oliveira, H., Sofia, J. (2012). Principais doenças parasitárias da videira. In *Manual Bayvitis: a fitossanidade da videira*, pp. 58-71.
- Reis, P., Pajot, E., Rego, C. (2016). *Trichoderma atroviride* strain I-1237: Colonization of Pruning Wounds Against Grapevine Wood Diseases. 10^o Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Portugal, 4-6 de Maio 2016, 1-11.
- Rolshausen, P.E., Úrbez-Torres, J.R., Rooney-Latham, S., Akif, E., Smith, R.J., Guble, W.D. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture* **61**, 113-119.
- Rotheray, T.D., Chancellor, M., T.H., Jones, Boddy, L. (2010). Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecology* **4**, 42-55.
- Schol-Shawar, M.B. (1959). The genus *Epicoccum*. *Transaction of the British Mycological Society* **42**, pp. 149-173.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are endophytes? In *Microbial Root Endophytes*, Vol. 9 of the series Soil Biology, B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T. N. Sieber (eds), Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-13.
- Silar, P. (2012). Hyphal Interference: self versus non-self fungal recognition and hyphal death. In *Biocommunication of Fungi*, G. Witzany (ed.), Springer Netherlands, pp.155-170.
- Slippers, B. & Wingfield, M.J. (2007). Review: Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**, 90-106.
- Spagnolo, A., Magnin-Robert, M., Alayi, T. D., Cilindre, C., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Clément, C., Larignon, P., Ramirez-Suero, M., Chong, J., Bertsch, C., Abou-Mansour, E., Fontaine, F. (2014). Differential responses of three grapevine cultivars to *Botryosphaeria* dieback. *Phytopathology* **104**, 1021-1035.
- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A., (2000a). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 46-52.
- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A., (2000b). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interactions among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 53-58.

- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A., (2000c). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeacremonium chlamyosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* **39**, 169-177.
- Sparapano, L., Bruno, G., Campanella, A. (2001). Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S417–S422.
- Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y., Stewart, A. (2003). Review: Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **31**, 281-291.
- Stewart, A., Brownbridge, M., Hill, R.A., Jackson, T.A. (2010). Utilizing soil microbes for biocontrol. *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. G.R. Dixon and E.L. Tilston (eds), Springer Netherlands, pp. 315-371.
- Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* **45**, S68–S86.
- Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2008). The esca disease complex. In *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*, A. Ciancio and K.G. Mukerji (eds), Springer Netherlands, pp. 119-136.
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **48**, 5-10.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary 16 genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Travadon, R., Rolshausen, P. E., Gubler, W. D., Cadle-Davidson, L., Baumgartner, K. (2013). Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease* **12**, 1529–1536
- Travadon, R., Lawrence, D.P., Latham-Rooney, S., Gubler, W.D., Wilcox, W.F., Rolshausen, P.E., Baumgaetner, K. (2014). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology* **119**, 53-66.
- Tripathi, A., Sharma, N., Tripathi, N. (2010). Biological Control of Plant Diseases: An overview and the *Trichoderma* system as biocontrol agents. *Management of Fungal Plant Pathogens*, A. Arya & A.E. Perelló (eds.), 121-137.
- Tuininga, A. R. 2005. Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. In *The Fungal Community, Its Organization and Role in the Ecosystem*, 3rd ed. Dighton, J., Oudemans, P. and J. White (eds.) CRC Press, New York, pp. 265–283.

- Ujor, V.C. (2010). The physiological response of the white-rot fungus, *Schizophyllum commune* to *Trichoderma viride*, during interspecific mycelial combat. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Filosofia da Universidade de Westminster, 279 pp.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M., Gubler, W.D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* **90**, 1490-1503.
- Úrbez-Torres, J.R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, S5-S45.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., Gubler, W. D. (2013). Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease* **97**, 1571-1579.
- Úrbez-Torres, J.R., Haag, P., Bowen, P., O’Gorman, D.T. (2014). Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. *Plant Disease* **98**, 469-482.
- Van Elsas, J. D., & Costa, R. (2007). Molecular assessment of microbial communities in soil - significance for assessing the potential of soil to suppress phytopathogens. In *Biotechnology and Plant Disease Management*, Z. H. Punja, Z.H., S. H. de Boer, & H. Sanfacon (eds.), 498-517.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* **91**, 37-51.
- Vujanovic, V., Mavragani, D., Hamel, C. (2012). Fungal communities associated with durum wheat production system: A characterization by growth stage, plant organ and preceding crop. *Crop Protection* **37**, 26-34.
- Wang, X., Zhang, X., Liu, L., Xiang, M., Wang, W., Sun, X., Che, Y., Guo, L., Liu, G., Guo, L., Wang, C., Yin, W.-B., Stadler, M., Zhang, X., Liu, X. (2015). Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici* reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. *BMC Genomics* **16**, 28.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**, S1, 487-511.
- Woodward, S. & Boddy, L. (2008). Interactions between saprotrophic. In *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. L Boddy, JC Frankland, P Van West (eds), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, Vol. 28, 125-141.

