

Universidade de Évora – Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia
Agronómica

Dissertação

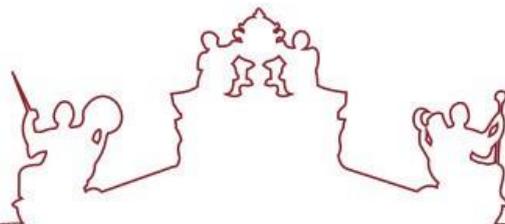
**Avaliação das comunidades de fungos endofíticos em
duas castas de videiras do Alentejo com diferentes
susceptibilidades a doenças do lenho**

Andreia Alexandra de Carvalho
Basílio

Orientador(es) | Maria do Rosário Félix
Patrick Materatski

Évora, 2021





Universidade de Évora – Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia
Agronómica

Dissertação

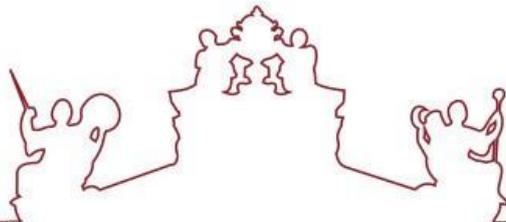
**Avaliação das comunidades de fungos endofíticos em
duas castas de videiras do Alentejo com diferentes
suscetibilidades a doenças do lenho**

Andreia Alexandra de Carvalho
Basílio

Orientador(es) | Maria do Rosário Félix
Patrick Materatski

Évora, 2021





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente		Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)
Vogais		Maria Doroteia Campos (Universidade de Évora (Argente)) Maria do Rosário Félix (Universidade de Évora) (Orientador)

Este projeto foi cofinanciada por:



GAFAPROTECT: ALT20-03-0145-FEDER-028263 e PTDC/ASP-PLA/28263/2017

TOMVIRPROTECT: ALT20-03-0145-FEDER-028266 e PTDC/ASP-PLA/28266/2017

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria do Rosário Fernandes Félix e ao Doutor Patrick Materatski agradeço por terem aceitado orientar-me neste trabalho, agradeço por todos os conhecimentos que me transmitiram, por toda a disponibilidade, motivação e paciência que tiveram ao longo destes meses, sem a vossa ajuda não seria possível terminar esta etapa.

Agradeço de coração aos meus pais, Jorge e Rita e à minha irmã Leonor por todo o apoio e carinho que demonstram em todas as fases da minha vida, por acreditarem sempre em mim e por não me deixarem desistir. Quero também agradecer ao José Maria Barroso, por todo o apoio e por toda a paciência que demonstrou ao longo deste tempo.

Aos meus amigos de sempre e aos que a Universidade me deu, agradeço por todo o apoio e incentivo que deram ao longo deste tempo. Aos colegas que tive a oportunidade de conhecer durante este percurso académico, por todos os momentos que passámos na companhia uns dos outros.

Um grande obrigado a todos vocês porque sem o vosso contributo não seria possível ter terminado esta etapa.

Este trabalho foi cofinanciado pelo projeto “Controle da antracnose da oliveira através de silenciamento e expressão de genes utilizando um vírus de planta como vector” (GAFAPROTECT) com a referência ALT20-03-0145-FEDER-028263 e PTDC/ASP-PLA/28263/2017 e pelo projeto “Desenvolvimento de um vetor para proteção de plantas de tomate contra TSWV” (TOMVIRPROTECT) com a referência ALT20-03-0145-FEDER-028266 e PTDC/ASP-PLA/28266/2017, ambos os projetos foram cofinanciados pela União Europeia através do Fundo de Desenvolvimento Regional Europeu, ALENTEJO2020 (Programa Regional Operacional do Alentejo), ALGARVE2020

(Programa Regional Operacional do Algarve) e através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, na sua componente nacional.

Resumo

As doenças do lenho são das mais importantes doenças associadas à videira. Este trabalho teve como objetivo principal estudar as diferenças da diversidade dos fungos endofíticos e patogénicos e a suscetibilidade de duas cultivares distintas: Trincadeira e Aragonez, em dois locais (A e B). Situadas na Região do Alentejo todas testadas em material lenhoso.

Os fungos endofíticos mais encontrados nas amostras de planta foi o pertencente ao género *Alternaria*, tanto para os dois locais como para as duas cultivares. Nos fungos patogénicos, os mais encontrados nas amostras das plantas foram os fungos das espécies *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus spp.* Verificou-se que a cultivar Aragonez, no local A é menos suscetível às doenças do lenho, ao contrário do que acontece no local B, neste local a cultivar menos suscetível às doenças do lenho é a Trincadeira.

As espécies *Botryosphaeria dothidea* e *Diplodia seriata* são causadores das doenças do lenho.

Palavras - chave: Videira; Doenças do lenho; NGS; Fungos endofíticos; ITS.

Evaluation of endophytic fungal communities in two grapevine cultivars from Alentejo Region showing different susceptibility to trunk diseases

Abstract

Trunk diseases is one of the most important diseases of the grapevine. The main objective of this work was to study the differences in the diversity of endophytic and pathogenic fungi and the susceptibility of two cultivars: Trincadeira and Aragonez in two sites (A and B) located in Alentejo Region and all tested in woody material.

The most endophytic fungi found in the plant samples was, the one belonging to the genus *Alternaria*, for both sites and cultivars. For pathogenic fungi, the most found in the plant samples were the species *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus spp.* It was also found, that the cultivar Aragonez in the organic production mode is less susceptible to trunk diseases, unlike what happens in the conventional production mode. In this mode the cultivar Trincadeira is less susceptible to these diseases.

Wood diseases are caused by the species: *Botryosphaeria dothidea* and *Diplodia seriata*.

Keywords: grapevine; trunk diseases; NGS; endophytic fungi; ITS.

Abreviaturas

Blast – Basic Local Alignment Search Tool

°C – Grau centígrado

CTAB – Cetyl trimethyl ammonium bromide

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

g – força da gravidade

h - Hora

ha – Hectares

ITS – Internal Transcribed Spacer

Mega-X – Molecular Evolutionary Genetics Analysis

min - Minuto

mL – Mililitro

PCR – Polimerase Chain Reaction

PDA – Potato dextrose agar

rpm – Rotações por minuto

seg – Segundos

v/v – Volume/Volume

μL – Microlitros

% – Percentagem

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Abreviaturas	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. As Principais Doenças do Lenho da Videira	3
2.1.1. Doença de Petri e Esca	6
2.1.2. Eutipiose	9
2.1.3. Escoriose Europeia	10
2.1.4. Escoriose Americana	12
2.1.5. Doença do Pé Negro	13
2.2. Tolerância e Suscetibilidade das Castas às Doenças do Lenho	15
2.3. Caracterização das Castas	16
2.4. Fungos Endofíticos	18
2.5. Importância dos Fungos Endofíticos na Proteção de Plantas	21
2.6. Fungos Fitopatogénicos	24

2.7.	Métodos de Controlo e Mitigação de Doenças do Lenho em Videira	26
3.	Objetivos	31
4.	Materiais e Métodos	32
4.1.	Identificação e Caraterização dos Solos	32
4.2.	Obtenção do Material Vegetal de Videira	32
4.3.	Obtenção dos Isolados de Fungos	33
4.4.	Extração de DNA e Identificação Molecular dos Isolados de Fungos Obtidos	34
4.5.	Análise Estatística dos Dados	37
5.	Resultados	38
5.1.	Descrição dos Solos	38
5.2.	Isolamento e Identificação de Fungos	42
5.3.	Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos	43
5.4.	Identificação de Fungos Fitopatogénicos	49
6.	Discussão	50
7.	Conclusão	60
8.	Perspetivas Futuras	63
9.	Referências Bibliográficas	64

Índice de Figuras

- Figura 1** – Triângulo da doença com os três fatores que em simultâneo provocam o aparecimento da doença. 3
- Figura 2** – Esquema das doenças do lenho para vinhas jovens e vinhas adultas. 5
- Figura 3** – Esquema da sintomatologia em corte transversal de três doenças do lenho da videira. 6
- Figura 4** – Necroses na na extremidade basal do porta-enxerto de videiras infetadas (A); Videira de baixo vigor (B); Folhas murchas e com cloração clorótica (C). 7
- Figura 5** – Sintomas da Esca na cepa (A), nas folhas (B) e nos bagos (C). 9
- Figura 6** – Sintomas foliares na videira, cachos com tamanho reduzido e amadurecimento irregular do bago; Corte transversal do tronco com mancha sectorial de cor escura. 11
- Folha 7** - Sintomas foliares nas castas e necroses na madeira causadas pela *Botryosphaeria* spp. 12
- Figura 8** – Folhas com manchas verdes e amarelas com centros necróticos e o ramo com pequenas lesões negras. 14
- Figura 9** – Sintomas da Doença do Pé Negro nas videiras – Vasos do xilema e estrias necróticas (A); Folhas murchas e com cloração clorótica (B); Videira afetada pela Doença do Pé negro (C). 15
- Figura 10** – Cacho da casta Trincadeira. 17
- Figura 11** – Cacho da casta Aragonez. 18
- Figura 12** – Esquema da ocorrência da resposta de defesa da planta e da virulência do fungo por uma colonização assintomática. 20

Figura 13 – Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos ‘primers’ ITS1 e ITS4.	34
Figura 14 – Carta de solos do local A.	38
Figura 15 – Carta de solos do local B.	40
Figura 16 – Análise electroforética em gel de agarose 1% do produto de amplificação obtido após PCR com os ‘primers’ ITS1 e ITS4, usando DNA extraído das culturas puras dos fungos isolados de material vegetal, amostras 1 a 9. M – Marcador 100 pb ‘DNA Ladder’. As setas indicam as bandas do marcador com tamanho de 500 pb e de 100 pb.	41
Figura 17 – Alguns exemplos dos isolados de fungos nas placas de Petri; 1 – <i>Sordaria fimicola</i> 2 – <i>Alternaria</i> spp. 3 – <i>Aureobasidium pullulans</i> 4 – <i>Epicoccum nigrum</i> 5 – <i>Cladosporium</i> spp. 6 – <i>Botryosphaeria dothidea</i> 7 – <i>Diplodia seriata</i> 8 – <i>Botrytis cinerea</i> 9 – <i>Cytospora</i> spp. 10 – <i>Purpureocillium lilacinum</i> 11 – <i>Aspergillus ustus</i> 12 – <i>Stereum hirsutum</i> .	46
Figura 18 – Gráfico da média de fungos endofíticos ± erro padrão (SE) em cada local (A e B) e cultivar (Trincadeira e Aragonez).	47
Figura 19 – Alguns exemplos dos fungos patogénicos na placa de Petri.	48

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Contribuição dos isolados de fungos (%) por local (A e B) e com as respectivas classificações taxonómicas. 45

1. Introdução

O presente estudo descreve a composição das comunidades de fungos endofíticos em plantas videiras (*Vitis vinifera* L.) de diferentes cultivares e diferentes modos de produção, situados na região do Alentejo, no Sul de Portugal. As amostras foram recolhidas no mês de fevereiro do ano de 2019, período de inverno, no qual as plantas de videiras se encontram em repouso vegetativo. A videira é uma das culturas mais cultivada na Europa, hospedando naturalmente uma grande diversidade de microrganismos, em especial fungos (Varanda *et al.*, 2016).

2. Revisão Bibliográfica

As doenças do lenho da videira (*Vitis vinifera L.*) e de todas as espécies do género *Vitis* constituem, atualmente e a nível mundial, uma ameaça à produção estável em vitivinicultura. Manifestam-se em plantas-mãe de porta-enxerto, videiras jovens e videiras adultas, comprometendo o sucesso das plantações e a longevidade das vinhas (Bohm, 2005).

Segundo (Agrios, 2005), uma planta doente, é uma planta que é impedida de desempenhar uma ou várias das suas funções, ou seja, apresenta uma disfunção de células ou tecidos devido à ação de um agente patogénico (fator biótico) ou fator ambiental (fator abiótico). Para que uma doença surja, é necessário que os três fatores que constituem o triângulo da doença ocorram em simultâneo, ou seja, que o agente patogénico seja compatível com o hospedeiro e que estejam reunidas as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento deste (Figura 1).

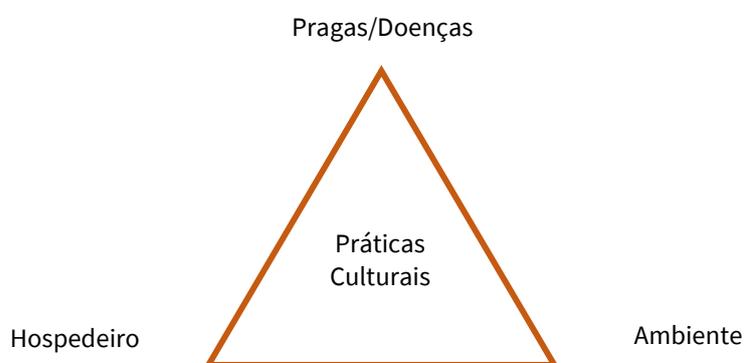


Figura 1 – Triângulo da doença com os três fatores que em simultâneo provocam o aparecimento da doença (Fonte: Agrios, 2005)

As doenças do lenho da videira são a consequência de vários fatores, como o “boom” da plantação de videira que ocorreu um pouco por todo o mundo durante a década de 90, e que não só levou a um aumento da utilização de material vegetativo contaminado, como levou também a um aumento da área de vinhas afetadas, em que numa determinada idade os sintomas são visivelmente expressos acabando assim por se tornar num problema predominante. Também existiram mudanças drásticas nos

métodos de produção, que acabaram por favorecer as infeções causadas por fungos, tal como a transformação das vinhas tradicionais de baixa densidade em vinhas com maior densidade de plantas, que muitas vezes são podadas mecanicamente levando a um aumento significativo das feridas de poda e a uma maior dispersão do inóculo devido à contaminação dos equipamentos utilizados (Gramaje *et al.*, 2018).

2.1. As Principais Doenças do Lenho da Videira

Segundo a International Organisation of Vine and Wine (OIV), as doenças do lenho são provavelmente a ameaça mais significativa para o setor da vitivinicultura nos dias de hoje (De la Fuente *et al.*, 2016), pois afetam os órgãos perenes da videira, causando a sua morte.

O declínio das videiras jovens constitui um tema atual em todo o mundo vitícola, pelos prejuízos que causam e pela falta de meios de luta eficientes no combate aos agentes que o originam. Em casos de grande incidência origina a mortalidade de um elevado número de plantas, logo após a plantação, obrigando assim a retanchas contínuas ou em último caso ao arranque total da vinha. Em situações de manifestações mais suaves da doença, as plantas apresentam debilidade, atraso no desenvolvimento, entrenós curtos, cloroses ou avermelhamento da folhagem, que irá ter reflexos na qualidade e na quantidade da produção e na longevidade da videira (Oliveira *et al.*, 2007).

As doenças do lenho são várias, todas causadas por mais que um fungo e todos eles diferentes, formando assim um complexo conhecido como ‘complexo de doenças do lenho’. Existem cinco principais doenças do lenho em videira, que são a Esca e Doença de Petri causadas pelos fungos *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *Fomitiporia* spp., a Eutipiose causada por *Eutypa lata*, a Escoriose Europeia causada por *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata* e por fungos da família *Botryosphaeriaceae*, e a Escoriose Americana causada por *Diaporthe ampelina* e por

fungos do género *Phomopsis* e o Pé Negro das Videira causado por *Cylindrocarpon* spp., *Campylocarpon* spp. e *Ilyonectria* spp. (Gramaje *et al.*, 2018).

Das várias doenças do lenho, algumas manifestam-se em plantas mais jovens outras só em vinhas adultas (Figura 2). Em videiras jovens (até 8-10 anos de idade), pode-se encontrar doenças como o Pé Negro, e a Doença de Petri, conhecidas por causarem o declínio das vinhas jovens (Bohm, 2005). Estas duas doenças apresentam uma sintomatologia muito semelhante ao nível dos sintomas foliares, pois apresentam um fraco desenvolvimento, rebentação tardia, entrenós mais curtos, folhas cloróticas com margens necróticas levando muitas vezes a que estas as folhas acabem por murchar. Estes sintomas também podem ser confundidos com distúrbios abióticos como geadas, stress hídrico e/ou deficiência de nutrientes pois apresentam sintomatologias muito semelhantes (Gramaje *et al.*, 2018).

Outras manifestam-se essencialmente em vinhas adultas, como é o caso da Esca, a Escariose Europeia e a Eutipiose (Figura 2). Existem ainda outras doenças que se manifestam tanto em videiras jovens como em videiras adultas, sendo responsáveis pelo depauperamento e quebra de rendimento das plantas atacadas, como é o caso da Escariose Americana (Bohm, 2005).

