

# **Identificação da micoflora associada à cortiça crua com o defeito da “mancha amarela”**

**Sandra Maria Ferreira Veloso**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
**Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais**

Orientador: Maria Helena Pires Bragança

Co-orientador: Ana Paula Ferreira Ramos

## **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Professora  
Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Helena Pires Bragança, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional  
de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Doutor José Pedro Viegas Fernandes



## ERRATA

página		onde se lê	deve ler-se
<b>20</b>	ultimo parágrafo	em gel de agarose a 1% em tampão <b>50x</b> TAE (Tris-Acetato-EDTA)	em gel de agarose a 1% em tampão <b>1x</b> TAE (Tris-Acetato-EDTA)
<b>60</b>	no Anexo 1	<i>Alternaria</i> sp.Nees <i>Aspergillus</i> sp.Fr.:Fr.	<i>Alternaria</i> sp.Nees <i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm <i>Aspergillus</i> sp.Fr.:Fr.

À memória de meu pai.

À minha mãe e ao meu irmão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que direta e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Agradeço especialmente a:

Direção da Unidade Industrial de Salteiros, Amorim Florestal, S.A.

Diretora da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Presidência do Instituto de Investigação Científica Tropical, I.P.

Doutora Helena Bragança

Doutora Ana Paula Ramos

Doutora Ana Magro

Doutor José Pedro Fernandes

Doutor Luís Bonifácio

Eng.º Eugénio Diogo

Eng.ª Clara Fernandes

Mestre Joana Henriques

Florinda Medeiros

Marina Soares

Também agradeço aos colegas de trabalho: Maria João Barrento, Isabel Rodrigues e a Márcia Silva.

Finalmente, agradeço ao Alberto e à minha mãe.

## RESUMO

Este estudo visa comprovar a relação entre os fungos presentes na “mancha amarela” (MA), um defeito sensorial da cortiça, e a presença de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), considerado o principal responsável pelo “gosto a rolha” em vinhos engarrafados. A presença de MA na cortiça, empiricamente relacionada com o TCA, é responsável por perdas consideráveis na indústria de cortiça. Os fungos filamentosos são apontados como os principais responsáveis pelo TCA, mas relativamente à MA, à sua origem e à sua relação com o TCA, muito pouco se sabe.

Foram recolhidas amostras de cortiça com e sem MA em diferentes regiões do País, para cada amostra foi determinado o valor de TCA por cromatografia gasosa e obtidos os isolados fúngicos. Os isolados foram agrupados de acordo com as suas características morfológicas. Para confirmação da identificação específica foram selecionados isolados para sequenciação da região ITS do DNA Ribossomal.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a relação entre MA e TCA e permitem verificar que fungos do género *Trichoderma*, estão associados ao defeito “mancha amarela”.

Palavras-chave: isolados; "gosto a rolha", 2,4,6-tricloroanisol; *Trichoderma* sp.

## ***Identification of the mycoflora associated with raw cork with "yellow spot"***

### **ABSTRACT**

This study aims to establish the relationship between the fungi present in the "yellow spot" (MA), a sensory defect of cork, and the presence of 2,4,6-trichloroanisole (TCA), considered the main responsible for "cork taint" in bottled wines. The presence of MA in cork, empirically related to TCA is responsible for considerable losses in the cork industry. The filamentous fungi are indicated as the main responsible for the TCA, but in respect of MA, its origin and its relationship with the TCA, very little is known.

Cork samples with and without MA were collected in different regions of the country, for each sample was determined by the value of TCA by gas chromatography and obtained fungal isolates. The isolates were grouped according to their morphological characteristics. To confirm the specific identification of isolates were selected for sequencing of the ITS region of the ribosomal DNA.

The results of this study confirm the relationship between MA and TCA and allowed prediction of fungi of the genus *Trichoderma* are associated with the default "yellow spot".

Keywords: isolates; "cork taint", 2,4,6-trichloroanisole; *Trichoderma* sp.

## EXTENDED ABSTRACT

This study characterized the diversity of microfungi on cork with "yellow spot" and its relationship with TCA values.

Planks were collected from ten different regions of the country: the Península of Setúbal; Baixo Alentejo; Alentejo Litoral; Alto Trás-os-montes; Médio Tejo; Lezíria do Tejo; Alentejo Central; Douro; Beira Interior Sul e Alto Alentejo. In each zone the following data were collected through a survey: soil type, whether or not grazing, cattle type, slope, moisture, sub-covered, density, average age of the oaks, mortality, and presence of "cobrilha".

For each region planks with and without the defect of "yellow spot" were chosen and the values of TCA were quantified by gas chromatography.

We proceeded to the fungi isolation from each sample. The isolates were grouped according to their morphological characteristics. Thus groups were created, with the exception of the Mucorales group, according to the genus and species. The group of the genus *Trichoderma* was considered an important group and, therefore, we proceeded to his monosporic isolation.

For the identification observation under the magnifying glass and the microscope were carried out. To identify the different species we preceded using molecular biology and the group of the genus *Penicillium* sp. proceeded to their identification using molecular biology and morphological characterization based on taxonomic keys.

Thirteen genera belonging to the Phylum Ascomicota were identified, six genera of the order Hypocreales, two genera of the order Eurotiales, a genus of the order Onygenales (*Histoplasma* sp.), a genus of the order Pleosporales (*Alternaria* sp.), a genus of the order Xylariales (*Biscogniauxia* sp.), a genus of the order Sordiales (*Crysonilia* sp.) and lastly, a genus of the order Diaphorthales (*Cryphonectria* sp.).

Twelve species were identified, six of them belonging to *Trichoderma* sp. and six belonging to *Penicillium* sp. by sequencing of the ITS region.

The values of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) were determined by Gas Chromatography.

After obtaining the results we conclude that the genus *Trichoderma* is associated with the presence of the defect "yellow spot".

After obtaining the results we conclude that the "yellow spot" is associated with the presence of TCA.

Was also developed an exploratory study to identify factors that field could be related to the TCA and the mycoflora associated with MA. The results revealed the sub-covered and humidity of the plot as the most influential variables in TCA and mycoflora of the samples respectively.

## Índice

I -Lista de Quadros .....	I
II - Lista de Figuras .....	II
II – Lista de abreviaturas .....	III
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O sobreiro e a cortiça .....	1
1.1.1. Estrutura e composição química da cortiça .....	5
1.1.2. Defeitos da cortiça .....	7
1.2. Problemas da indústria da rolha de cortiça, 2,4,6-tricloroanisol e gosto do vinho.....	8
1.3. Fungos associados ao 2,4,6-tricloroanisol /mancha amarela .....	10
1.4. Sistemas de informação geografia.....	11
1.5. Objetivos do trabalho .....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Seleção e recolha de amostras de cortiça .....	13
2.2. Determinação dos valores de 2,4,6-tricloroanisol por Cromatografia Gasosa .....	15
2.3. Isolamento de fungos .....	17
2.4. Identificação de fungos .....	19
2.4 1. Identificação com base em características morfológicas .....	19
2.4 2. Identificação molecular .....	20
2.5 Sistemas de informação geografia.....	21
2.6. Análise estatística .....	22

3. RESULTADOS .....	23
3.1. Valores de TCA .....	23
3.2. Isolados das amostras .....	28
3.3. Caracterização das espécies identificadas .....	39
3.4. Enquadramento geográfico (SIG) .....	46
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
6. ANEXOS.....	58

## Índice de Quadros

Quadro 1 - Composição química média da cortiça virgem e da cortiça amadia de 10 árvores de uma região .....	6
Quadro 2 - Sistema de projeção e o sistema de coordenadas.....	21
Quadro 3 - Valores de TCA por cada amostra.....	23
Quadro 4 - Resultados dos testes não paramétricos para avaliar a variação dos níveis de TCA relativamente às variáveis recolhidas nas fichas de campo.....	26
Quadro 5 - Resultados dos testes não paramétricos para avaliar a variação dos níveis de TCA relativamente às variáveis resultantes da avaliação laboratorial das amostras.....	27
Quadro 6 - Géneros ou espécies dos isolados .....	28
Quadro 7 - Número de ocorrência das amostras .....	32
Quadro 8 - Descrição das colónias dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
Quadro 9 - Descrição das 5 diferentes colónias do género <i>Penicillium</i> .....	44
Quadro 10 - Dados biométricos das estruturas de 5 espécies do género <i>Penicillium</i> .....	45

## Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição mundial do Sobreiro.....	2
Figura 2 - Evolução das áreas totais por espécie florestal.....	3
Figura 3 - Evolução das Exportações Portuguesas de Cortiça 2001-2012 .....	3
Figura 4 - Alteração da área de sobreiro 1995-2010. Relatório INF6.Fonte ICNF..	4
Figura 5- Os fungos filamentosos permitem a transformação do TCP em TCA.....	9
Figura 6 A - Mapa de distribuição do sobreiro em Portugal .....	13
Figura 6 B Regiões de proveniência das amostras.....	13
Figura 7 - Pranchas de cortiça com mancha amarela (MA) .....	14
Figura 8 - Amostra controlo sem MA .....	14
Figura 9 - Aparas de cortiça com MA de onde foram cortados os pedaços para determinação dos valores de TCA.....	15
Figura 10 - Frascos com os pedaços de cortiça cortados em solução de etanol a 12%..	16
Figura 11 - Cromatógrafo Gasoso - CG.....	17
Figura 12 - Placa de Petri contendo meio gelosado - PDA, com as três sub-amostras extraídas da cortiça e início da formação das colónias dos fungos. ....	18
Figura 13 - Valores de TCA por cada amostra e suas correspondentes regiões: ...	24
Figura 14 - Histograma de distribuição de frequências dos valores das leituras de TCA das amostras de cortiça. ....	25
Figura 15 - Valores de TCA no sub-coberto com matos e limpo por amostra.....	27

Figura 16 – Colônias de diferentes isolados, a 25°C, na ausência de luz.....	30
Figura 17 - Frequência de ocorrências (em porcentagem) dos isolados das amostras nas diferentes regiões do país .....	31
Figura 18 - Ocorrência do gênero <i>Trichoderma</i> (%) por amostra.....	34
Figura 19 - Valores de TCA por ocorrência do gênero <i>Trichoderma</i> (%) e por amostra.....	35
Figura 20 - Porcentagem de ocorrência de <i>Trichoderma</i> spp. nas amostras .....	37
Figura 21- Porcentagem de ocorrência de <i>Penicillium</i> spp. nas amostras.....	38
Figura 22 - Taxa de crescimento (cm) do <i>Trichoderma</i> spp.....	42
Figura 23 - Colônias em PDA (15mL), após 14 dias de crescimento, 23°C no escuro ..	43
Figura 24 - Distribuição geográfica dos isolados das amostras .....	46
Figura 25 - Distribuição geográfica do <i>Penicillium</i> spp. (3 -100%; 2 - 67%; 1 - 33%; 0 - 0%) .....	47
Figura 26 - Distribuição geográfica do <i>Trichoderma</i> spp. e o <i>Trichoderma</i> grupo 6.....	49

## Lista de abreviaturas

$\mu\text{L}$  – microlitro

ng - nanograma

MA – mancha amarela

TCA – 2,4,6 -tricloroanisol

TCP – 2,4,6 – triclorofenol

PCP - pentaclorofenol

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

Iniav – Instituto de Investigação Agrícola e Veterinária

ADN – ácido dextrorribonucleico

dNTP – dextrorribonucleióditridifosfatado

PCR – “Polimerase ChainReaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

pb – pares de bases

PDA – Potato Dextrose Agar (agár de batata dextrosada)

SNA – nutriente sintético de agar

Taq – enzima polimerase (purificada de *Thermusaquaticus*)

pH – índice que exprime a concentração do ião hidrogénio numa solução

TAE - Tris-Acetato-EDTA

V – Volts

UV – Ultra Violetas

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”

CG - Cromatógrafo Gasoso

ECD – “electroncapturedetector”

SPME - fase sólida por exposição no headspace

PDMS - fibra de Polidimetilsiloxane

N – número total de amostras

$s^2$  - variância amostral

SD – desvio padrão

ACM -Análise de Componentes Múltiplas

ACP - Análise de Componentes Principais

GH – Grupos homogéneos

GL – Graus de liberdade

Anova – Análise de variância

LSD - Teste para comparação de médias

SIG – Sistemas de Informação Geográfica

SHAPE – shapefile

Ø – diâmetro

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O sobreiro e a cortiça

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é um carvalho de porte médio, copa ampla e pertencente à família Fagaceae, sendo considerado desde 2011 árvore nacional de Portugal.

Não há dúvida sobre a sua origem mediterrânea. As inúmeras adaptações xerófitas desta árvore, tanto estruturais como fisiológicas levam a supor que a sua origem remonta à Era Terciária (oligoceno-mioceno). O género *Quercus* tem um grande número de espécies, mas *Quercus suber*, é uma espécie mais notável e valiosa. São três as características que o distinguem dos outros *Quercus*: o engrossamento da casca de cortiça nos troncos e ramos; a capacidade de regenerar a camada geradora da cortiça, após o descortiçamento; a homogeneidade e pureza do tecido suberoso e suas notáveis propriedades físicas, mecânicas e químicas (Natividade 1950).

O sobreiro em Portugal pode ser encontrado disperso, em montado ou em sobreiral. O sobreiral, difere do montado, por ser um povoamento de sobreiro de origem espontânea com densidades elevadas, uma estrutura irregular ou jardinada e um abundante subcoberto. A sua exploração resume-se às podas e descortiçamento. Há sobreirais no norte do país: Trás-os-Montes e Algarve. A produtividade de cortiça é menor do que na do montado de sobreiro (Costa & Pereira, 2007).

Em Portugal, o montado de sobreiro é um sistema de uso múltiplo agro-florestal, típico das regiões planas mediterrâneas-continentais (Costa & Pereira, 2007) semelhante às “dehesas” em Espanha (Pinto-Correia *et al.*, 2011; Pereira, 2007). Caracteriza-se por uma cobertura de árvores esparsas e vegetação rasteira, que vão desde formações arbustivas a pastagens, suportando altos níveis de biodiversidade. Estes ecossistemas requerem uma gestão ativa e uso por seres humanos para garantir a sua sobrevivência (Bugalho *et al.*, 2011), sendo um ecossistema artificial, em que a sua principal característica é a dominância do sobreiro. Para além da produção, é, recentemente, também um espaço de consumo, nomeadamente, recreio, turismo e usos residenciais (Almeida & Pinto-Correia, 2012).

No montado de sobreiro, para além da importância económica da cortiça, existem aspetos ambientais importantes como: a regulação dos regimes de escoamentos das águas pluviais, favorecendo a infiltração superficial nas áreas arborizadas; a proteção das encostas

da erosão, evitando a exportação de nutrientes do solo, contribuindo para a conservação da sua fertilidade; a fixação do carbono na biomassa perene (MADRP, 2000).

Portugal possui a maior extensão de sobreiros do mundo com 730 mil hectares, cerca de 33% da área mundial (APCOR, 2014). Mundialmente, o sobreiro distribui-se, apenas, na Bacia Mediterrânica ocidental, principalmente com influência atlântica, como é o caso de Portugal (Fig. 1). A sua distribuição abrange os seguintes países: Marrocos, Argélia, Tunísia, França, Itália, Espanha e Portugal (Pereira, 2007).

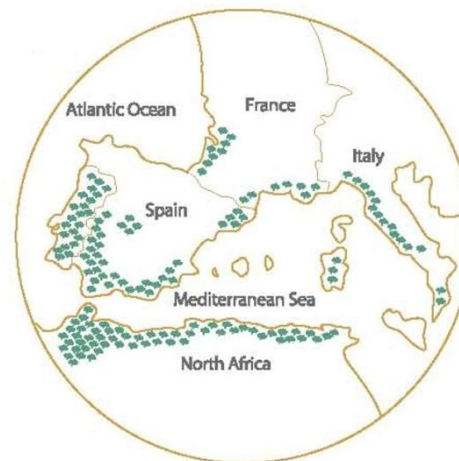


Figura 1-Distribuição mundial do Sobreiro. Fonte APCOR.

Considerado património nacional, há séculos que o montado de sobreiro é legalmente protegido (Decreto-lei nº 169/2001), sendo proibido o seu abate (com exceção dos abates sanitários que obrigatoriamente têm de ser autorizados) e incentivada a sua plantação e exploração, uma iniciativa em que Portugal foi pioneiro e que se tem revelado acertada, pois atualmente, a extração da cortiça para o fabrico de rolhas transformou-se numa indústria de enorme importância económica. O montado de sobreiro representa cerca de 21% da área florestal portuguesa (Fig. 2) e é responsável pela produção de mais de 50% da cortiça consumida em todo o mundo (APCOR, 2014). As exportações portuguesas de cortiça atingiram, em 2012, 845,7 milhões de Euros e 189,3 milhares de toneladas (Fig. 3). A nível nacional, o valor das exportações de bens portugueses de cortiça representa 2% das exportações de bens portuguesas e mais 30% do conjunto das exportações portuguesas de produtos florestais (INE, 2014).

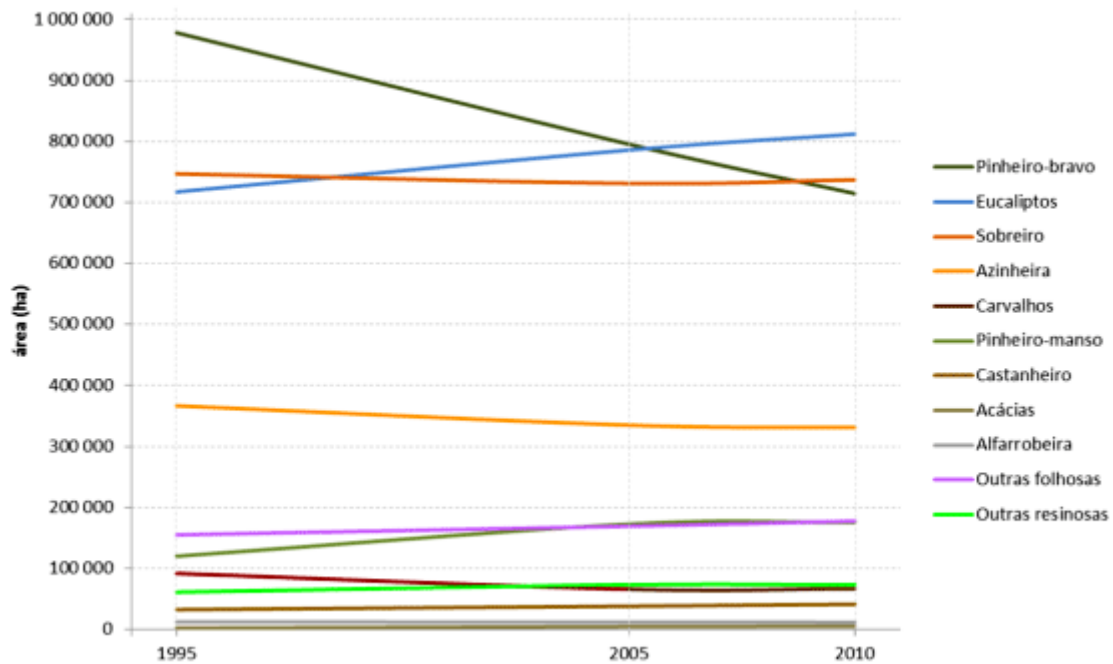


Figura 2 - Evolução das áreas totais por espécie florestal. A área de sobreiro apresenta-se estável entre 1995 e 2010, com uma ligeira diminuição. Relatório IFN6. Fonte ICNF.

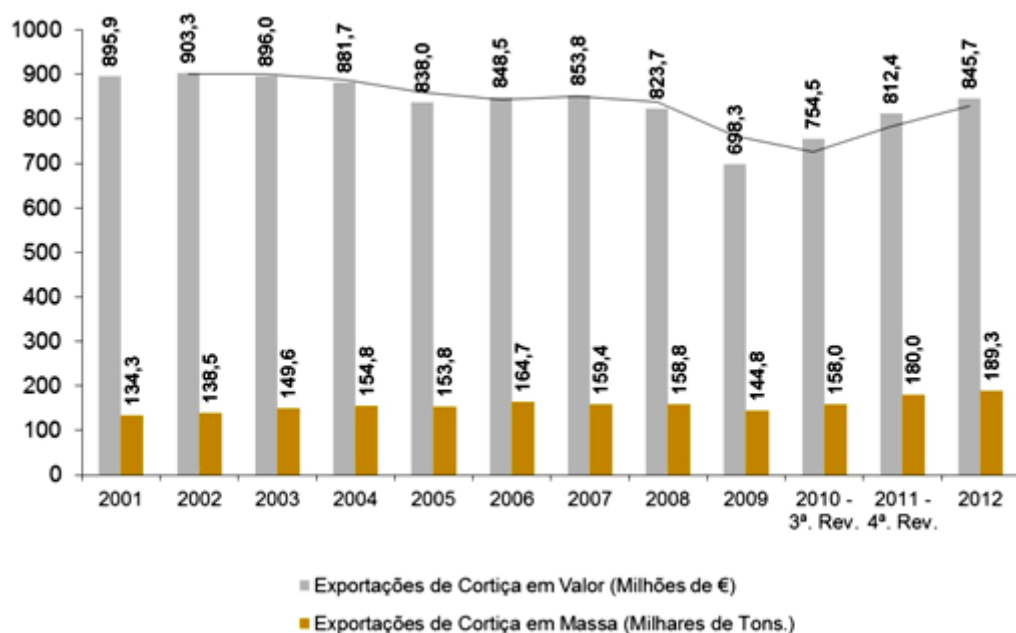


Figura 3 - Evolução das Exportações Portuguesas de Cortiça 2001- 2012. Fonte - Instituto Nacional de Estatística (INE).

Segundo o relatório do 6º Inventário Nacional Florestal (ICNF 2014), no que diz respeito à alteração das áreas de sobreiro, verifica-se que apesar de terem alteração líquida pouco expressiva entre 1995 e 2010, estiveram sujeitas a diversos processos de

arborização e desarborização sendo de destacar a perda de área para matos e pastagens de cerca de 28 mil ha e o ganho de área por arborização de terrenos agrícolas da ordem dos 18 mil ha (Fig. 4).