Wunderlich, N., Ash, G.J., Steel, C.C., Raman, H., Savocchia, S. (2011). Association of Botryosphaeriaceae grapevine trunk disease fungi with the reproductive structures of *Vitis vinifera*. *Vitis* **50**, 89-96.

<https://en.wikipedia.org/> (consultado em 22/04/2014).

<https://www.mycobank.org/> (consultado em 30/03/2014).

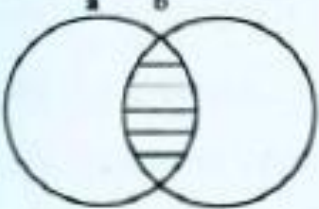

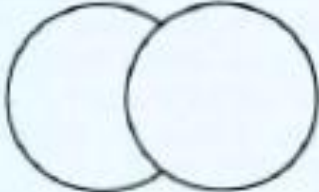



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (consultado em 11/04/2016).

<https://www.oekolandbau.de/> (consultado em 04/02/2017).

ANEXO A

Tipos de interações entre duas colónias fúngicas, adaptado de Dharmaputra *et al.*, 2003

Quadro A - Tipos de interações entre duas colónias fúngicas, adaptado de Dharmaputra *et al.*, 2003

Tipo de Interação	Descrição da Classificação
<p>A</p>	<p>Crescimento mútuo intermingling, cada fungo cresce em direção ao outro, sem apresentar sinal de interação macroscópica</p> 
<p>B</p>	<p>Inibição mútua por contato ou espaço entre pequenas colónias (< 2 mm)</p> 
<p>C</p>	<p>Inibição por contato de uma das espécies, a espécie inibida continua a crescer a uma taxa significativamente reduzida e espécie inibidora cresce a uma taxa ligeiramente reduzida</p> 
<p>D</p>	<p>Inibição mútua por distância (> 2 mm)</p> 
<p>E</p>	<p>Inibição por contato de uma das espécies, a espécie inibidora continua a crescer a uma taxa reduzida através da colónia inibida</p> 
<p>F</p>	<p>Inibição por contato ou distância de uma das espécies, a espécie inibidora continua a crescer a uma taxa constante através ou por cima da colónia inibida</p> 

a= espécies inibidoras; **b**= espécies inibidas

ANEXO B

Ensaio de crescimento micelial de uma coleção de fungos do género *Epicoccum* em diferentes meios de cultura (diâmetro das colónias, cm)

Quadro B.1. Análise da Variância (a) do diâmetro das colônias de *Epicoccum* sp. em meio gelosado de batata dextrosada (PDA) e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	940,2240	1	940,2240	6339,657	0,00
Dentro dos grupos	166,5797	15	11,1053	74,880	0,00
Total	4,7459	32	0,1483		

b) Comparação de Médias

Isolado de <i>Epicoccum</i>	Diâmetro médio das colônias (cm)	Grupo homogêneo
Epic 13	7,3	a
Epic 5	6,8	ab
Epic 3	6,5	abc
Epic 4	6,2	bc
Epic 16	6,0	bc
Epic 11	5,9	bc
Epic 14	5,4	cd
Epic 2	4,8	d
Epic 9	4,6	d
Epic 10	3,1	ef
Epic 1	2,7	ef
Epic 7	2,7	ef
Epic 8	2,5	ef
Epic 12	2,4	ef
Epic 6	2,0	ef
Epic 15	1,8	f