DOENÇAS DO LENHO DA VIDEIRA



Figura 2 - Esquema das doenças do lenho para vinha jovens e vinhas adultas

A *International Organisation of Vine and Wine* (OIV, 2016) afirma, que as doenças do lenho são consideradas as doenças mais destrutivas da videira nas últimas três décadas e são uma preocupação crescente em todos os países produtores de vinho. Estas doenças tornaram-se num enorme problema, uma vez que os microrganismos fitopatogénicos que as causam atacam os órgãos vegetativos e levam à morte das videiras a curto ou médio prazo, o que significa um custo económico elevado para a sua substituição (De la Fuente *et al.*, 2016).

Os fungos causadores de doenças do lenho podem infetar através de qualquer ferida que exista na videira, como por exemplo de feridas causadas pela poda, que acaba por ser um ponto de entrada para os fungos. Os viveiros vitícolas por vezes também acabam por ser uma fonte de material vegetal infetado, que pode resultar na infeção cruzada de lotes de estacas e por consequência dar origem a vinhas jovens infetadas (Gramaje *et al.*, 2018).

Os sintomas gerais expressam-se ao nível da madeira por necrose setorial e/ou central, pela presença de estrias castanhas ou cancrios (Figura 3) e ao nível foliar por descoloração e dessecação (De la Fuente *et al.*, 2016).



Figura 3 – Esquema da sintomatologia em corte transversal de três doenças do lenho da videira (Fonte: <https://www.advid.pt/imagens/cadernos/13992817344134.pdf>)

2.1.1. Doença de Petri e Esca

A doença de Petri é uma doença que ataca as videiras jovens, sendo o material vegetal infetado considerado como fonte primária do inóculo dos agentes patogénicos desta doença. No entanto, as videiras podem ser infetadas através dos inóculos aéreos dos agentes patogénicos da Doença de Petri, infetando a planta através das feridas de poda (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Segundo os mesmos autores, as plantas podem também ser inoculadas através do solo pelos agentes patogénicos desta doença.

Os sintomas da Doença de Petri são muito idênticos aos sintomas da doença do Pé Negro, sendo por vezes difíceis de os distinguir quando são observados na videira.

No entanto, as videiras infetadas pela doença de Petri apresentam no interior do tronco estrias castanhas e uma necrose castanha/avermelhada, que são resultados de tiloses, gomas e compostos fenólicos formados dentro dos vasos pelo hospedeiro em resposta ao fungo que cresce nos vasos do xilema. No lenho, quando é feito um corte transversalmente, são visíveis pontuações castanhas claras e/ou escuras, especialmente ao nível do enxerto (Figura 4 – A). Este fluxo tem origem a partir de necroses e é comum chamarem de “black goo”, ou seja, goma preta. Ao nível de sintomas externos, a videira apresenta órgãos aéreos com a presença de vegetação debilitada ou vegetação menos desenvolvida (Figura 4 – B), as folhas apresentam uma cloração clorótica com as bordaduras necróticas (Figura 4 – C) e apresentam um tronco com um tamanho inferior ao normalmente verificado em plantas isentas destas doenças (De la Fuente *et al.*, 2016).

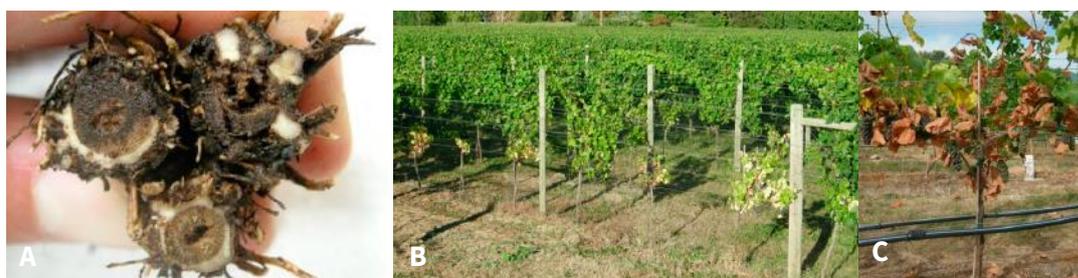


Figura 4 – Necroses na extremidade basal do porta-enxerto de videiras infetadas (A); Videira de baixo vigor (B); Folhas murchas e com cloração clorótica (C) (Fonte: Gramaje *et al.*, 2018)

Existem ainda alguns fatores abióticos que acabam por desempenhar um papel importante no desenvolvimento desta doença, que são, os fatores ambientais (chuva, vento e temperatura) o stress do hospedeiro, a falta de nutrientes, uma drenagem insuficiente e conseqüentemente a compactação dos solos, sendo que estes dois fatores podem contribuir para um fraco desenvolvimento das raízes. A plantação de vinhas em solos mal preparados e feridas da poda que possam existir na videira, também podem potenciar a doença e a expressão da sintomatologia (Gramaje *et al.*, 2018).

A Esca é uma doença complexa onde os sintomas e a sua expressão ao longo do tempo é altamente variável (Luque *et al.*, 2009), e é considerada uma das doenças mais destrutivas dos tecidos lenhosos da videira. O nome da doença Esca deriva do latim “tinder” e este termo foi utilizado pelos viticultores do Sul de Itália no início de 1900 para se referirem à apoplexia, possivelmente devido à presença de madeira podre observada principalmente em plantas apopléticas (Bertsch *et al.*, 2013).

É uma doença que ataca as videiras adultas e é causada por um complexo de fungos fitopatogénicos. Estudos recentes concluíram que estes fungos, que estão associados à doença da Esca, são os ascomicetes *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., sendo estes responsáveis pelo aparecimento de necroses vasculares e pelos basidiomicetes *Fomitiporia* spp., responsável pela decomposição da madeira e *Fomitiporia mediterranea*, que é responsável pelo aparecimento de podridão branca que transforma a madeira numa massa algodonosa com um tom esbranquiçado/amarelado. Numa secção transversal, os tecidos apodrecidos apresentam uma linha negra ou castanha escura (Figura 5 – A) que os separa dos tecidos saudáveis, e por vezes, a podridão pode aproximar-se ou atingir a superfície originando fendas no tronco (Alves, 2001). Podem ainda ser visíveis estrias vasculares de coloração de castanhas a negras ou ainda, a observação de madeira seca com aparência prateada (Gramaje *et al.*, 2018).

A Esca pode apresentar-se de duas formas na videira, de forma crónica/lenta ou de forma aguda, conhecida como a apoplexia (Luque *et al.*, 2009).

A forma crónica/lenta ocorre no final da primavera ou no verão, e é visível ao nível da zona foliar verificando-se uma senescência precoce da folhagem. As folhas apresentam necroses nas margens, estendendo-se para o centro (Figura 5 – B), podendo verificar-se a sua queda e apresentam uma coloração avermelhada e amarelada, podendo, mais tarde, tornar-se necrótica. Na forma aguda/apoplética, é caracterizada por existir uma desidratação súbita de toda a planta e conseqüentemente a morte da videira a meio do verão, nas folhas mantém a forma normal, mas dá-se o aparecimento de folhas secas e necróticas, podendo existir a sua queda e o seu enrugamento, nos bagos não há um enchimento correto e podem acabar por não atingir a maturação acabando por secar (Figura 5 – C) e causar avultadas perdas de produção. Todos estes sintomas internos e externos podem ocorrer devido a toxinas produzidas pelos fungos nos tecidos lenhosos descolorados ou deteriorados (Figura 5 – A), enzimas e à obstrução dos vasos, em que pode existir uma redução do transporte de água e nutrientes dando, por exemplo, origem à não maturação dos bagos (Gramaje *et al.*, 2018; Larignon & Dubos, 1997).



Figura 5 – Sintomas da Esca na cepa (A), nas folhas (B) e nos bagos (C)
(Fonte: <http://www.winetwork-data.eu>)

2.1.2. Eutipiose

A Eutipiose é causada pelo fungo *Eutypa lata*, este fungo causa uma doença grave nas videiras que infeta. Estas são infetadas principalmente através de feridas de poda, reduzindo drasticamente o tempo de vida produtivo da planta. A Eutipiose está associada a sintomas como o crescimento atrofiado dos ramos com entrenós curtos e em ziguezague, morte dos braços ou mesmo de toda a planta, embora os sintomas possam expressar-se de maneira diferente entre as cultivares (Hallen *et al.*, 2010).

A sintomatologia foliar é causada por metabolitos tóxicos que são produzidos apenas pela *Eutypa lata*, os sintomas foliares podem aparecer 3 a 8 anos após a infeção e pode variar de ano para ano (Gramaje *et al.*, 2018). As estruturas reprodutivas do fungo formam-se na madeira morta. A Eutipiose mostra a sua presença através do enrugamento e o atrofio dos rebentos que apresentam uma coloração clorótica, ficam enrugados e as folhas são aparentemente mais pequenas, enroladas e com necroses na margem, sendo mais visível na altura da primavera, pode ocorrer a dessecação das inflorescências e os cachos apresentam tamanho reduzido e os bagos um amadurecimento irregular (Figura 6), as necroses podem observar-se ao longo de todo o sarmento (De la Fuente *et al.*, 2016).

A infeção ocorre quando os ascósporos da *Eutypa lata* são libertados da madeira morta e dispersados pela chuva e vento. As infeções podem ocorrer quando existem feridas de poda e os esporos se instalam e germinam nos vasos do xilema colonizando a madeira e causando gradualmente sintomas de tecido morto (dieback) na videira (Figura 6) e eventualmente o aparecimento de cancrios (Ayres *et al.*, 2016).



Figura 6 – Sintomas foliares na videira, cachos com tamanho reduzido e amadurecimento irregular do bago; Corte transversal do tronco com mancha sectorial de cor escura.
(Fonte: <https://www.advid.pt/imagens/cadernos/13992817344134.pdf>; Gramaje *et al.*, 2018).

2.1.3. Escoriose Europeia

A Escoriose Europeia é causada por *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata* e também por vários fungos pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* a qual apresenta uma ampla distribuição geográfica. Tal como as outras doenças que constituem o complexo de doenças do lenho, a Escoriose Europeia conduz a um grande impacto na economia e coloca em causa a longevidade da videira (Úrbez-Torres, 2006).

Os sintomas que a doença possa causar são especialmente graves nos casos em que a planta hospedeira está submetida a um stress, sendo que os sintomas podem ser diferenciados de país para país, sobretudo devido à forma como diferentes castas reagem à infeção por estes agentes fitopatogénicos e as condições climáticas. Contudo, os sintomas podem ser semelhantes a outras doenças do lenho da videira, como os da Eutipiose e aos do complexo de Esca (Niekerk *et al.*, 2006).

Botryosphaeria spp. é considerado o agente fitopatogénico mais importante da videira, no entanto a sua sintomatologia pode ser observada no campo apenas um ou dois anos após a infeção através de feridas de poda ou de outras lesões. Este agente fitopatogénico pode ter uma fase de crescimento como fungo endofítico, tornando-se posteriormente saprófito ou patogénico (Niekerk *et al.*, 2006), e é observado

nomeadamente em vinhas adultas, sendo que, no entanto, também está descrito como podendo originar o aparecimento de cancrios e provocar morte das videiras jovens (Gramaje *et al.*, 2018). A Escoriose Europeia apresenta sintomas foliares (Figura 7) que se manifestam por cloroses entre as nervuras que com o tempo se transformam em necroses em toda a folha. As plantas afetadas são caracterizadas como ‘braço morto’ (DeadArm), o seu desenvolvimento vegetativo é fraco por existir um bloqueio do sistema vascular, levando a uma baixa percentagem de lançamentos, a planta pode apresentar algumas deformações nas folhas e cloroses mais ou menos extensas que evoluem para necroses, e no tronco há o aparecimento de uma necrose setorial típica com uma descoloração vascular (Figura 7) (De la Fuente *et al.*, 2016).



Figura 7 – Sintomas foliares nas castas e necroses na madeira causadas pela *Botryosphaeria* spp. (Fonte: <http://www.winetwork-data.eu/>)

2.1.4. Escoriose Americana

A Escoriose Americana é causada por *Diaporthe ampelina* e por fungos do género *Phomopsis* onde a espécie principal é *Phomopsis viticola*. Esta doença, apresenta alguns sintomas muito semelhantes aos que se podem observar nas plantas afetadas por Escoriose Europeia, como por exemplo a morte da planta, a deficiente rebentação e o aparecimento de cancrios. Atualmente, sete espécies do género *Diaporthe* têm-se mostrado patogénicos da madeira da videira, sendo a mais virulenta a espécie *Diaporthe ampelina* (Gramaje *et al.*, 2018).

Phomopsis spp. é conhecida por infetar videiras, causando manchas foliares (Figura 8) e pode ocorrer em qualquer videira que seja cultivada sendo mais severa em regiões de caracterizadas por um clima temperado húmido durante a fase inicial do ciclo vegetativo, infetando todas as partes verdes da videira, como as folhas, rebentos, sarmentos e frutos. Assim, os sintomas iniciais podem ser observados nas folhas que apresentam pequenas manchas verdes e amarelas com centros necróticos (Úrbez-Torres *et al.*, 2013).

Nos sarmentos jovens, a doença manifesta-se nos primeiros entrenós com a presença de pequenas manchas negras que mais tarde evoluem para manchas mais escuras (Figura 8). Na base das varas pode parecer que existe um estrangulamento, podendo levar à sua quebra por ação do vento e pelo peso dos cachos (De la Fuente *et al.*, 2016).

Segundo De la Fuente *et al.* (2016), durante a fase de dormência, nos ramos há um aparecimento de manchas brancas e pretas na zona dos entrenós e podem ser também encontradas umas manchas necróticas ao longo das nervuras secundárias, bem como nos pecíolos. Os bagos apresentam uma cor acastanhada e acabam por murchar.



Figura 8 – Folha com manchas verdes e amarelas com centros necróticos e o ramo com pequenas lesões negras (Fonte: https://www.ivdp.pt/pt/docs/ficha_escoriose.pdf)

2.1.5. Doença do Pé Negro

A doença do Pé Negro é uma doença de declínio e morte das videiras jovens, causada por um complexo patogénico de fungos existentes no solo, é causada por várias espécies pertencentes aos géneros *Cylindrocarpon* spp. e *Campylocarpon* spp., e é a doença do lenho da videira mais recentemente descrita (Halleen *et al.*, 2007).

A doença do Pé Negro é identificada pelo aparecimento de uma necrose negra que começa na parte inferior do tronco (Figura 9 – A) e vai subindo, acabando por afetar a maior parte da madeira do porta-enxerto. *Cylindrocarpon* spp., causa o declínio de porta-enxertos de videiras em solos de viveiros, conduzindo a um atrofio da planta e causando uma coloração negra no tronco (Halleen *et al.*, 2007).

Esta doença também se pode expressar na parte aérea da planta em que, na primavera, as plantas afetadas podem não apresentar rebentação, a floração apresenta um atraso anormal e a parte vegetativa apresenta um crescimento atrofiado que muitas vezes acaba por secar no início do verão (Figura 9 – B). Verifica-se também que as raízes das plantas infetadas apresentam uma coloração castanha necrótica e para compensar a perda de biomassa da raiz submersa e necrótica, um segundo crescimento de raízes de crescimento horizontal é formada por vezes perto da superfície do solo (Halleen *et al.*, 2007). Contudo, a planta apresenta um vigor reduzido com troncos de pequeno porte, maturidade irregular da madeira as

pequenas folhas apresentam cloroses inter-nervuras e necroses (Figura 9 – C) (De la Fuente *et al.*, 2016).

No verão, as altas temperaturas também têm um papel importante no desenvolvimento do sintoma, pois a raiz e o sistema vascular de plantas doentes podem não ser capazes de fornecer água suficiente para compensar a elevada taxa de transpiração (Figura 9 – B) (Halleen *et al.*, 2007).



Figura 9 – Sintomas da Doenças do Pé Negro nas videiras – Vasos do xilema escuros e estrias necróticas (A); Folhas murchas e com cloração clorótica (B); Videiras afetadas pela doença do Pé negro (C) (Fonte: Gramaje *et al.*, 2018)

2.2. Tolerância e Suscetibilidade das Castas às Doenças do Lenho

Segundo Pouzoulet *et al.* (2014), não existe nenhuma evidência que haja alguma videira completamente resistente às doenças do lenho, no entanto existem graus de suscetibilidade que variam de altamente suscetível a tolerante. Existem também evidências de que a anatomia da madeira e, especificamente, os diâmetros dos vasos do xilema diferem entre as cultivares da videira e que essas características podem dizer muito sobre o grau de suscetibilidade das cultivares (Pouzoulet *et al.*, 2014).

Existem ainda alguns fatores que podem influenciar a suscetibilidade da videira às doenças do lenho, como o clima, a idade da videira, a fertilização do solo, o modo de produção, os porta-enxertos e as cultivares (Almeida *et al.*, 2020; Fontaine *et al.*, 2016).