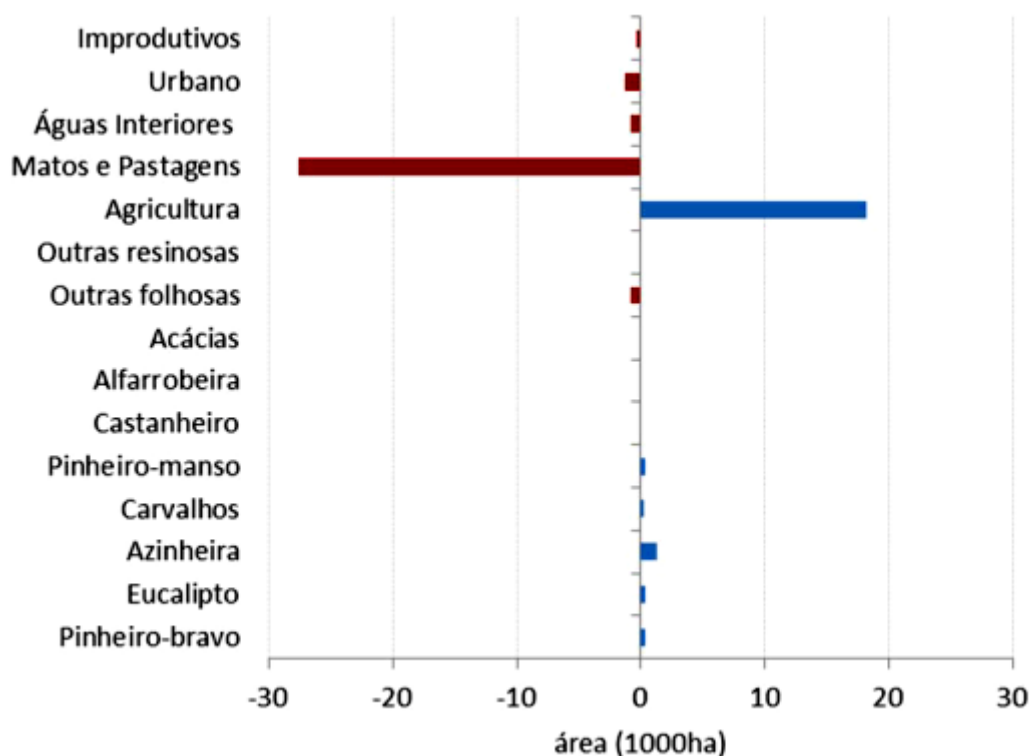


Figura 4- Alteração da área de sobreiro 1995-2010. Relatório INF6.Fonte ICNF.

Segundo Oliveira & Costa (2012), o mais otimizado e bem sucedido sistema de cultivo é aquele para o qual existe um mercado bem definido para produto da árvore. Neste caso o produto é a cortiça. Propostas de estratégias de recobro para os padrões Ibéricos estão focados na florestação de novas áreas. O objetivo é melhorar a produção de cortiça e fazer face ao mercado competitivo de rolhas de material diferente da cortiça, rolhas de alumínio e de plástico.

O principal produto tecnológico obtido a partir de cortiça é a rolha. Cada rolha de cortiça contém cerca de 800 milhões de células numa estrutura que nenhuma tecnologia consegue replicar. Tem sido a exploração económica da cortiça, através da venda de rolhas e outros produtos como é o caso de produtos para isolamento principalmente acústico, que tem mantido viva toda a floresta de sobreiro, a sua biodiversidade e os serviços de ecossistema proporcionados (QUERCUS, 2014).

De salientar que o sector rolheiro representa cerca de 70% do valor das exportações da indústria da cortiça (INE, 2014).

### 1.1.1 Estrutura e composição química da cortiça

A cortiça faz parte do sistema periderme que reveste os caules e raízes das plantas dicotiledóneas, com crescimento secundário, isto é com engrossamento devido à atividade do câmbio. Constitui uma camada de células protetoras que substitui nas suas funções a epiderme, o primeiro sistema protetor de revestimento dos órgãos da planta, quando a epiderme morre e cai. A periderme é formada por três partes: o felogénio (ou câmbio cortical), que é uma camada celular com capacidade de divisão celular; o felema, ou cortiça, que é produzido pelo felogénio para o exterior; e a feloderme, que é produzida pelo felogénio para o interior (Graça, 1998). O sobreiro tem a particularidade única de renovar o seu câmbio suber-felogénico, formando um tecido suberoso com vários centímetros a volta do tronco (Fortes *et al.*, 2004).

A cortiça é praticamente constituída só por membranas celulares, sem meatos, o conteúdo da célula formada desaparece durante o crescimento e posterior processo de suberificação das membranas. Assim, não há qualquer comunicação com os tecidos vivos do sobreiro (Natividade, 1950), o que faz com que a cortiça mesmo quando está na árvore seja um conjunto de células mortas. É um material com células fechadas. São células vazias, células em contacto com as suas adjacentes (Pereira, 2007).

A essência da cortiça é definida pelas suas células que estão agrupadas numa estrutura alveolar característica, sendo a sua composição muito diferente dos outros tecidos da planta. Num centímetro cúbico da cortiça contam-se cerca de 30 a 42 milhões de células, consoante o crescimento do sobreiro for mais lento ou mais acelerado (Natividade, 1950). Cada célula tem a forma de um minúsculo prisma, pentagonal ou hexagonal, cuja altura não ultrapassa os 40 a 50  $\mu\text{m}$  (igual a milésimos de milímetro). As células mais pequenas medem 20 ou mesmo 10  $\mu\text{m}$ . Maiores ou menores, todas estas células são preenchidas por uma mistura de gases semelhante ao ar. Uma prancha de cortiça contém cerca de 60% de elementos gasosos, o que explica a sua extraordinária leveza (APCOR, 2014).

A cortiça estabelece uma barreira protetora entre os tecidos fisiologicamente ativos das árvores com o meio ambiente. A cortiça resiste à perda de água, controla as transferências gasosas, e não permite a passagem de muitas moléculas e micro organismos. É um material que não absorve água. É compressível e impermeável a líquidos e é usada como tampão de reservatórios líquidos. É uma estrutura anisotrópica (Pereira, 2007) que também protege o sobreiro contra incêndios, visto ter combustão lenta. Esta é uma característica importante na proteção contra os incêndios, frequentes na bacia do Mediterrâneo (Pausas *et al.*, 2008).

No que se refere à composição química da cortiça podemos dizer que a parede celular da cortiça se divide em componentes estruturais e componentes não-estruturais, os primeiros são macromoléculas, de natureza poliédrica, insolúveis, que conferem às células a sua forma e grande parte das suas propriedades físicas e químicas. São a suberina, lenhina e os polissacáridos celulose e hemiceluloses. Os componentes não estruturais classificam-se em extrativos e componentes inorgânicos. Os extrativos são compostos de massa molecular pequena e, na cortiça, são habitualmente dois grupos, as ceras e os taninos. Os compostos inorgânicos são englobados no que se designa por cinzas, isto é, por resíduo da combustão completa do material (Pereira, 2007). Resumidamente temos os seguintes componentes na cortiça:

- Suberina - representa, em média, 40-50% da estrutura da parede celular da cortiça (Pereira, 2007; Silva *et al.*, 2005).
- Lenhina - representa, em média, entre 22-25% da estrutura dos componentes estruturais na parede celular da cortiça (Fortes *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005).
- Celulose e hemicelulose- representam, em média, 18-20% (Fortes *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005)
- Extrativos – representam, em média, entre 8% a 24%, mas habitualmente o seu valor varia entre 14% e 18%. Habitualmente classificam-se em dois grupos: um constituído por lípidos e outro constituído por compostos fenólicos. Os lípidos são cerca de um terço do total de extrativos (5-8% da cortiça) e nos compostos fenólicos são representados por taninos em mais de 90% (Fortes *et al.*, 2004).

Componentes inorgânicas (cinzas) – representam, em média, 1-2%, sendo o cálcio o que tem percentagem mais elevada. A costa da cortiça possui um teor consideravelmente mais elevado de elementos minerais (Fortes *et al.*, 2004).

Como exemplo, apresenta-se a composição química da cortiça, nomeadamente, entre cortiça virgem e cortiça amadia, Quadro 1.

Quadro 1- Composição química média da cortiça virgem e da cortiça amadia de 10 árvores de uma região (Fortes *et al.*, 2004) (o desvio padrão em parêntesis)

Componente	% em peso seco	
	Cortiça virgem	Cortiça amadia
Cinzas	0.9 (0.2)	1.2 (0.2)
Extractivos	16.9 (2.5)	14.2 (1.1)
Suberina	35.2 (3.1)	39.4 (1.7)
Lenhina	22.4 (1.1)	24.0 (0.8)
Polissacáridos	21.3 (2.4)	19.9 (2.6)

A principal componente da cortiça é a suberina. Este biopolímero é constituinte das paredes celulares da cortiça, representa cerca de 50% da sua massa seca (Santos *et al.*, 2005). Como tal, as propriedades da cortiça enquanto material são determinadas por este biopolímero. A suberina é uma macromolécula constituída por monómeros ligados entre si por ligações éster incluindo dois grupos principais de monómeros: o glicerol, molécula pequena tri-álcool e os compostos alifáticos de cadeia longa, cuja estrutura tem afinidade com a dos ácidos gordos.

As propriedades da suberina são notáveis, pois é praticamente infusível, insolúvel na água, no álcool, no éter, no clorofórmio, no ácido sulfúrico concentrado, no ácido clorídrico (Pereira, 2007).

### 1.1.2 Defeitos da cortiça

Vários defeitos podem afetar a cortiça para a sua utilização como um material industrial. Os principais defeitos são "poros", que resultam dos canais das lenticelas, que cruzam a cortiça na direção radial (Ramos *et al.* 2013)

Excesso de porosidade, dureza, excesso ou falta de elasticidade, marmoreado, permeabilidade das membranas celulares, esfoliação, craqueamento, galerias de insetos e mancha amarela - são os defeitos da cortiça descritos por Natividade (1950).

Atualmente, os principais defeitos visuais da cortiça são os seguintes: bofe, frouxa, terrenta (ou barrenta), preguenta, madeirenta, amuada, com crescimento irregular, com fio inclinado, enguiada, (formigada, cobrilhada-galeria de insetos), picada por aves, chumbada, queimada, folhada (esfoliada, repelosa, desunida ou solapada), verde, com ferrugem, com carvão, com "mancha amarela", marmoreada (ou jaspeada), manchada (AFN, 2014).

Esta lista pode ser dividida em três grandes grupos: as descontinuidades (fraturas); inclusões no felema e manchas e presença de níveis de água elevados (Pereira, 2007).

A "mancha amarela" é um dos defeitos da cortiça que menos se tem estudado. Este defeito da cortiça, supostamente resultado de ataques microbianos e normalmente associado a elevados valores de TCA e a uma modificação das propriedades mecânicas da cortiça (Rocha *et al.*, 2005), leva a grandes perdas na indústria pelo facto de induzir à rejeição das pranchas que apresentam este defeito. Porém o conceito de "mancha amarela" ainda é pouco objetivo uma vez que é um "chapéu" para características muito diferentes e pode variar com a unidade industrial que o atribui.

Para Natividade (1950) a "mancha amarela" caracteriza-se por manchas cinzento claras na raspa e na descoloração do tecido suberoso subjacente, que adquire um cheiro

característico a bolor”. Segundo este autor trata-se de um defeito particular da cortiça que permanece na árvore durante muitos anos em condições de humidade ambiental excessiva.

Segundo Pes e Vodret (1971) a mancha amarela deve-se à ação do fungo *Armillaria mellea*<sup>1</sup> no entanto para além deste estudo, referenciado inúmeras vezes noutros artigos, esta relação não foi comprovada posteriormente por outros autores. Estudos relativamente recentes, desenvolvidos em Portugal no âmbito do projeto P/AGR/11237/1998 coordenado pela Universidade de Aveiro e financiado pela FCT para estudar a relação entre a presença de *Armillaria sp.*”mancha amarela”/presença de TCA não permitiram comprovar qualquer relação entre a mancha amarela e a presença de *A. mellea* (Bragança, comunicação pessoal).

## **1.2.Problemas da indústria da rolha de cortiça, 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e gosto do vinho**

Se as rolhas estão em contacto direto com o vinho, componentes voláteis e não voláteis, solúveis no etanol podem migrar para o vinho, contribuindo para as propriedades sensoriais do vinho (Rudnitskaya *et al.*, 2006). Esta contribuição nem sempre é benéfica e pode comprometer a qualidade do vinho engarrafado pela ocorrência de um problema conhecido como o “gosto a rolha”. Um vinho com “gosto a rolha” é um vinho com um defeito de aroma, o qual é descrito como o cheiro a bolor do papel ou de cave húmida não arejada e, por vezes, pode fazer tornar um vinho engarrafado completamente intragável (Vlachos *et al.*, 2008).

Há autores que referem que o “gosto a rolha” como sendo causado por vários compostos e podem e muitas vezes resultando da ação cumulativa desses vários compostos. Contudo o composto mais fortemente associado ao “gosto a rolha”, pelo seu baixo limite de perceção sensorial (2-4 ng/L) é o TCA (Neto, 2005; Felter *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2006) ou 0.5-5ng/L (Mazzoleni & Maggi, 2007).

Segundo (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2003) os vários componentes químicos, que estão relacionados com o problema do “gosto a rolha” são: anisóis, guanol, 2-metilisoborneol (MIB), pirazinas, e vários compostos alifáticos, mas o anisol que tem mais de 80% de responsabilidade pelo “gosto a rolha” é o TCA.

O TCA é um composto não polar com grande afinidade para os lípidos tais como os que são encontrados na cortiça (extratáveis monoméricos e suberina polimérica). Forma-se

---

<sup>1</sup> Classificadores de todos dos fungos presentes no texto descritos no Anexo 1

por uma reação de biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP) mediada por diferentes espécies microbiológicas (Sousa e Silva, 2009).

O pentaclorofenol (PCP) teve inúmeros usos em diferentes indústrias e foi usado massivamente como pesticida (fungicida, herbicida, inseticida, etc.) por todo o mundo (APPCOR, 2014). O 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), precursor do TCA, também foi usado como biocida (Prak *et al.*, 2007; Silva Pereira *et al.*, 2000) e no tratamento de madeiras. Como consequência, temos estes poluentes em vários ambientes no mundo, incluindo em Portugal.

A Figura 5 ilustra o modo como a cortiça e pipas de vinho ficam afetadas com o TCA. O mesmo acontece nas madeiras das caves onde o vinho é armazenado para amadurecer (Navascués *et al.*, 2001). O fenómeno também verifica-se nas rolhas branqueadas com hipoclorito de cálcio (Pedra, 2013; Silva Pereira *et al.*, 2000). Ilustra, também que são os fungos filamentosos que permitem a transformação do TCP em TCA.

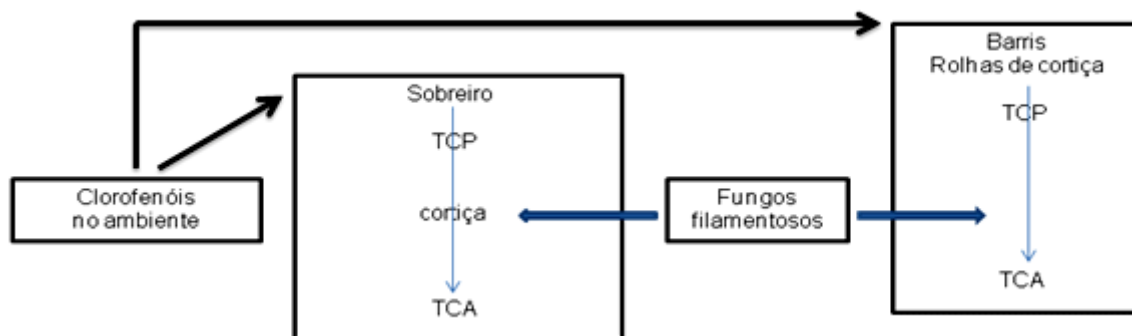


Figura 5 –Os fungos filamentosos permitem a transformação do TCP em TCA.

Para além do que foi exposto, também é importante referir que o problema do defeito no vinho “gosta a rolha” pode depender das próprias características do vinho, do seu tempo de envelhecimento, do seu teor em álcool e das castas de uvas intervenientes (Neto, 2005) e do próprio processo de elaboração do vinho e seu armazenamento, em ambientes contaminados com o precursor do TCA contaminando vinho que não esteve em contacto com a cortiça (Chantonnet *et al.*, 2004, cito em Teixeira *et al.*, 2006).

A cortiça que apresenta o defeito “mancha amarela” (MA) tem uma probabilidade de elevada apresentar valores de TCA que comprometem a boa qualidade das rolhas (Rocha *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 2005; Neto, 2005). A indústria corticeira diariamente rejeita um elevado número de pranchas com MA havendo um grande desperdício pelo facto destas pranchas serem eliminadas.

A indústria corticeira reúne esforços no sentido de perceber o que causa o defeito da MA, e sobretudo que tipos de fungos estão associados a valores de TCA prejudiciais para a

indústria. O controlo de qualidade, no processo de fabrico das rolhas de cortiça, é um dos meios que a indústria utiliza para minimizar os defeitos.

De acordo com “Relatório da autoridade da concorrência sobre o sector cortiça-2012” (ADC, 2012) este controlo de qualidade é particularmente importante para minimizar o nível de TCA nas rolhas, uma das principais desvantagens competitivas destes vedantes face aos alternativos.

### 1.3 Fungos associados ao TCA e à mancha amarela

Têm-se desenvolvido estudos no sentido de identificar os fungos associados às diferentes etapas no fabrico das rolhas (Santos *et al.*, 2005; San Romão, 2009; Oliveira *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2008; Barreto *et al.*, 2011) e particularmente sobre quais os fungos associados à presença TCA na cortiça (Prak *et al.*, 2007; Álvarez Rodríguez *et al.*, 2002).

*Mucor hiemalis*, *Trichoderma pseudoconingii*, *Trichoderma viride* e *Penicillium* sp. são fungos que, com maior frequência são referidos fazendo parte da microflora da cortiça crua (Santos *et al.*, 2005). Os fungos filamentosos encontrados na cortiça durante o processo do fabrico da rolha são maioritariamente: *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, *Mucor plumbeus* e *Trichoderma longibrachiatum*, segundo San Romão (2009); *C. sitophila*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. (Oliveira *et al.*, 2003). Estudos de Serra *et al.* (2008) revelaram várias espécies de *Penicillium* sp. nas diferentes fases do processo do fabrico da rolha.

Os fungos são os principais responsáveis pelo TCA porque têm a capacidade de metabolizar os clorofenóis em cloroanisóis (Oliveira, 2011; Maggi *et al.*, 2008). Os géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* *Trichoderma*, isolados de rolhas de cortiça contendo TCA têm a capacidade de converter o TCP em TCA (Prak *et al.*, 2007). Nos trabalhos realizados por Álvarez Rodríguez *et al.* (2002), foram isoladas 14 isolados, maioritariamente de diferentes géneros, a partir de pranchas de cortiça contendo TCA, que depois foram inoculadas individualmente em granulados de cortiça contendo TCP e verificou-se que 11 desses isolados eram os responsáveis pelo aumento de valores de TCA nos granulados. Este autor supõe haver uma reação de biometilação do TCP como parte de um processo de detoxificação (remoção da toxicidade) dos fungos filamentosos, formando-se TCA.

Há contudo, fungos como é o caso de *C. sitophila* que só não contribuem para o surgimento do TCA, como têm até um contributo positivo para a indústria, uma vez que tornam a estrutura da cortiça mais adequada ao fabrico das rolhas. Esta espécie não tem a capacidade de metabolizar TCA (Maggi *et al.*, 2008; San Romão, 2009) mas contribui para a

diminuição da rigidez da cortiça, alterando o comportamento visco-elástico desta (San Romão, 2009). Supõe-se que a *C. sitophila* através da produção de esterases e lipases (Centeno & Calvo, 2001) tem a capacidade de interferir na suberina da cortiça, além de interferir na celulose através da produção de celulases (Silva Pereira *et al.*, 2006; Vitorino *et al.*, 2007).

Silva Pereira *et al.* (2006) desenvolveu estudos sobre os efeitos da colonização da cortiça por fungos e (Martins *et al.*, 2014) desenvolveu estudos sobre os efeitos da colonização da cortiça pelo fungo *Aspergillus nidulans* e tendo concluindo que as propriedades da cortiça eram afetadas. Este último autor e Barreto *et al.* (2011) verificaram que determinadas enzimas produzidas pelos fungos têm a capacidade de degradar/alterar os componentes da cortiça.

Quanto às alterações existentes na zona da cortiça com mancha amarela verifica-se que este defeito está associado a diferenças estruturais, mecânicas e óticas quando comparado com a cortiça sem defeito e nela há a possibilidade de surgir o defeito que confere ao vinho “gosto a rolha” (Rocha *et al.*, 2005). Verifica-se a presença de componentes fenólicos na zona da cortiça com mancha amarela diferentes e em concentração superior aos componentes fenólicos na cortiça sã. (Rocha *et al.*, 2005; Rudnitskaya *et al.*, 2006). Os estudos destes autores confirmam que pode haver degradação da lenhina da parede celular das células da cortiça.

O problema da indústria no fabrico de rolhas de cortiça no que diz respeito ao defeito do vinho "gosto a rolha" levou ao desenvolvimento de estudos sobre as causas do surgimento do TCA. O defeito da "mancha amarela" da cortiça tem sido pouco explorado, não há estudos anteriores sobre quais os fungos presentes na “mancha amarela” e quais as suas consequências, sendo importante o presente trabalho.

#### **1.4 Sistemas de informação Geográfica**

Informação geográfica é definida como ligações de informações de locais da superfície do planeta Terra a propriedades/características desses locais. As tecnologias para tratar essas informações incluem sistemas de posicionamento global (GPS), deteção remota e sistemas de informação geográfica (SIG) (Goodchild, 2009).

Os SIG integram hardware, software, dados e capital humano, tal como os Sistemas de Informação (SI), mas com componente geográfica (ESRI, 2014).

Os SIG permitem visualizar, interpretar, compreender, inquirir os dados de várias formas, revelando relações, padrões e tendências espaciais, consubstanciadas em mapas,

globos, relatórios ou gráficos (ESRI, 2014). Possibilitam a integração de grandes volumes de informação espacial e de outros tipos num mesmo sistema e o seu tratamento conjunto. Permitem que se realizem com eficiência as operações elementares de adição, remoção e atualização dos dados (Geopoint, 2004).

Os objetos no espaço podem ser representados nos SIG por “features”. A “shapefile” é um formato de ficheiros com dados espaciais e permite que as “features” possam ser representadas em três formas diferentes: pontos; linhas e polígonos, sendo composta (no mínimo) por três ficheiros, guardados no disco com o mesmo caminho e com o mesmo prefixo para que possa ser reconhecida pelo programa SIG: shp; dbf; shx., (Campanholo, 2013).

Neste trabalho o objetivo dos SIG é ter uma base de dados georreferenciada dos resultados obtidos e poder relacioná-los. A base de dados pode ser atualizada, com a adição de novos dados.