Quadro B.2. Análise da Variância (a) do diâmetro das colônias de *Epicoccum* sp. em meio gelosado de Extrato de Malte e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	1186,637	1	1186,637	12154,02	0,00
Dentro dos grupos	134,919	15	8,995	92,13	0,00
Total	3,124	32	0,098		

b) Comparação de Médias

Isolado de <i>Epicoccum</i>	Diâmetro das colônias (cm)	Grupo homogêneo
Epic 3	7,7	a
Epic 16	6,9	ab
Epic 13	6,9	ab
Epic 8	6,5	bc
Epic 4	6,0	bcd
Epic 11	6,0	bcd
Epic 5	5,7	cd
Epic 2	5,4	d
Epic 9	5,3	d
Epic 12	5,2	d
Epic 10	3,8	e
Epic 14	3,5	ef
Epic 6	3,0	efg
Epic 7	2,7	fg
Epic 15	2,5	g
Epic 1	2,5	g

Quadro B.3. Análise da Variância (a) do diâmetro das colônias de *Epicoccum* sp. em meio gelosado de Czapeck-Dox e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	1491,424	1	1491,424	5898,843	0,00
Dentro dos grupos	226,128	15	15,075	59,625	0,00
Total	8,091	32	0,253		

b) Comparação de Médias

Isolado de <i>Epicoccum</i>	Diâmetro das colônias (cm)	Grupo homogêneo
Epic 9	8,0	a
Epic 16	8,0	a
Epic 3	8,0	a
Epic 2	7,5	a
Epic 5	7,4	a
Epic 11	7,2	a
Epic 13	7,2	a
Epic 4	6,8	ab
Epic 10	5,6	bc
Epic 7	4,9	cd
Epic 12	4,3	cde
Epic 8	3,8	de
Epic 14	3,4	ef
Epic 1	3,3	ef
Epic 6	2,0	fg
Epic 15	1,5	g

Quadro B.4. Análise da Variância (a) do diâmetro das colônias de *Epicoccum* sp. em meio gelosado de Oatmeal e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	1603,372	1	1603,372	20366,75	0,00
Dentro dos grupos	92,628	15	6,175	78,44	0,00
Total	2,519	32	0,079		

b) Comparação de Médias

Isolado de <i>Epicoccum</i>	Diâmetro das colônias (cm)	Grupo homogêneo
Epic 4	7,7	a
Epic 9	7,7	a
Epic 3	7,6	a
Epic 2	7,1	ab
Epic 5	7,1	ab
Epic 11	6,8	abc
Epic 8	6,5	bc
Epic 16	6,2	cd
Epic 13	5,5	d
Epic 12	4,6	e
Epic 6	4,5	e
Epic 1	4,4	e
Epic 7	4,3	e
Epic 15	4,3	e
Epic 14	4,2	e
Epic 10	3,9	e

ANEXO C

Interação entre fungos patogênicos do lenho da videira

Interação *Epicoccum* versus BOTRYOSPHAERIAEAE

Quadro C.1. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de “*Botryosphaeria*” sp. em ensaios de antagonismo com *Epicoccum* spp. e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	SS	Degr. of	MS	F	<i>p</i>
Entre grupos	1409,511	1	1409,511	158,7434	0,000000
Dentro do grupo	719,677	15	47,978	5,4035	0,000870
Erro	142,067	16	8,879		

b) Comparação de Médias

Isolado de <i>Epicoccum</i>	Inibição (%)	Grupo homogéneo
Epic 3	14,23	a
Epic 13	13,88	a
Epic 2	10,80	a
Epic 12	10,03	ab
Epic 4	9,01	ab
Epic 8	7,24	ab
Epic 5	6,98	ab
Epic 11	6,89	ab
Epic 16	6,75	abc
Epic 9	6,27	abc
Epic 7	6,22	abc
Epic 15	6,01	abc
Epic 14	5,11	abc
Epic 10	3,01	abc
Epic 1	-1,19	bc
Epic 6	-5,07	c

Interação *Epicoccum* versus fungos responsáveis pela esca da videira

Quadro C.2.1. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sp. em ensaios de antagonismo com *Epicoccum* spp. e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$), ao fim de 7 dias de incubação.

a) ANOVA – 7 dias

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	2249,422	1	2249,422	16,60835	0,001539
Dentro dos grupos	2073,561	2	1036,781	7,65495	0,007197
Total	1625,271	12	135,439		

b) Comparação de Médias – 7 dias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogéneo
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	24,59	a
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	15,71	ab
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	-3,57	b

Quadro C.2.2. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sp. em ensaios de antagonismo com *Epicoccum* spp. e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$), ao fim de 14 dias de incubação.

