

Interações entre fungos do pé negro da videira e do complexo da esca

Interactions between fungi associated with black-foot disease and esca disease complex of grapevine

Tatiana Santos Coletto, Teresa Nascimento e Helena Oliveira*

LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(*E-mail: heloliveira@isa.ulisboa.pt)

<https://doi.org/10.19084/RCA.17070>

Recebido/received: 2018.01.20

Aceite/accepted: 2018.12.23

RESUMO

Muitos dos fungos envolvidos na doença do pé negro e no complexo da esca ocorrem numa mesma videira, mas as interações que se estabelecem entre eles são pouco conhecidas. Em materiais de propagação vegetativa e videiras jovens coexistem frequentemente agentes causadores da doença de Petri (*Phaeoacremonium (Pm.) minimum* e/ou *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora*) e do pé negro (entre outros, *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*). Em videiras adultas, a estes fungos associam-se por vezes basidiomicetas, nomeadamente *Fomitiporia mediterranea*, responsável pelo sintoma de podridão-branca do lenho, característico da “esca”. O presente estudo teve como objetivo clarificar como interagem *in vitro* fungos responsáveis pela doença de Petri e pelo pé negro da videira, no seu conjunto responsáveis pelo declínio de videiras jovens. Complementarmente avaliaram-se ainda interações entre os principais fungos envolvidos no “complexo da esca”, *Pm. minimum* (= *Pm. aleophilum*), *Pa. chlamydospora* e *F. mediterranea*. Os resultados obtidos indicam que o crescimento micelial de *I. liriodendri* e *D. macrodidyma* é significativamente favorecido pela presença de *Pa. chlamydospora* ou *Pm. minimum*. Por sua vez, o fungo *F. mediterranea*, inicialmente favorecido por *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*, é posteriormente inibido por *Pm. minimum*, mas não por *Pa. chlamydospora*.

Palavras-chave: *Dactylonectria macrodidyma*, *Fomitiporia mediterranea*, *Ilyonectria liriodendri*, *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeomoniella chlamydospora*.

ABSTRACT

Many of the fungi involved in black foot and esca complex diseases of grapevine occur on the same plant, but the interactions between them are poorly understood. In vegetative propagating material and young vines, fungi involved in Petri disease (e.g. *Phaeomoniella (Pa.) chlamydospora* and *Phaeoacremonium (Pm.) minimum*) and black foot disease (e.g. *Ilyonectria liriodendri* and *Dactylonectria macrodidyma*) coexist frequently. On the whole these fungi are responsible for the decline of young vines. In adult vines, they are frequently associated with basidiomycetes, namely *Fomitiporia mediterranea*, responsible for the symptom of white rot of the wood, characteristic of the esca disease. The aim of the present study was to clarify how fungi responsible for Petri disease and black foot of grapevine interact *in vitro* and also with *F. mediterranea*. The results indicate that the mycelial growth of *I. liriodendri* and *D. macrodidyma* is significantly favoured by *Pa. chlamydospora* and *Pm. minimum*. The fungus *F. mediterranea*, initially favoured by *Pa. chlamydospora* and *Pm. minimum*, is subsequently inhibited by *Pm. minimum*, but not by *Pa. chlamydospora*.

Keywords: *Dactylonectria macrodidyma*, *Fomitiporia mediterranea*, *Ilyonectria liriodendri*, *Phaeoacremonium minimum*, *Phaeomoniella chlamydospora*.

INTRODUÇÃO

As doenças do lenho da videira (*grapevine trunk diseases*) são causadas por fungos patogénicos

que deterioram os órgãos perenes da videira (*Vitis vinifera* L. e *Vitis* spp.) (Magnin-Robert *et al.*, 2014). Dentre estas doenças destacam-se, pela sua importância mundial, a esca, a doença de Petri,

a botriosferiose e a eutipiose (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2012), bem como o pé negro da videira (Rego, 2004; Gubler *et al.*, 2005; Cabral, 2011; Gramaje e Armengol, 2011). Muitos dos agentes causais destas doenças estão presentes em plantas-mãe de porta-enxertos e de garfos, plantas provenientes de viveiro vitícola, videiras jovens e videiras adultas (Gramaje e Armengol, 2011; Agustí-Brisach *et al.*, 2013; Gramaje, 2016).