A tolerância e/ou suscetibilidade das duas cultivares em estudo, Aragonez e Trincadeira, pode estar relacionada com os fatores acima mencionados. A cultivar Aragonez é mais suscetível às doenças do lenho, sendo a mais atacada por a Esca seja na forma crônica ou na forma aguda, Escoriose Europeia e Americana e Eutipiose, acabando por apresentar sintomas mais severos do que a cultivar Trincadeira, que quase não apresenta sintomas ou esses são pouco visíveis, é considerada mais tolerante, sendo, no entanto, mais sensível à podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* e ao oídio causado por *Erysiphe necator* (Fontaine *et al.*, 2016).

2.3. Caracterização das Castas

A casta Trincadeira (Figura 10) é uma das mais antigas e tradicionais castas do Alentejo, com uma excelente adaptação às condições edafo-climáticas (Cabrita, 2003). É considerada uma casta autóctone com vigor elevado, porte semi-erecto e necessita de cuidados extremos no controlo de maturação, apresenta uniforme homogeneidade de produção entre as plantas e é uma casta bastante estável aos fatores abióticos (Bohm, 2005).

Exige que as sebes sejam equilibradas, ou seja, uma boa relação entre a área foliar exposta e a produção, de modo a garantir que haja boa qualidade. É uma casta que prefere solos com baixa fertilidade, textura fraca/arenosa, secos ou bem drenados, aguenta um clima quente, com horas suficientes de insolação, mas em caso de excesso de calor existe o perigo de secagem e degradação dos bagos. Os porta-enxertos devem ser de baixo vigor e de ciclo curto, é uma casta pouco resistente à conservação após a maturação, devido às podridões (Bohm, 2005).

Esta casta tem algumas particularidades, as folhas têm uma cor verde muito brilhante, seio peciolar fechado, com lóbulos muito sobrepostos, sendo que é a última casta a perder as folhas. A trincadeira tem perigo de excesso de produção e, neste caso, os cachos tem fraca aptidão para se conservarem sãos na videira até atingirem a maturação (Bohm, 2005).

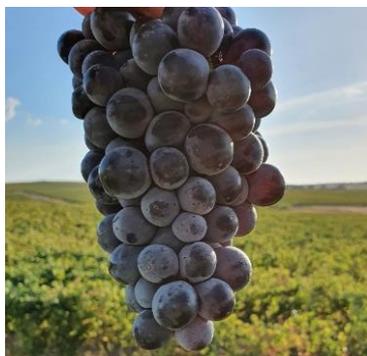


Figura 10 – Cacho da casta Trincadeira (Fotografia da autora)

A casta Aragonez (Figura 11) é uma casta com origem em Espanha e em Portugal, sendo o Douro e o Alentejo as regiões de maior expansão e atualmente a superfície vitícola é de 23 500 ha. É uma casta ibérica das mais importantes, sendo também conhecida por outros nomes, como Tempranillo e Tinta Roriz, sendo esta última mais conhecida nas regiões do Douro e Dão.

Esta casta é tradicional das vinhas Alentejanas, cuja sua presença tem sofrido alterações significativas aos longo dos anos (Cabrita, 2003).

É uma casta muito adaptável a diferentes climas e solos, preferindo solos profundos, bem drenados, com reduzida disponibilidade hídrica em que o elevado teor de água provoca um atraso no pintor e na redução da qualidade. Quanto aos porta-enxertos, não é conhecida nenhuma incompatibilidade com os habituais da região, mas no caso de qualidade é recomendado a utilização de porta-enxertos pouco vigorosos. Para que se consiga garantir características de excelência na casta Aragonez a produção deve ser controlada para que seja maior e haja uma maior concentração dos bagos, obtendo assim mais qualidade. É uma casta que prefere solos arenosos e argilo-calcários, clima seco e quente (Bohm, 2005).

A casta Aragonez é uma casta de ciclo curto, com abrolhamento, floração, pintor e maturação em época média (Silva, 2009). É uma casta precoce, apresenta um vigor médio-elevado, com uma elevada homogeneidade de produção, suporta carência hídrica. No Alentejo é sensível ao escaldão das folhas com insolação intensa e é sensível ao vento.

A nível da sensibilidade criptogâmica, é suscetível ao oídio e ao míldio causado por *Plasmopara viticola*, à Escariose Europeia e Americana, à Esca e à Eutipiose (Bohm, 2005).



Figura 11 –Cacho da casta Aragonez

(Fonte: <https://www.clubevinhosportugueses.pt/vinhos/castas-tintas-aragonez/>)

2.4. Fungos Endofíticos

O termo endofítico foi introduzido por DeBary (1866) e inicialmente foi aplicado a qualquer organismo encontrado no interior de uma planta (Toofanee & Dulynamode, 2002).

Endofítico é um termo que vem da combinação de duas palavras gregas “endon” (dentro) e “phyton” (planta) (Carvalho *et al.*, 2020).

O termo “endofítico” é usado para descrever os microrganismos que podem ser detetados em algum momento dentro dos tecidos do hospedeiro vegetal aparentemente saudável, muitas vezes sem a planta apresentar qualquer sintoma da doença (Schulz & Boyle, 2006).

Os endofíticos representam um grupo de microrganismos que vivem dentro do microambiente hospedeiro e recebem proteção de stresses ambientais, acesso a nutrientes e, posteriormente, enfrentam menos competição de outros micróbios. Os microrganismos endofíticos são cruciais para os mecanismos de defesa das plantas, pois eles interagem diretamente com o sistema da planta e são também conhecidos por apresentar benefícios diretos ou indiretos e gerir o stress da planta hospedeira, levando a uma relação benéfica entre estes (Singh *et al.*, 2020).

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos vegetais saudáveis sem causar qualquer sintoma negativo da doença. São descritos como promotores de crescimento da planta e da resistência a doenças, acabando por mostrar a sua atividade antimicrobiana (Materatski *et al.*, 2019).

A colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre o hospedeiro e o endofítico (Figura 12). Os endofíticos e patogênicos possuem os mesmos fatores de virulência, os endofíticos estudados até agora produzem exoenzimas necessárias para infectar e colonizar o hospedeiro. Se durante o momento de interação entre o patogêneo-hospedeiro for equilibrado, a interação permanece assintomática, no caso

de em algum momento dessa interação existir um desequilíbrio, pode-se dar o aparecimento da doença, podendo isso acontecer quando o hospedeiro se encontra stressado ou senescente. Estes equilíbrios e desequilíbrios durante as interações dependem de alguns fatores como o estado geral do hospedeiro, da virulência do fungo, das defesas do hospedeiro que podem ser influenciadas por fatores ambientais, estado nutricional e pelas fases de desenvolvimento (Schulz & Boyle, 2006).

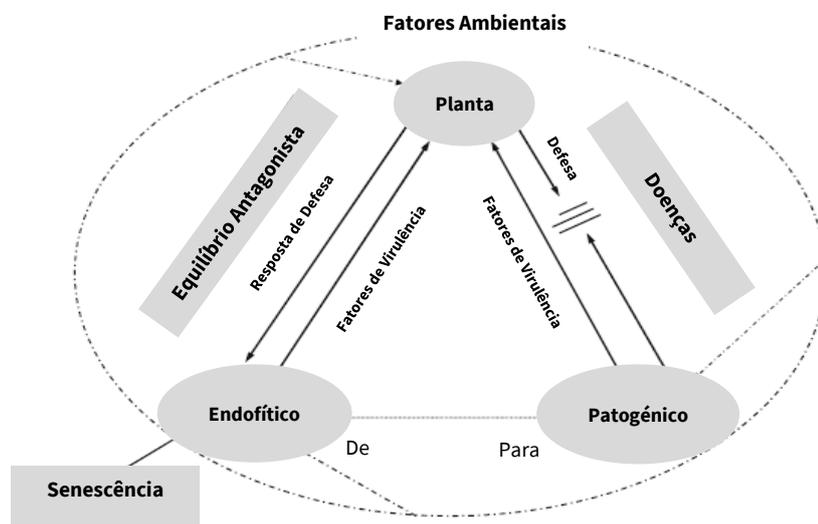


Figura 12 – Esquema da ocorrência da resposta de defesa da planta e da virulência do fungo por uma colonização assintomática (Fonte: Schulz & Boyle, 2006).

Segundo Torres *et al.* (2012), os fungos endofíticos não são apenas habitantes passivos das plantas, mas são colonizadores ativos do interior e exterior da planta e são considerados manipuladores da fisiologia vegetal e reprodução, alterando a tolerância ao stress oxidativo por meio do aumento das concentrações de compostos antioxidantes e enzimas.

A comunidade endófito na planta é normalmente composta por numerosas espécies de fungos, em que o seu número e composição é influenciado por fatores como o

ambiente (velocidade do vento, luz, temperatura e humidade relativa), a fisiologia vegetal, fatores antropogénicos e o agente patogénico, deposição de esporos, germinação e/ou produção de estruturas de infeção (Toofanee & Dulynamode, 2002; Varanda *et al.*, 2016).

Os fungos endofíticos aumentam a resistência das plantas aos fatores de stress abiótico como o aumento da tolerância à seca, diferentes temperaturas, baixos valores de pH, alta salinidade e presença de metais pesados no solo. Por outro lado, as plantas fornecem um ambiente protetor para o crescimento e multiplicação de fungos endofíticos, proteção contra a aridez e longevidade por via de transmissão de sementes para a próxima geração de hospedeiros, sendo um fenómeno generalizado na natureza, a associação simbiótica entre o fungo e a planta (Rana *et al.*, 2019), considerando-se essa relação de longo prazo entre os dois organismos, quer seja benéfico para os indivíduos que estão envolvidos ou não (Rodriguez & Redman, 2008).

Atualmente, os fungos endofíticos podem ser subdivididos em quatro classes, com: 1) intervalo de hospedeiros, 2) no padrão de colonização, 3) transmissão e 4) função ecológica. Os fungos infetam as plantas e acabam por permanecer inativos até à senescência das plantas, representando assim uma boa estratégia para os fungos retirarem nutrientes da planta (Rodriguez & Redman, 2008).

Por último, os fungos endofíticos geralmente apresentam dois tipos de transmissão. A transmissão vertical em que o fungo vai desde a planta até se instalar na semente. Quando as sementes germinam em condições favoráveis, os fungos endofíticos presentes nas plantas recém-formadas durante a germinação das sementes, realizam a transmissão de fungos endofíticos para toda a planta hospedeira e as próximas gerações de plantas. A transmissão horizontal está relacionada com a transmissão dos fungos por via aérea e/ou pela fragmentação de hifas, por agentes de dispersão biótica (herbívoros ou insetos) ou agentes abióticos (vento ou chuva) de planta para a planta, realizando assim a transmissão de fungos endofíticos entre os diferentes hospedeiros (Yan *et al.*, 2019).

2.5. Importância dos Fungos Endofíticos na Proteção de Plantas

Nos fungos endofíticos, existe uma relação de interação entre o endofítico e o hospedeiro. No entanto, essa interação pode não ser garantida de forma contínua, porque, alguns endofítico podem apresentar um estilo de vida mutualista para parasítico, ou seja, alguns fungos patogênicos conseguem viver como endofíticos durante o seu ciclo de vida, sendo assim, um desafio importante para a patologia vegetal, descobrir e perceber as diferenças entre o estilo de vida endofítico e patogênico. Na videira é especialmente importante, porque os agentes conhecidos por causar algumas doenças do lenho na videira, Doença de Petri, Esca ou Escoriose, foram isolados de tecidos vegetais internos de plantas assintomáticas e assintomáticas. Em alguns casos, os endofíticos reproduzem-se sexualmente em tecidos mortos da sua planta hospedeira (Varanda *et al.*, 2016).

Nos últimos anos os microrganismos endofíticos (fungos e bactérias) têm suscitado grande interesse devido à sua presença benéfica para a planta hospedeira, a nível do seu desenvolvimento e defesa (Giménez *et al.*, 2007). Toda a investigação desenvolvida tem como propósito compreender a sua ecologia e evolução, qual o impacto no ecossistema e na comunidade planta (Aly *et al.*, 2011).

A produtividade agrícola está ligada direta ou indiretamente à diversidade de microrganismos que habitam o solo, sendo este um componente importante no meio ambiente e que não serve apenas como um recurso natural no sistema agrícola, mas suporta também numerosos processos de vida (Singh *et al.*, 2020).

Segundo Singh *et al.* (2020), nos últimos anos bactérias promotoras de crescimento de plantas, particularmente bactérias endofíticas, surgiram como um importante e proeminente protagonista para a agricultura sustentável, como por exemplo, as diversas formas de relacionamentos benéficos encontrados entre plantas e microrganismos.

Atualmente a pesquisa que tem sido feita com endofíticos concentra-se principalmente em dois aspectos: a exploração de moléculas bioativas e a exploração da possibilidade de endofíticos como agentes de biocontrole. Como todas as interações entre os fungos endofíticos e as plantas são mediadas por meio de sinalização química, é necessário entender os mecanismos de como é que os endofíticos funcionam nas plantas. Destacando-se as respostas benéficas das plantas ao stress biótico e abiótico (Yan *et al.*, 2019)

Para se adaptar a estes stresses, os endofíticos produzem substâncias bioativas. Em muitos casos a tolerância ao stress biótico correlaciona-se com produtos naturais de fungos ou bactérias ou metabolitos biologicamente ativos, aumentando a resistência do hospedeiro contra herbívoros, insetos, doenças, variações de temperatura e salinidade. Os endofíticos aumentam a resistência das plantas a fatores de stress abiótico, como o aumento da tolerância à seca, as diferenças de temperaturas, baixo pH e a presença de metais pesados (Rana *et al.*, 2019).

O potencial químico dos endofíticos foram utilizados para a descoberta de medicamentos, como o foco na deteção de constituintes vegetais farmacêuticos, produtos de biossíntese fúngica e na agricultura a utilização de fungos endofíticos em programas de controlo biológico (Aly *et al.*, 2011; Arnold, 2007).

Com o passar dos anos e a saída de mercado de muitas substâncias de síntese química utilizadas em controlo fitossanitário passou-se a utilizar-se mais o controlo natural e biológico que acaba por ser menos prejudicial para os consumidores e é mais económico para os produtores. Muitas vezes a utilização dos produtos químicos acaba por eliminar espécies importantes que ajudam no controlo das doenças, fazendo com que exista uma inibição de outros microrganismos, sendo os fungos endofíticos os mais afetados (Azevedo *et al.*, 2000).

Os fungos endofíticos constituem assim uma fonte de agentes biológicos úteis para o controlo de agentes patogénicos importantes nas plantas em geral onde a videira não é exceção. Contudo, entende-se que o estudo das comunidades endofíticas na videira

são essenciais para determinar tratamentos futuros nestas plantas e produzir-se produtos de alta qualidade (Varanda *et al.*, 2016).

2.6. Fungos Fitopatogénicos

Ao longo da história da agricultura os fungos fitopatogénicos têm sido uma ameaça devastadora. Estes fungos desenvolveram uma infinidade de estratégias para colonizar as plantas, e essas interações resultaram num espectro de resultados que vão desde interações benéficas até à morte do hospedeiro (Doehlemann *et al.*, 2016).

Os fungos representam provavelmente o grupo mais diverso de ameaças ecológicas e economicamente mais relevantes, sendo os patogéneos mais comuns pertencentes às Divisões Ascomycota e Basidiomycota, agrupando-se depois em várias classes (Doehlemann *et al.*, 2016).

Para contaminar os tecidos da videira os fungos causadores de doença do lenho necessitam de feridas recentes como pontos de entrada, como é o caso de feridas causadas pela poda, uma vez que preferencialmente estes agentes patogénicos colonizam os hospedeiros através de uma porta de entrada, pois os hospedeiros têm camadas de proteção como a periderme e o ritidoma que dificultam a sua entrada. Cada infeção bem-sucedida é originada inicialmente pela ocorrência simultânea de inóculo externo e uma ferida (Claverie *et al.*, 2020).

Segundo Claverie *et al.* (2020), o termo “inóculo externo” pode ser definido por várias formas de propagação dos fungos da doença do lenho no ar, água ou no solo (esporos ou micélio) que podem permanecer na superfície ou nas proximidades da videira ou em detritos de madeira. O termo “inóculo interno” é caracterizado por fungos do lenho que penetram e se desenvolvem nos tecidos da videira.

De acordo com o seu ciclo de vida e estratégias de infeção os agentes patogénicos podem ser classificados como necrotróficos, biotróficos e hemibiotróficos. Os primeiros alimentam-se de tecidos mortos que segregam os nutrientes da planta e acabam por levar à morte celular da planta hospedeira (Armijo *et al.*, 2016). É importante fazer uma distinção entre os verdadeiros patogéneos necrotróficos, que atacam e matam as plantas saudáveis, e os patogéneos necrotróficos secundários que

são saprofíticos por natureza, mas podem infectar ocasionalmente plantas que foram previamente enfraquecidas por outros patógenos, lesões ou mesmo pelos efeitos abióticos. Os patógenos biotróficos alimentam-se de tecidos vivos, e evoluíram de modo a coincidir com o ciclo de vida da planta hospedeira e dependem do seu hospedeiro para completar o seu ciclo de vida (Doehlemann *et al.*, 2016). Quanto aos patógenos hemibiotróficos são espécies que combinam os estilos de vida biotróficos e necrotróficos, sendo que a maioria dos cientistas define hemibiotrófico como uma espécie que têm um comprimento variável de uma fase biotrófica antes de mudar para a fase necrotrófica, acabando o seu ciclo de infeção, levando à morte do hospedeiro (Armijo *et al.*, 2016; Doehlemann *et al.*, 2016).