### **1.5. Objetivos do trabalho**

Pretendeu-se fazer o estudo da micoflora existente na cortiça extraída ainda não submetida ao processo de cozedura (cortiça crua), com o defeito sensorial "mancha amarela". Assim, deste modo para o presente trabalho foram feitos isolamentos a partir das pranchas de cortiça, das zonas que tinham o defeito "mancha amarela". Pretendeu-se, também quantificar o valor de TCA dessas amostras por cromatografia gasosa.

Simultaneamente foram obtidos isolados de pranchas de cortiça crua sem o defeito "mancha amarela" e quantificados por cromatografia gasosa os valores de TCA respetivos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Seleção e recolha de amostras de cortiça

Foram selecionadas amostras de cortiça crua (cortiça extraída ainda não submetida ao processo de cozedura), das pilhas de cortiça armazenadas na unidade fabril industrial de Salteiros, pertencente à empresa Amorim Florestal, S.A., provenientes de propriedades e/ou locais geograficamente diferentes, tendo como base a carta de distribuição do sobreiro em Portugal (Fig. 6A). A amostragem contemplou todas as regiões inseridas no mapa de distribuição do sobreiro, com exceção do Algarve, totalizando dez regiões (Fig. 6B). Pelo facto da empresa não comercializar cortiça do Algarve, este estudo não contemplou amostras desta região do país.

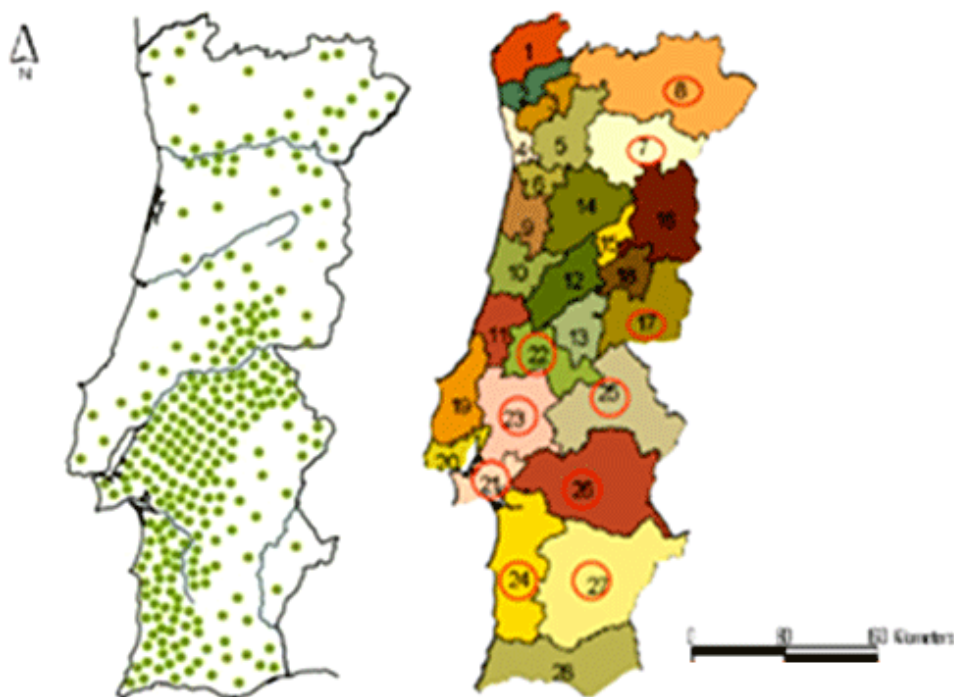


Figura 6 A

Figura 6 B

Figura 6 A - Mapa de distribuição do sobreiro em Portugal (Árvores e Arbustos de Portugal online, 2004).

Figura 6 B - Regiões de proveniência das amostras (regiões referenciadas por nº assinalado com círculo vermelho):

- 7 - Douro;
- 8 - Alto Trás-os-Montes;
- 17 - Beira Interior Sul;
- 21 - Península de Setúbal;
- 22 - Médio Tejo;
- 23 - Lezíria do Tejo;
- 24 - Alentejo Litoral;
- 25 - Alto Alentejo;
- 26 - Alentejo Central;
- 27 - Baixo Alentejo

Para a recolha de amostras, com e sem “mancha amarela” (MA), Figura 7 e Figura 8, selecionaram-se três lotes por cada região de proveniência. Cada lote correspondente a uma propriedade individualizada. De cada propriedade foram recolhidos os seguintes dados através de um inquérito: região do país; tipo de solo, existência ou não de pastoreio, tipo de gado nas pastagens, declive, humidade, sub-coberto, idade média dos sobreiros, taxa de mortalidade, sinais da presença de cobrilha da cortiça, níveis de ocorrência do defeito “mancha amarela” na propriedade e data de descortiçamento (Anexo 2). As amostras foram avaliadas no laboratório relativamente à presença de líquenes, presença de bolor branco/cinza, presença de bolor verde e presença de cheiro a mofo (Anexo 2).



Figura 7 – Pranchas de cortiça com mancha amarela (MA)



Figura 8 - Amostra controlo sem MA

De cada lote foram retiradas aleatoriamente três pranchas de cortiça e de cada uma destas pranchas foi cortada uma amostra de cortiça com a dimensão de aproximadamente 20x20x20cm. Das amostras assim obtidas foram retirados aparas de cortiça para quantificação dos valores de TCA na unidade industrial (método descrito em 2.2) e o restante material devidamente acondicionado em sacos de plástico esterilizados, catalogado (cada amostra foi identificada como o número da região de origem, seguindo-se o respetivo lote e número de amostra. Para observação e pesquisa de fungos associados à MA as amostras foram posteriormente transportadas e processadas no laboratório de micologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). Para controlo consideraram-se amostras provenientes do mesmo lote mas sem mancha amarela. Antes de se proceder ao isolamento dos fungos as amostras foram rigorosamente observadas e anotadas as suas características em fichas.

## **2.2. Determinação dos valores de 2,4,6 - tricloroanisol (TCA) por Cromatografia Gasosa**

### Preparação das amostras e extração de 2,4,6-tricloroanisol (TCA)

As amostras para análise de TCA foram processadas na unidade industrial da seguinte forma: de cada prancha de cortiça selecionada com base na presença de MA foi retirada uma apara com as dimensões 200x30x3 mm, (Fig. 9).



Figura 9 - Aparas de cortiça com MA de onde foram cortados os pedaços para determinação dos valores de TCA

Cada apara foi cortada em pequenos pedaços (de aproximadamente 5x5x5 mm), que se introduziram em frascos devidamente identificados com o código da amostra (o código integrava: referência da região e do lote de onde era proveniente a amostra). A cada frasco adicionou-se 20 mL de uma solução de etanol a 12% (valor próximo do teor alcoólico

do vinho). Os frascos foram tapados com alumínio e só depois colocada a respetiva tampa de plástico (o plástico absorve TCA e por esse facto não se podem utilizar tampas de plástico em contato direto com a atmosfera do frasco), tendo ficado em maceração durante 24 horas (Fig.10).



Figura 10 -Fracos com os pedaços de cortiça cortados em solução de etanol a 12%

A extração de TCA foi realizada sem modificação da matriz líquida pelo método microextração em fase sólida por exposição no headspace (SPME) com a ajuda de uma fibra PDMS utilizada para absorção de compostos voláteis. Os compostos foram desorvidos e analisados numa coluna capilar de baixa polaridade (Varian VF-5ms, 30mx0.25mm). A deteção e quantificação foram feitas por captura eletrónica (ECD - electron capture detector). A quantificação dos compostos baseia-se na relação entre a área do analito e do padrão interno (2,3,6 – tricloroanisol) através duma curva de calibração previamente definida.

O equipamento usado foi um cromatógrafo GC/ECD-Varian CP3800; “vials” 20 mL com cápsulas magnéticas de 20 mm e septo de silicone; fibra de Polidimetilsiloxane (PDMS) de 100  $\mu$ m e coluna apolar.

Após as 24 horas, foram pipetadas de cada frasco 10 mL da solução de maceração para um “vial” de cromatografia de 20 mL, ao qual se adicionou 2g de cloreto de sódio e 100  $\mu$ L de padrão interno (2,3,6-TCA 4000  $\mu$ g/mL). O cloreto de sódio permite que seja forçado o equilíbrio dos solúveis para a fase gasosa “salting out”.

Os “vials” foram colocados através do amostrador automático numa incubadora. Após a pré-incubação de dois minutos a fibra é exposta no “headspace” do tubo durante oito minutos a 50°C. A extração (adsorção) dos contaminantes é realizada com agitação. Os

voláteis são termicamente desorvidos da fibra para o injetor do cromatógrafo a 270°C. A fibra fica no injetor durante quatro minutos, em modo “splitless”. Os compostos desorvidos são transportados por um gás de arraste, hélio. Posteriormente, a separação cromatográfica dos compostos injectados é efectuada na coluna capilar, instalada no Cromatógrafo Gasoso (CG) (Fig. 11).



Figura 11 - Cromatógrafo Gasoso - CG

### 2.3. Isolamento de fungos

Cada amostra de cortiça foi observada a olho nu e à lupa binocular para seleccionar as zonas afetadas com fungos. Retiraram-se, da superfície de cada amostra de cortiça e das suas lenticelas, três sub-amostras de cortiça aproximadamente 2 x 2 mm. Estas foram colocadas em caixas de Petri, (9 cm Ø) contendo 15 mL de agar de batata dextrosada (PDA) diluído em 50% e suplementado com sulfato de estreptomicina (500 µg/L) (Figura 10). Nas amostras que apresentaram o defeito MA as três sub-amostras foram retiradas apenas na zona com esse defeito. Nas caixas de Petri colocou-se o código da amostra e numeraram-se três zonas de acordo com o local de onde foi retirada a sub-amostra para identificação dos isolados (Fig. 12). Estas foram posteriormente colocadas em estufas de incubação a 25°C, sem luz. Para alguns dos isolados foi necessário submeter as colónias a luz natural para induzir a esporulação com vista a proceder à identificação dos mesmos.

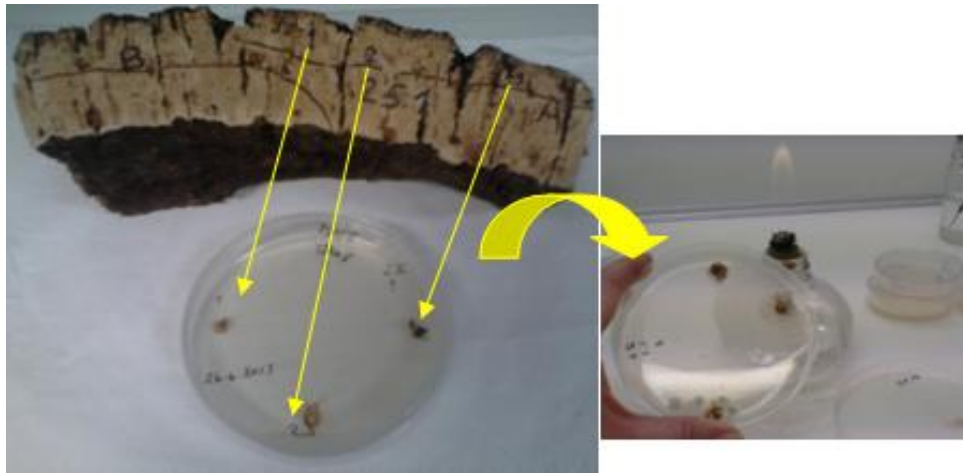


Figura 12- Placa de Petri contendo meio gelosado - PDA, com as três sub-amostras extraídas da cortiça e início da formação das colónias dos fungos.

Após obtenção de crescimento fúngico observaram-se as características macro e micro-morfológicas das colónias, utilizando para o efeito uma lupa binocular (Wild HEERBRUGUEE-MDG 17) e um microscópio óptico (OLYMPUS- BX41TF). A partir destas observações selecionaram-se colónias com características diferentes, procedendo-se em seguida à respetiva purificação para posterior identificação ao nível de género e espécie.

Cada colónia foi assim repicada para uma nova caixa de Petri contendo 20 mL de meio de PDA. Estas caixas foram a incubar numa estufa à temperatura de 25°C, às escuras, durante cinco dias. Sempre que necessário efetuaram-se repicagens sucessivas para obtenção de culturas puras.

### Isolamento monospórico

No caso dos fungos isolados pertencentes ao género *Trichoderma* procedeu-se à obtenção de culturas monospóricas. Para esse efeito prepararam-se suspensões de conídios, juntando a 1 mL de água destilada estéril em tubo "Eppendorf" de 2 mL, uma pequena quantidade de micélio com esporulação. Marcaram-se linhas a tracejado em caixas de Petri (9 cm Ø) com 15 mL de meio de agar a 4%. De cada tubo, depois de agitado, recolheu-se uma pequena quantidade da suspensão com uma ansa, que foi distribuída pela superfície do meio segundo as linhas a tracejado, com o objetivo de ter conídios isolados e convenientemente distanciados uns dos outros. Após 24 horas, em incubação em condições de bancada laboratorial, observou-se a superfície do meio de cultura à lupa binocular em ambiente estéril. Selecionaram-se três os esporos germinados que foram transferidos para caixas de Petri (6 cm Ø) com 20 mL de meio de PDA. Em seguida estas foram colocadas numa estufa de incubação a 22,5°C, às escuras durante três dias.

## 2.4. Identificação de fungos

### 2.4.1. Identificação com base em características morfológicas

Com o auxílio de um furador fizeram-se discos de inóculo de 5 mm de diâmetro de todas as culturas puras obtidas. No caso do género *Trichoderma* estes inóculos foram colocados na periferia de caixas de Petri com 15 mL de meio de PDA e com 15 mL de meio de nutriente sintético de agar (SNA) (Crous *et al.*, 2009). Para os outros géneros, utilizou-se unicamente o meio de PDA e o inóculo foi colocado no centro da caixa de Petri. Estas caixas foram a incubar numa estufa a 23°C e 25°C, durante seis e sete dias respetivamente. Após o período de incubação, procedeu-se ao agrupamento dos isolados com base nas seguintes características morfológicas: cor, zonagem, margem e aspeto micelial na face superior e inferior da colónia. Sempre que necessário, usou-se uma lupa binocular.

Para o género *Trichoderma* foram medidas as taxas de crescimento da colónia. Foram selecionados três isolados representativos de cada grupo. Retirou-se, em cada isolado, um inóculo com 5 mm de diâmetro, que foi colocado no centro de caixas de Petri (9 cm Ø) com 15 mL de meio PDA e incubadas durante três dias a 25°C na ausência de luz. O crescimento da colónia foi medido em duas direções perpendiculares. Foram usados três replicados para cada para isolado. Foi efetuada uma análise de variância a um fator (one-way ANOVA) para o tratamento dos dados, usando o software *Statística 6.1*.

Os isolados do género *Penicillium*, identificados pela biologia molecular, foram caracterizados a nível de micro-morfologia, utilizando-se câmaras de Riddell. Sobre uma lâmina de vidro esterilizada colocou-se um cubo de meio de cultura com uma espessura muito fina. Em seguida inoculou-se o fungo isolado nas quatro extremidades desse mesmo cubo e cobriu-se com uma lamela. A lâmina inoculada foi colocada numa caixa de Petri, sobre uma vareta de vidro em forma de V que se encontrava mergulhada numa fina película de água destilada esterilizada, de forma a criar uma câmara húmida. Em seguida colocou-se esta caixa de Petri numa estufa de incubação a 25°C durante vários dias.

Observou-se diariamente a evolução do crescimento fúngico, até se visualizar uma rede de hifas na superfície da lâmina e da lamela. Após esta etapa, separou-se a lamela da lâmina com a ajuda de uma agulha esterilizada, de forma a não se danificar as estruturas. Numa nova lâmina de vidro esterilizada colocou-se a lamela sobre uma gota de lactofenol com azul de algodão, no caso de fungos com estruturas hialinas ou sobre uma gota de lactofenol no caso de fungos com estruturas coradas.

Estas preparações foram depois observadas ao microscópio ótico, registando-se as características e medições das estruturas reprodutivas. Para a identificação da espécie recorreu-se a manuais de identificação e respetivas chaves dicotómicas dos autores: Raper *et al.* (1949), Pitt & Hocking (1997) e Samson *et al.* (2004). A caracterização das cores das colónias foi baseada na carta de Saccardo (1891).

#### **2.4.2. Identificação molecular**

Para a extração do ADN o micélio cresceu em PDA, cinco dias a 25°C, no escuro. Foi raspado da superfície da colónia uma porção de cerca de 2cm x2cm e colocou-se em tubos eppendorf de 2 mL e fez-se a extração do ADN usando o KIT Nucleo Spin Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemanha). O procedimento de extração foi seguido conforme o protocolo do fabricante, com ligeiras alterações baseadas em Bragança *et al.* (2011).

Amplificou-se o ADN através de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction). O par de “primers” usado na amplificação foi LR5 (5’TCCTGAGGGAAACTTCG) segundo Vilgalys & Hester (1990) e ITS5 (5’GGAAGTAAGTCGAACAAGG) segundo White *et al.* (1990).

As condições das reacções de PCR, num volume final de 25 µL, foram: 2,5 µL de Tampão de Taq (10x) (Biotaq, Bioline); 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Biotaq, Bioline); 0,15 µL de mistura de dNTPs (10mM) (Bioline); 2 µL de cada “primer” (LR5 10µL) e (ITS5 10µL) e 0,25 µL de Taq Adn Polimerase (5 U/µL, Biotaq, Bioline), perfazendo-se um volume de 22 µL adicionando água ultra pura estéril. Posteriormente, adicionou-se 3 µL de ADN (diluição de 10x).

As reacções de PCR foram realizadas em termociclador (MJ Research PTC-100, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial de cinco minutos a 94°C; 39 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C, 90 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C durante sete minutos, terminando sob uma temperatura de 10°C.

As amostras amplificadas por PCR foram submetidas a uma electroforese, em gel de agarose a 1% em tampão 50x TAE (Tris-Acetato-EDTA) num aparelho de electroforese horizontal (Enduro, Labnet International, EUA) durante quarenta minutos a 87V. Previamente, adicionou-se 5 µL de corante azul de bromofenol 6x concentrado a cada tubo de reacção de amplificação e usou-se como referência para o cálculo do peso molecular o marcador “100bp DNA” (Gibco) e cada poço do gel foi carregado com 20 µL do produto amplificado. O gel foi corado em GelRed e foi visualizado num Sistema de Tratamento de Imagem de UV e

analisadas com o programa informático GeneSnap versão 6.08.03 (Syngene, Box Hr, Inglaterra).

Antes de ir para a sequenciação o ADN foi purificado com o KIT -" DNA E RNA E protein purification, Macherey-Nagel MN", segundo o protocolo do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas a uma análise por BLAST (Altschul *et. al*, 1997) para a pesquisa de homologias no GenBank (NCBI).

## 2.5. Sistemas de Informação Geográfica

### Dados e Metodologia:

- Tabelas dos isolados e dos dados de campo - Informação geográfica relevante para análise dos dados obtidos nas fichas de inquérito e dados obtidos no laboratório:
  - Dados do campo (fichas de inquérito);
  - Dados da avaliação laboratorial das pranchas;
  - Dados resultantes do trabalho de laboratório;
  - Dados resultantes da quantificação do TCA.

Carta militar de Portugal, escala 1:25000, do Instituto Geográfico do Exército

- Shapefiles:
  - Concelhos;
  - Criação e georreferenciação de "Shapefile" pontos dos dados a analisar.
- O sistema de projeção, o sistema de coordenadas e o datum foi o mesmo para todas as shapefiles, conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Sistema de projeção e o sistema de coordenadas

Projected Coordinate System:	<i>Lisboa_Hayford_Gauss_IGeoE</i>
Projection:	<i>Transverse_Mercator</i>
False_Easting:	<i>200000,00000000</i>
False_Northing:	<i>300000,00000000</i>
Central_Meridian:	<i>-8,13190611</i>
Scale_Factor:	<i>1,00000000</i>
Latitude_Of_Origin:	<i>39,66666667</i>
Linear Unit:	<i>Meter</i>
Geographic Coordinate System:	<i>GCS_Datum_Lisboa_Hayford</i>

Datum:	<i>D_Datum_Lisboa_Hayford</i>
Prime Meridian:	<i>Greenwich</i>
Angular Unit:	<i>Degree</i>

- Criação de Layout

## 2.6. Análise estatística

Para estudar a relação entre a mancha amarela e a presença de TCA aplicaram-se vários testes aos dados. Para o cumprimento dos pressupostos para a utilização de métodos paramétricos utilizou-se o Teste Levene e no caso de não cumprimento recorreu-se ao teste de Mann-Whitney.

Para relacionar o TCA e as variáveis das parcelas de campo (12 variáveis) e da avaliação laboratorial (presença de líquenes, cheiro a mofo, presença de bolores brancos, presença de bolores verdes (Anexo 2) verificou-se a correlação entre as elas e fez-se uma análise de componentes Múltiplos (ACM), método não paramétrico, para reduzir a extensão do conjunto dos dados e identificar as variáveis mais importantes (Oliveira, 2002). As variáveis discriminadas por este método foram consideradas para o restante tratamento estatístico recorrendo a testes Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, conforme o número de grupos considerados.

Para relacionar o TCA/MA com os géneros de fungos obtidos efetuou-se uma análise de componentes Principais (ACP), técnica de análise exploratória multivariada, para reduzir a amostra de isolados (amostra de variáveis independentes) e analisar os mais revelantes.

As ocorrências dos diferentes fungos identificados (em percentagem relativamente ao total de amostras recolhidas em cada lote) foram transformadas (arco seno da raiz quadrada das ocorrências) de modo a satisfazer os pressupostos para aplicação das análises de variância (Maroco, 2003). Estas ocorrências foram relacionadas com os níveis de TCA das amostras (agrupados em quatro classes) e com as diferentes variáveis consideradas relevantes pela ACM, através análises de variância a um fator (one-way ANOVA).

O teste complementar de comparação múltipla de médias de Fisher-LSD, *Least Square Differences*, foi efetuado para a definição de grupos homogéneos, sempre que foram registadas diferenças estatisticamente significativas. Este teste é o mais robusto e apresenta maior poder discriminatório do que os restantes testes disponíveis (ex: *Tukey HSD*, Newman-Keuls, Bonferroni, Scheffé e Duncan) (Zar, 1999).

Os tratamentos estatísticos foram efetuados com o auxílio do software Statistica (versão 6.1 – StatsoftInc., 2003).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Valores de TCA

Os valores de TCA de cada amostra encontram-se no Quadro 3 e no gráfico da Figura 13. Todas as amostras controlo têm valores de TCA inferiores a um nanograma por litro. Os valores mais altos de TCA encontram-se no Alto Alentejo, Douro, Península de Setúbal, Baixo Alentejo e Beira Interior Sul.