Uma videira portadora de doença do lenho abriga no seu interior um complexo de fungos patogénicos que podem atuar simultaneamente ou de forma sequencial, podendo haver um agente patogénico dominante (Rego *et al.*, 2012). As interações patogénio-patogénio e patogénio-ambiente na videira são bastante complexas e dependem das espécies de fungos que colonizam os tecidos do lenho, das características do hospedeiro, bem como das condições ambientais a que estes estão sujeitos.

O pé negro da videira, associado a fungos dos géneros "*Cylindrocarpon*"/*Ilyonectria*, *Campylo-carpon*, *Cylindrocladiella* e *Dactylonectria*, afeta sobretudo materiais de propagação vegetativa de videira, viveiros vitícolas e videiras jovens, originando, em casos severos, o declínio e morte das plantas (Scheck *et al.*, 1998; Halleen *et al.*, 2004; Rego, 2004; Cabral, 2011; Cabral *et al.*, 2012a, b; Agustí-Brisach e Armengol, 2013). Os sintomas característicos desta doença incluem lesões necróticas nas raízes e redução da biomassa radicular, bem como necroses internas no lenho, com maior incidência na base do porta-enxerto. Em consequência, as plantas apresentam atraso no desenvolvimento, crescimento raquítico, vigor reduzido, entrenós curtos e clorose ou necrose foliar (Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2006; Agustí-Brisach e Armengol, 2013).

Por sua vez, a doença de Petri da videira, uma das doenças incluídas no "complexo da esca", é causada por *Phaeoacremonium* (*Pm.*) *minimum*, outras espécies de *Phaeoacremonium* e *Phaeo-moniella* (*Pa.*) *chlamydospora*. Origina sintomas que se confundem com os do pé negro da videira (Rego *et al.*, 2000; Agustí-Brisach e Armengol, 2013; Úrbez-Torres *et al.*, 2014), mas, por vezes, em corte transversal, as plantas atacadas exibem exsudação de goma viscosa negra ("black goo"). Os respetivos

agentes causais podem coexistir numa mesma planta (Rego *et al.*, 2000) e podem ainda surgir em associação, entre outros, com fungos Botryosphaeriaceae e *Phomopsis* spp. formando complexos de doenças (Oliveira *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2007). Ainda não estão esclarecidas as interações que estes fungos estabelecem entre si, salvo raras exceções para os fungos da "esca propriamente dita" ou "esca *proper*" (Sparapano *et al.*, 2000c).

A "esca *proper*", ou "esca" refere-se a um complexo de duas doenças que podem ocorrer em simultâneo na mesma videira: podridão branca ou "*white-rot*" e doença vascular (Surico, 2009; Andolfi *et al.*, 2011), sendo a última causada pelos mesmos fungos que originam a doença de Petri. Já a podridão branca ("*white-rot*") é causada por fungos basidiomicetas, dentre os quais se destaca *Fomitiporia mediterranea* pela sua importância na Europa (Fischer, 2006) e em Portugal. A "esca" é uma doença de carácter destrutivo, cuja incidência tem vindo a aumentar à escala mundial ao longo dos últimos anos, sendo particularmente grave em regiões vitivinícolas do Mediterrâneo, onde é conhecida desde há mais de 100 anos (Fischer e Kassemeyer, 2003).

Videiras afetadas por "esca", estão frequentemente colonizadas por *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*, considerados fungos primários ou precursores, que atacam o lenho da videira e que abrem caminho à atuação dos "fungos de degradação final da madeira", os basidiomicetas, designadamente *F. mediterranea*. Outros fungos podem ser isolados de videiras afetadas por esca (*Eutypa* spp., outras espécies de *Phaeoacremonium*, fungos Botryosphaeriaceae, fungos do complexo "*Cylindrocarpon*"/*Dactylonectria*/*Ilyonectria*, bem como *Phomopsis* spp.), os quais podem estar associados à doença (ou não). Os mecanismos de interação existentes entre estes fungos encontram-se ainda mal esclarecidos (Graniti *et al.*, 2000; Fisher e Kassemeyer, 2003; Bruez *et al.*, 2016).