Assim todas as culturas devem ser protegidas desta ameaça por compostos antifúngicos, agentes de controlo biológico, práticas agrícolas, desenvolvimento de cultivares resistentes ou uma combinação dessas medidas, pois estes fungos adaptam-se a um conjunto limitado de hospedeiros e reduzem assim a eficácia das defesas dessas espécies de plantas (Charlotte & Rep, 2017).

Segundo Charlotte & Rep (2017), o sistema imunológico da planta pode limitar o crescimento ou desenvolvimento de microrganismos invasores, mesmo que os fungos patogénicos sejam altamente adaptados a um conjunto limitado de hospedeiros, sendo capazes de reduzir a eficácia das defesas. A chave para a patogenicidade dos fungos, consiste em responder ao ambiente do hospedeiro de forma a promover o seu crescimento dentro do hospedeiro, apesar da presença de mecanismos de vigilância e de defesa, concluindo assim que chave da patogenicidade reside na expansão da diversidade de por exemplo de proteínas secretadas e por adaptação de sistemas conservados (Charlotte & Rep, 2017).

Conclui-se que os fungos patogénicos são altamente diversificados e têm um enorme impacto na agricultura, pois apresentam uma elevada flexibilidade genética, o que permite ao patógeno invadir rapidamente os novos hospedeiros, bem como desenvolver resistências a tratamentos com fungicidas (Doehlemann *et al.*, 2016).

2.7. Métodos de Controlo e Mitigação de Doenças do Lenho em Videira

Na instalação de uma cultura deve-se ter em atenção às boas práticas como a qualidade do material vegetativo e às condições de plantação, estes são dois pontos importantes no controlo da propagação dos fungos. Os métodos propostos atualmente não são métodos curativos (fungicidas, produtos químicos e estimuladores biológicos etc.) são, portanto, métodos meramente preventivos, que são frequentemente aplicados à vinha (De la Fuente *et al.*, 2016).

→ Medidas no viveiro antes da plantação

Uma videira saudável é fundamental para um início bem-sucedido e para a sustentabilidade de todas as vinhas, sendo o primeiro ponto da cadeia produtiva. O grande número de cortes e feridas feitos durante as diferentes etapas do processo de propagação em viveiros tornam o material vegetal vulnerável à infeção por fungos patogéneos (Gramaje *et al.*, 2018).

Consequentemente, uma boa higiene e proteção de feridas são de extrema importância. Vários estudos chegaram à conclusão de que o material vegetal já pode estar infetado em vinhas jovens ou por contaminação durante o processo de propagação, portanto a deteção antes da plantação é fundamental para garantir a longevidade das videiras recém plantadas (De la Fuente *et al.*, 2016).

Os métodos de controlo e mitigação mais correntemente utilizados são:

- Tratamento com água quente

Este tratamento é usado em viveiros para controlar os fungos patogénicos envolvidos no tronco da videira para se obter plantas em boas condições sanitárias (Bruez *et al.*, 2007).

O tratamento com água quente é o mais eficaz para desinfetar varas dormentes durante o processo de propagação, e consiste na imersão do material de propagação em água quente a uma temperatura (50°C) durante um período de tempo (30 minutos), no entanto esta abordagem pode causar stress na planta e se não for aplicada corretamente pode resultar na perda do material vegetal (De la Fuente *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2020).

O tratamento com água quente pode ser aplicado em estacas de porta-enxertos antes da enxertia ou em vinhas jovens enxertadas pouco antes do envio (Gramaje *et al.*, 2018).

Segundo Gramaje *et al.* (2018), o material utilizado neste processo é suscetível a tensões causadas por práticas de manuseamento inadequado, como períodos prolongados de armazenamento no frio após este tratamento. No entanto é um tratamento bem-sucedido na eliminação de pragas e outros microrganismos prejudiciais, como é o caso da bactéria *Xylella fastidiosa*.

As variedades de videiras têm diferentes graus de sensibilidade ao tratamento com água quente, que podem ser afetados pela temperatura experimentada durante o período de cultivo do corte anterior. Além disso, a faixa de temperatura utilizada irá depender dos patógenos que necessitam de ser controlados (De la Fuente *et al.*, 2016).

Segundo alguns estudos foi divulgado que temperaturas entre 45 – 47°C eliminam *Phaemoniella chlamydospora*, podendo reduzir a sua presença. Enquanto temperaturas entre 51 – 53°C são necessárias para eliminar patógenos mais resistentes do que os da doença de Petri. Concluiu-se que este tratamento foi a única prática entre os diferentes métodos de controlo testados (métodos químicos, biológicos e tecnológicos) que apresentou alguns resultados promissores na redução *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* e *Phaemoniella chlamydospora* (De la Fuente *et al.*, 2016).

A fim de garantir que o efeito benéfico inicial do tratamento com água quente nas videiras jovens seja prolongado, devem ser aplicadas medidas sanitárias assim que as vinhas sejam plantadas, devendo estas medidas serem mantidas ao longo da sua vida (Bruez *et al.*, 2007).

- Medidas preventivas no cultivo da vinha

Os métodos de controlo de cultura são essenciais para limitar a propagação do inóculo, devendo-se remover e queimar ramos, videiras mortas ou que possam vir a morrer, podar braços mortos e tentar evitar períodos de seca. É também recomendado reduzir e proteger as feridas de poda (De la Fuente *et al.*, 2016).

Os cuidados na pré-plantação são essenciais para manter a qualidade das vinhas, devendo ser efetuada uma preparação do local para vinha antes da plantação. Assim que as vinhas chegam ao local devem ser imediatamente plantadas, devendo a preparação do local deve ser feita com base na avaliação da densidade e distribuição do inóculo no solo. A plantação em solos pesados e mal drenados deve ser evitada, pois irá favorecer a infeção pelos agentes patogénicos causadores da doença do Pé Negro (Gramaje *et al.*, 2018).

É também recomendado que seja realizada a poda tardia na estação de dormência, ou seja, o mais próximo possível do desenvolvimento dos rebentos, uma vez que as feridas cicatrizam mais rapidamente com temperaturas mais altas. A suscetibilidade da ferida é influenciada pela humidade relativa e pelos períodos de chuva, uma vez que a chuva estimula a libertação de esporos (De la Fuente *et al.*, 2016).

Os métodos de saneamento costumam ser complementados com a proteção de feridas de poda contra geadas ou ataque biótico pela aplicação de fungicidas, formulações biológicas ou a utilização de ambos em rotação (De la Fuente *et al.*, 2016).

- Produtos de controlo químico e biológico

No passado utilizavam-se alguns produtos para o controlo das doenças do lenho, mas devido ao facto de terem implicações prejudiciais, a sua utilização foi proibida. Neste

contexto, encontra-se o arsenito de sódio, que em 2003 foi proibido em todos os países produtores de vinho devido à sua toxicidade (De la Fuente *et al.*, 2016).

O controlo químico é baseado em medidas preventivas para a proteção de feridas de poda, geralmente fungicidas, de modo a evitar a infeção da videira e para limitar a expansão fúngica na planta. Tratamentos químicos que muitas vezes contêm mais do que um fungicida são frequentemente aplicados no solo, no tronco e em feridas de poda, sendo as injeções no tronco mais eficazes do que pomadas que possam ser colocadas nas feridas, pois estas são facilmente lavadas no caso de ocorrência de chuva (De la Fuente *et al.*, 2016).

A dificuldade em encontrar um produto curativo para estas doenças está em localizar no lenho, os agentes patogénicos responsáveis. Tal situação requer o uso de produtos penetrantes e duradouros, sendo que acabam por apresentar características que não são compatíveis com o nível aceitável de toxicidade e ecotoxicidade (Grenet & Mercier, 2007). Contudo, atualmente, tenta-se evitar o uso de produtos químicos devido ao nível de toxicidade que possam apresentar para a cultura e para o ser humano.

Há muito tempo que se conhecem microrganismos capazes de controlar agentes patogénicos. Esta situação é natural visto que caso se desenvolvam no lenho, são capazes de atingir os agentes patogénicos *in situ*, através do controlo biológico, como é o caso da utilização de fungos do género *Trichoderma* que são conhecidos pelo seu carácter antagónico, tendo um papel mais eficiente e sustentável (Grenet & Mercier, 2007).

O fungo, *Trichoderma* pode ser encontrado em produtos comerciais, em várias formulações, incluindo pó, grânulos entre outros. No caso do pó pode ser misturado com água para aplicação por imersão das plantas durante a fase de hidratação em viveiros. A eficácia destes produtos de biocontrolo com *Trichoderma* depende muito do crescimento ativo dos fungos, que pode ser comprometido por misturas de aplicações que contenham fungicidas e pela aplicação de fungicidas tóxicos e/ou após o tratamento com o inóculo *Trichoderma* (Gramaje *et al.*, 2018).

- Sistema de práticas de renovação do tronco de vinhas afetadas

Neste ponto, os tipos de poda devem ser consideradas a fim de evitar grandes ferimentos durante a poda mecânica ou através da utilização de outras máquinas elétricas, que favorecem o inóculo inicial. A colheita deve ser controlada, devido ao tremor que é produzido na altura da passagem da máquina que frequentemente pode causar algum dano foliar semelhante à apoplexia (De la Fuente *et al.*, 2016). Segundo os mesmos autores, nas vinhas, atualmente as distâncias entre as linhas são mantidas, mas o espaço entre as videiras diminui, de modo que se aumente a densidade por hectare. Este modo cultural favorece o estabelecimento, disseminação e desenvolvimento do doenças do lenho (De la Fuente *et al.*, 2016).

De la Fuente *et al.* (2016), afirmam que a renovação de ramos não é uma prática nova na viticultura, isto porque na natureza as vinhas têm troncos múltiplos, por isso é essencial um sistema de condução. Assim, a poda é realizada de maneira a melhorar a renovação dos troncos velhos infetados e a manter cordões com varas não infetadas. A prática dos troncos múltiplos é utilizada em zonas com invernos rigorosos para substituir os troncos danificados pelo frio e pode ser também usada para o combate das doenças do lenho.

Alguns estudos demonstram que a Eutipiose pode ser controlada usando os rebentos saudáveis da base da planta para substituir o tronco, sendo que esta técnica funciona também com outras doenças do lenho. É importante salientar que o sistema radicular da videira pode ser salvo, se a planta for saudável (De la Fuente *et al.*, 2016)

3. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi investigar as diferenças nos padrões de diversidade dos fungos endofíticos e patogénicos em duas cultivares de videira com diferentes suscetibilidades a doenças do lenho, Trincadeira, menos suscetível e Aragonez, mais suscetível, através da avaliação, em condições de campo, das comunidades destes microrganismos presentes em videiras cultivadas em dois modos de produção diferentes: produção biológica (Local A) e produção convencional (Local B). Compreender os padrões de distribuição das comunidades de fungos e sua interação sob condições variáveis, conforme proposto aqui, é uma linha de base importante para o conhecimento de meios de controlo biológico às doenças do lenho em videiras.

4. Materiais e Métodos

4.1. Identificação e Caracterização dos Solos

Para identificar e caracterizar os solos presentes em cada um dos locais A e B utilizou-se o programa ArcGis (ESRI 2019) em conjunto com a Carta de Solos de Portugal nº460 com uma escala de 1:25 000, as Cartas de Solos foram fornecidas pela Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR - <https://www.dgadr.gov.pt/>).

4.2. Obtenção do Material Vegetal de Videira

A amostragem foi realizada durante o mês de fevereiro do ano de 2019, em duas importantes vinhas da Fundação Eugénio de Almeida, um dos maiores produtores de vinho do Alentejo, com uma área aproximada de 600 ha, localizadas no sul de Portugal. Os dois locais são influenciados pelo clima mediterrânico e foram denominados para este estudo como Local A (38°35'09" N 7°55'05" W) e Local B (38°33'19" N 7°51'51" W). Os dois locais apresentam dois tipos de modo de produção: produção biológica (Local A) e convencional (Local B). Em cada local foram amostradas plantas de duas cultivares de videira, Trincadeira e Aragonez.

No modo de produção biológica foram utilizadas durante as operações culturais as seguintes substâncias fungicidas; hidróxido de cobre, enxofre e extratos de *Equisetum arvense* e *Saponaria officinalis*. No modo de produção convencional foram utilizadas as seguintes substâncias fungicidas; fosetil-alumínio, folpete, cimoxanil, espiroxamina, ciflufenamida, difenoconazol, oxiclreto de cobre, chinoxifenil e miclobutanil. Essas substâncias foram utilizadas para prevenir a escoriose americana, podridão negra, míldio, oídio e podridão cinzenta.

No momento da amostragem, que foi feito durante o repouso vegetativo e antes da poda, não foi possível avaliar a presença da doença do lenho.

Em cada Local (A e B) foram amostradas 30 plantas de videira, 15 plantas de cada cultivar; Trincadeira e Aragonéz. As 60 amostras foram transportadas e conservadas em câmara fria (4°C) para posterior análise em laboratório.

4.3. Obtenção dos Isolados de Fungos

Realizou-se o isolamento e purificação dos microrganismos na bancada do laboratório, sendo esta previamente desinfetada com álcool a 96% e realizada junto à área de influência da chama do bico de Bunsen, tendo o objetivo de cumprir as condições de assepsia e diminuição do risco de contaminação das amostras com outros microrganismos não desejados.

Todo o material de laboratório utilizado foi submetido a um ciclo de esterilização em autoclave (Uniclave 88, A.J. Costa), a uma temperatura de 120°C e a uma pressão de 1 atmosfera durante 20 minutos.

Para suprimir microrganismos epifíticos no material vegetal amostrado nos dois locais, todo o material vegetal foi sujeito a um ciclo de desinfecções, segundo o protocolo adaptado por Varanda *et al.* (2016). A desinfecção da superfície do material vegetal envolveu uma sequência de imersões de 2 minutos numa solução de álcool a 96% (v/v), seguida de uma imersão em hipoclorito de sódio a 3% (v/v) durante mais dois minutos e uma imersão em etanol a 70%(v/v) por mais dois minutos. Por fim, o material vegetal foi lavado em dois ciclos de imersão em água ultrapura, um minuto em cada ciclo, com o objetivo de remover o excesso de desinfetante das imersões anteriores. No final do ciclo de lavagens cada amostra vegetal foi seca em papel de filtro Whatman estéril.

O material vegetal esterilizado foi fracionado em segmentos de aproximadamente 5 x 5 mm e colocados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (seis pedaços por placa) contendo um meio de cultura com 3,9% de PDA (Potato dextrose agar) (Merck, Alemanha). Todo o procedimento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar. As placas foram incubadas no escuro a 23-25°C durante quatro dias. Os

fungos que cresceram a partir das amostradas vegetais foram então isolados em cultura pura, por transferência da colônia para uma nova placa de Petri contendo meio PDA. O micélio de cada isolado de fungo foi macerados em azoto líquido e armazenado em microtubos de 2 mL à temperatura de -80°C para posterior extração de DNA e identificação taxonômica.

4.4. Extração de DNA e Identificação Molecular dos Isolados de Fungos Obtidos

A extração de DNA total dos isolados de fungos foi realizada segundo o método de CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas alterações (Varanda *et al.*, 2016).

Às amostras maceradas e congeladas nos microtubos, adicionou-se 600 µL de tampão de extração CTAB 2% (20 mM EDTA; 0,1 M Tris-HCl pH 8.0; 1,4 M NaCl; 2% de CTAB; 4% de PVP; 0,1% de β-mercaptoetanol adicionados imediatamente antes da sua utilização) e 0,5% de Proteinase K. Esta solução foi incubada durante 90 minutos a 55°C e cuidadosamente misturada por inversão a cada 15 min. Após a incubação, adicionou-se a cada tubo 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a solução foi novamente agitada por inversão durante 10 min. Os microtubos foram centrifugados a 10000g durante 10 min e o sobrenadante foi recuperado para novos microtubos. Adicionou-se a cada microtubo 800 µL de etanol absoluto frio. As amostras foram misturadas cuidadosamente por inversão e novamente centrifugadas a 12000g, durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionou-se 500 µL de etanol a 70% ao microtubo, de modo a eliminar resíduos de sais aderentes ao DNA. Realizou-se novamente uma centrifugação a 12000g durante 15 min e após a centrifugação descartou-se novamente o sobrenadante. Por fim, o DNA foi seco na centrifuga 'speed vacuum' (CentriVap micro IR, Labconco) por 20 min a 55°C e novamente hidratado com 30 µL de água ultrapura, as amostras de DNA total foram conservadas a -20°C até à sua utilização.