Quadro 3 - Valores de TCA por cada amostra

Amostra	TCA (ng/L)	Amostra	TCA (ng/L)
*7-1.0	<0,5	23-1.1	23,21
7-1.1	177,09	23-1.2	**1,32
7-1.2	18,02	23-1.3	19,18
7-1.3	544,67	*24-1.0	0,50
*8-3.0	<0,5	24-1.1	**1,67
8-3.1	28,16	24-1.2	8,87
8-3.2	23,71	24-1.3	7,92
8-3.3	22,95	*24-3.0	0,23
*17-3.0	<0,5	24-3.1	13,83
17-3.1	422,16	24-3.2	30,88
*21-1.0	0,26	24-3.3	18,36
21-1.1	43,45	*25-1.0	<0,5
21-1.2	34,04	25-1.1	210,79
21-1.3	216,50	*26-1.0	<0,5
21-3.1	32,05	26-1.1	9,34
21-3.2	69,37	*26-3.0	0,32
21-3.3	12,46	26-3.1	31,56
*22-3.0	<0,5	26-3.2	**1,71
22-3.1	7,04	26-3.3	4,75
22-3.2	73,31	*27-2.0	0,28
22-3.3	12,28	27-2.1	**1,89
*23-1.0	0,24	27-2.2	2,16
		27-2.3	795,20

\* controlos; \*\*amostras com valores de TCA considerados toleráveis para a indústria

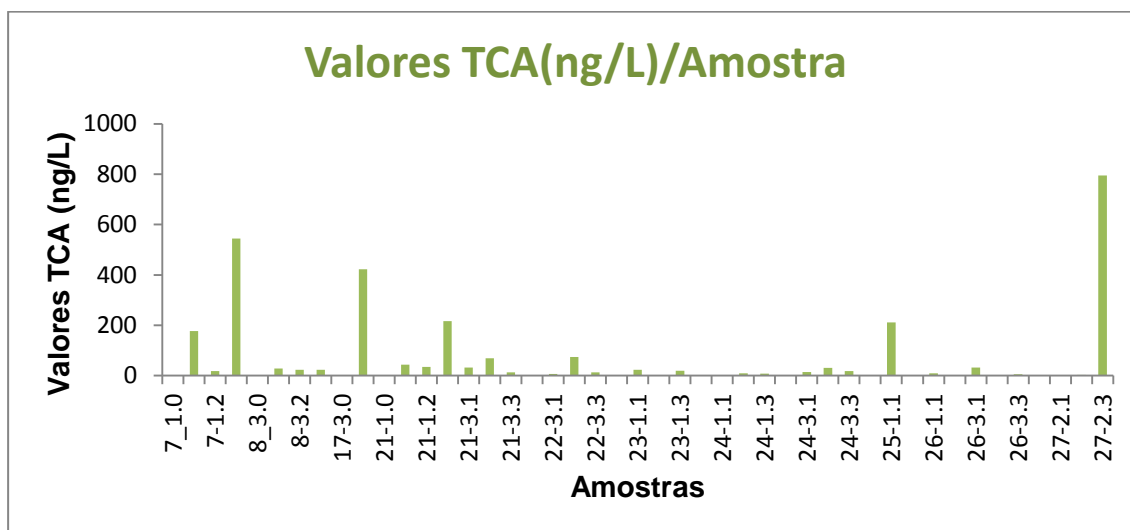


Figura 13 - Valores de TCA por cada amostra: o primeiro algarismo do código de cada amostra indica a região de proveniência (7-Douro, 8-Trás-o-Montes, 17- Beira Interior Sul, 21- Península de Setúbal, 22-Médio Tejo, 23- Lezíria do Tejo , 24- Alentejo Litoral, , 25- Alto Alentejo, 26- Alentejo Central, 27-Baixo Alentejo). Amostras controlo apresentam o nº 0 no final do código.

A análise estatística destes resultados não cumpriu os pressupostos para utilização de métodos paramétricos, nomeadamente, a homogeneidade das variâncias (Teste Levene:  $F_{(1,43)} = 8,0071$ ;  $p = 0,0071$ ). (Anexo 3). Por outro lado o histograma da distribuição de frequências das leituras de TCA não segue a normalidade, apresentando-se enviesado para valores baixos, histograma da Figura 14. Deste modo não estão cumpridos importantes pressupostos para a aplicação dos testes paramétricos, tendo-se recorrido a testes não paramétricos.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney aplicado aos dados revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores de TCA dos controlos e das amostras com mancha amarela ( $Z_{ajustado} = 5,0913$ ;  $p < 0,0001$ ).

Confirma-se assim uma relação muito estreita entre a presença da Mancha Amarela e a presença de TCA nas amostras.

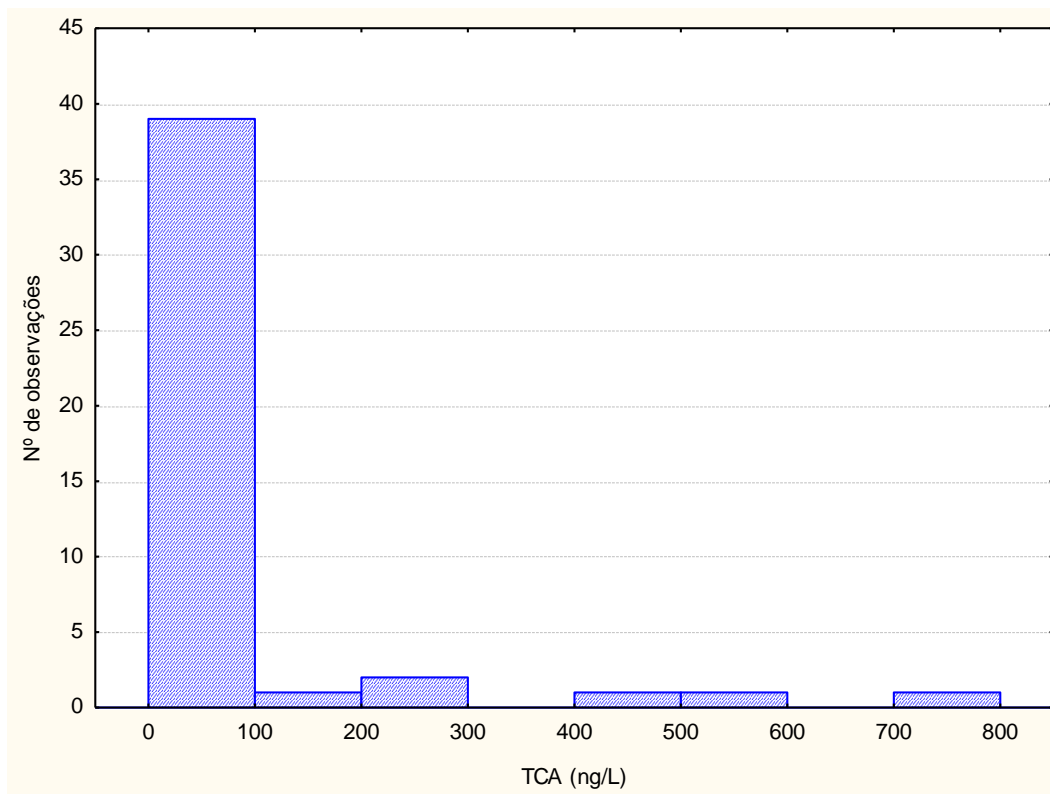


Figura 14 – Histograma de distribuição de frequências dos valores das leituras de TCA das amostras de cortiça.

Análise Estatística Exploratória (ACM) com dados das variáveis relacionadas com as características da propriedade e das amostras, permitiu destacar alguns fatores como mais relacionados com a presença de TCA: ao longo dos eixos 1 e 2 o TCA surge associado à ocorrência de “mancha amarela na propriedade” estando ainda no mesmo quadrante a presença de sub-coberto e declive na propriedade, bem como as variáveis da amostra “cheiro a mofo”, presença de “bolor branco” e presença de líquenes. A conjugação do eixo 1 com o eixo 3 levou ao afastamento das variáveis sub-coberto e declive sendo neste caso a variável humidade na propriedade mais próxima da variável TCA. Mantiveram-se relacionadas com o TCA “cheiro a mofo” na amostra, presença de “bolor branco” e presença de líquenes na amostra (Anexo 4).

Os dados do inquérito relativos aos solos, não foram considerados por não serem coerentes com a carta de solos para as regiões em causa. Relativamente aos dados relacionados com a presença de gado na propriedade, “pastoreio” e “tipo de gado”, apenas se utilizou a variável “tipo de gado” na posterior análise estatística porque estavam correlacionadas (coeficiente de correlação=0,9123).

Após a análise de componentes múltiplas (ACM) foram consideradas relevantes as variáveis das fichas de inquérito do campo: sub-coberto; declive; humidade da parcela; região do país. Não houve influências significativas entre as variáveis declive ( $H_{(2,45)} = 0,5538$ ,  $p = 0,7581$ ); humidade na parcela ( $H_{(2,45)} = 2,2740$ ,  $p = 0,3208$ ) e região do país ( $H_{(9,45)} = 6,458540$ ,  $p = 0,6933$ ). A presença, ou ausência, de qualquer uma destas variáveis, não influencia os níveis TCA das amostras.

O teste de Mann-Whitney revelou que o sub-coberto influencia significativamente, a 95% de confiança, os valores de TCA, ( $U = 155,00$ ;  $p = 0,0411$ ), como se pode verificar no Quadro 4.

**Quadro 4** – Resultados dos testes não paramétricos para avaliar a variação dos níveis de TCA relativamente às variáveis recolhidas nas fichas de campo consideradas mais relevantes (teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney).

Variáveis de campo	Resultados estatísticos		
Declive	$H_{(2,45)} = 0,5538$	$p = 0,7581$	NS
Humidade na parcela	$H_{(2,45)} = 2,2740$	$p = 0,3208$	NS
Região do país	$H_{(9,45)} = 6,4585$	$p = 0,6933$	NS
Sub-coberto	$U = 155,00$	$p = 0,0411$	*

Diferenças estatisticamente não significativas (NS) e significativas (\*).

No gráfico da Figura 15 pode-se observar que os valores de TCA são elevados nas amostras com sub-coberto com matos. Assim, a média dos níveis de TCA no sub-coberto com matos ( $101,86 \pm 192,81$ ) é superior à média dos níveis de TCA no sub-coberto sem mato ( $9,69 \pm 10,72$ ), a presença ou ausência de matos interfere nos valores de TCA.

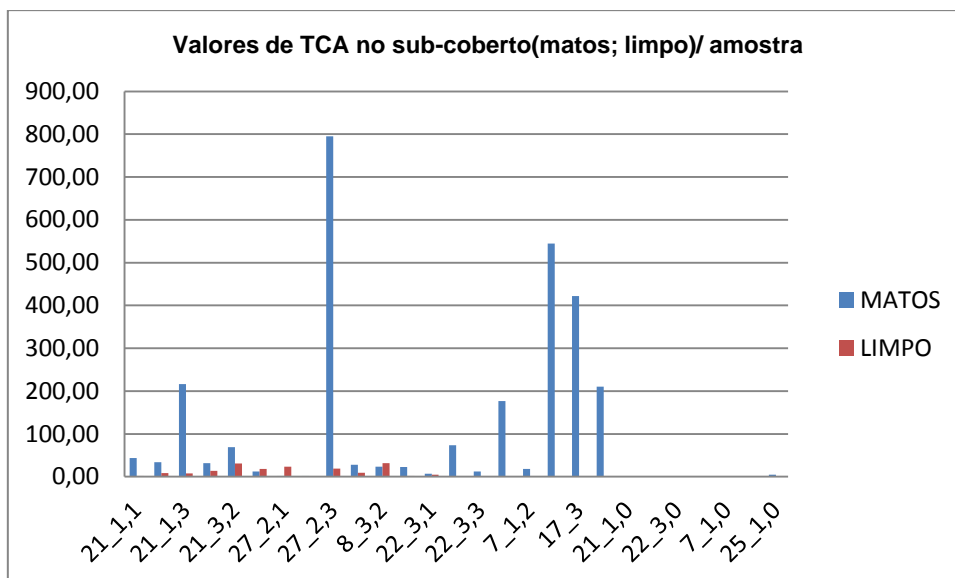


Figura 15 - Valores de TCA das amostras de acordo com o tipo de sub-coberto: o primeiro algarismo do código de cada amostra indica a região de proveniência (7-Douro, 8-Trás-o-Montes, 17- Beira Interior Sul, 21- Península de Setúbal, 22-Médio Tejo, 23- Lezíria do Tejo, 24- Alentejo Litoral, 25- Alto Alentejo, 26- Alentejo Central, 27- Baixo Alentejo). Amostras controlo apresentam o nº 0 no final do código

Para as variáveis mais relevantes da avaliação laboratorial das amostras, após a realização do teste de Mann-Whitney, não se verificaram diferenças significativas nos valores de TCA (Quadro 5).

**Quadro 5** – Resultados dos testes não paramétricos para avaliar a variação dos níveis de TCA relativamente às variáveis consideradas mais relevantes da avaliação laboratorial das amostras, (Mann-Whitney).

Variáveis	Resultados		
Cheiro a mofo	U=42,00	p= 0,1100	NS
Bolor branco/ cinza	U=90,00	p= 0,0852	NS
Líquenes	U=103,00	p= 0,0935	NS

Diferenças estatisticamente não significativas (NS).

### 3.2 Isolados das amostras

No Quadro 6 apresentam-se os isolados obtidos das amostras. As suas culturas estão numa coleção de trabalho no INIAV. Os grupos foram estipulados de acordo com o género ou espécie, tendo em atenção as características morfológicas descritas para os diversos géneros ou espécies, consoante os isolados. Nos isolados pertencentes à ordem Mucorales o agrupamento teve por base não o género mas a ordem. Foram criados dez grupos para o género *Trichoderma* e seis para o género *Penicillium*. O grupo *Trichoderma* grupo 2 foi subdividido pelas respetivas espécies.

Quadro 6 – Géneros ou espécies dos isolados

Código do Isolado	Género/ Espécie
MA48*	<i>Trichoderma koningii</i> (Grupo 2)
MA14*	<i>Trichoderma koningiopsis</i> (Grupo 2)
MA25*	<i>Trichoderma gamsii</i> (Grupo 2)
MA4, MA3*	<i>Trichoderma hamatum</i> (Grupo 3)
MA2, MA17, MA18*, MA20, MA21, MA32	<i>Trichoderma harzianum</i> (Grupo 4)
MA1*, MA16*	<i>Trichoderma atroviride</i> (Grupo 5)
MA41, MA147	<i>Trichoderma</i> Grupo 1
MA3, MA19, MA27, MA28, MA29, MA31, MA32, MA82	<i>Trichoderma</i> Grupo 6
MA6	<i>Trichoderma</i> Grupo 7
MA24	<i>Trichoderma</i> Grupo 8
MA22	<i>Trichoderma</i> Grupo 9
MA29	<i>Trichoderma</i> Grupo 10
MA1, MA8	<i>Trichoderma</i> spp. (não agrupado**)

\* identificados pela biologia molecular

(continua na página seguinte)

(continuação da página anterior)

Código do Isolado	Género/ Espécie
MA46, MA57, MA58, MA73, MA74, MA77, MA78, MA79, MA81, MA85, MA89, MA90, MA98, MA99, MA100, MA101, MA105, MA51*, MA66*	<i>Penicillium glabrum</i> (Grupo 1)
MA43*, MA49, MA70, MA72, MA102, MA104, MA108, MA109	<i>Penicillium adametzioides</i> (Grupo 2)
MA71, MA72*	<i>Penicillium purpurogenum</i> (Grupo 3)
MA65, MA69*	<i>Penicillium kloeckeri</i> (Grupo 4)
MA59, MA77, MA78, MA81, MA82*, MA85	<i>Penicillium citreo-viride</i> (Grupo 5)
MA114*	<i>Penicillium diversum</i>
MA56 MA30	<i>Penicillium</i> Grupo 6
MA10, MA11, MA12, MA13, MA17, MA20, MA21, MA30, MA31, MA34, MA35, MA36, MA37, MA38, MA39, MA40, MA41, MA42, MA44, MA45, MA46, MA50, MA52, MA53, MA54, MA55, MA60, MA61, MA62, MA63, MA64, MA67, MA68, MA75, MA76, MA78, MA79, MA83, MA84, MA86, MA87, MA90, MA91, MA92, MA93, MA94, MA95, MA96, MA97, MA110, MA111, MA112, MA113, MA115, MA116, MA117, MA118, MA119, MA123, MA124, MA125, MA126, MA127, MA128, MA129, MA130, MA131, MA134, MA136, MA137, MA139, MA143, MA145, MA146, MA149, MA150, MA152, MA155, MA156, MA159, MA162, MA163, MA172, MA174, MA175, MA177, MA181, MA186, MA187, MA190	<i>Penicillium spp.</i> (não agrupado**)
MA137, MA138, MA139, MA140, MA141, MA142, MA143, MA144, MA145, MA146, MA147, MA148, MA149, MA150, MA151, MA152, MA153, MA154, MA190,	Ordem Mucorales
MA155, MA156, MA157, MA158	<i>Histoplasma sp.</i>
MA159, MA160, MA161, MA162, MA163, MA164, MA165, MA166, MA167, MA168, MA169, MA170	<i>Crysonilia sp.</i>
MA171; MA172	<i>Biscogniauxia sp.</i>
MA174, MA175, MA176	<i>Cryphonectria sp.</i>
MA177, MA178, MA179, MA180, MA181, MA182, MA183, MA184	<i>Gliocladium sp.</i>
MA185, MA186	<i>Aspergillus sp.</i>
MA173	<i>Alternaria sp.</i>
MA188	<i>Trichothecium sp.</i>
MA189	<i>Bionectria sp.</i>
MA191	<i>Acremonium sp.</i>
MA192	<i>Fusarium sp.</i>

\* identificados pela biologia molecular

Na Figura 16 estão representados alguns dos isolados recolhidos das amostras.

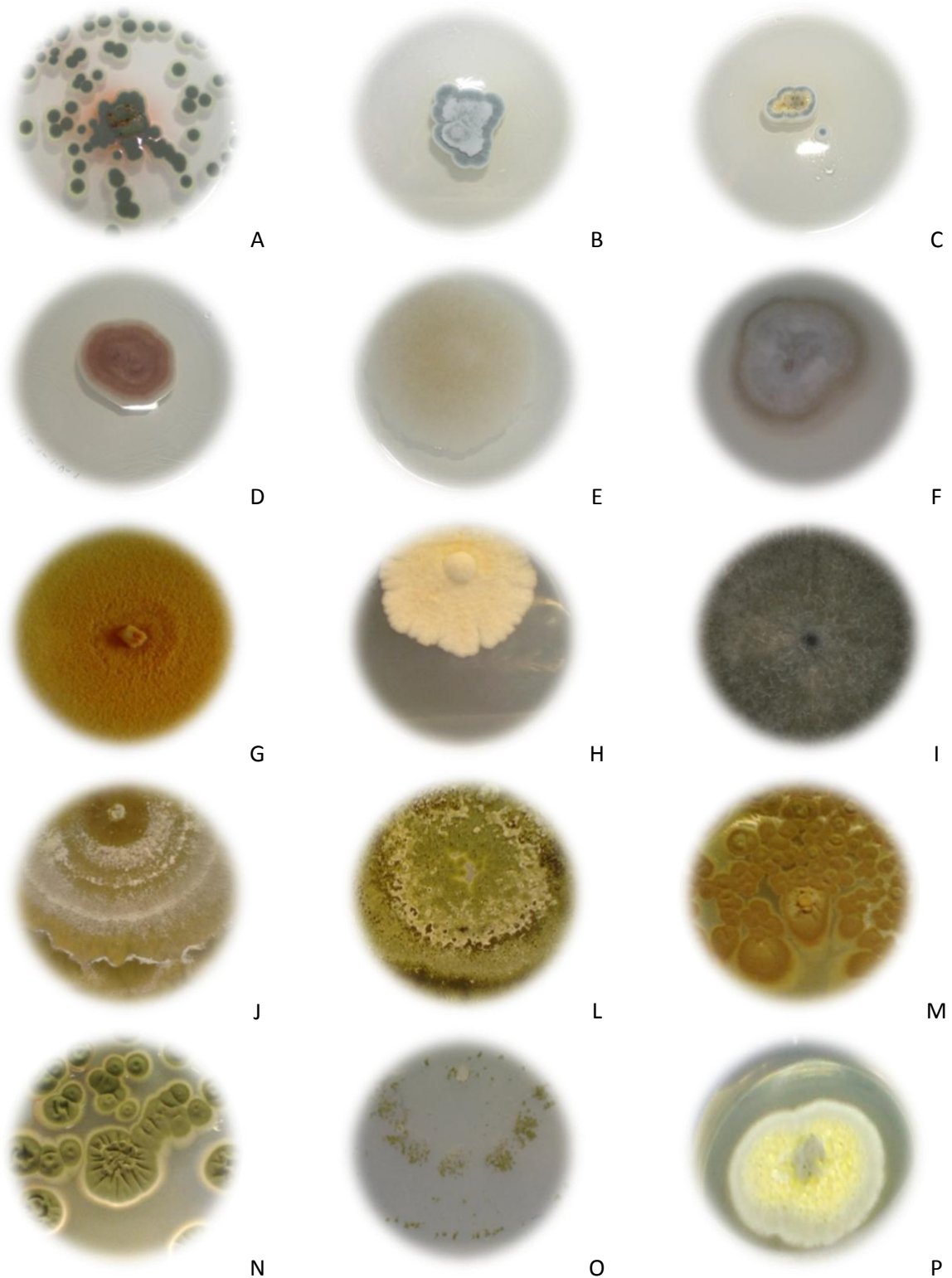


Figura 16 – Colónias de diferentes isolados, a 25°C, na ausência de luz. Colónias em caixas de Petri (9mmØ), com PDA com 7 dias, (A-F) *P. purpurogenum* (A); *Penicillium* 6 (B); *Penicillium kloeckeri* (C); Ordem Mucorales (D); Ordem Mucorales (E); Ordem Mucorales (F); Colónias em caixas de Petri (9mmØ) com PDA, com 14 dias, (G-N) *Cryphonectria* sp (G); *Gliocladium* sp (H); *Biscogniauxia* sp (I); *Trichoderma* 10 (J); *Trichoderma* 8

(L); *Penicillium glabrum* (M); *Penicillium adametzioides* (N). Colónias em caixas de Petri (9mmØ), SNA com 14 dias *Trichoderma* 10 (O). Colónias em caixas de Petri (6mmØ), com PDA com 7 dias *Penicillium citreoviride* (P).