Estudos realizados em videira, indicam que *Pm. minimum* e *Pa. chlamydospora* compartilham o mesmo nicho ecológico, atuando sinergicamente, em que *Pa. chlamydospora* secretará toxinas que reduzem as defesas da planta, favorecendo a atividade de *Pm. minimum* (Luini *et al.*, 2010; Magnin-Robert *et al.*, 2014; Pierron *et al.*, 2016). Dados genómicos recentes revelam que *Pa. chlamydospora*

e *Pm. minimum* possuem baixa virulência, quando comparados com outros fungos patogênicos, sugerindo que eles possam interagir com outros fungos associados ao lenho da videira (Pierron *et al.*, 2016).

As interações que se estabelecem entre fungos constituem uma componente importante na ecologia dos fungos, os quais vivem em comunidades complexas, e na maioria das vezes competindo entre si, entre outros, por espaço e recursos disponíveis (Arfi *et al.*, 2013). Essas interações desempenham um papel importante no desenvolvimento, na composição e na sucessão da comunidade fúngica nos processos de degradação da madeira (Boddy, 2000; Arfi *et al.*, 2013), as quais são igualmente afetadas por fatores bióticos e abióticos (Hiscox *et al.*, 2016). Uma tão grande complexidade de fatores envolvidos dificulta o estudo desses fatores, sendo que o modelo *in vitro*, por introduzir simplificação de parâmetros, pode revelar-se útil para estudos preliminares.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as interações entre os principais fungos responsáveis pela doença de Petri e pelo pé negro da videira, no seu conjunto responsáveis pelo declínio de videiras jovens, bem como as interações entre fungos envolvidos na “esca” da videira.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados e condições de cultura

Os fungos do lenho da videira usados no presente estudo encontravam-se conservados em micoteca, no Laboratório Patologia Vegetal (DCEB/ISA), em tubos contendo PDA (Gelose de Batata Dextrosada, BD-Difco), à temperatura de 4 °C, na obscuridade. Estudaram-se no total cinco fungos: *Dactylonectria macrodydima* (CBS 112615), *Ilyonectria liriodendri* (Cy68=CBS 117526), *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoacremonium (Pm.) minimum* e *Phaeoconiella (Pa.) chlamydospora* (CBS 161.90). Os isolados com acrônimo CBS integram a coleção de fungos do CBS-KNAW, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Holanda. Todos os ensaios foram realizados em placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de PDA, e incubadas à temperatura de 25 °C, na obscuridade. Para obtenção dos pré-inóculos,

cada um dos fungos foi cultivado, nas condições descritas, durante períodos de incubação variáveis, consoante a taxa de crescimento de cada um.

Testes de interação pelo método de culturas pareadas

Retiraram-se discos miceliais (4 mm de diâmetro) de cada um dos isolados, a partir da margem das colônias crescidas como pré-inóculo, que se posicionaram em locais opostos de placas de Petri contendo 15 mL de meio PDA, afastados entre si cerca de 40 mm e 25 mm do bordo da placa (cultura pareada). Nos casos em que se confrontou o crescimento de três fungos, os discos miceliais foram dispostos nos vértices de um triângulo com aproximadamente 40 mm de lado. Após inoculação, as placas foram seladas com Parafilm e incubadas durante 11 dias para os fungos envolvidos no pé negro da videira, *D. macrodydima* e *I. liriodendri*, e até 14 dias, para os fungos responsáveis pelo complexo da esca, *F. mediterranea*, *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum* (Sparapano *et al.*, 2000c).

O crescimento micelial foi avaliado pela medição de dois raios de cada uma das colônias, um em direção à extremidade da placa (r1) e outro em direção ao fungo em confronto (r2). Para cada combinação fungo x fungo foram realizadas 4 repetições. A inibição do crescimento micelial, expressa em percentagem, foi determinada através da fórmula de Fokkema (1973), $I (\%) = (r1-r2)/r1 \times 100$.

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

Os parâmetros avaliados neste ensaio incluíram ainda observação da alteração da coloração das colônias dos isolados e desenvolvimento de linha de confronto vegetativo, entre culturas. Os tipos de interação existentes entre dois isolados foram classificados de acordo com Tuininga (2005) (Quadro 1).

Quadro 1 - Terminologia proposta para interações interespecíficas não-nutritivas entre duas espécies fúngicas, respetivas repostas e exemplos de mecanismos (adaptado de Tuininga, 2005)

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

0, espécie não afetada, +, espécie beneficiada, -, espécie prejudicada pela presença de outra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apurados indicam que os fungos causadores do pé negro da videira, *D. macrodidyma* (CBS 112615) e *I. liriodendri* (Cy68), são favorecidos no seu crescimento micelial pelos fungos *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*, agentes causadores da doença de Petri (Figuras 1, 2 e 3).