O DNA obtido anteriormente foi sujeito a PCR ('Polimerase Chain Reaction' – Reação da polimerase em cadeia), para amplificação da região ITS ('Internal Transcribed Spacer') a partir do DNA genómico, usando os 'primers' universais ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Figura 13) (Singh *et al.*, 2014).

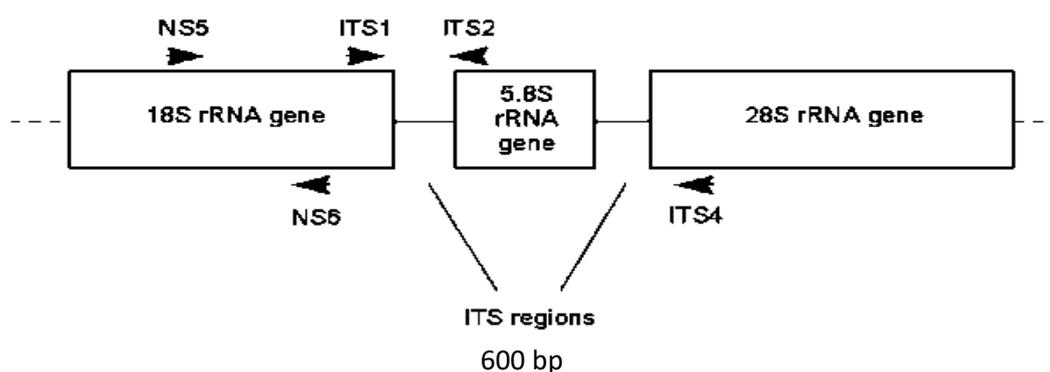


Figura 13 – Representação esquemática da região de rDNA com a localização dos 'primers' ITS1 e ITS4. (Fonte: <http://www.fao.org/3/X4946E/x4946e0k.htm>)

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 50 µL, contendo 30-80 ng de DNA genómico, Tris-HCl 10 mM (pH 8,6), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (Thermo Scientific), 0,2 mM de cada 'primer' e 2,5 U de DreamTaq DNA polimerase (Thermo Scientific). As reações de amplificação foram realizadas num termociclador (BioRad), com as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial de 95°C durante 3 minutos, seguidos de 39 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos e 72° C durante 2 minutos e a extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (1X: 1 M Tris-HCl; 0,83 M Ácido Borico; 10 mM EDTA; pH 7,5) com uma voltagem constante de 80V, durante 1 h. Como referência utilizou-se o marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Os produtos de amplificação por PCR depois de analisados foram purificados com o kit de purificação de produtos de PCR (NzyTech), seguindo as instruções do fabricante. Como foi referido anteriormente, os produtos purificados foram analisados em gel de agarose e quantificados e posteriormente enviados para sequenciação na empresa MacroGen Europa (Madrid, Espanha).

Os resultados da sequenciação foram analisados com recurso ao programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA-X” (Kumar *et al.*, 2015). A procura por sequências homólogas foi feita usando a base de dados “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). As sequências foram identificadas sempre que possível até à espécie e com um grau de semelhança o mais próximo possível de 100% (entre os 97% e os 100%).

4.5. Análise Estatística dos Dados

Neste trabalho foi utilizada a análise de variância (ANOVA), esta foi realizada para comparar o número total de fungos entre os locais (A e B) e as cultivares (Trincadeira e Aragonez). A análise estatística foi executada com recurso ao software IBM SPSS v.20. O teste Turkey HSD foi o utilizado para as comparações múltiplas, e os conjuntos de dados foram considerados estatisticamente diferentes quando o resultado foi $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Descrição dos Solos

Segundo a DGADR (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural) todos os solos encontrados nos locais A e B fazem parte da família dos Solos Argiluvitados Pouco Insaturados, são os solos Pmn, Pmg, Pmh e Pgn.

O local A (Figura 14) apresenta apenas um tipo de solo, o solo Pmn, é considerado um Solo Mediterrâneo, Pardo, de Minerais Não Calcários, Normais, de rochas cristalofílicas e apresenta quatro horizontes: horizonte A1, horizonte B1, horizonte B2 e por último o horizonte C. Para o local A o horizonte A1 corresponde a uma variação de 15 a 30 cm; pardo-amarelado-escuro ou pardo-acinzentado-escuro; franco-arenoso ou arenoso-franco, por vezes franco; normalmente com saibro e cascalho subanguloso de quartzo; estrutura granulosa média ou grosseira fraca; consistência muito friável ou solto; pH 6,0 a 7,0. Existe uma transição nítida para o horizonte B1 que corresponde a uma variação de 10 a 15 cm; pardo ou pardo-escuro-amarelado-escuro; franco ou franco-argilo-arenosa; normalmente com saibro e cascalho subanguloso de quartzo; estrutura anisoforme grosseira e média, moderada a fraca; consistência friável. Existe uma transição nítida para o horizonte B2 que corresponde a uma variação de 15 a 30 cm; pardo-oliváceo, por vezes com algumas ou bastantes manchas pardo-amareladas e pardo-acinzentadas escuras; franco-argilosa a argilosa, por vezes franco-argilo-arenosa; normalmente com saibro e cascalho subanguloso de quartzo e de rocha-mãe; estrutura anisoforme angulosa muito grosseira forte, por vezes tendente para prismática média moderada; películas de argila; consistência firme; com algumas concreções ferruginosas. E o Horizonte C indica que o solo é proveniente da meteorização de rochas cristalofílicas, nomeadamente xistos e gneisses (Cardoso, 1965; DGADR, 2020).



Figura 14 – Carta de solos do local A

O local B (Figura 15) apresenta três tipos de solos, dois deles são uma mistura de solos, o solo Pgn + Pmg e, o solo Pmg + Pmh. O terceiro solo presente no local B, é um Pmg (p), que se encontra numa fase pedregosa.

O solo Pgn, é um Solo Mediterrâneo, Pardo, de Minerais Não Calcários, Normais, de gnaisses ou rochas afins que apresenta três horizontes: horizonte A1, horizonte B e horizonte C. De seguida, o solo Pmg, é um Solo Mediterrâneo, Pardos, de Minerais Não Calcários, Normais, de quartzodioritos que apresenta três horizontes: horizonte A1, horizonte B e o horizonte C. E o solo Pmh, é um Solo Mediterrâneo, Pardo, de Minerais Não Calcários, Para-Solos Hidromórficos, de quartzodioritos que apresenta quatro horizontes: horizonte A1, horizonte A2, horizonte B e o horizonte C (Cardoso, 1965; DGADR, 2020).

Para o local B o horizonte A1 corresponde a uma variação de 15 a 30 cm, pardo ou castanho; franco-arenoso a arenoso; estrutura granulosa fina fraca ou sem agregados; consistência não aderente, não plástico, muito friável ou solto, fofo ou solto; pH 5,5 a 6,5. Existe uma transição nítida ou abrupta para o horizonte B que apresentou uma variação de 20 a 50 cm; pardo ou castanho com pontuações esbranquiçadas de feldspatos; franco-argilo-arenoso, franco-argiloso, argilo-arenoso ou argiloso; estrutura prismática média ou grosseira moderada; há películas de argilo nas faces dos agregados; consistência aderente, plástico, muito firme ou firme, muito rijo ou rijo; pH 6,5 a 7,0. Verificou-se uma transição nítida ou gradual para o horizonte C que é descrito como material proveniente da desagregação de quartzodioritos. Apresenta solos argiluvitados pouco insaturados, solos mediterrâneos, pardos, de minerais não calcários, para solos hidromórficos de quartzodioritos (Pmh). O horizonte A1 apresentou uma variação de 20 a 30 cm; pardo ou pardo-acinzentado; franco-arenoso, com bastante saibro sub-anguloso de quartzo (por vezes rolado) e/ou de pórfiro e algum cascalho anguloso de pórfiro; estrutura granulosa muito fina a média, fraca ou sem agregados; consistência muito friável; pH 5,0 a 6,0. Verificou-se uma transição nítida para o horizonte A2 que mostrou uma variação entre 0 a 30 cm; mais claro que o anterior: pardo-pálido, por vezes pardo-amarelado-claro, especialmente em profundidade; franco-arenoso a arenoso, com bastante saibro sub-anguloso de quartzo (por vezes rolado) e/ou de pórfiro e algum cascalho anguloso de pórfiro; sem agregados; consistência muito friável; com concreções ferruginosas; abrupta, muitas vezes através de uma linha de pedras; pH 5,5 a 6,5. Verificou-se uma transição abrupta para o horizonte B que variou entre 15 a 50 cm; pardo-acinzentado com manchas de tonalidade variável, em geral pardo-avermelhadas escuras, tornando-se com a profundidade menos distintas até se confundirem com uma nova cor de fundo entre parda e castanha; argiloso; estrutura maciça ou prismática média ou grosseira fraca ou moderada; nota-se algumas películas de argila fraca ou moderada; consistência muito aderente, muito plástico, extremamente firme, extremamente rijo; pH 5,5 a 6,5. Com uma transição nítida para o horizonte C onde o material proveniente é descrito como proveniente de meteorização de quartzodioritos. Com solos argiluvitados pouco

insaturados, solos mediterrâneos, pardos, de minerais não calcários, normais de gnaisses ou rochas afins (Pgn). O horizonte A1 apresentou um variação entre 20 a 30 cm; pardo ou castanho; arenoso-franco ou franco-arenosa; estrutura granulosa fina fraca; consistência friável ou muito friável; pH 5,0 a 6,0. Com uma transição gradual para o horizonte B que apresentou uma variação entre 15 a 40 cm; pardo-forte ou castanho; franco a franco-arenoso; estrutura anisoforme angulosa grosseira moderada a fraca; consistência friável; pH 5,5 a 6,5. Com uma transição gradual para o horizonte C, onde o material é proveniente da desagregação de gnaisses ou rochas afins (Cardoso, 1965; DGADR, 2020).

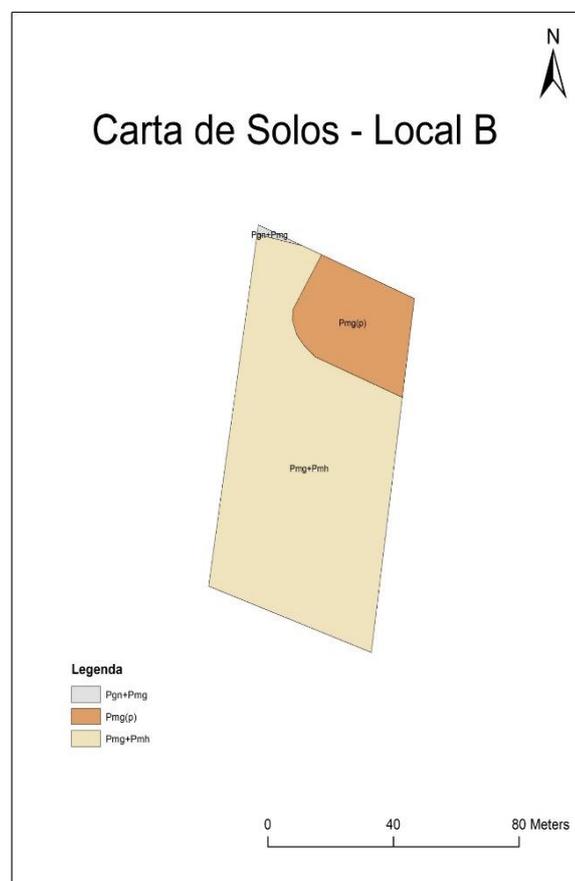


Figura 15 – Carta de solos do local B

5.2. Isolamento e Identificação de Fungos

Em todas as 60 amostras recolhidas nos locais A e B foram obtidos isolados de fungos. Foram identificados um total de 183 isolados de fungos, todos os isolados encontrados foram identificados molecularmente com sucesso, ao nível da espécie e em alguns casos somente ao nível do género. Estes resultados foram obtidos com base na análise das sequências da região ITS, por meio de uma pesquisa de sequências homólogas pelo programa BLAST N no NCBI (National Center for Biotechnology Information). O tamanho dos produtos de amplificação por PCR variou de 500 a 700 pb (Figura 16).

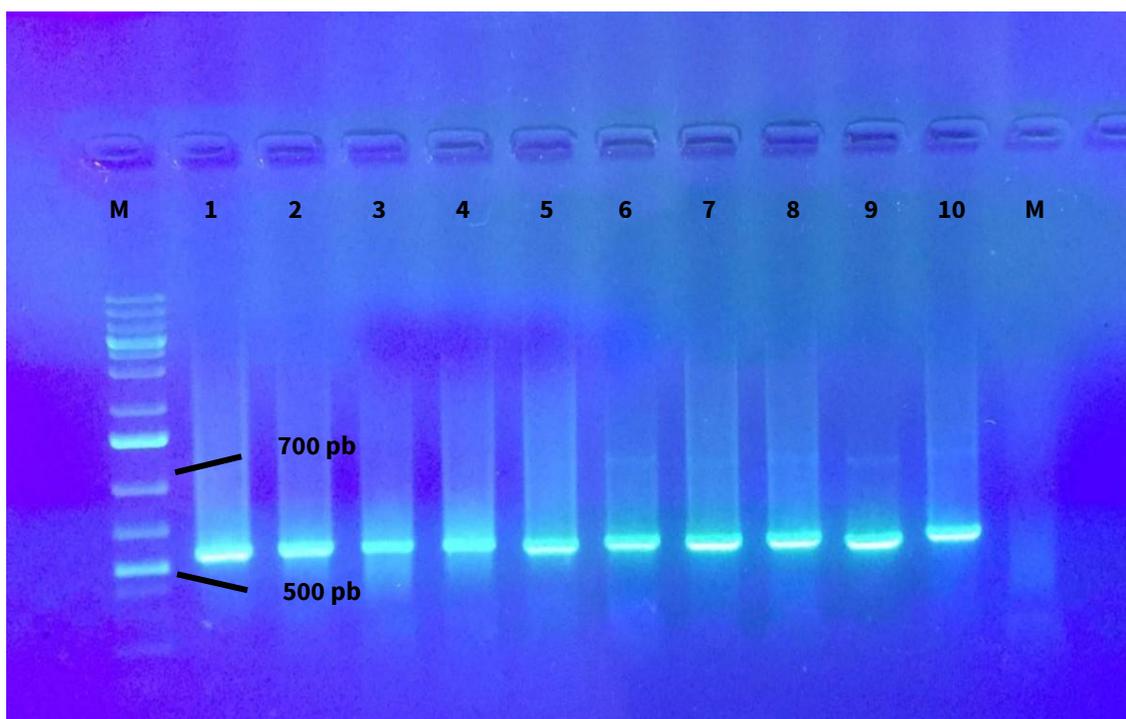


Figura 16 – Análise electroforética em gel de agarose 1% do produto de amplificação obtido após PCR com os ‘primers’ ITS1 e ITS4, usando DNA extraído das culturas puras dos fungos isolados de material vegetal, amostras 1 a 10. M – Marcador 100 pb ‘DNA Ladder’. As setas indicam a bandas do marcador com tamanho de 500 pb e de 700 pb.

5.3. Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos

Como se pode verificar da análise da Tabela 1, a maioria dos isolados de fungos analisados nos dois locais (A e B) (Figura 17), pertencem à Divisão Ascomycota (80,95%), seguido da Divisão Basidiomycota (14,29%) e da Divisão Zygomycota (4,76%). Dentro da Divisão Ascomycota, os isolados de fungos identificados pertencem a quatro classes: Dothideomycetes (33,33%), Sordariomycetes (23,81%), Eurotiomycetes (19,05%) e Leotiomycetes (4,76%). Dentro da Divisão Basidiomycota todos os isolados de fungos identificados pertencem somente à classe Agaricomycetes (14,29%) e dentro do Divisão Zygomycota somente um isolado foi identificado e pertence à classe Zygomycetes (4,76%).

Para ambos os locais, 183 isolados de fungos foram identificados como pertencentes a 21 géneros, destes, 14 isolados (66,67%) foram identificados ao nível da espécie, *Aureobasidium pullulans*, *Diplodia seriata*, *Epicoccum nigrum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Purpureocillium lilacinum*, *Diplodia sapinea*, *Sordaria fimicola*, *Fusarium solani*, *Talaromyces purpureogenus*, *Aspergillus ustus*, *Sistotrema brinkmannii*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor*, *Botrytis cinerea*, e 7 isolados (33,33%) foram identificados somente até ao nível do género; *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Cytospora* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Rhizopus* spp.

O Local A apresentou 6 géneros exclusivos em comparação com o Local B *Botryosphaeria*, *Diplodia sapinea*, *Purpureocillium*, *Cytospora*, *Fusarium* e *Paecilomyces*. Por outro lado, o local B apresentou 7 géneros exclusivos em comparação ao local A *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Sistotrema*, *Stereum* e *Botrytis*.