Na Figura 17 estão representadas as frequências de ocorrência (%) de todos os fungos isolados das amostras provenientes das diferentes regiões do país.

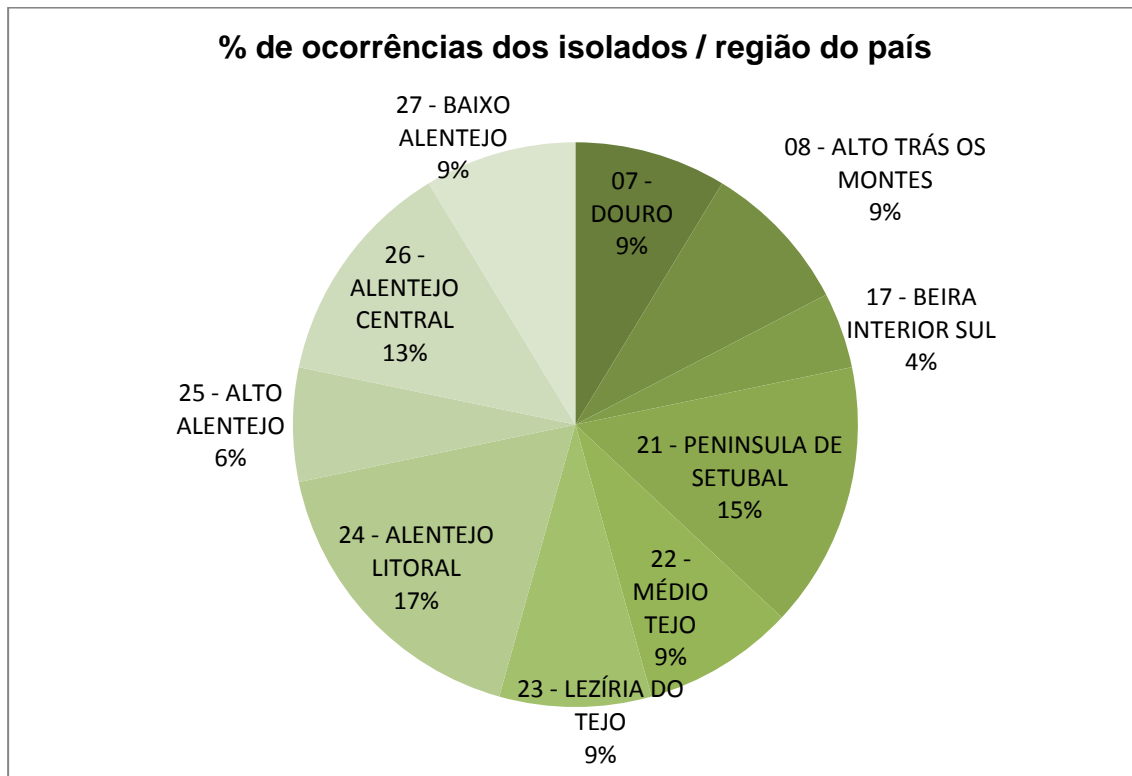


Figura 17 – Frequência de ocorrências (em percentagem) dos isolados das amostras nas diferentes regiões do país.

As regiões do Alto Alentejo Litoral e da Península de Setúbal são as mais representativas no nº de ocorrências dos isolados, sendo reflexo de um maior nº de amostras provenientes dessas regiões, conforme se pode ver no Quadro 7.

**Quadro 7** - Número de ocorrências das amostras, sub-amostras e ocorrências dos isolados por sub-amostra, nas várias regiões do país.

Região	Amostra*	Sub-amostra**	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp	Ordem Mucorales	<i>Histoplasma</i> sp.	<i>Crysonilia sitophilasp.</i>	<i>Biscogniauxia mediterraneasp.</i>	<i>Cryphonectria naterciasp.</i>	<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> spp.
07 - DOURO	4	12	3	8	4						
08 - ALTO TRÁS OS MONTES	4	12	4	5		2	1				
17 - BEIRA INTERIOR SUL	2	6		5			3				
21 - PENINSULA DE SETUBAL	7	21	10	10	4		3	1		4	
22 - MÉDIO TEJO	4	12		7	3						1
23 - LEZÍRIA DO TEJO	4	12		9	5						
24 - ALENTEJO LITORAL	8	24	6	22	6	1				1	
25 - ALTO ALENTEJO	3	9	1	6			3				
26 - ALENTEJO CENTRAL	6	18	3	12	5		2		3		
27 - BAIXO ALENTEJO	4	12	5	10		1		1		2	1

Nos resultados obtidos, verificou-se que o género *Trichoderma* não ocorreu em nenhuma amostra controlo e há algumas amostras com o defeito “mancha amarela” sem a presença deste género, gráfico da Figura 18.

No gráfico da Figura 19 os valores de TCA foram comparados com as percentagens de ocorrência dos isolados das amostras, verificando-se que a Península de Setúbal é a região do país com maior ocorrência do género *Trichoderma* (100%). No Douro, Alto Alentejo e Baixo Alentejo, apesar de nos valores de TCA serem elevados (no Baixo Alentejo o valor do TCA é de 795,2 ng/L) a percentagem de ocorrência do género *Trichoderma* é baixa (33%).

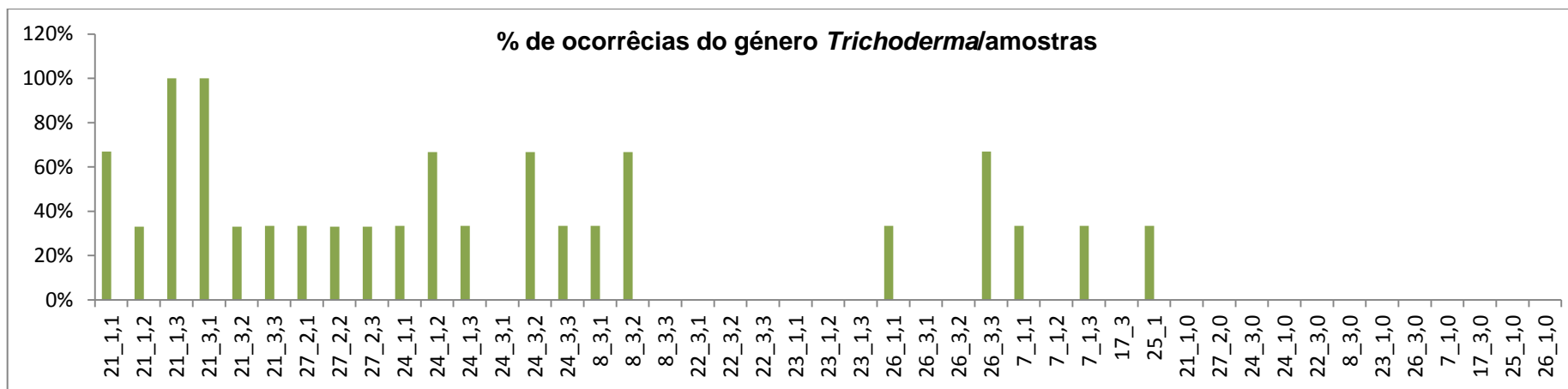


Figura 18 - ocorrência do género *Trichoderma* (%) por amostra: o primeiro algarismo do código de cada amostra indica a região de proveniência (7-Douro, 8-Trás-o-Montes, 17- Beira Interior Sul, 21- Península de Setúbal, 22-Médio Tejo, 23- Lezíria do Tejo, 24- Alentejo Litoral, 25- Alto Alentejo, 26- Alentejo Central, 27-Baixo Alentejo). Amostras controlo apresentam o nº 0 no final do código.

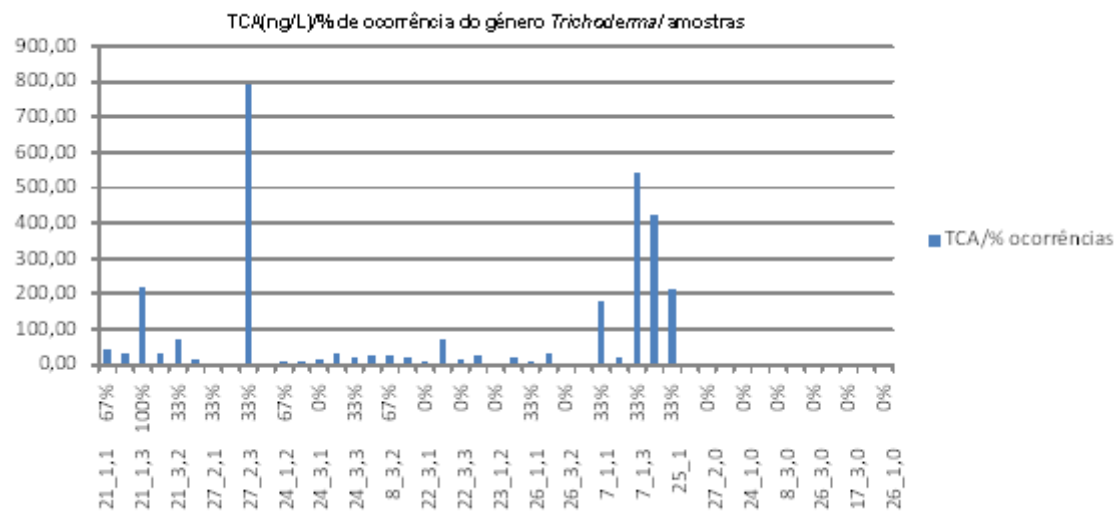


Figura 19 - Valores de TCA por ocorrência do género *Trichoderma* (%) e por amostra: o primeiro algarismo do código de cada amostra indica a região de proveniência (7- Douro, 8-Trás-o-Montes, 17- Beira Interior Sul, 21- Península de Setúbal, 22-Médio Tejo, 23- Lezíria do Tejo, 24- Alentejo Litoral, 25- Alto Alentejo, 26- Alentejo Central, 27- Baixo Alentejo). Amostras controlo apresentam o nº 0 no final do código

Após a análise de componentes principais (ACP) das diferentes espécies/gêneros de fungos identificados, foram consideradas relevantes, em relação à variável TCA, as espécies/gêneros: *Trichoderma* grupo 1; *Trichoderma hamatum*; *Trichoderma harzianum*; *Trichoderma atroviride*; *Trichoderma* grupo 6; *Trichoderma* spp; *Penicillium* spp; *Gliocladium* sp, *Crysonilia* sp., *Biscogniauxia* sp, *Cryphonectria* sp; ordem Mucorales; *Histoplasma* sp. e *Aspergillus* spp. (Anexo 5).

Foram realizadas análises de variância a um fator para verificar o comportamento dos isolados considerados relevantes em relação ao TCA. Para o efeito foram definidas quatro classes com base nos histogramas de distribuição de frequências dos valores de TCA. Assim, com base na Figura 14 (ponto 3.1) foi constituída uma classe que engloba os valores de TCA superiores a 100 (Classe 3, N= 6) e, posteriormente, com base no novo histograma que incluiu apenas com os valores de TCA abaixo de 100, foram constituídas as restantes classes: Classe 0 com o intervalo ]0, 4] e N= 16; Classe 1 com o intervalo ]4, 24] e N= 15; Classe 2 com o intervalo ]24, 100] e N = 8 (Anexo 6).

Os resultados das análises de variância permitiram revelar que os isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* diferenciam a classe de baixos valores de TCA de todas as outras, sendo a ocorrência deste gênero significativamente mais elevada em amostras com níveis de TCA acima de 4 ng/L ( $F_{(3, 41)} = 5,2106$ ;  $p=0,0038$ ) (Fig. 20) (Anexo 7).

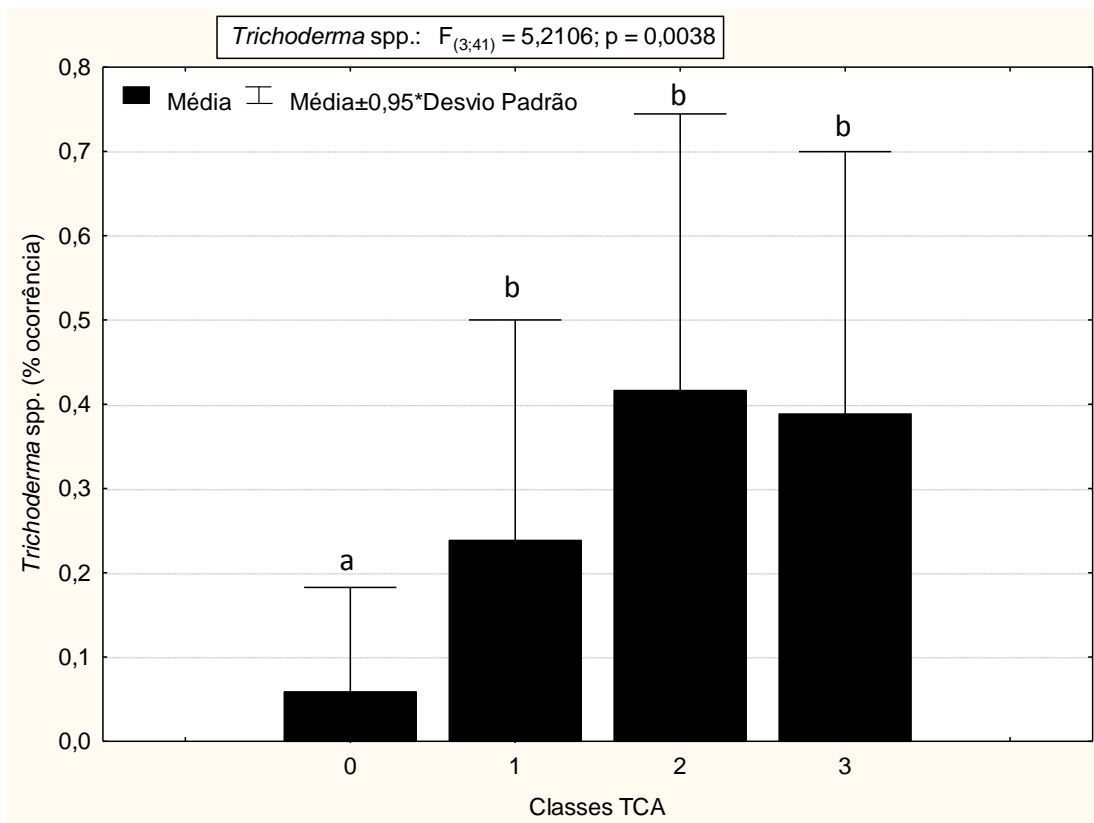


Figura 20 - Percentagem de ocorrência de *Trichoderma* spp. nas amostras. As letras associadas a cada linha correspondem aos Grupos Homogêneos definidos pelo Teste de Fisher-LSD.

As análises de variância feitas revelaram, para cada espécie de *Trichoderma* sp., que a variável TCA (classes) só está significativamente relacionada com a presença de *Trichoderma* grupo 6 com  $F_{(3,41)}=4,7580$   $p= 0,0062$  (Anexo 4).

Com efeito, o *Trichoderma* grupo 6 nunca ocorre em amostras sem mancha amarela e com TCA abaixo de 4 ng/L (classe de TCA mais baixo).

O género *Penicillium* ao contrário do género *Trichoderma* revelou estar significativamente mais associado à classe das amostras com menores teores de TCA  $F_{(3,41)}= 4,5580$ ,  $p= 0,0076$  (Fig. 21; Anexo 4).

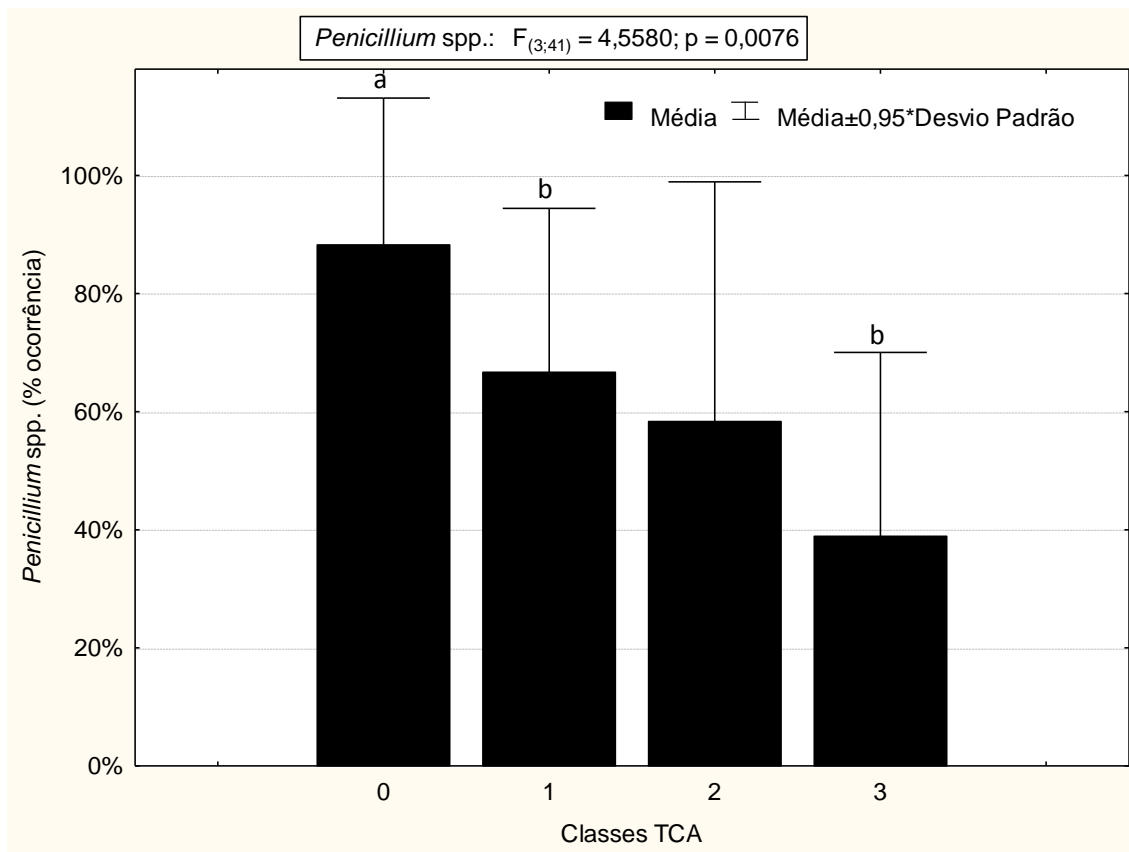


Figura 21- Percentagem de ocorrência de *Penicillium* spp. nas amostras. As letras associadas a cada linha correspondem aos Grupos Homogêneos definidos pelo Teste de Fisher- LSD.

Os resultados das análises de variância aplicados aos restantes fungos não revelaram diferenças significativas para as diferentes classes de TCA (Anexo 7).

Relativamente à relação entre a presença dos vários grupos de fungos e as variáveis relacionadas com a parcela, destacou-se o grupo Mucorales com uma presença significativamente maior nas amostras provenientes de parcelas sem matos ( $F_{(1,43)} = 4,7751$ ;  $p = 0,0344$ ), tal como *Cryphonectria* sp. ( $F_{(1,43)} = 5,1600$ ;  $p = 0,0282$ ), e com uma presença nula nas amostras provenientes das zonas mais secas ( $F_{(2,42)} = 6,0191$ ;  $p = 0,0050$ ). Já os fungos *Crysonilia* sp. e *Biscogniauxia* sp. aparecem mais associados às amostras provenientes de zonas mais secas (Anexo 8).

### **3.3 Caracterização das espécies identificadas**

Foram identificadas espécies do género *Trichoderma* e do género *Penicillium*, resultado da combinação entre os métodos morfológicos e moleculares.

Os resultados referentes às características morfológicas dos isolados pertencentes ao género *Trichoderma* estão apresentados no Quadro 8 e na Figura 22.