Analisando as interações que se estabelecem em cultura pareada, verifica-se que o crescimento micelial de *I. liriodendri* é ligeiramente inibido quando este fungo é confrontado entre si (Figuras 1, A1-A2 e 2), sugerindo uma relação de coantagonismo (redução do crescimento de ambas as culturas), mas é favorecido quando pareado com *D. macrodidyma*. Por sua vez, *Pa. chlamydospora* e, sobretudo, *Pm. minimum* favorecem significativamente o crescimento de *I. liriodendri*. Já o crescimento de *D. macrodidyma* é ligeiramente inibido por *I. liriodendri* (Figuras 1, B1-B2 e 2), indicando um fenómeno de agonismo, em que a redução do crescimento de uma das espécies é acompanhada pelo aumento do crescimento da outra espécie, e no confronto com *D. macrodidyma* (Figura 1, E1-E2), evidenciando neste caso uma interação do tipo coantagonismo. O crescimento de *D. macrodidyma* é significativamente favorecido pela presença de qualquer um dos agentes causadores da doença de Petri, *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum* (Figura 2).

No confronto entre fungos da doença de Petri e do pé negro verifica-se que o crescimento de *Pa. chlamydospora* é significativamente inibido por *I. liriodendri* (Figuras 1, C1-C2 e 3), e ligeiramente inibido por *D. macrodidyma* (Figuras 1, F1- F2 e 3), evidenciado pelo agonismo, enquanto o de *Pm. minimum* é inibido quer pelo isolado de *Ilyonectria* quer pelo de *Dactylonectria*, sugerindo igualmente uma interação do tipo agonismo (Figuras 1, D1- D2, G1- G2 e 3).

Os resultados globais deste ensaio apontam no sentido do favorecimento acentuado e significativo do crescimento dos fungos responsáveis pelo pé negro da videira (*Dactylonectria* sp. e *Ilyonectria* sp.), quando presentes os agentes da doença de Petri.

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

As relações entre os fungos causadores da “esca” da videira são complexas e estão ainda mal esclarecidas. Quando o basidiomiceta *F. mediterranea* é confrontado entre si, em cultura pareada,