No local A, dentro da Divisão Ascomycota foram identificadas 3 classes, a classe Dothideomycetes com 58,90%, seguida da classe Sordariomycetes (26,03%) e da classe Eurotiomycetes (5,48%). Dentro da Divisão Basidiomycota foi identificada 1 classe, Agaricomycetes com 1,37%. Por fim na Divisão Zygomycota somente uma

classe foi identificada, Zygomycetes (8,22%). Os 73 isolados de fungos identificados no local A foram identificados como pertencentes a 14 géneros, sendo que deste, 5 géneros e uma espécie apresentaram cerca de 91% do total dos fungos identificados. O género *Alternaria* foi o que apresentou maior percentagem com 38,36%, seguido dos géneros *Sordaria* (21,92%), *Rhizopus* (8,22%), *Penicillium* (4,11%) e *Aureobasidium* (2,74%). A espécie *Diplodia seriata* apresentou uma percentagem 10,96% de isolados. Dos 73 isolados de fungos do local A, 36 foram encontrados na cultivar Trincadeira e identificados em 10 géneros, sendo o género *Alternaria* com a maior percentagem 38,89% seguido dos géneros *Sordaria* (19,44%), *Rhizopus* (16,67%), *Epicoccum* (2,78%), *Botryosphaeria* (2,78%), *Purpureocillium* (2,78%), *Fusarium* (2,78%), *Penicillium* (2,78%), *Paecilomyces* (2,78%) e a espécie *Diplodia seriata* com 8,33%. Destes 10 géneros, 4 foram exclusivos da cultivar Trincadeira em comparação com a cultivar Aragonez, sendo eles os géneros *Purpureocillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Rhizopus*. Os restantes 37 isolados de fungos do local A foram encontrados na cultivar Aragonez e identificados em 6 géneros e duas espécies predominantes, sendo o género *Alternaria* com a maior percentagem 37,84% seguido dos géneros *Sordaria* (24,32%), *Aureobasidium* (5,41%), *Penicillium* (5,41%), *Cytospora* (2,70%) e *Trametes* (2,70%) e as espécies *Diplodia seriata* e *Diplodia sapinea* com uma percentagem de (13,51%) e (8,11%) respetivamente. Destes géneros identificados, 4 foram exclusivos da cultivar Aragonez em comparação com a cultivar Trincadeira, sendo eles os géneros *Aureobasidium*, *Diplodia sapinea*, *Cytospora* e *Trametes*.

No local B, dentro da Divisão Ascomycota foram identificadas 3 classes; a classe Dothideomycetes com 63,64%, seguida da classe Sordariomycetes (16,36%) e da classe Eurotiomycetes (3,64%). Dentro da Divisão Basidiomycota foi identificada 1 classe, Agaricomycetes com 3,64%. Por fim na Divisão Zygomycota também somente a classe Zygomycetes foi identificada com 6,36%. Os 110 isolados de fungos identificados no local B foram identificados como pertencentes a 15 géneros, sendo que destes, 6 géneros e uma espécie apresentaram cerca de 90% do total dos fungos identificados. O género *Alternaria* foi o que apresentou maior percentagem com

41,82%, seguido dos géneros *Sordaria* (14,55%), *Epicoccum* (11,82%), *Botrytis* (6,36%), *Rhizopus* (6,36%), *Aureobasidium* (2,73%), a espécie *Diplodia seriata* encontra-se com uma percentagem de 5,45%. Dos 110 isolados de fungos do local B, 39 foram encontrados na cultivar Trincadeira e identificados em 12 géneros e uma espécie predominante, sendo o género *Alternaria* com a maior percentagem (38,46%) seguido dos géneros *Rhizopus* (7,69%), *Sordaria* (7,69%), *Aureobasidium* (5,13%), *Trichoderma* (5,13%), *Penicillium* (5,13%), *Cladosporium* (2,56%), *Talaromyces* (2,56%), *Aspergillus* (2,56%), *Sistotrema* (2,56%), *Stereum* (2,56%) e *Trametes* (2,56%) e a espécie *Diplodia seriata* com 15,38%. Destes 12 géneros, 6 foram *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sistotrema* e *Stereum* e também a espécie *Diplodia seriata* como sendo exclusivos da cultivar Trincadeira em comparação com a cultivar Aragonez. Os restantes 71 isolados de fungos do local B foram encontrados na cultivar Aragonez e identificados em 8 géneros, sendo o género *Alternaria* com a maior percentagem (43,66%) seguido dos géneros *Sordaria* (18,31%), *Epicoccum* (18,31%), *Botrytis* (9,86%), *Rhizopus* (5,63%), *Aureobasidium* (1,41%), *Cladosporium* (1,41%) e *Trametes* (1,41%). Destes 8 géneros, 2 foram exclusivos da cultivar Aragonez em comparação com a cultivar Trincadeira, sendo eles os géneros *Epicoccum* e *Botrytis*.

Tabela 1: Contribuição dos isolados de fungos (%) por Local (A e B) e com as respectivas classificações taxonômicas.

Divisão	Classe	Gênero/Espécie	Local A (%)	Local B (%)
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2.74	2.73
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Alternaria</i> spp.	38.36	41.82
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Cladosporium</i> spp.	0.00	1.82
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Diplodia seriata</i>	10.96	5.45
Ascomycota	Dothidiomycetes	<i>Epicoccum nigrum</i>	1.37	11.82
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1.37	0.00
Ascomycota	Dothideomycetes	<i>Diplodia sapinea</i>	4.11	0.00
Ascomycota	Sordariomycetes	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	1.37	0.00
Ascomycota	Sordariomycetes	<i>Sordaria fimicola</i>	21.92	14.55
Ascomycota	Sordariomycetes	<i>Cytospora</i> spp.	1.37	0.00
Ascomycota	Sordariomycetes	<i>Trichoderma</i> spp.	0.00	1.82
Ascomycota	Sordariomycetes	<i>Fusarium solani</i>	1.37	0.00
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	0.00	0.91
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Penicillium</i> spp.	4.11	1.82
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus ustus</i>	0.00	0.91
Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Paecilomyces</i> spp.	1.37	0.00
Ascomycota	Leotiomycetes	<i>Botrytis cinerea</i>	0.00	6.36
Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	0.91
Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	0.91
Basidiomycota	Agaricomycetes	<i>Trametes versicolor</i>	1.37	1.82
Zygomycota	Zygomycetes	<i>Rhizopus</i> spp.	8.22	6.36

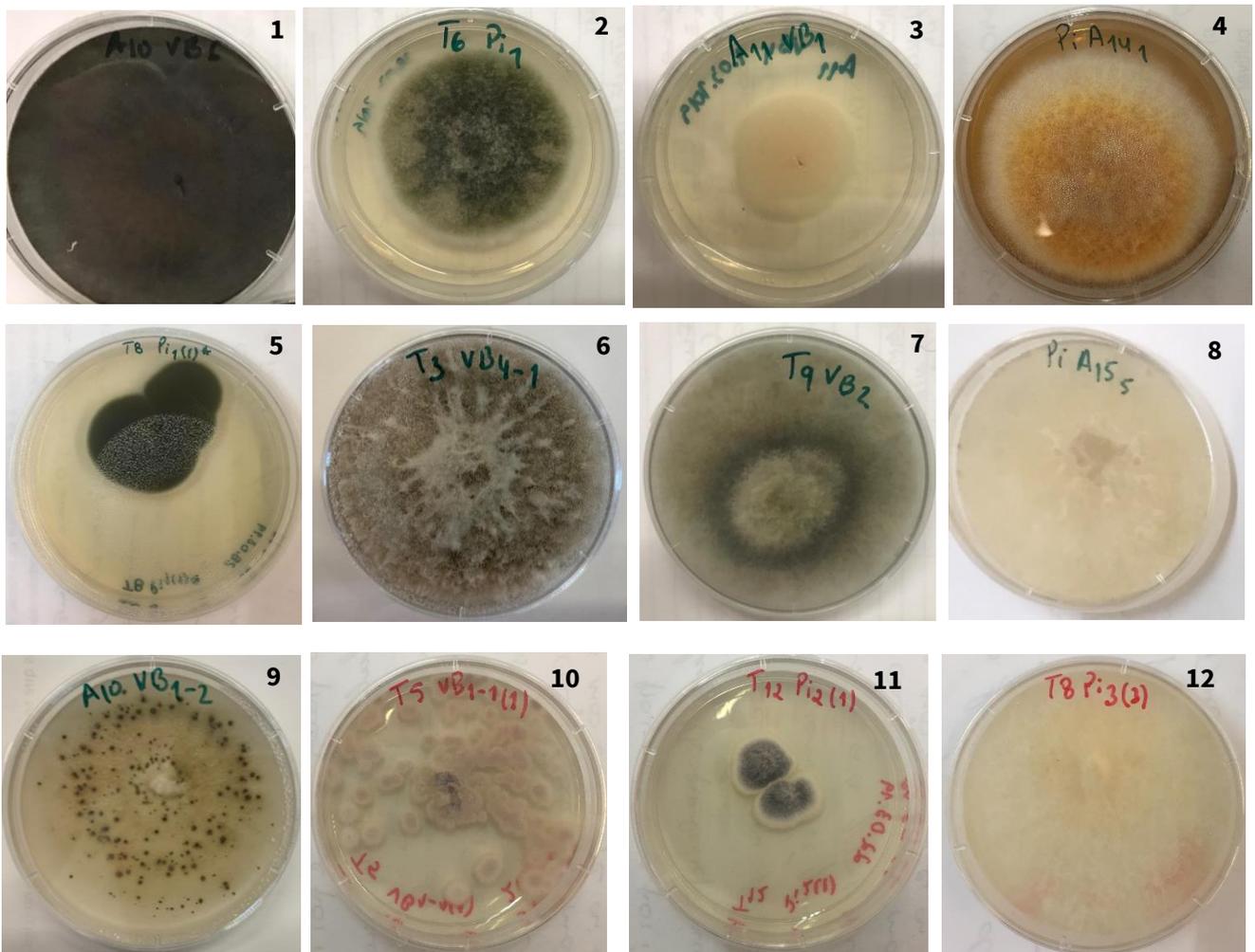


Figura 17 – Alguns exemplos dos isolados de fungos nas placas de Petri; 1 – *Sordaria fimicola*; 2 – *Alternaria* spp.; 3 – *Aureobasidium pullulans*; 4 – *Epicoccum nigrum*; 5 – *Cladosporium* spp.; 6 – *Botryosphaeria dothidea*; 7 – *Diplodia seriata*; 8 – *Botrytis cinerea*; 9 – *Cytospora* spp.; 10 – *Purpureocillium lilacinum*; 11 – *Aspergillus ustus*; 12 – *Stereum*

A média \pm (SE) do número total de fungos no local A foi de $12,17 \pm 1,35$ valor este ligeiramente menor em comparação ao local B $18,33 \pm 2,68$, no entanto para a análise das variâncias (ANOVA) estes valores não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Para o local A, a média \pm (SE) do número de fungos encontrados para a cultivar Trincadeira é de $11,67 \pm 0,67$ e para a cultivar Aragonez é de $12,33 \pm 2,85$, valores que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Para o local B, a média \pm (SE) do número de fungos encontrados para a cultivar Trincadeira é de $13,00 \pm 2,00$ foi significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação à cultivar Aragonez é de $23,67 \pm 1,86$ (Figura 18).

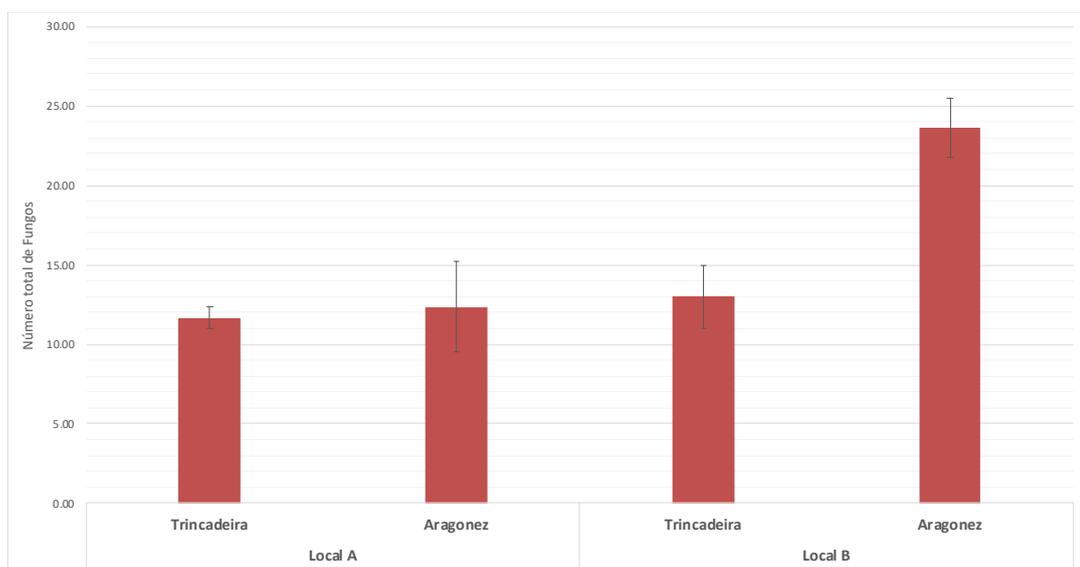


Figura 18 – Gráfico da média de fungos endofíticos \pm erro padrão (SE) em cada local (A e B) e cultivar (Trincadeira e Aragonez).

5.4. Identificação de Fungos Fitopatogénicos

Dos 21 géneros de fungos identificados neste trabalho, apenas 5 destes incluem fungos fitopatogénicos (Figura 19); *Cladosporium*, *Diplodia*, *Botrytis*, *Botryosphaeria* e *Rhizopus*. Destes 5 fungos fitopatogénicos, dois deles são causadores das doenças do lenho, são os fungos da espécie *Diplodia seriata* e *Botryosphaeria dothidea*.

Destes possíveis fungos patogénicos, 3 géneros/espécies foram encontrados no local A, as espécies *Diplodia seriata* (10,96%) e *Botryosphaeria dothidea* (1,37%) e o género *Rhizopus* (8,22%). Para a ocorrência destes fungos patogénicos em cada cultivar no Local A, verificou-se que para a cultivar Trincadeira estavam presentes as espécies *Diplodia seriata* (4,11%) e *Botryosphaeria dothidea* (1,37%) e o género *Rhizopus* (8,22%), embora na cultivar Aragonez apenas foi encontrada a espécie *Diplodia seriata* (6,85%).

No local B foram encontrados 4 géneros/espécies com possível atividade patogénica, as espécies *Botrytis cinerea* (6,36%) e *Diplodia seriata* (5,45%) e os géneros *Rhizopus* (6,36%) e *Cladosporium* (1,82%). Para a ocorrência dos fungos com possível atividade patogénica em cada cultivar no Local B, verificou-se que para a cultivar Trincadeira foram identificados. A espécie *Diplodia seriata* (5,45%) e os géneros *Rhizopus* (2,73%) e *Cladosporium* (0,91%) e para a cultivar Aragonez, foram identificados a espécie *Botrytis cinerea* (6,36%) e os géneros *Rhizopus* (3,64%) e *Cladosporium* (0,91%).



Figura 19 – Alguns exemplos dos fungos patogénicos na placa de Petri.

6. Discussão

Estudos recentes mostram que alguns fungos endófitos podem apresentar efeitos benéficos nos seus hospedeiros, podendo estes atuar como promotores de crescimento da planta, conferindo tolerância a stresses ambientais e ataques de patógenos e herbívoros, neste último, por exemplo, diminuindo a palatabilidade do tecido do hospedeiro aos herbívoros por meio da produção de compostos tóxicos (Arnold *et al.*, 2003; Bea *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2008; Oono *et al.*, 2015). Por este motivo, torna-se necessário conhecer as comunidades de fungos endofíticos em diferentes modos de produção e cultivares, uma vez que a variabilidade destas comunidades pode interferir na produção e na qualidade da uva (Dissanayake *et al.*, 2018). Existem vários fatores que podem alterar a densidade e diversidade das comunidades endofíticas nas plantas, como por exemplo, o local de amostragem (tipos de solos e condições climáticas), a idade do tecido vegetal, a vegetação associada e o tipo cultivar, que tem sido descrito como um dos fatores mais importantes para a variabilidade das comunidades (Casieri *et al.*, 2009; Gonzalez & Tello, 2011). Outros fatores como a temperatura, a precipitação e o estado fitossanitário da planta hospedeira exercem algum efeito sobre essa composição das comunidades endofíticas (González & Tello, 2011).

Na identificação e na caracterização dos solos foi possível perceber que os dois locais (A e B) em estudo apresentam diversos solos e, apesar de todos os solos encontrados pertencerem à mesma família dos Solos Argiluvitados Pouco Insaturados, havia diferenças entre eles. O local A, apenas apresenta um solo (Pmn), enquanto o local B apresenta três solos diferentes, em que dois deles são considerados misturas de solos, Pgn+Pmg; Pmg+Pmh e o solo Pmg (p), numa fase pedregosa.