a) ANOVA – 14 dias

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	19182,83	1	19182,83	812,3485	0,000000
Dentro dos grupos	2183,29	2	1091,64	46,2286	0,000002
Total	283,37	12	23,61		

b) Comparação de Médias – 14 dias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogêneo
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	42,71	a
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	45,78	a
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	18,79	b

Interação entre fungos responsáveis pela esca da videira

Quadro C.3.1. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Fomitiporia mediterranea* por *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	5147,509	1	5147,509	110,4202	0,000002
Dentro dos grupos	5360,088	2	2680,044	57,4901	0,000007
Total	419,557	9	46,617		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogêneo
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	6,39	a
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	-23,349	b
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	-45,189	c

Quadro C.3.2. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora* por *Fomitiporia mediterranea* e *Phaeoacremonium aleophilum*, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	1125,857	1	1125,857	6,41760	0,032061
Dentro dos grupos	3789,067	2	1894,534	10,79921	0,004059
Total	1578,894	9	175,433		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogêneo
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	-5,19	a
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	-0,42	a
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	34,66	b

Quadro C.3.3. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phaeoacremonium aleophilum* por *Phaeomoniella chlamydospora* e *Fomitiporia mediterranea*, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	562,4014	1	562,4014	32,51101	0,000294
Dentro dos grupos	508,7175	2	254,3587	14,70384	0,001460
Total	155,6892	9	17,2988		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogéneo
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	9,36	a
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	13,26	a
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	-2,08	b

Interação entre fungos responsáveis pela doença de Petri e o pé negro da videira

Quadro C.4.1. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Ilyonectria liriodendri* em ensaios de antagonismo com fungos responsáveis pelo pé negro e pela doença de Petri da videira, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	12376,56	1	12376,56	365,5846	0,000000
Dentro dos grupos	10142,19	3	3380,73	99,8615	0,000000
Total	406,25	12	33,85		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogéneo
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	8,75	a
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	-20,00	b
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	-41,25	c
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	-58,75	d

Quadro C.4.2. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Dactylonectria macrodidyma* em ensaios de antagonismo *in vitro* com fungos responsáveis pelo pé negro e pela doença de Petri da videira, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	SS	Degr. of	MS	F	p
Entre grupos	1600,00	1	1600,000	170,6667	0,000000
Dentro do grupo	12887,50	3	4295,833	458,2222	0,000000
Erro	112,50	12	9,375		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogéneo
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	21,2500	a
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	15,0000	a
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	-33,7500	b
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	-42,5000	c

Quadro C.4.3. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phaeomoniella chlamydospora* em ensaios de interação com os fungos do pé negro, e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	2195,846	1	2195,846	11,08025	0,015832
Dentro dos grupos	1521,243	1	1521,243	7,67620	0,032397
Total	1189,059	6	198,176		

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogêneo
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	30,36	a
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	2,78	b

Quadro C.4.4. Análise da Variância (a) da percentagem de inibição do crescimento micelial de *Phaeoacremonium aleophilum* em ensaios de interação com fungos do pé negro e comparação das médias (b) pelo teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$).

a) ANOVA

Fonte de variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F	p
Entre grupos	2514,050	1	2514,050	74,08219	0,000135
Dentro dos grupos	37,293	1	37,293	1,09893	0,334880
Total	203,616	6	33,936		

Não significativo.

b) Comparação de Médias

Fungo	Inibição (%)	Grupo homogêneo
<i>Ilyonectria liriodendri</i>	19,89	a
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	15,57	a

ANEXO D

Composição dos meios de cultura usados para a caracterização cultural dos isolados do género *Epicoccum*

Anexo D - Composição dos meios de cultura usados para a caracterização cultural dos isolados do género *Epicoccum*

Meio de cultura	Composição
gelose de batata dextrosada (PDA)	amido de batata 4% (p/v), dextrose 20% (p/v), agar 15% (p/v)
gelose de extrato de malte (Malt Extract Agar – MEA)	maltose 12,75% (p/v), dextrina 2,75% (p/v), glicerol 2,35% (p/v), peptona 0,78% (p/v), agar 15% (p/v)
gelose de aveia (Oatmeal agar – AO)	aveia 60% (p/v), agar 12,5% (p/v),
gelose de Czapeck-Dox (Czapeck-Dox)	nitrito de sódio 2% (p/v), cloreto de potássio 0,5% (p/v), glicerofosfato de magnésio 0,5% (p/v), sulfato ferroso 0,01% (p/v), sulfato de potássio 0,35% (p/v), sucrose 30% (p/v)