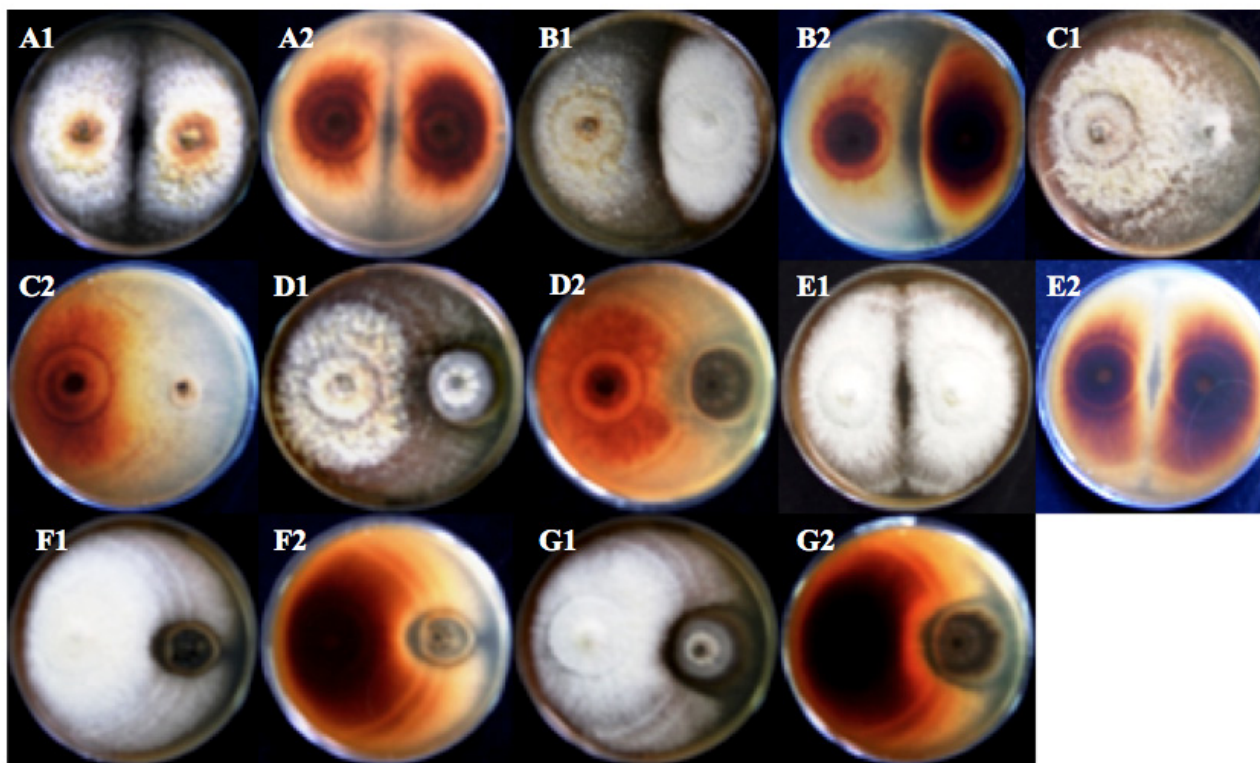


Figura 1 - Aspecto cultural das interações entre fungos do pé negro da videira e da doença de Petri: A1 (frente) - A2 (verso), *Ilyonectria liriodendri* x *I. liriodendri*; B1 (frente) - B2 (verso), *I. liriodendri* x *Dactylonectria macrodidyma*; C1 (frente) - C2 (verso), *I. liriodendri* x *Phaeoconiella chlamyospora*; D1 (frente) - D2 (verso), *I. liriodendri* x *Phaeoacremonium minimum*; E1 (frente) - E2 (verso), *D. macrodidyma* x *D. macrodidyma*; F1 (frente) - F2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pa. chlamyospora*; G1 (frente) - G2 (verso), *D. macrodidyma* x *Pm. minimum*.

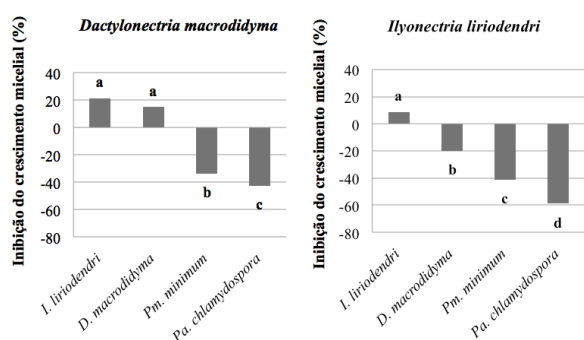


Figura 2 - Inibição do crescimento micelial de *Dactylonectria macrodidyma* e *Ilyonectria liriodendri*, em cultura pareada. Cada um dos fungos foi confrontado com ele mesmo, com outra espécie causadora de pé negro e com fungos responsáveis pela doença de Petri, *Phaeoconiella chlamyospora* e *Phaeoacremonium minimum*. As culturas cresceram durante 11 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade à temperatura de 25 °C. Letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

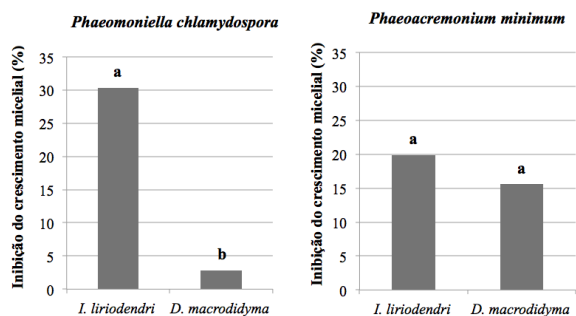


Figura 3 - Inibição do crescimento micelial de *Phaeoconiella chlamyospora* e *Phaeoacremonium minimum*, em cultura pareada com *Ilyonectria liriodendri* e *Dactylonectria macrodidyma*, decorridos 11 dias de incubação em meio de cultura PDA, na obscuridade, à temperatura de 25 °C. Para cada um dos fungos, letras diferentes a afetar cada uma das colunas representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

verifica-se uma ligeira inibição do crescimento de uma das colónias (Figura 4, A1-A2 e 5), o mesmo não se verificando na segunda colónia.