Segundo Rana *et al.* (2019), os microrganismos endofíticos aumentam a resistência das plantas aos fatores de stress abiótico e biótico, como o aumento da tolerância à seca, diferenças de temperaturas, nível de pH, diferenças de salinidade, dos nutrientes disponíveis em cada local e da presença de metais pesados, entre outros

parâmetros. Por outro lado, as plantas fornecem um ambiente protetor para o crescimento e multiplicação de fungos endofíticos. Para este estudo, as diferenças existentes ao nível da constituição dos solos dos locais A e B podem também estar envolvidas na variabilidade de fungos presentes nos dois locais em estudo para ambas as cultivares.

Os resultados das análises das sequências da região ITS dos 183 isolados de fungos permitiu agrupá-los em 21 géneros diferentes, 17 dos quais pertenciam à Divisão Ascomycota (80,95%), três à Divisão Basidiomycota (14,29%) e uma à Divisão Zygomycota (4,76%). De facto, a região ITS têm demonstrado bons resultados na identificação de géneros de fungos endofíticos em diversas culturas e em especial na videira (Varanda *et al.*, 2016). No entanto, para estudos onde há identificação das espécies dentro de cada género torna-se crucial, recorrer à amplificação de outros genes com β -tubulina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Actina (ATC), Quintina (CHS-1) e Histona 3 (HIS-3) (Materatski *et al.*, 2019).

A Divisão Ascomycota representa a maioria dos táxons endofíticos identificados neste estudo, sendo a Divisão dominante encontrada em todas as cultivares e modos de produção. Esta parece ser uma característica geral das comunidades endofíticas na videira encontradas neste estudo e é consistente com outros estudos endofíticos relativos à videira, onde estes três taxóns são identificados (Bruez *et al.*, 2016; Gonzalez & Tello, 2011; Mostert *et al.*, 2000; Pancher *et al.*, 2012;) e também em outras plantas lenhosas (Arnold, 2007; Materatski *et al.*, 2019).

Dentro dos Ascomycota, encontram-se 17 géneros, sendo estes géneros representados por quatro classes (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes e Leotiomycetes). A classe Dothideomycetes é a mais representativa em ambos os locais (A e B), seguindo-se a classe Sordariomycetes com mais isolados de fungos em ambos os locais, embora no local A (26,03%) esta classe seja mais representativa em comparação ao local B (16,36%). Segundo Martínez-Diz (2020) a classe mais dominante na comunidade endofítica em videira é a Dothideomycetes, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Ao comparar videiras sob os diferentes modos de produção, observou-se que o número total de fungos detetados não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o modo de produção biológico (Local A) e o modo convencional (Local B). Resultados diferentes foram encontrados por Varanda *et al.* (2016), onde o modo convencional apresentou valores significativos maiores no número total de fungos em comparação ao modo biológico, embora neste estudo, tenham sido comparadas diferentes castas (Syrah e Aragonez) do que no presente estudo (Trincadeira e Aragonez). De facto, os resultados obtidos nesta dissertação e o estudo de Varanda *et al.* (2016) são ambos surpreendentes, já que os tratamentos convencionais são descritos como tendo impacto sobre as comunidades de fungos endofíticos, diminuindo a densidade e diversidade. As práticas biológicas geralmente estão associadas a diversidades mais elevadas (Araújo *et al.*, 2009).

Ainda segundo Varanda *et al.* (2016), as folhas apresentam maior frequência e diversidade de fungos endofíticos em relação a outras partes vegetativas da planta, como o lenho por exemplo, possivelmente devido às barreiras que os fungos enfrentam para a infeção ser menos eficaz em relação aos outros órgãos vegetativos das plantas.

Almeida *et al.* (2020), identificou em ramos de videiras um número maior de isolados de fungos (1082) do que os encontrados no presente trabalho (183). Embora o material seja proveniente dos mesmos órgãos vegetativos das plantas, o facto das amostras terem sido recolhidas em diferentes estações do ano, logo diferentes etapas do ciclo vegetativo da videira, pode ter influência no desenvolvimento e na diversidade dos fungos endofíticos. É interessante ressaltar que apesar destas diferenças nas densidades dos isolados de fungos, estes estudos permitiram identificar que nos diferentes materiais vegetais (ramos e/ou folhas), a diversidade das comunidades de fungos endofíticos encontrados apresenta muitas semelhanças. Reforçando a ideia de que diferentes fatores que podem moldar o microbioma da videira, como a sazonalidade, genótipo da planta, idade, características edafoclimáticas, as presenças de um patógeno, o tipo de planta hospedeira, entre outros

(Almeida *et al.*, 2020).

No presente estudo foi possível identificar os fungos endofíticos e possíveis fungos presentes nos ramos de videiras das cultivares Trincadeira e Aragonez e dentro destas comunidades de fungos endofíticos também foi possível verificar a presença de alguns fungos descritos como patogénicos para a videira. Segundo Arnold (2007), os fungos endofíticos tem um estilo de vida incompreensível e omnipresente. Alguns endofíticos são utilizados como agentes de biocontrolo contra os patogéneos que possam existir na videira (Dissanayake *et al.*, 2018).

Considerou-se como fungos endofíticos espécies pertencentes aos géneros *Alternaria* spp. e *Penicillium* spp., e as espécies *Epicoccum nigrum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus ustus* e *Aureobasidium pullulans*, que não são descritos como apresentando nenhuma patogenicidade em plantas de videira. De facto, alguns fungos endofíticos da videira, têm sido referidos com tendo efeitos benéficos, como propriedades antagonistas contra alguns fungos patogénicos importantes, como é o caso dos fungos pertencentes ao género *Alternaria* e *Epicoccum* que apresentam antagonismo contra a *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* (Varanda *et al.*, 2016).

Neste trabalho o género predominante nos dois locais foi o género *Alternaria*, com 38,36% no local A e com 41,82% no local B, apesar de não ter sido possível identificar as espécies de *Alternaria* presentes, este estudo corrobora o estudo realizado por Pancher *et al.* (2012), onde o género *Alternaria* foi considerado o fungo endofítico mais abundante em videiras. Para além disso, foi também verificado que o género *Alternaria* predomina entre os fungos endofíticos isolados em folhas e em outros tecidos vegetativos de vários grupos de plantas (Polizzoto *et al.*, 2012). Este trabalho também demonstrou que o género *Alternaria* apresentou maior frequência nas duas cultivares para o mesmo local (A), na cultivar Trincadeira com 14 isolados de fungos (38,89%) e na cultivar Aragonez com 15 isolados de fungos (38,46%). No local B, a cultivar Trincadeira com 15 isolados de fungos (38,46%) e na cultivar Aragonez com 31 isolados de fungos (43,66%), sendo esta cultivar no local B com mais isolados deste fungo.

Pela consulta da tabela 1 das contribuições dos isolados de fungos é possível perceber, que existe uma grande quantidade de isolados de *Alternaria* em ambos os locais (A e B) e os fungos patogénicos que possam existir nesses locais de estudo não se manifestam tão facilmente, ou em alguns casos que haja fungos patogénicos que se comportem como fungos endofíticos e apenas se manifestam quando tem as condições ambientais necessárias para tal.

As espécies de *Alternaria* são geralmente a fonte principal da componente de comunidades endofíticas em filosferas, devido principalmente ao seu estilo de vida particular, que produz hifas capazes de resistir e crescer sob condições intensas de radiações UV (Varanda *et al.*, 2016).

O fungo *Epicoccum nigrum* foi identificado com maior frequência no local B (11,82%), no modo de produção convencional, em comparação ao local A (1,37%), no modo de produção biológico. De facto, é comum encontrar este género em abundância em modo de produção convencional, já que os tratamentos químicos tendem a selecionar os fungos com resistência aos tratamentos. É interessante citar que este género possui propriedades antifúngicas devido aos metabolitos secundários produzidos durante o seu crescimento e ciclo de vida (Martini *et al.*, 2009).

Outro fungo endofítico que é descrito como antagonista de fungos patogénicos é o *Aureobasidium pullulans* (Wang *et al.*, 2013). Este fungo é conhecido por possuir atividade contra uma ampla gama de patogénicos da videira, incluindo em fungos de característicos de pós-colheita (González & Tello, 2011), embora a sua abundância nos dois locais seja semelhante e pouco frequente.

O género *Sordaria fimicola* é considerado um potente inibidor de crescimento de fungos patogénicos (Santra & Banerjee, 2020). Uma vez que este género é considerado um inibidor de crescimento de patogéneos. Neste estudo o género *Sordaria fimicola* manifesta-se com alguma frequência nos dois locais e nos dois modos de produção para ambas as cultivares. Sendo mais frequente no local A (21,92%) do que no local B (14,55%) e para ambos os locais é mais dominante na cultivar Aragonez.

Uma vez que os fungos endofíticos podem influenciar a comunidade microbiana existente dentro das videiras, estes podem retardar o estabelecimento de agentes patogêneos nas feridas, como a *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea* e algumas espécies de *Aureobasidium pullulans* são capazes de reduzir a acumulação de ocratoxina que possam existir nas uvas (Martini *et al.*, 2009).

Segundo Almeida *et al.* (2020), existem muitos microrganismos antagonistas ativos *in vivo*, como por exemplo os fungos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Neste estudo, dois dos três fungos acima mencionados, apenas se manifestaram no local B, com pouca frequência, como é o caso do gênero *Trichoderma* (1,82%) e *Aspergillus* (0,91%), ao contrário do gênero *Penicillium* que apesar de ser pouco frequente, se manifestou nos dois locais.

Penicillium spp. é um dos fungos endofíticos que pode apresentar atividade patogênica quando as condições ambientais se tornam favoráveis (Almeida *et al.*, 2020) e é também considerado como um antagonista. Este é um fungo pouco frequente neste estudo em ambos os modos de produção, tendo três isolados de fungos no local A (4,11%), manifestando-se nas duas cultivares e com apenas dois isolados de fungos no local B (1,82%), apenas na cultivar Trincadeira.

Apesar de se ter considerado as espécies *Fusarium solani* e *Aspergillus ustus* como fungos endofíticos, neste trabalho estes dois fungos não se manifestaram com grande frequência. O fungo *Fusarium solani*, sendo considerado um fungo do solo, apenas foi identificado no local A (1,37%), no modo de produção biológico na cultivar Trincadeira, considerou-se assim, um fungo exclusivo deste local. E para o fungo *Aspergillus ustus* apenas se verificou a presença no local B (0,91%), no modo de produção convencional, também na cultivar Trincadeira, sendo um fungo exclusivo deste local.

Neste estudo encontraram-se 3 espécies, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* e *Botrytis cinerea* e dois gêneros *Cladosporium* e *Rhizopus* de fungos que foram identificados também em outros estudos como sendo patogênicos. Dos fungos

identificados como possíveis fungos patogênicos e, apesar de a sua ocorrência neste estudo ser uma quantidade muito pequena, os fungos que mais se manifestaram em ambos os locais (A e B) foram a espécie *Diplodia seriata* e o gênero *Rhizopus*.

A Escoriose Europeia é provocada por várias espécies pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* é uma das principais doenças do lenho da videira, sendo considerada uma das mais mortais para a videira. Assim, o fungo *Diplodia seriata*, é considerado um dos fungos mais frequente nas videiras doentes (Reveglia et al., 2018). Neste estudo, este fungo manifestou-se nos locais (A e B), tendo maior frequência no local A (10,96%) para as duas cultivares e no local B (5,45%), manifestando-se apenas na cultivar Trincadeira. Este resultado mostra-se contraditório se se tiver em conta que a cultivar Trincadeira é considerada uma casta pouco suscetível a doença do lenho, no entanto, estudos recentes mostram que a expressão dos sintomas perante a presença dos agentes patogênicos causadores de doença do lenho está relacionada com a ativação de genes de resposta ao stress que variam entre cultivares e condições culturais como é o caso dos dois modos de produção em estudo neste trabalho (resultados não publicados).

A *Botryosphaeria dothidea* é um dos fungos que pode estar presente no lenho da videira, mas sem causar qualquer tipo de sintomas (Bruez *et al.*, 2016), embora, tal como referido os fungos *Botryosphaeria* spp. possam causar cancrios e até a morte das videiras. É um fungo que apenas mostrou incidência no local em modo de produção biológica (local A) com 1,37%, na cultivar Trincadeira. Neste local e para a cultivar Trincadeira há alguma incidência de fungos antagonistas, mesmo que em pouca quantidade, acabam por fazer com que a *Botryosphaeria dothidea* se manifeste.

Os fungos do gênero *Rhizopus* manifestou-se nos dois locais, tendo também maior frequência no local A (8,22%), mas apenas se manifestou na cultivar Trincadeira e no local B (6,36%) manifestando-se nas duas cultivares (Aragonez e Trincadeira). O fungo *Botrytis cinerea*, é um fungo que apenas se manifesta no local B, no modo de produção convencional (6,36%), é um fungo exclusivo deste local, mais propriamente da cultivar Aragonez. Apesar de neste mesmo local e na mesma casta existirem uma

grande quantidade de antagonistas, este fungo consegue de alguma maneira manifestar-se. A espécie *Botrytis cinerea* é considerado um patógeno importante da videira, que se pode encontrar oculto, isto é, comportando-se como um endofítico, a planta apresenta um comportamento assintomático e pode torna-se num agente patogénico quando existem condições ambientais propícias ao seu desenvolvimento ou fisiologicamente a planta está mais suscetível (Pancher *et al.*, 2012).

O género *Cladosporium* spp. também foi outro patógeno que mostrou pouca incidência, com apenas 1,82%, e só se manifestou no local B em ambas as cultivares. Uma vez que no local B existe muita dominância de fungos antagonistas, como a *Alternaria* para ambas as cultivares e, o *Epicoccum nigrum* na cultivar Aragonez. Estes podem ter levado a uma inibição dos efeitos patogénicos do género *Cladosporium* e este se acabe por apresentar pouca relevância na videira.

As videiras podem ser infetadas por diferentes agentes patogénicos ao longo do tempo, devido a múltiplas oportunidades de infeção e cada planta pode ser afetada por uma ou mais doenças do complexo de doenças lenho simultaneamente. Apesar de alguns fungos poderem viver como endofíticos, assintomáticos durante uma parte do seu ciclo de vida, em algum momento, podem alterar o seu comportamento e tornar-se num fungo patogénico, levando à expressão de sintomas da doença (Almeida *et al.*, 2020). No entanto, os fungos endofíticos também podem ter efeitos benéficos nas plantas hospedeiras, uma vez que ajudam essas plantas a resistir aos stresses que possam ser causados por fungos patogénicos e ajudam a ativar o mecanismo de defesa das plantas, tornando-as mais resistentes e ao ataque de agentes patogénicos e à expressão de sintomas.

Se as condições ambientais não forem favoráveis e a patogenicidade do fungo não for ativada, o fungo pode entrar num estado latente e acaba por permanecer dentro do hospedeiro sem causar qualquer tipo de sintoma. Pois, a presença de microrganismos antagonistas pode dificultar o desenvolvimento da doença, impedindo a colonização do patógeno pela competição dos nutrientes, espaço ou pela produção de metabólitos secundários que inibem o crescimento de fungos (Almeida *et al.*, 2020).

Assim, apesar de o número de fungos endofíticos antagonistas ser sempre superior ao número de fungos tipicamente patogénicos, estes conseguem sempre manifestar-se, possivelmente por existirem condições favoráveis para que se desenvolvam. Ou porque os patogénicos adotam o comportamento de fungos endofíticos e apenas se desenvolvem quando as condições assim o permitem, ou o contrário, quando os fungos endofíticos que acabam por se manifestar como patogénicos, quando as condições são favoráveis. Com isto, observou-se que existem fungos exclusivos de ambos os locais nas duas cultivares, sejam eles patogénicos, endofíticos ou fungos que não têm características de nenhum dos dois.

Neste trabalho todos os fungos identificados são fungos endofíticos, sendo que foram identificados fungos que não estão agrupados em nenhum grupo, visto que não se sabe quanto à sua patogenicidade, uma vez que as condições podem não ser as ideias para estes se manifestarem, e as suas quantidades por local e por cultivar são de muito pouca frequência, existindo ainda assim evidências destes fungos nas amostras de videira. Os fungos identificados foram as espécies *Diplodia sapinea*, *Purpureocillium lilacinum*, *Talaromyces purpureogenus*, *Sistotrema brinkmannii*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor* e *Sordaria fimicola*, e os géneros *Cytospora* spp. e *Paecilomyces* spp.. Tendo em conta que, o fungo *Sordaria fimicola* apresenta alguma incidência nos dois locais para ambas as cultivares.