Quadro 8- Descrição das colónias dos isolados de *Trichoderma* sp. após 6 dias de crescimento, em meio PDA e meio SNA, a 23°C e na ausência de luz

Espécie/grupo	isolado	meio de cultura	textura	margem	Pústulas conídias	aspeto cultural da face superior da colónia	exsudado	cheiro a coco	diâmetro médio da colónia (cm)
T. 1	MA11, MA32	PDA	aveludado	regular	ausente	conídios verdes distribuídos uniformemente	ausente	ausente	6,34
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	ausente	ausente	
<i>T. koningii</i>	MA15	PDA	lanoso	regular	ausente	conídios amarelo/esbranquiçados distribuídos uniformemente	ausente	ausente	5,0
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	ausente	ausente	
<i>T. koningiopsis</i>	MA12	PDA	lanoso	regular	ausente	conídios amarelo/esbranquiçados distribuídos uniformemente	castanho	ausente	5,0
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas num anel concêntrico na periferia	ausente	ausente	
<i>T. gamsii</i>	MA25	PDA	lanoso	regular	ausente	conídios amarelo/esbranquiçados distribuídos uniformemente	ausente	com	5,4
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	ausente	ausente	
<i>T. hamatum</i>	MA1, MA4	PDA	cotonoso	regular	amarelas	conídios verdes distribuídos em anéis concêntricos, por vezes com afloramentos radiais de micélio farinhoso. Conídios amarelos em pústulas	ausente	ausente	5,4
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos	ausente	ausente	
<i>T. harzianum</i>	MA2, MA17 MA18, MA20, MA21, MA32	PDA	cotono baixo	regular	ausente	Cor branca a sulfuroso coberta uniformemente com conídios verdes abundantes	amarelo e castanho-escuro	ausente	6,48
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anel concêntrico	ausente	ausente	

Espécie/grupo	isolado	meio de cultura	textura	margem	Pústulas conídias	aspecto cultural da face superior da colónia	exsudado	cheiro a coco	diâmetro médio da colónia (cm)
<i>T.atroviride</i>	MA1, MA16	PDA	aveludado	irregular	ausente	anéis concêntricos cobertos com conídios verdes abundantes	ausente	ausente	5,2
		SNA		irregular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas num anel concêntrico na periferia	ausente	ausente	
T.6	MA10, MA19, MA28, MA29, MA31, MA32, MA33	PDA	feltroso	regular	ausente	conídios verdes e amarelados distribuídos em anéis concêntricos	castanho a castanho-escuro	ausente	6,14
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	ausente	ausente	
T.7	MA6	PDA	aveludado	irregular	ausente	conídios verdes distribuídos uniformemente	ausente	ausente	6,0
		SNA		irregular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos	ausente	ausente	
T.8	MA24	PDA	cotonoso	Irregular	amarelas a verdes	conídios verdes distribuídos uniformemente e conídios em pústulas dispostas num anel concêntrico	castanho-escuro	ausente	6,2
		SNA		irregular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	ausente	ausente	
T.9	MA22	PDA	cotonoso	regular	amarelas a verdes	conídios verdes distribuídos uniformemente e conídios em pústulas dispostas num anel concêntrico	amarelo	ausente	6,2
		SNA		regular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos na periferia	castanho-escuro	ausente	
T.10	MA29	PDA	feltroso	irregular	branca	conídios amarelos distribuídos uniformemente e conídios em pústulas dispostas em anéis concêntricos	ausente	ausente	6,12
		SNA		irregular	verdes	conídios verdes em pústulas dispostas em anéis concêntricos	ausente	ausente	

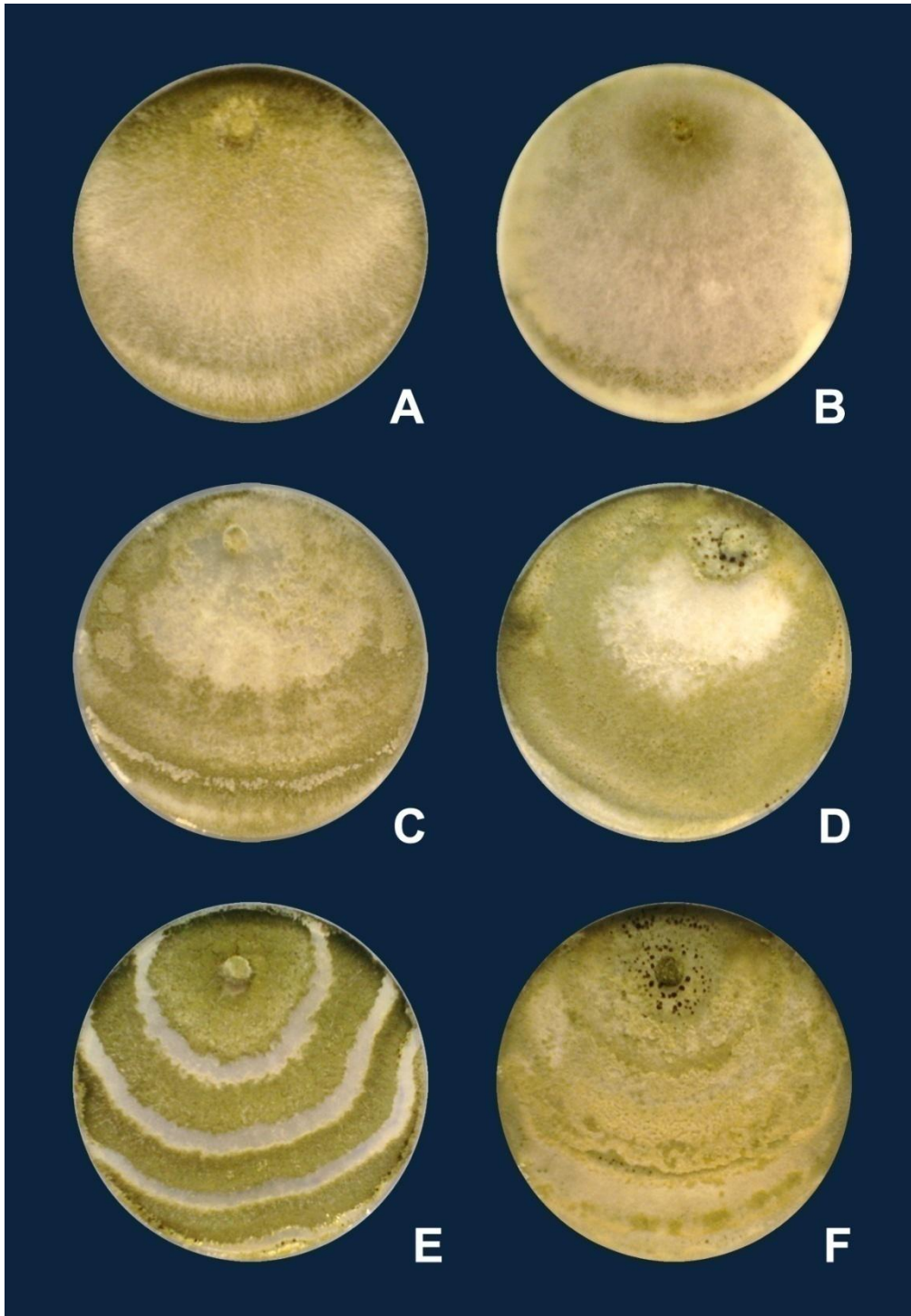


Figura 22 – Colônias em PDA (15mL), após 14 dias de crescimento, 23°C no escuro. A – *Trichoderma* grupo 1; B – *Trichoderma koningiopsis*; C – *Trichoderma hamatum*; D – *Trichoderma harzianum*; E – *Trichoderma atroviride*; F – *Trichoderma* grupo 6

A análise estatística ANOVA dos crescimentos das culturas dos vários grupos de *Trichoderma* estabelecidos permitiram apenas individualizar o Grupo 5 (*Trichoderma atroviride*), apresentando este grupo crescimento significativamente menor que todos os outros. Os Grupos 6 e 2 não se distinguem entre si mas apresentam um crescimento significativamente maior que o Grupo 5 e significativamente menor que todos os outros ( $F_{(9,242)} = 20,07$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 23; Anexo 9).

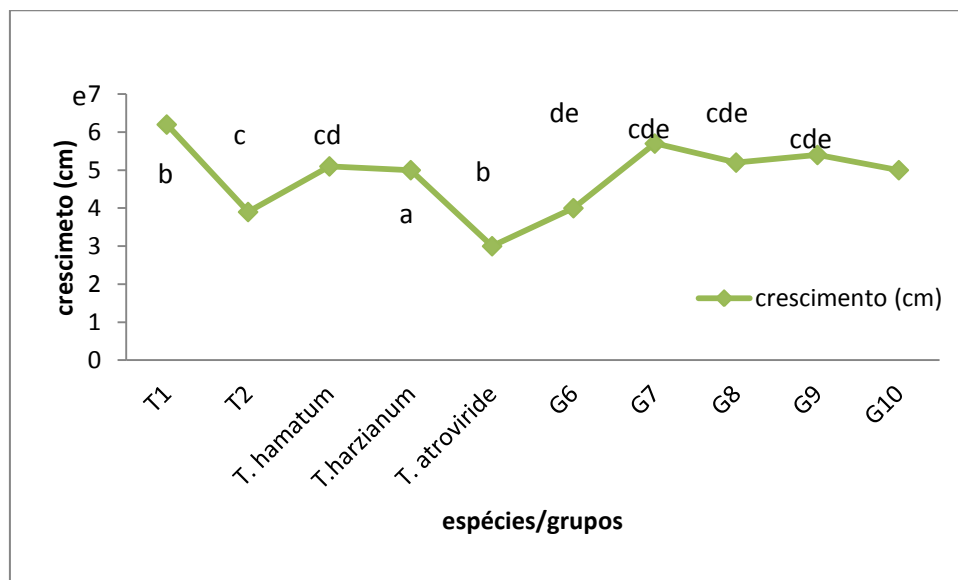


Figura 23 – Taxa de crescimento (cm) dos grupos *Trichoderma* spp. As letras associadas a cada ponto correspondem aos Grupos Homogêneos definidos pelo Teste de Fisher- LSD.

Os resultados referentes às características morfológicas dos isolados pertencentes ao género *Penicillium* estão apresentados no Quadro 9.

Quadro 9 –Descrição das 5 diferentes colónias do género *Penicillium* após 6 dias de crescimento à temperatura de 25°C e na ausência de luz.

	face superior da colónia	micélio	zonagem	margem	exsudado	Produção de pigmento	face inferior da colónia	diâmetro da colónia (cm)
<i>P. admatizoides</i>	cor verde acinzentado	feltroso, funículoso	ausente	regular	ausente	ausente	cor amarela	3-3,2
<i>P. glabrum</i>	cor verde	aveludado funículoso	ausente	regular	ausente	solúvel amarelo	amarela a amarelo alaranjado	2,8-3,4
<i>P. citreo-viride</i>	cor amarelo	aveludado funículoso	ausente	regular	amarelo	ausente	cor amarela	2,67
<i>P. purpurogenum</i>	cor verde	aveludado funículoso	ausente	regular	vermelho	solúvel vermelho	cor vermelho-acastanhado	2,13
<i>P. diversum</i>	cor acinzentado verde	aveludado	com	regular	ausente	ausente	cor amarelo muito claro	5-5,5

No Quadro 10 são apresentadas as medições dos conidióforos, das fiálides, dos conídios e para as espécies biverticiladas são apresentadas as medições das métulas.

Quadro 10 – Dados biométricos das estruturas de 5 espécies do género *Penicillium*

<b>Espécie Monoverticilada</b>	<b>fiálides por conidióforo</b>	<b>conidióforos</b>	<b>fiálides</b>	<b>conídios</b>	
<i>P. admatizoides</i>	3-5	lisos 32,31 µm	lanceoladas 8,58-(9,09µ±0,44)- 11,44 µm	globosos, hialinos, lisos ou ligeiramente rugosos 2,57-(3,05±0,116)-3,43 µm	
<i>P. glabrum</i>	3-4	lisos 40,65 µm	ampuliformes 8,58µm	conídios globosos, hialinos, lisos 2,86-(3,35±0,036)- 3,432 µm	
<i>P. citreo-viride</i>		lisos 65,78 µm	ampuliformes 2,86-(5,42±0,744)-8,58 µm	globosos, hialinos, lisos 1,43-( 1,69± 0,074)- 2,002 µm	
<b>Espécie Biverticilada</b>	<b>conidióforos</b>	<b>métulas</b>	<b>Nº de fiálides em cada métula</b>	<b>fiálides</b>	<b>conídios</b>
<i>P. purpurogenum</i>	lisos 70 µm	14.3 µm	5	fiálides lanceoladas 7,15-(13,63±1,637)- 17,16	elipsoidais hialinos, lisos 288-(2,898±0,148)-3,432 µm
<i>P. diversum</i>	300 µm	9-11µm	3	lanceoladas 8-10 µm	elipsoidais hialinos, lisos 2-2,2µm

### 3.4. Enquadramento geográfico (SIG)

Os isolados das amostras encontram-se georreferenciados nas diferentes zonas do País, Figura 24.

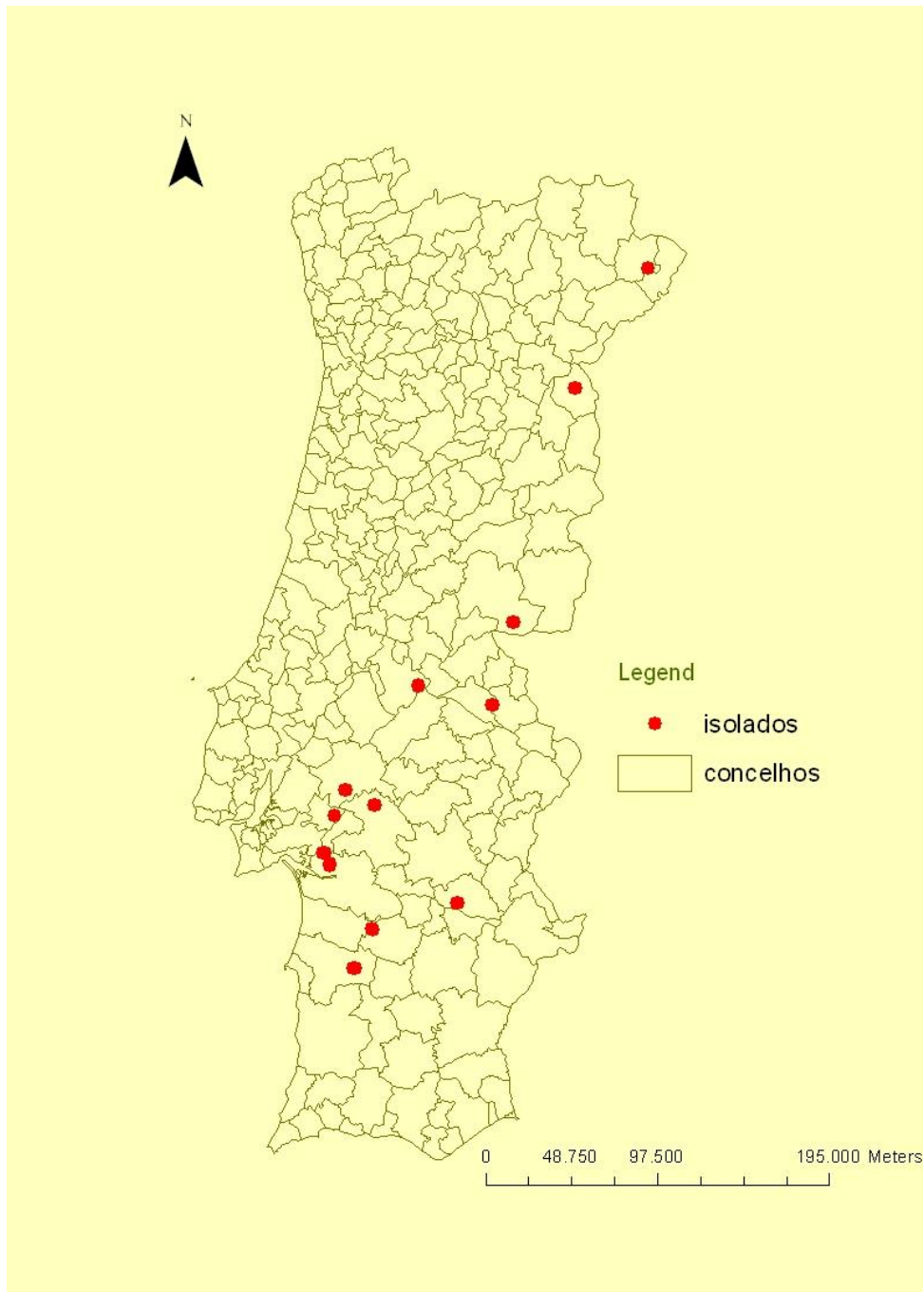


Figura 24 – Distribuição geográfica dos isolados das amostras

O género *Penicillium* spp. encontra-se distribuído por todas as regiões em diferentes percentagens de ocorrência, (Fig. 25).

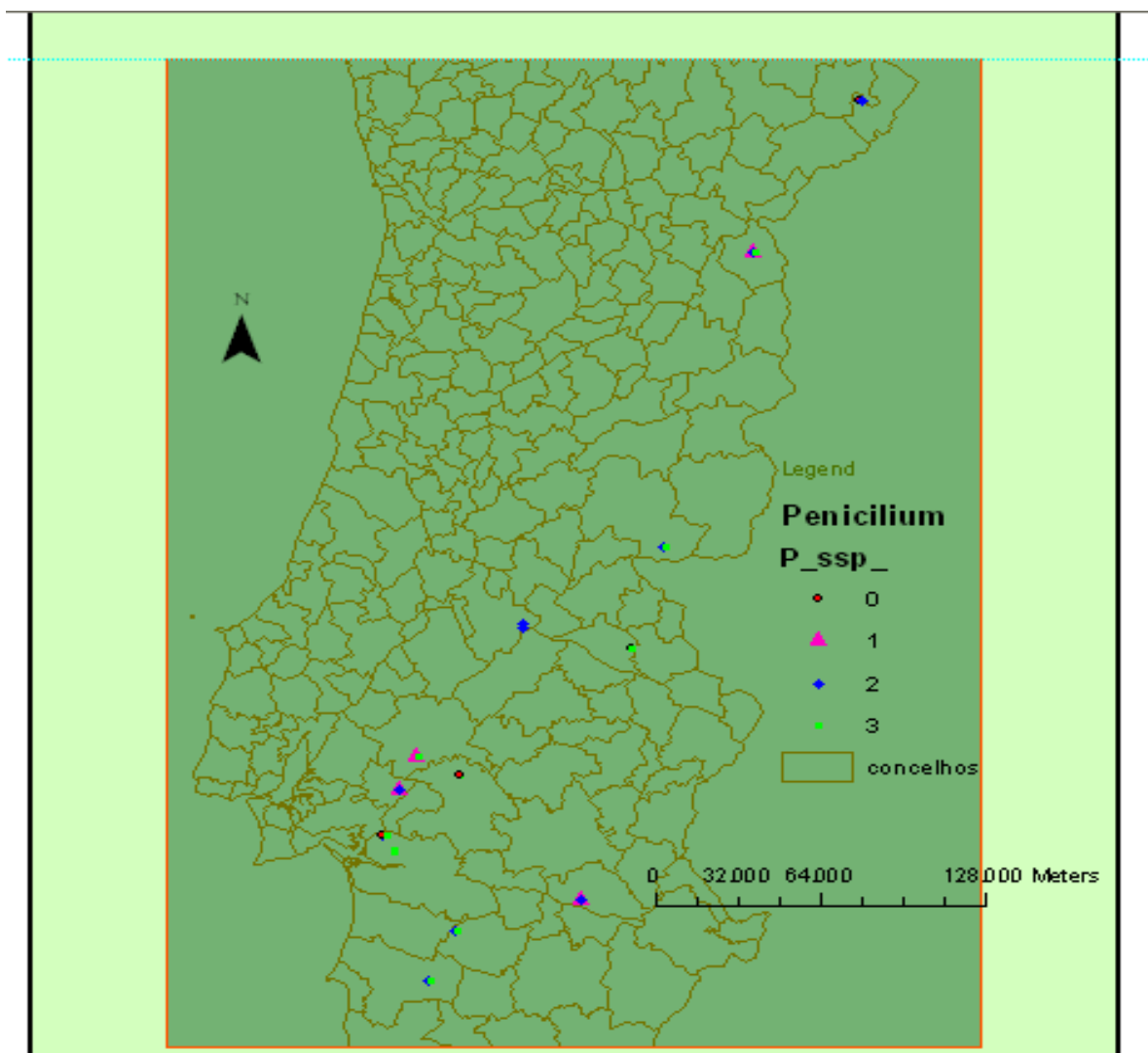


Figura 25 – Distribuição geográfica do *Penicillium* spp. (3 -100%; 2 - 67%; 1 - 33%; 0 - 0%)

Por último, na Figura 26 vê-se a distribuição do *Trichoderma* spp. e a azul encontra-se a distribuição do *Thichoderma* grupo 6. O uso da ferramenta SIG permite a visualização geográfica acompanhada de informação complementar. Neste exemplo, ao consultar a região Douro (região 7), verifica-se quais as amostras usadas no estudo desta região, as coordenadas da região, a percentagem de ocorrência dos isolados

desta região, os valores de TCA associados à amostra e os dados do campo. Ao escolher a amostra 7\_1,3 para a "shapefile Trichoderma" o programa revela que existe *Trichoderma Harzianum* (33%), o *Trichoderma* grupo 1 (33%) e o *Trichoderma* grupo 6. É ainda disponibilizado o valor de TCA - 544,67 ng/L. Da mesma forma, a partir da informação da shapefile "campo" ficamos a saber os dados de campo associados a essa amostra 7\_1,3.

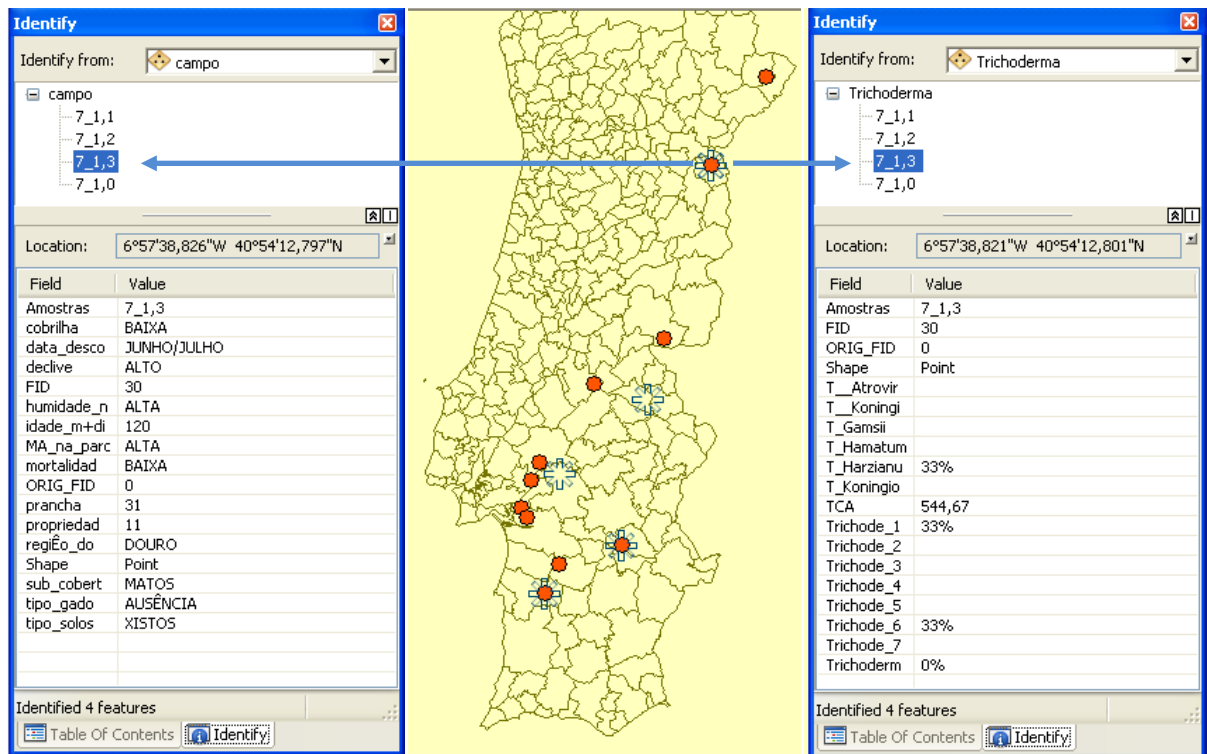


Figura 26 – Distribuição geográfica do *Trichoderma* spp. e o *Trichoderma* grupo 6

Através de outras “shapefiles” o programa permite estabelecer inúmeras relações entre todas as variáveis lançadas na base de dados.

A atualização desta base de dados permite relacionar os dados existentes com aspetos ou situações futuras para as análises que a indústrias corticeiras considerarem importantes.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O TCA é o fator que mais vezes aparece referenciado como sendo o principal responsável pelo “gosto a rolha” em vinhos engarrafados. Ainda que existam casos de vinhos com “gosto a rolha” sem TCA, e de a indústria ter investido em técnicas que permitem a eliminação do TCA de cortiça, este composto continua a ser um dos grandes inimigos da indústria corticeira.