Por sua vez, quando se analisa o crescimento micelial de *F. mediterranea*, face a outros fungos envolvidos na “esca”, verifica-se que *Pm. minimum* e *Pa. chlamydospora* estimulam o crescimento do basidiomiceta, com efeito mais significativo de *Pa. chlamydospora*, evidenciando um fenómeno de agonismo (Figura 5). Ainda assim, tal como se pode observar na Figura 4 (B1-B2), a margem da colónia de *F. mediterranea* é abruptamente interrompida na proximidade de *Pm. minimum*, formando-se uma barreira espessa de cor castanha que impede o posterior crescimento de *F. mediterranea*, indicando um fenómeno de antagonismo exercido por *Pm. minimum*, em relação a *F. mediterranea*.

Naquele confronto verifica-se a alteração da cor da colónia de *Pm. minimum* (face superior da colónia) e de *F. mediterranea* (face inferior da colónia), provavelmente devido à produção de pigmentos e outros metabolitos. Na interação *F. mediterranea* x *Pa. chlamydospora* (Figura 4, C1-C2), verifica-se um fenómeno oposto, uma vez que a colónia do primeiro fungo consegue crescer sobre *Pa. chlamydospora*.

Quando *Pm. minimum* é confrontado com ele próprio, há uma ligeira inibição do seu crescimento (coantagonismo), tal como no confronto com *F. mediterranea* (Figuras 4, D1-D2 e 5), sugerindo uma interação de antagonismo. Já no confronto com *Pa. chlamydospora* verifica-se favorecimento significativo do crescimento de *Pm. minimum*, indicando um fenómeno de agonismo (Figuras 4, E1-E2 e 5). Neste confronto, a cor da colónia de *Pm. minimum* sofre alterações, que são visíveis na face superior e inferior da mesma.