O fungo *Diplodia sapinea* (4,11%) e *Cytospora* spp. (1,37%), apenas foram detetados no local A e na cultivar Aragonez. Para o mesmo local, foram detetados os fungo *Paecilomyces* spp. e *Purpureocillium lilacinum* ambos com a mesma percentagem (1,37%), mas foram detetados apenas na cultivar Trincadeira. O fungo *Trametes versicolor* que foi encontrado no local A com 1,37% na cultivar Aragonez e encontrou-se ainda no local B com percentagem semelhante para as duas cultivares. Por fim, os fungos *Talaromyces purpureogenus*, *Sistotrema brinkmannii* e *Stereum hirsutum* detetados apenas no local B e com percentagem muito semelhante. Sendo, o fungo *Stereum hirsutum* considerado um dos fungos responsáveis pela Esca e também um fungo com características saprofiticas, não causando apenas necroses descoloridas,

mas também fazendo com que haja a degradação da madeira e está também associado a outro microrganismo como *P. chamydosporum* (Larignon & Dubos, 1997).

Foi possível perceber ao longo deste trabalho que para ambos os locais existem fungos que apenas se manifestaram num dos locais. Assim, no local A, o modo de produção é o biológico, e os fungos encontrados apenas nas plantas dessa vinha foram: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia sapinea*, *Purpureocillium lilacinum*, *Cytospora sp.*, *Fusarium solani* e *Paecolimyces spp.*

No local B, o modo de produção é o convencional, e os fungos encontrados exclusivamente nesse local foram: *Cladosporium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Talaromyces purpureogenus*, *Aspergillus ustus*, *Sistotrema brinkmannii*, *Stereum hirsutum* e *Botrytis cinerea*.

A comunidade endofítica pode construir uma fonte de novos agentes fúngicos de biocontrole que sejam úteis para controlar as doenças da videira, especialmente as doenças que estão associadas ao declínio das videiras jovens produzidas em viveiros (González & Tello, 2011).

A cultura estudada nos dois modos de produção revelou algumas diferenças no número de fungos totais de endofíticos, a diversidade de fungos e a comunidade de fungos existentes. Por vezes, o modo de gestão da cultura pode ser a explicação para os diferentes tipos de fungos que possam existir na cultura em questão, pode estar relacionado com o uso de substâncias ativas autorizadas para cada modo de gestão da cultura, as alterações da fisiologia vegetal e os microrganismos presentes na planta.

Alguns estudos têm demonstrado que os modos de produção das culturas também podem interferir no papel dos fungos endofíticos, para além de que a capacidade antagónica da mesma espécie de fungo endofítico pode variar entre cultivar, idade do hospedeiro ou no tecido de planta amostrado (Varanda *et al.*, 2016).

7. Conclusão

Desde há muito tempo que as doenças do lenho da videira, são um problema a nível mundial, sendo uma ameaça para as culturas, causando grandes prejuízos a nível económico, tanto pela perda que possam causar como pelos gastos utilizados em produtos químicos, que nem sempre produzem o efeito desejado. Desde então, tem sido recorrente a pesquisa por meios alternativos e eficazes para o controle destas doenças, e nos dias de hoje já começam a existir alternativas à utilização de produtos químicos, visto que estes, podem ser prejudiciais à saúde humana e causam problemas no meio ambiente.

O controlo biológico é uma possível alternativa aos produtos de síntese química, uma vez que são menos dispendiosos e não são tóxicos, nem para a saúde humana nem para o meio ambiente e acabam por não causar inibição dos fungos endofíticos, de modo a que estes sejam mais eficazes no controlo de fungos patogénicos. Os fungos endofíticos colonizam os tecidos internos das plantas durante uma parte do seu ciclo, sem que estes causem qualquer tipo de sintoma aparente de doença no hospedeiro, o que tem suscitado interesse por parte dos cientistas, uma vez que têm uma presença benéfica para o seu hospedeiro, tanto a nível do seu desenvolvimento e defesa pois, apresentam um amplo grupo de microrganismos capazes de controlar os fungos patogénicos, como pelo seu carácter antagónico e pela produção de compostos bioativos e de endofíticos como agentes de biocontrolo.

Este trabalho permitiu avaliar a diversidade de fungos endofíticos na videira e verificar as diferenças e/ou semelhanças da comunidade endofítica e patogénica, entre as diferentes cultivares de videira (Aragonez e Trincadeira), em diferentes modos de produção (biológico e convencional) para os dois locais (A e B), de modo a verificar também a suscetibilidade das cultivares em estudo.

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a videira apresenta uma grande diversidade de fungos endofíticos e que nas plantas em modo de produção

biológico (Local A) esta diversidade é menor do que nas plantas em modo de produção convencional (Local B). Foi ainda possível concluir resultados para cada cultivar em cada local. Assim, para os mesmos fungos do local A e B para a cultivar Trincadeira, esta apresentou sempre menos incidência (23,29% - A/ 18,18% - B) de fungos endofíticos em relação à cultivar Aragonez (24,66% - A/ 40,91% - B), sendo o fungo endofítico com propriedades antagonistas do gênero *Alternaria* sempre mais incidente para os dois locais e para as duas cultivares. Para além deste, verificou-se também a presença de mais dois fungos endofíticos com propriedades antagonistas, como é o caso das espécies *Epicoccum nigrum* e *Aureobasidium pullulans*.

Os fungos patogénicos são considerados um grupo de ameaças ecológicas e economicamente relevantes, que muitas vezes infetam o hospedeiro através de feridas que existem nos tecidos da planta. Por vezes, estes fungos podem não se manifestar logo, e apenas se manifestam quando existem condições favoráveis para que se desenvolvam.

Foi possível concluir que os fungos patogénicos apresentam uma diversidade muito idêntica para ambos os locais (A e B). A cultivar Trincadeira (13,70%) apresenta mais incidência de fungos em relação à cultivar Aragonez (6,85%) para o local A (modo de produção biológico), o mesmo não acontece para o local B (modo de produção convencional), pois, estes apresentam mais incidência para a cultivar Aragonez (10,91%) em relação à cultivar Trincadeira (9,09%).

Um dos objetivos deste trabalho foi perceber a suscetibilidade das cultivares às doenças do lenho, e foi possível verificar que a cultivar Aragonez apresentou menos suscetibilidade em relação à cultivar Trincadeira. Principalmente para o local A, em modo de produção biológico, a cultivar Aragonez apenas apresentou incidência de um fungo patogénico (*Diplodia seriata*), uma vez que neste local e nesta cultivar existe grande diversidade de fungos endofíticos (24,66%) e alguns deles com propriedades antagonistas. Na cultivar Trincadeira para o mesmo local, esta apresentou incidência de três fungos patogénicos (*Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* e *Rhizopus*), estes acabaram por se manifestar, talvez por existirem condições favoráveis ao seu

desenvolvimento, apesar de existir uma incidência de 23,29% de fungos endofíticos.

Para o local B, a cultivar Aragonez (10,91%) mostrou-se mais suscetível a estas doenças em relação à cultivar Trincadeira (9,09%), apesar da cultivar Aragonez apresentar uma maior diversidade de fungos endofíticos (40,91%), esta desenvolveu mais fungos patogénicos em relação à cultivar Trincadeira que apresenta menos diversidade de fungos endofíticos (18,18%).

Neste trabalho foi possível verificar que dos fungos fitopatogénicos identificados, dois deles são causadores das doenças do lenho, mais propriamente da doença Escoriose Europeia, são os fungos *Botryosphaeria dothidea* e *Diplodia seriata*.

Estas diferenças podem existir devido ao modo de gestão da cultura e de cada local, podendo interferir nas diversidades de fungos endofíticos, variando de cultivar para cultivar.

8. Perspetivas Futuras

Este trabalho abriu novas perspetivas e decerto um caminho para mais estudos a realizar do que aquilo que se explorou nesta dissertação. Seria interessante repetir este mesmo estudo, e perceber se existem diferenças nas comunidades de fungos endofíticos e patogénicos para os diferentes modos de produção. Perceber se o fungo do género *Alternaria* continuaria a ser o mais incidente nestas duas cultivares, nos dois modos de produção.

Seria interessante realizar testes de antagonismo com fungos endofíticos, como a *Alternaria* spp., o *Epicoccum nigrum*, que para este estudo foram os que mais incidência apresentaram.

E ainda desenvolver mais estudos sobre os fungos endofíticos como meio de controlo biológico, de modo a que se percebam novas interações numa perspetiva de controlo de fungos patogénicos.

9. Referências Bibliográficas

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology, Fifth Edition. *Department of Plant Pathology University of Florida, USA: Elsevier Academic Press.*

Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2013). Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. *Plant Soil*, pp. 5-13.

Almeida, A. B. d., Concas, J., Campos, M. D., Materatski, P., Varanda, C., Patanita, M., . . . Félix, M. d. R. (2020). Endophytic fungi as potencial biological control agents against grapevine trunk diseases in Alentejo Region. *Biology*, pp. 2-23.

Alves, A. J. d. C. P. (2001). *Caraterização fenotípica e genotípica de estirpes de fungos fitopatogénicos do género Phaeoacremonium*. Tese de Mestrado em Microbiologia Molecular, Universidade de Aveiro, pp. 1-157.

Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises, *Applied Microbiology and Biotechnonoly*, 90: 1829-1845.

Araújo, A. S. F., Leite, L. F. C., Santos, V. B., & Carneiro, R. F. V. (2009). Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability*, 1, 268-276.

Armijo, G., Schlechter, R., Agurt, M., Muñoz, D., Nuñez, C., & Arce-Johnson, P. (2016). Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science*, pp. 1-18.

Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathigen damage in tropical tree. *PNAS*, 100: 15649-15654.

Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi - progress, challenges and frontiers. *Fungal biology reviews* - Elsevier, pp. 51-66.

Azevedo, J. L., Jr., W. M., Pereira, J. O., & Araújo, W. L. d. (2000). Endophytic microorganisms - a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol 3, nº1, pp. 40-65.

Ayres, M. R., Wicks, T. J., Scott, E. S., & Sosnowski, M. R. (2016). Developing pruning wound protection strategies for managing Eutypa dieback. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, pp. 102-111.

Bea, H., C. Sicher, R., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophytic *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3279-3295.

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

Bohm, J. (2005). Portugal Vitícola, O Grande Livro das Castas (2 ed.), Chaves Ferreira, pp. 1-234.

Bruetz, E., Larignon, P., Compant, S., & Rey, P. (2007). Investigating the durable effect of the hot water treatment used in the nurseries on pathogenic fungi inhabiting grapevine wood and involved in grapevine trunk diseases. *Crop Protection - Elsevier*, pp. 203-210.

Bruetz, E., Baumgartner, K., Bastien, S., Travadon, R., Guérin-Dubrana, L., & Rey, P. (2016). Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22: 288-295.

Cabrita, M. j. P. d. B. (2003). *Caraterização Físico- Química de uvas e vinhos de castas tradicionais do Alentejo*. Tese de Doutoramento em Ciências Agrárias, Universidade de Évora, pp. 1-251.

Cardoso, J. V. J. D. C. (1965). Solos de Portugal: sua classificação, caracterização e génese. Secretaria de Estado da Agricultura, Direção-Geral dos Serviços Agrícolas, pp. 1-310.

Carvalho, J. O. d., Broll, V., Martinelli, A. H. S., & Lopes, F. C. (2020). Endophytic fungi positive association with plants. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* - Elsevier, pp. 321-332.

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

Charlotte, H., & Rep, M. (2017). Adaptation to the host environment by plant-pathogenic fungi.pdf. *The annual review of phytopathology*, 55: 427-450.

Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F., & Wery, J. (2020). Current knowledge on Grapevine Trunk Diseases with complex etiology: a systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 59: 29-53.

Dissanayake, A. J., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K. D., Zhang, W., Xu, H., . . . Yan, J. (2018). Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*, pp. 85-107.

De la Fuente, M., Florence, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z., . . . Marie-France, C.-c. (2016). *Grapevine Trunk Diseases. A review*. OIV publications, pp. 2-24.

Doehlemann, G., Okmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2016). Fungal Interactions with Plants: Impact on Agriculture and the Biosphere. *The Fungal Kingdom*, pp. 701-726.

DGADR. (2020). Nota explicativa da Carta de Solos de Portugal e da Capacidade de Uso do Solo. Obtido de: <https://www.dgadr.gov.pt/>.

Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A. C., & Spagnolo, A. (2016). The Effects Of Grapevine Trunk Diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 144: 707-721.

Giménez, C., Cabrera, R., Reina, M., & González-Coloma, A. (2007). Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection. *Current Organic Chemistry*, 11: 707-720.

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

Gramaje, D., Sosnowaki, M. R., & Úrbez-Torres, J. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease*, pp. 12-39.

Grenet, M., & Mercier, M. (2007). Doenças do Lenho - Impactos e soluções. *Revista de Viticultura e Enologia* (www.infowine.com), pp. 1-5.

Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2007). Control of black foot disease. *Plant Pathology*, 56: 637-645.

Halleen, F., Fourie, P. H., & Lombard, P. J. (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by Biological and Chemical Methods. *South African Journal for Enology and Viticulture*, pp. 125-184.

Larignon, P., & Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, pp. 147-157.

Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R., & Garcia-Figueres, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology*, pp. 381-390.

Martínez-Diz, M. d. P., Eichmeier, A., Spetik, M., Bujanda, R., Díaz-Fernández, Á., Díaz-Losada, E., & Gramaje, D. (2020). Grapevine pruning time affects natural wound colonization by wood-invading fungi. *Fungal Ecology - Elsevier*, 48: 1-13.

- Martini, M., Musetti, R., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., & Osler, R. (2009). DNA - dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease*, *93*: 993-998.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & Félix, M. d. R. (2019). Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology* - Elsevier, pp. 1-11.
- Miller, J. D., Sumarah, M. W., & Adams, G. W. (2008). Effect of a Rugulosin-producing Endophyte in *Picea glauca* on *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Chemical Ecology*, *34*: 362-368.
- Mostert, L., Crous, P. W., & Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the "*Phomopsis viticola*" complex. *Sydowia*, *52*: 46-58.
- Niekerk, J. M. V., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, vol: 45.
- Oliveira, H., Rego, C., Santos, M. T., Nascimento, T., & Cabral, A. (2007). Declínio das videiras jovens: Novos desenvolvimentos. Paper presented at the 7º Simpósio de viticultura do Alentejo, Évora, pp. 1-11.
- Oono, R., Lefèvre, E., Simha, A., & Lutzoni, F. (2015). A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology* - Elsevier, vol: 119, pp. 917-928.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano, A. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 4308-4317.
- Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., & Musetti, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of Microbiological Methods*, *88*: 162-171.

Pouzoulet, J., Pivovarov, A. L., Santiago, L. S., & Rolshausen, P. E. (2014). Can cell dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science - Plant Physiology*, 5:1-11.

Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Dhiman, A., Yadav, N., Yadav, A. N., . . . Saxena, A. K. (2019). Endophytic fungi: biodiversity, ecological, significance and potential industrial applications. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi, Fungal Biology*, pp. 1-62.

Reveglia, P., Savocchia, S., Billones-Baaijens, R., Masi, M., Cimmino, A., & Evidente, A. (2018). Phytotoxic metabolites by nine species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in Australia and identification of those produced by *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum australe* and *Neofusicoccum luteum*. *Natural Product Research*, pp. 1-8.

Richards, A., Estaki, M., Úrbez-Torres, J. R., Bowen, P., Lowery, T., & Hart, M. (2020). Cover crop diversity as a tool to mitigate vine decline and reduce pathogens in vineyard soils. *Diversity*, pp. 1-30.

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

Santra, H. K., & Banerjee, D. (2020). Fungal Endophytes: A source for biological control agents. *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture, Fungal Biology*, pp. 181-216.

Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes?, *Soil Biology*, vol 9, *Microbial Root Endophytes*, pp. 1-13.

Silva, M. J. (2009). *Controlo do Rendimento casta Aragonez*. Tese de Mestrado em Viticultura e Enologia, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 1-60.

Singh, A., Shahid, M., & Srivastava, M. (2014). Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum* Tasp/8940 using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *International Journal of Advanced Research*, 2: 979-986.

Singh, M., Srivastava, M., Kumar, A., Singh, A. K., & Pandey, K. D. (2020). Endophytic bacteria in plant disease management. *Microbial Endophytes: Prospects of Sustainable Agriculture* - Elsevier, pp. 61-88.

Toofanee, S. B., & Dulynamode, R. (2002). Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity*, 11: 169-175.

Torres, M. S., Jr^a, J. F. W., Zhang, X., Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (2012). Endophytic Fungi, Chapter 12, Encyclopedia of Science & Tecnology. McGraw-Hill Education.

Úrbez-Torres, J. (2006). Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90: 1490-1503.

Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). *Phomopsis dieback*: A Grapevine Trunk Disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, pp. 1571-1579.

Varanda, C. M. R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M. I. E., & Félix, M. d. R. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 120(12), 1525-1536.

Wang, N., Thomson, M., Bodles, W. J., Crawford, R. M., Hunt, H. V., Featherstone, A. W., . . . Buggs, R. J. (2013). Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Molecular Ecology*, 22: 3098-3111.

Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 3327-3340.