A “mancha amarela” da cortiça é um defeito sensorial que empiricamente se tem associado à presença de TCA e que, como já foi dito na introdução deste trabalho, implica a rejeição de grandes quantidades de cortiça em fábrica. A comunidade científica tem-se debruçado afincadamente sobre esta temática e ainda que não haja certezas absolutas sobre as principais origens do TCA presente nos vinhos, os fungos filamentosos, são apontados como os principais responsáveis pela reação de biometilização do TCA (através da enzima O-methyltransferase), em presença do seu correspondente precursor TCP (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002; Barreto *et al.*, 2011). Relativamente à “mancha amarela”, à sua origem e à sua relação com o TCA, muito pouco se sabe.

Este foi um trabalho pioneiro que permitiu responder a algumas questões da indústria e da comunidade científica. Com este trabalho prova-se que a cortiça com “mancha amarela” tem elevados teores de TCA e como tal, pranchas de cortiça com este defeito devem ser eliminadas da linha de produção de rolhas para vinhos.

Os resultados deste trabalho permitiram verificar que fungos do género *Trichoderma*, nomeadamente os isolados “*Trichoderma* grupo 6”, estão intimamente associados à “mancha amarela” e a níveis de TCA considerados problemáticos para a indústria. Estes fungos são responsáveis pela degradação da parede celular das células de cortiça, através da produção de enzimas celulósicas e enzimas ligninolíticas (Júnior *et al.*, 2009). Os resultados evidenciam de que nem todas as espécies serão determinantes para a produção de TCA, uma vez que se verificou a presença de espécies deste género nalgumas amostras com baixos teores de TCA.

Será da maior importância a identificação específica dos isolados classificados como “*Trichoderma* grupo 6”, por serem provavelmente os que têm uma maior contribuição para a produção de TCA. Devido à elevada diversidade de fungos obtida neste estudo, o trabalho de identificação das espécies revelou-se ciclópico e incompatível com os “timings” requeridos para apresentação de uma dissertação de mestrado no entanto deu-se prioridade a este género, pelas razões já apresentadas.

Ainda não foi possível identificar todos os isolados mas os resultados,

nomeadamente os testes de crescimento, indiciam que venham a decorrer ajustamentos nos grupos já criados com base na morfologia.

Após a finalização da identificação específica dos fungos relacionados com o TCA e “mancha amarela” será da maior importância realizar ensaios de inoculação para estudar/comprovar a interferência que estes fungos têm na produção de TCA.

Ao contrário dos fungos do género *Trichoderma*, os resultados obtidos para os fungos do género *Penicillium* revelaram que este género está sempre associado a baixos valores de TCA (valores negligenciáveis para a indústria).

Segundo Maggi *et al.* (2008) e Prak *et al.* (2007) fungos do género *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Trichoderma*, têm a capacidade de converter TCP em TCA. No entanto para o género *Penicillium*, os resultados obtidos, parecem contradizer aqueles estudos. Seria facilmente justificável a fraca ligação do *Penicillium* sp. aos níveis elevados de TCA uma vez que há elevada prevalência de *Trichoderma* sp. nessas amostras, e espécies deste género segregam substâncias que impedem o crescimento de fungos de outros géneros (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002; Ortiz & Orduz, 2001). No entanto na ausência de *Trichoderma* sp. seria de esperar que as espécies de *Penicillium* sp. estivessem associadas a elevados valores de TCA, o que não aconteceu.

Relativamente ao trabalho exploratório cujo objetivo foi o de relacionar o TCA com algumas variáveis associadas às características da propriedade de onde são provenientes as amostras (dados de campos), obtiveram-se alguns resultados interessantes e coerentes com o conhecimento atual. Por exemplo o sub-coberto ou a humidade na parcela parecem ser variáveis com algum interesse para explorar, por terem revelado influência no tipo de micoflora presente na cortiça. É de referir no entanto, que estes resultados devem ser encarados apenas como exploratórios podendo constituir a base de um trabalho mais rigoroso no futuro.

## Referências bibliográficas

ADC (2012). Análise do sector e da fileira da cortiça em Portugal. Relatório Final Gabinete de Estudos Económicos e Acompanhamento de Mercados, Autoridade da Concorrência, **195**: 89-90.

Almeida, M. & Pinto-Correia, T. (2012). Novas procuras na paisagem rural do Alentejo: as visões e preferências dos urbanos. *Revista da Faculdade de Letras – Geografia – Universidade do Porto*, **1**: 101–121.

Álvarez-Rodríguez, M. L., Lopez-Ocana, L., Lopez-Coronado, J. M., Rodriguez, E., Martinez, M. J., Larriba, G. & Coque, J. J. (2002). Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (12): 5860-5869.

Álvarez-Rodríguez, M. L., Belloch, C., Villa, M., Uruburu, F., Larriba, G. & Coque, J-J R. (2003). Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiology Letters*, **220**: 49-55.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhan.g Z., Miller, W. & Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25** (17): 3389-3402.

APCOR (Associação Portuguesa da Cortiça). Disponível em <http://www.apcor.pt/artigo/139.htm>, acedido em Janeiro 2014.

APCOR (Associação Portuguesa da Cortiça). Disponível em <http://www.apcor.pt/artigo/comercializacao-cortica.htm>, acedido em Janeiro 2014.

APCOR (Associação Portuguesa da Cortiça). Disponível em <http://www.apcor.pt/artigo/montado.htm>, acedido em Janeiro 2014.

Barreto, M. C., Vilas Boas, L. C., Carneiro, L. & San Romão, M.V. (2011). Volatile Compounds in Samples of Cork and also Produced by Selected Fungi. *J. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 6568-6574.

Bragança, H., Rigling, D., Diogo, E., Capelo, J., Phillips, A. & Tendeiro, Rogério (2011). *Cryphonectria naterciae*: A new species in the *Cryphonectria-Endothia* complex and diagnostic molecular markers based on microsatellite-primed PCR. *Fungal Biology* **115**: 852-861.

Bugalho, M.N., Caldeira, M. C., Santos Pereira, J., Aronson, J. & Pausas, J. G. (2011). Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **9**: 278–286.

Campanholo, M. (2013). Geographic Information Systems. *Diapositivos das aulas da disciplina de Estatística e Delineamento Experimental*, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Centeno, S. & Calvo, M. A. (2001). Enzymatic activity of microorganisms isolated from cork wine stoppers. *Microbios*, **106** (413): 69-73.

Costa, A. & Pereira, H. (2007). A silvicultura do sobreiro. *In*: Silva, J. S. (ed). *Os montados – muito para além das árvores*. Coleção: Árvores e Florestas de Portugal, Público, Comunicação Social, S.A. e Fundação Luso-Americana para o desenvolvimento, 248 pp.

Costa, A. & Pereira, H. (2007). Montados e sobreirais: uma espécie, duas perspectivas. *In*: Silva, J. S. (ed). *Os montados – muito para além das árvores*. Coleção: Árvores e Florestas de Portugal. Público, Comunicação Social, S.A. e Fundação Luso-Americana para o desenvolvimento, 248 pp.

Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. & Samson, R.A. (2009). *Fungal Biodiversity*. CBS Laboratory Manual Series 1, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht , 270 pp.

ESRI (Environmental Systems Research Institute) (2014). Disponível em <http://www.esriportugal.pt>, acedido em Abril 2014.

Felter, R., Álvarez-Rodríguez, M.L., Barreiro, C., Godio, R.P. & Coque, J.J.R. (2010). Characterization of a novel 2,4,6- trichlophenol - inducible gene encoding clorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* responsible for the formation of

chloroanisoles and detoxification of chlorophenols. *Fungal Genetics and Biology*, **47**: 458-467.

Geopoint (2005). *Formação em Sistemas de Informação Geográfica*. Geopoint - Geografia, Formação & Marketing, Lda., Lisboa.

ICNF (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas) (2014). Disponível em <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/ifn6#dad>, acessido em Janeiro 2014.

INE (Instituto Nacional de Estatística). Disponível em [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_main](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main), acessido em Janeiro 2014.

Fortes, M.A., Rosa, M.E. & Pereira, H. (2004). *A Cortiça*. 2ª Edição. Instituto Superior Técnico, Lisboa, 259 pp.

Graça, J. A. R. (1998). *A suberina da cortiça. Lípidos macromoleculares estruturais das paredes celulares suberificadas da cortiça de Quercus suber L.*. Tese de Doutoramento em Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 135 pp.

Goodchild, M. F. (2009). Geographic information systems and science: today and tomorrow. *Procedia Earth and Planetary Science*, **1**: 1037-1043.

Júnior, G. F., Braga, R.M., Lopes V. R. O., Sousa, C. G., Amorim, M. V. F. S., Martins, S. C. S., Pinto, G. A. S. & Martins, C. M. (2009). Atividade xilanolítica em fungos isolados de solo de manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga. *In: Proceedings "XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo"*, Fortaleza. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11558/1/AT09058.pdf> (accedido em Abril 2014).

MADRP (2000). *O sobreiro e a cortiça - um património universal e uma herança a preservar*. Direção Geral do Desenvolvimento Rural, Lisboa, 91 pp.

Maggi, L., Mazzoleni, V., Fumi, M.D. & Salinas, M.R. (2008). Transformation ability of fungi isolated from cork and grape to produce 2,4,6-trichloroanisole from 2,4,6-trichlorophenol. *Food Additives and Contaminants*, **25** (03): 265-269.

Martins, I., Garcia, H., Varela, A., Núñez, O., Planchon, S., Galceran M.T., Renaut, J., Rebelo, L. P. N. & Silva Pereira, C. (2014). Investigating *Aspergillus nidulans* secretome during colonisation of cork cell walls. *Journal of proteomics*, **98**: 175-188.

Maroco, J. (2003). *Análise Estatística com utilização SPSS*. Edições Sílabo, 508 pp.

Mazzoleni, V. & Maggi, L. (2007). Effect of wine style on the perception of 2,4,6-trichloroanisole, a compound related to cork taint in wine. *Food Research International*, **40**: 694-699.

Natividade, J.V. (1950). *Subericultura*. Ministério da Economia – Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Lisboa, 387 pp.

Navascués, E., Calderón, F. & Suárez, J. A. (2001). El metabolismo microbiano en el binómio corcho-vino. *ACE Revista de Enología*, **54**: 8-12.

[http://www.acenologia.com/ciencia54\\_1.htm](http://www.acenologia.com/ciencia54_1.htm) (acedido em Abril 2014).

Neto, C. V. (2005). *Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de Quercus suber L. Estudos dos efeitos de matriz por micro-extração em fase sólida na região de espaço cabeça*. Tese de Mestrado em Métodos Instrumentais e Controlo da Qualidade Analítica, Universidade de Aveiro, 110 pp.

Oliveira, A. C., Peres, C. M., Pires Correia, J. M., Pereira, C. S., Vitorino S., Marques, J. J. F., Crespo, M. T B. & San Romão, M.V. (2003). Cork stoppers industry: defining appropriate mould colonization. *Microbiological Research*, **158**: 117-124.

Oliveira, B. R. (2011). *Identification fingerprinting of cork fungi: a phenetic approach*, Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 44 pp.

Oliveira, G. & Costa, A. (2012). How resilient is *Quercus suber* L. to cork harvesting? A review and identification of knowledge gaps. *Forest Ecology and Management*, **270**: 257–272.

Oliveira, R. (2002). Aplicação de uma técnica de análise multivariada (Análise de Componentes Principais - ACP) para a descrição de dados de monitorização de séries de lagoas tratando águas residuais domésticas no nordeste do Brasil. *Proceedings do*

”XXXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental”, Cacun, México, 27-31 Outubro.

Ortiz, A. & Orduz, S. (2001). In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*, **150** (2): 53-60.

Pausas, Juli G., Llovet, J., Rodrigo, A. & Vallejo R. (2008). Are wildfires a disaster in the Mediterranean basin? – A review. *International Journal of Wildland Fire*, **17**: 713-723.

Pedra, C. S. V. (2013). *Otimização de revestimento em rolhas naturais*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 58 pp.

Pereira, H. (2007). *Cork: Biology, Production and Uses*. Elsevier Publications, 336 pp.

Pinto-Correia, T., Ribeiro, N. & Sá Sousa, P. (2011). Introducing the montado, the cork and holm oak agroforestry system of Southern Portugal. *Agroforest System*, **82**: 99-104.

Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, 593 pp.

Prak S., Gunata Z., Guiraud J-P. & Galindo S. S (2007). Fungal strains isolated from cork stoppers and formation of 2,4,6-trichoroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiology*, **24**: 271 – 280.

QUERCUS (Associação Nacional de Conservação da Natureza) (2014). Disponível em <http://www.quercus.pt/>, acedido em Janeiro 2014.

Ramos, M., Rocheta, M., Carvalho, L., Inácio, V., Graça, J. & Morais-Cecilio, L. (2013). Expression of DNA methyltransferases is involved in *Quercus suber* cork quality. *Tree Genetics & Genomes*, **9**: 1481–1492.

Raper, K. B., Thom, C. & Fennel, D. I. (1949). *A Manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, 875 pp.

Rocha, S. M., Delgadillo, I. & Correia, A. J. F. (1996). GC-MS Study of Volatiles of Normal and Microbiologically Attacked Cork from *Quercus suber* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 865-871.

Rocha, S. M., Ganito, S., Barros, A., Carapuça, H. M. & Delgadillo, I. (2005). Study of cork (from *Quercus suber* L.) – wine model interactions based on voltammetric multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, **528**: 147-156.

Rudnitskaya, A., Delgadillo, I., Rocha, S.M., Costa, A. M. & Legin, A. (2006). Quality evaluation of cork from *Quercus suber* L. by the electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, **563** (1-2): 315-318.

Samson, R.A., Hockstra, E. & Frisvad, J.C. (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. CBS Centraalbureaus voor Schimmelcultures Utrecht, 389 pp.

San Romão, M.V. (2009). Biological diversity preservations as a challenge – the role of microbiological cork colonization a short review. *Ciência Técnica Vitivinícola*, **24**: 81-90.

Santos, M. N., Bragança, M. H. & Casimiro, P.P. (2005). Microrganismos associados à cortiça em diferentes fases da sua fileira. *Silva Lusitana*, **13**: 75-93.

Santos, S., Rodrigues, J. & Graça, J. (2005) Variabilidade da composição química da suberina de cortiças amadias de várias origens geográficas. *Proceedings do “5º Congresso Florestal”*, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, 16-19 Maio.

Serra, R., Peterson, S., CTCOR & Venâncio, A. (2008). Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. *Research in Microbiology*, **159**: 178-186.

Silva Pereira, C., Figueiredo Marques, J. J. & San Romão, M.V. (2000). Cork taint in Wine: scientific Knowledge and public perception: a critical review. *Critical reviews in Microbiology*, **26** (3): 147-62.

Silva Pereira, C., Soares, G. A. M., Oliveira, A. C., Rosa, M. E., Pereira, H., Moreno, N. & San Romão, M. V. (2006). Effect of fungal colonization on mechanical performance of cork. *Internacional Biodeterioration & Biodegradation*, **57**: 244-250.

Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F. & Reis, R. L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, **50** (6): 345-365.

Sousa e Silva, A. R. B. (2009). *Estudo da Relação entre Parâmetros de Qualidade de Rolhas de Cortiça e a sua Contaminação com 2,4,6-Tricloroanisol*. Tese de Mestrado em Química Analítica e Controlo da Qualidade, Universidade de Aveiro, 86 pp.

Teixeira, M. I. V., San Romão, M. V., Bronze, M. R. & Vilas Boas, L. (2006). 2,4,6-trichloroanisole: a consumer panel evaluation. *Ciência Técnica Vitivinícola*, **21** (2): 53-65.

Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, **172** (8): 4238-4246

Vitorino, S. I., Neves, F. E. S. G., Gaspar, F., Figueiredo Marques, J. J. & San Romão, M.V. (2007). Suberin utilization by *Crysonilia sitophila*: Evidence for lipolytic enzymes production. *Ciência Técnica Vitivinícola*, **22**: 1- 4.

Vlachos, P., Stathatos, E., Gerasimos, L. & Panagiotis, L. (2008). Gas-phase photocatalytic degradation of 2,4,6-trichloroanisole in the presence of a nanocrystalline Titania film. Applications to the treatment of cork stoppers. *Catalysis Communications*, **9**: 1987-1990.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White, T.J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods na applications*. Academic Press, New York, 315-322.

Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 662 pp.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Nomes científicos dos *Taxa* de fungos referidos no texto

*Acremonium* sp.Link

*Alternaria* sp.Nees

*Aspergillus* sp.Fr.:Fr.

*Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter

*Bionectria* sp.Speg.

*Biscogniauxia* sp.Kuntze

*Chrysonilia* sp.Arx

*Chrysonilia sitophila* Arx

*Cryphonectria* sp. (Sacc.) Sacc.&D. Sacc.

*Fusarium* sp.Link

*Gliocladium* sp. Corda

*Histoplasma* sp.Darling

*Mucor* sp.Fresen.

*Mucor plumbeus* Bonord.

*Paecilomyces* sp.Bainier

*Penicillium* sp Link: Fr.

*Penicillium adametzioides* S. Abe ex G. Sm.

*Penicillium citreoviride* Biourge

*Penicillium diversum* Raper & Fennell

*Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling

*Penicillium kloeckeri* Pitt

*Penicillium purpurogenum* Stoll

*Trichoderma* sp. Pers.

*Trichoderma atroviride* P. Karst

*Trichoderma gamsii*

*Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier

*Trichoderma harzianum* Rifai

*Trichoderma koningii* Oudem.

*Trichoderma koningiopsis* Samuels, C. Suárez & H.C. Evans

*Trichoderma longibrachiatum* Rifai

*Trichothecium* sp. Link

## Anexo 2 – Resultados das fichas de inquérito.

Região do País	07 - DOURO			08 - ALTO TRÁS-OS-MONTES			17 - BEIRA INTERIOR SUL			21 - PENINSULA DE SETUBAL						22 - MÉDIO TEJO			23 - LEZÍRIA DO TEJO		
	Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 2			Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 3			Propriedade 1		
Código de amostra	07/1.1	07/1.2	07/1.3	08/3.1	08/3.2	08/3.3	17/2.1	17/2.2	17/2.3	21/1.1	21/1.2	21/1.3	21/3.1	21/3.2	21/3.3	22/3.1	22/3.2	22/3.3	23/1.1	23/1.2	23/1.3
Data descorticação	JUNHO/JULHO			JUNHO/JULHO			JUNHO			JUNHO/JULHO			JULHO/AGOSTO			JUNHO/JULHO			JUNHO		
Idade média do povoamento	120			100			120			125			50			100			120		
Sub-coberto	MATOS			MATOS			MATOS			MATOS			MATOS			MATOS			LIMPO		
Tipo de solos	XISTOS			XISTOS			XISTOS			ARENITOS			ARENITOS			ARENITOS			ARENITOS		
Pastoreio	SEM			SEM			SEM			PERMANENTE			PERMANENTE			SEM			SEM		
Tipo de gado										OVINO			BOVINO								
Humidade	ALTA			ALTA			BAIXA			MEDIA			BAIXA			MÉDIA			MEDIA		
Declive	ALTO			MÉDIO			ALTO			BAIXA			MEDIA			ALTO			MEDIA		
Mortalidade	BAIXA			BAIXA			MÉDIA			ALTA			MEDIA			MÉDIA			ALTA		
Cobrilha	BAIXA			BAIXA			MÉDIA			BAIXA			BAIXA			ALTA			BAIXA		
Mancha amarela na propriedade	ALTA			MÉDIA			BAIXA			BAIXA			BAIXA			BAIXA			BAIXA		

Região do País	24 - ALENTEJO LITORAL						25 - ALTO ALENTEJO			26 - ALENTEJO CENTRAL						27 - BAIXO ALENTEJO		
	Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 1			Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 1		
Código de amostra	24/1.1	24/1.2	24/1.3	24/3.1	24/3.2	24/3.3	25/1.1	25/1.2	25/1.3	26/1.1	26/1.2	26/1.3	26/3.1	26/3.2	26/3.3	27/1.1	27/1.2	27/1.3
Data descorticação	JUNHO/JULHO			JULHO			JUNHO/JULHO			JUNHO/JULHO			JULHO			JULHO		
Idade média do povoamento	100			130			120			120			70			100		
Sub-coberto	LIMPO			LIMPO			MATOS			LIMPO			LIMPO			MATOS		
Tipo de solos	ARENOSO E BARRO			ARENITOS			COM			ARENOSO/ARGILHA/ BARRO			TERRA PRETA E BARRO			ARGILOSOS		
Pastoreio	NÃO PERMANENTE			PERMANENTE			BOVINO			PERMANENTE			SEM			COM		
Tipo de gado	BOVINO			OVINO			BOVINO			BOVINO/BRAVO			NÃO TEM			OVINOS		
Humidade	MEDIA			MEDIA			BAIXA			MEDIA			MEDIA			BAIXA		
Declive	BAIXO			MEDIA			BAIXO			MEDIA			BAIXO			BAIXO		
Mortalidade	MEDIA			MEDIA			MÉDIA			MEDIA			BAIXA			MÉDIA		
Cobrilha	BAIXA			BAIXA			MÉDIA			MEDIA			BAIXA			MÉDIA		
Mancha amarela na propriedade	BAIXA			BAIXA			BAIXA			BAIXA			BAIXA			BAIXA		