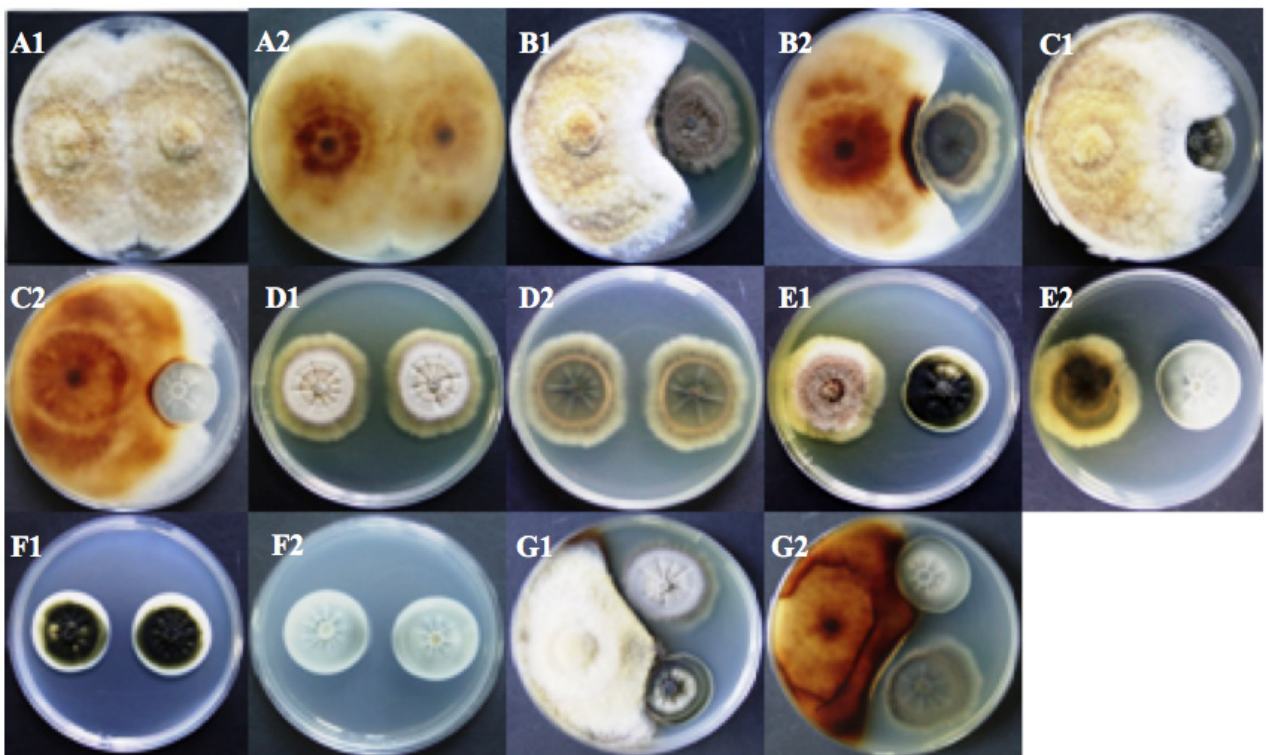


Figura 4 - Aspeto cultural das interações entre fungos do complexo da esca: A1 (frente) - A2 (verso), *Fomitiporia mediterranea* x *F. mediterranea*; B1 (frente) - B2 (verso), *F. mediterranea* x *Phaeoacremonium minimum*; C1 (frente) - C2 (verso), *F. mediterranea* x *Phaeomoniella chlamydospora*; D1 (frente) - D2 (verso), *Pm. minimum* x *Pm. minimum*; E1 (frente) - E2 (verso), *Pm. minimum* x *Pa. chlamydospora*; F1 (frente) - F2 (verso), *Pa. chlamydospora* x *Pa. chlamydospora*; G1 (frente) - G2 (verso), *F. mediterranea* x *Pm. minimum* x *Pa. chlamydospora*.

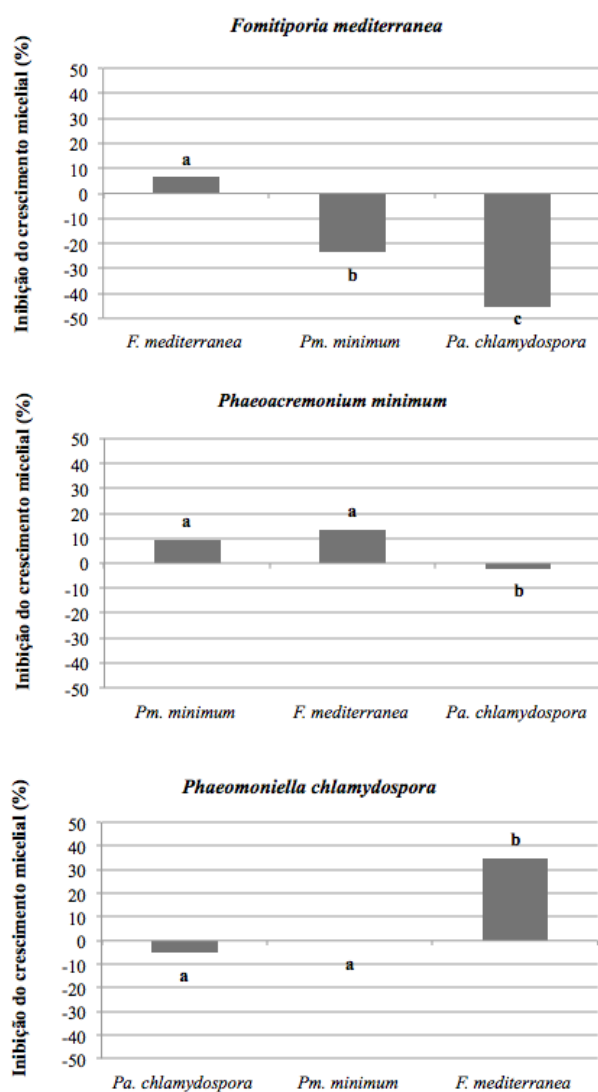


Figura 5 - Inibição do crescimento micelial dos fungos *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoacremonium minimum* e *Phaeomoniella chlamydospora*, quando confrontados entre si. Crescimento ao fim de 14 dias em meio de cultura PDA, na obscuridade, à temperatura de 25 °C. Letras diferentes representam diferenças significativas para $\alpha=0,05$ (teste de Tukey).

O fungo *Pa. chlamydospora*, no confronto com ele próprio ou com *Pm. minimum*, expressa um aumento pouco significativo de crescimento, mas uma situação oposta é observada no confronto com *F. mediterranea*, que origina inibição significativa do crescimento de *Pa. chlamydospora* (Figuras 4, F1-F2 e 5). A alteração da cor da colônia de *Pa.*

chlamydospora (face superior), e de *F. mediterranea* (face inferior), assim como a formação da linha de confronto levemente acastanhada em torno de *Pa. chlamydospora* são visíveis, e podem ser resultantes das alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante as interações.