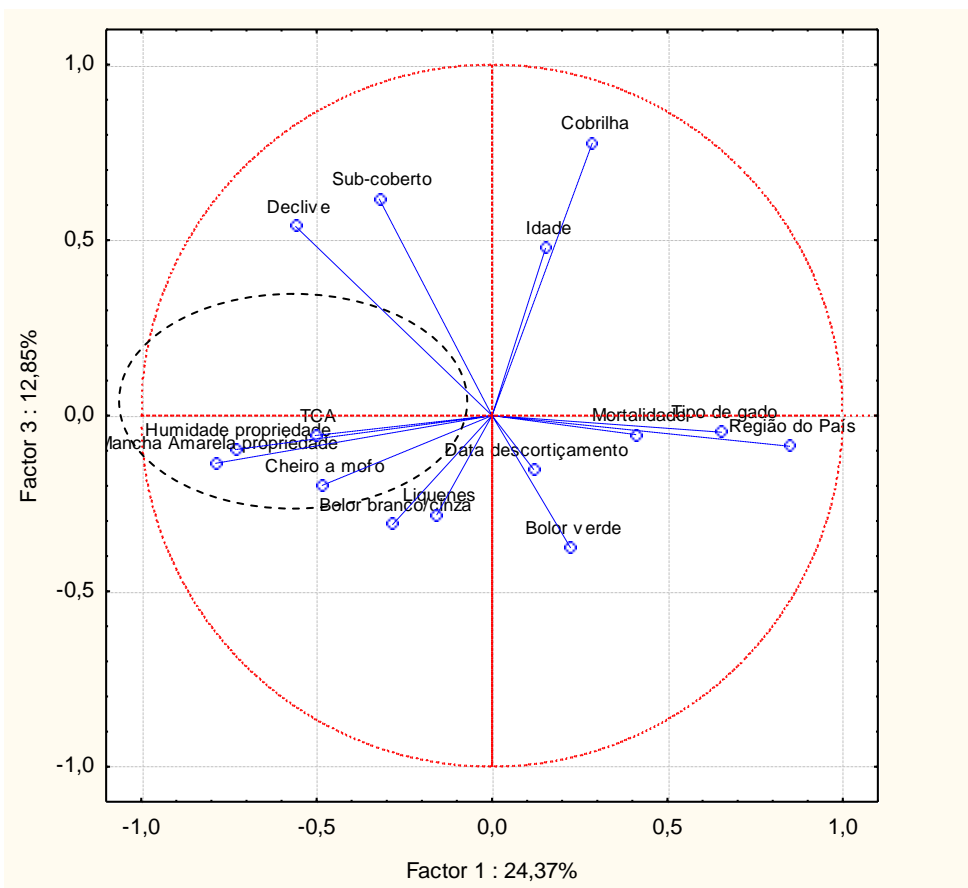
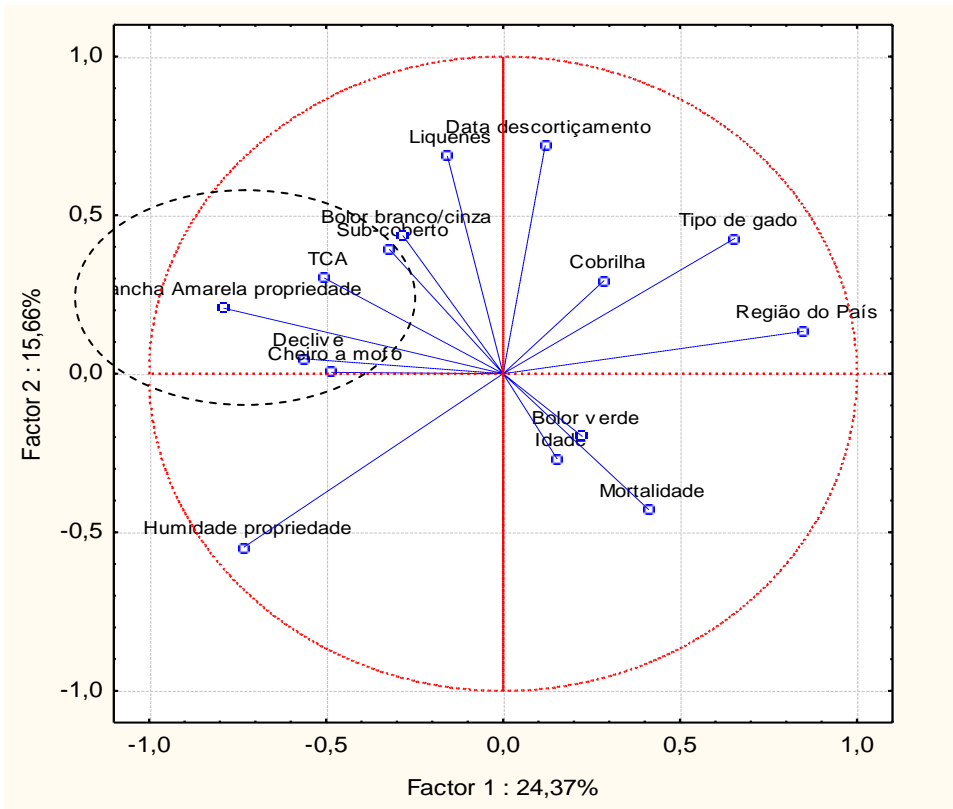
07 - DOURO			08 - ALTO TRÁS-OS-MONTES			17 - BEIRA INTERIOR SUL			21 - PENINSULA DE SETUBAL						22 - MÉDIO TEJO			23 - LEZÍRIA DO TEJO	
Propriedade 1		Propriedade 3			Propriedade 2			Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 3			Propriedade 1		
07/1.1	07/1.2	07/1.3	08/3.1	08/3.2	08/3.3	17/2.1	17/2.2	17/2.3	21/1.1	21/1.2	21/1.3	21/3.1	21/3.2	21/3.3	22/3.1	22/3.2	22/3.3	23/1.1	23/1.2
Bolor branco na costa na costa da prancha			COM			SEM		SEM			SEM			COM			SEM		COM
Bolor verde na costa na costa da prancha			SEM			SEM		SEM			SEM			SEM			COM		SEM
Líquens na costa na costa da prancha			COM			COM		COM			SEM			COM			SEM		SEM
MA na costa da prancha			COM			COM		COM			COM			COM			COM		COM
Cheiro a mofo			COM			SEM		SEM			SEM			SEM			SEM		SEM

Região do País	24 - ALENTEJO LITORAL						25 - ALTO ALENTEJO			26 - ALENTEJO CENTRAL						27 - BAIXO ALENTEJO		
	Propriedade 1		Propriedade 3				Propriedade 1			Propriedade 1			Propriedade 3			Propriedade 1		
Código de amostra	24/1.1	24/1.2	24/1.3	24/3.1	24/3.2	24/3.3	25/1.1	25/1.2	25/1.3	26/1.1	26/1.2	26/1.3	26/3.1	26/3.2	26/3.3	27/1.1	27/1.2	27/1.3
Bolor branco na costa na costa da prancha	COM		SEM				SEM			SEM			COM			COM		
Bolor verde na costa na costa da prancha	COM		SEM				SEM			SEM			SEM			SEM		
Líquens na costa na costa da prancha	SEM		SEM				SEM			SEM			COM			COM		
Cheiro a mofo	SEM		SEM				SEM			SEM			COM			SEM		

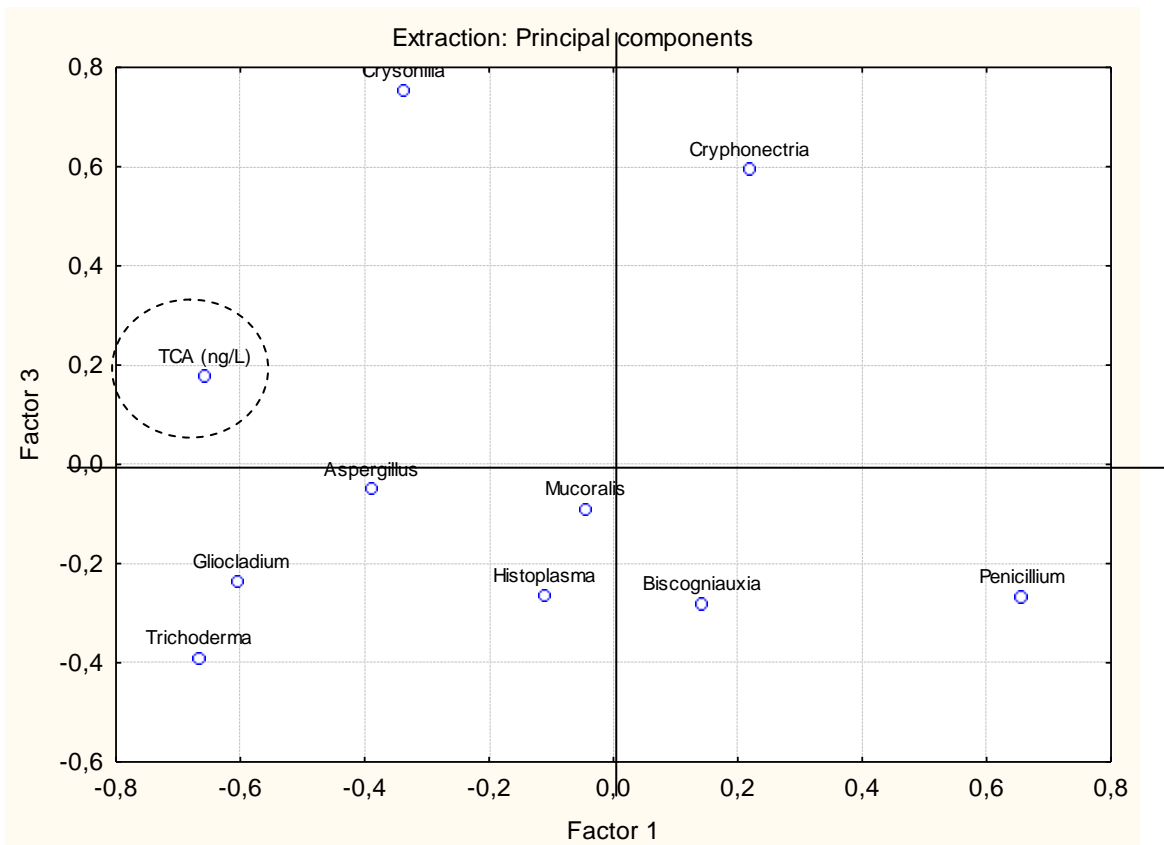
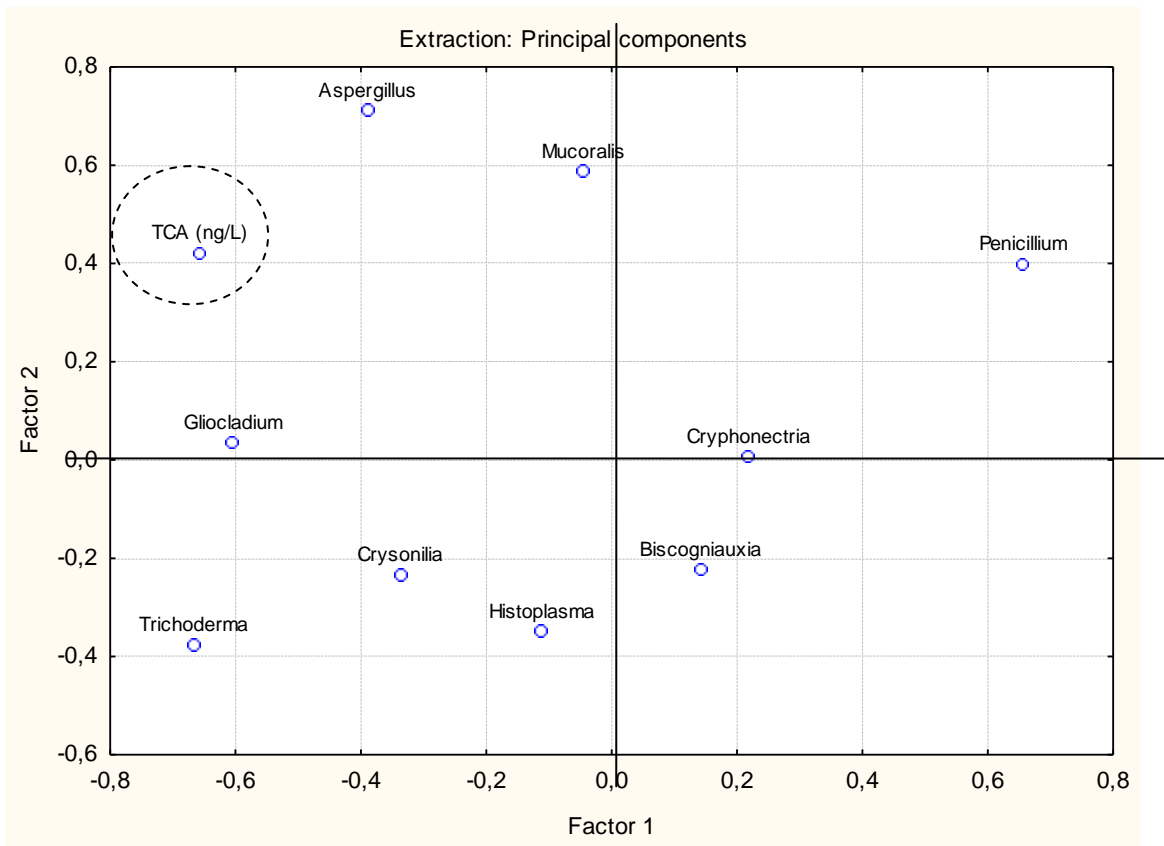
**Anexo 3 – Teste Levene**

Levene Test of Homogeneity of Variances (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Marked effects are significant at $p < ,05000$								
	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
TCA (ng/L)	108678,6	1	108678,6	583629,6	43	13572,78	8,007098	0,007054

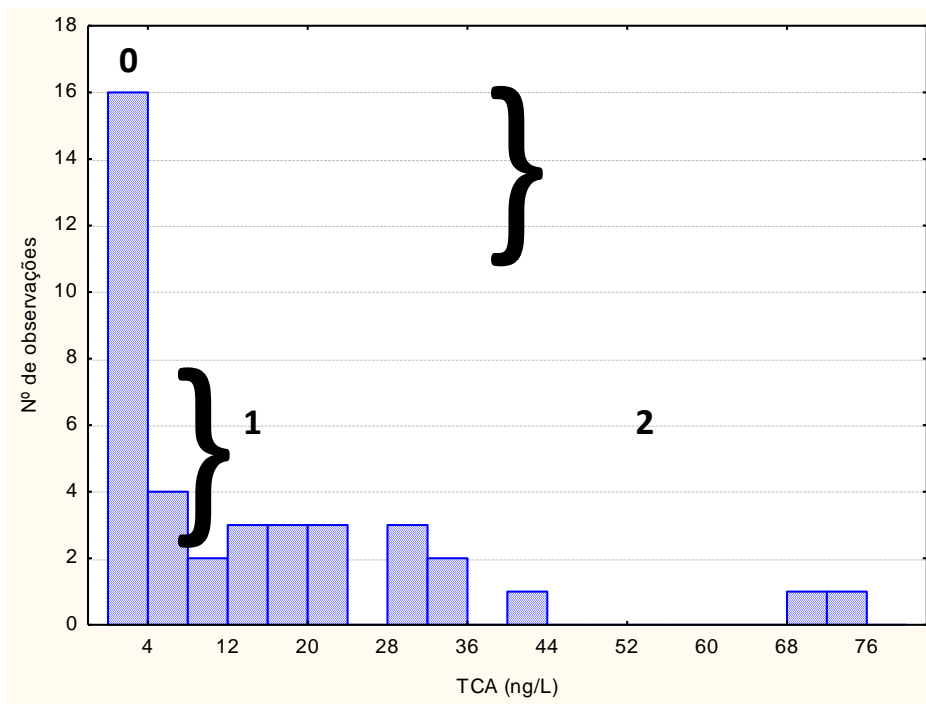
### Anexo 4 – Análise Componentes Múltiplas (ACM)



### Anexo 5 – Análise de Componentes Principais (ACP)



Anexo 6 – Histograma de frequências dos valores de TCA abaixo de 100.



## Anexo 7 – Análises de Variância (ANOVA)

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma spp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. freedom	MS	F	p
Intercept	7,9052	1	7,9052	51,2981	0,0000
TCA (classes)	2,4089	3	0,8030	5,2106	0,0038**
Error	6,3182	41	0,1541		

LSD test; variable <b>ASEN Trichoderma spp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,15410, df = 41,000		
TCA (classes)	ASEN Trichoderma spp.	GH
0	0,108406	a
1	0,380815	b
2	0,665541	b
3	0,671529	b

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma GRUPO 1</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,110294	1	0,110294	4,505482	0,039872
TCA (classes)	0,057008	3	0,019003	0,776257	0,514007
Error	1,003675	41	0,024480		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Grupo 3 -T.HAMATUM</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,132344	1	0,132344	4,960648	0,031481
TCA (classes)	0,145212	3	0,048404	1,814320	0,159639
Error	1,093833	41	0,026679		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Grupo 4-T.HARZIUM</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,399262	1	0,399262	6,799772	0,012659
TCA (classes)	0,233123	3	0,077708	1,323430	0,279838
Error	2,407393	41	0,058717		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Grupo 5-T.ATROVIRIDE</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,029991	1	0,029991	1,808003	0,186140
TCA (classes)	0,035550	3	0,011850	0,714380	0,549062
Error	0,680104	41	0,016588		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma GRUPO 6</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. freedom	MS	F	p
Intercept	0,452827	1	0,452827	12,85385	0,000888
TCA (classes)	0,502860	3	0,167620	4,75802	0,006154
Error	1,444385	41	0,035229		

LSD test; variable <b>ASEN Trichoderma GRUPO 6</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,03523, df = 41,000		
TCA (classes)	ASEN Trichoderma GRUPO 6	GH
2	0,000000	a
0	0,000000	a
1	0,131130	ab
3	0,305970	b

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma spp. Restantes</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,116648	1	0,116648	4,283398	0,044827
TCA (classes)	0,122506	3	0,040835	1,499503	0,228968
Error	1,116539	41	0,027233		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Penicillium spp</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	35,48274	1	35,48274	150,2823	0,000000
TCA (classes)	3,22851	3	1,07617	4,5580	0,0076
Error	9,68040	41	0,23611		

LSD test; variable <b>ASEN Penicillium spp</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,23611, df = 41,000		
TCA (classes)	ASEN Penicillium spp	GH
3	0,580238	b
2	0,904813	b
1	1,014383	b
0	1,369782	a

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Gliocladium spp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,532328	1	0,532328	10,12028	0,002794
<b>TCA (classes)</b>	0,288706	3	0,096235	1,82957	0,156871
<b>Error</b>	2,156605	41	0,052600		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Crysonilia sp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1,564068	1	1,564068	9,723325	0,003322
<b>TCA (classes)</b>	1,221202	3	0,407067	2,530613	0,070380
<b>Error</b>	6,595148	41	0,160857		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Biscogniauxia sp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,015232	1	0,015232	0,881742	0,353224
<b>TCA (classes)</b>	0,015669	3	0,005223	0,302339	0,823511
<b>Error</b>	0,708289	41	0,017275		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Cryphonectria sp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,052863	1	0,052863	2,167452	0,148595
<b>TCA (classes)</b>	0,060722	3	0,020241	0,829898	0,485117
<b>Error</b>	0,999961	41	0,024389		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Grupo Mucorales</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	4,178993	1	4,178993	20,25653	0,000055
<b>TCA (classes)</b>	0,075382	3	0,025127	0,12180	0,946738 NS
<b>Error</b>	8,458446	41	0,206304		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Histoplasma sp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	0,094409	1	0,094409	2,568804	0,116667
<b>TCA (classes)</b>	0,057202	3	0,019067	0,518811	0,671694
<b>Error</b>	1,506840	41	0,036752		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Aspergillus spp.</b> (Tabela resultado final stat19maio14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	0,045651	1	0,045651	2,784402	0,102806
<b>TCA (classes)</b>	0,051747	3	0,017249	1,052056	0,379896
<b>Error</b>	0,672211	41	0,016395		

**Anexo 8 – Análises de variância entre as variáveis relevantes da ACM e a ocorrências das diferentes espécies/grupos de fungos.**

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma spp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	5,457645	1	5,457645	27,36622	0,000005
<b>Sub-coberto</b>	0,151636	1	0,151636	0,76035	0,3881 NS
<b>Error</b>	8,575488	43	0,199430		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Penicillium spp</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	52,22464	1	52,22464	186,3816	0,0000
<b>Sub-coberto</b>	0,86018	1	0,86018	3,0699	0,0869 NS
<b>Error</b>	12,04872	43	0,28020		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Grupo Mucorales</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degrees freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	5,618592	1	5,618592	31,45467	0,000001
<b>Sub-coberto</b>	0,852952	1	0,852952	4,77510	0,0344 **
<b>Error</b>	7,680876	43	0,178625		

LSD test; variable <b>ASEN Grupo Mucorales</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,17863, df = 43,000		
Sub-coberto	ASEN Grupo Mucorales	GH
MATOS	0,220124	b
LIMPO	0,501153	a

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Histoplasma sp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,092150	1	0,092150	2,543566	0,118069
<b>Sub-coberto</b>	0,006213	1	0,006213	0,171485	0,680853 NS
<b>Error</b>	1,557830	43	0,036229		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Crysonilia sp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,677170	1	0,677170	3,835595	0,056682
<b>Sub-coberto</b>	0,224744	1	0,224744	1,272982	0,265464 NS
<b>Error</b>	7,591607	43	0,176549		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Biscogniauxia sp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,022448	1	0,022448	1,376000	0,247241
<b>Sub-coberto</b>	0,022448	1	0,022448	1,376000	0,247241 NS
<b>Error</b>	0,701510	43	0,016314		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Cryphonectria sp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,113645	1	0,113645	5,160000	0,028175
<b>Sub-coberto</b>	0,113645	1	0,113645	5,160000	0,028175 *
<b>Error</b>	0,947038	43	0,022024		

LSD test; variable <b>ASEN Cryphonectria sp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,02202, df = 43,000		
Sub-coberto	ASEN Cryphonectria sp.	GH
MATOS	0,000000	a
LIMPO	0,102580	b

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Gliocladium spp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
<b>Intercept</b>	0,279104	1	0,279104	5,100157	0,029053
<b>Sub-coberto</b>	0,092150	1	0,092150	1,683881	0,201328 NS
<b>Error</b>	2,353161	43	0,054725		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Aspergillus spp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	0,022448	1	0,022448	1,376000	0,247241
<b>Sub-coberto</b>	0,022448	1	0,022448	1,376000	0,247241 NS
<b>Error</b>	0,701510	43	0,016314		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Trichoderma spp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	4,126550	1	4,126550	20,94472	0,000042
<b>Declive (alto, médio, baixo)</b>	0,452242	2	0,226121	1,14770	0,327118 NS
<b>Error</b>	8,274883	42	0,197021		

Univariate Tests of Significance for <b>ASEN Penicillium spp.</b> (Tabela resultado final stat02abril14.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	<b>SS</b>	<b>Degr. of</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	43,93492	1	43,93492	142,9900	0,000000
<b>Declive (alto, médio, baixo)</b>	0,00404	2	0,00202	0,0066	0,993448 NS
<b>Error</b>	12,90486	42	0,30726		

**Anexo 9 – Análise de variância para crescimento de *Trichoderma* sp.**

Univariate Tests of Significance for crescimento (crescimentos culturas Tricho stat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1517,084	1	1517,084	14816,37	0,0000
<b>Grupos</b>	18,497	9	2,055	20,07	0,0000
<b>Error</b>	24,779	242	0,102		

LSD test; variable crescimento (crescimentos culturas Tricho stat) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,10239, df = 242,00		
Grupo	Crescimento	GH
5 – <i>T.atroviride</i>	2,302083	a
2	2,545833	b
6	2,581944	b
3 – <i>T.hamatum</i>	2,843056	c
4 – <i>T.harzianum</i>	2,970833	cd
8	3,000000	cde
10	3,041667	cde
9	3,050000	cde
7	3,141667	de
1	3,189167	e