Os resultados obtidos são dificilmente comparáveis aos de outros autores, pois a literatura existente sobre o assunto é escassa. Ainda assim, Sparapano *et al.* (2000b, 2001) verificaram relações de agonismo entre *Pa. chlamydospora* x *Pm. minimum*, bem como agonismo inicial na interação *F. mediterranea* x *Pa. chlamydospora*, seguido de crescimento de *F. mediterranea* sobre o segundo fungo. Também verificaram o efeito antagonista de *Pm. minimum* sobre *Fomitiporia*, idêntico ao observado no presente estudo.

Quando se confrontam em simultâneo os três principais fungos envolvidos na "esca", *F. mediterranea*, *Pm. minimum* e *Pa. chlamydospora* (Figura 4, G1-G2) observa-se novamente o efeito antagonista de *Pm. minimum* sobre *F. mediterranea* e, aparentemente, tal como observado por Sparapano *et al.* (2000b), este efeito parece estar a prevenir que o micélio de *Fomitiporia* se sobreponha ao de *Pa. chlamydospora*.

Sparapano *et al.* (2000b, 2001) apontam como mecanismos de ação a competição pelos nutrientes e a antibiose em resultado da produção de metabolitos secundários por *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*.

Por sua vez, as alterações morfológicas observadas em culturas pareadas são usuais e explicadas com base, entre outras, nas alterações sofridas pelo micélio de cada um dos fungos, na composição química dos metabolitos secundários produzidos e na síntese de compostos relacionados com o stresse (Boddy, 2000; Boddy *et al.*, 2008; Arfi *et al.*, 2013). Também o mecanismo de antibiose e a competição pelos nutrientes e espaço conduzem, em geral, a alterações morfológicas na zona frontal da interação entre colônias de fungos (Hiscox *et al.*, 2010; Arfi *et al.*, 2013).

A verificação destes resultados *in planta* impõe-se, para que conclusões mais robustas possam ser extraídas. Apesar deste constrangimento, o presente estudo sugere o favorecimento significativo do crescimento micelial dos agentes causais

do pé negro da videira, *I. liriodendri* e *D. macrodyma*, quando em presença dos agentes causais da doença de Petri, *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*, o que pode explicar uma intensificação da severidade do pé negro na presença de *Pa. chlamydospora* e/ou *Pm. minimum*, por exemplo em vinhas jovens com sintomas de declínio. O isolamento simultâneo dos agentes causais daquelas duas doenças em Portugal é muito frequente (Rego *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004) e os efeitos resultantes não serão exatamente aditivos.

No caso da “esca” da videira, a sucessão de fungos que coloniza o lenho da videira está ainda por determinar com rigor. A maioria dos autores sugere que os fungos *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum* (e outros, *Phaeoacremonium* spp., Botryosphaeriaceae e *Eutypa* spp.) poderão atuar como agentes primários da degradação do lenho, a que se seguirá a invasão por fungos de degradação secundária da madeira, como é o caso de *F. mediterranea* e de outros basidiomicetas (Larignon e Dubos, 1997). No entanto, fungos do género *Fomitiporia* também têm sido referidos como causadores de “white-rot”, mesmo na ausência dos fungos precursores, *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum* (Sparapano *et al.*, 2000a), mas a hipótese de leveduras e bactérias não identificadas desempenharem um papel neste processo não

pode ser descartada (Bruez *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2012; Choueiri *et al.*, 2014).

Trabalhos futuros deverão aprofundar os mecanismos de interação que se estabelecem não só entre os fungos estudados, mas sobretudo na sua interação com a planta, uma vez que as condições *in vitro* nem sempre reproduzem com exatidão os resultados obtidos em hospedeiro/substrato natural (Baptista *et al.*, 2011).

CONCLUSÕES

Os fungos do género *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, agentes causais do pé negro da videira são significativamente favorecidos pela presença de *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum*, responsáveis pela síndrome vascular da “esca”, necrose estriada em materiais de propagação vegetativa de videira e doença de Petri em videiras jovens. Por sua vez, estes últimos fungos, quando interagem entre si e com *F. mediterranea* revelam relações complexas, em que numa primeira fase *Pa. chlamydospora* e *Pm. minimum* exercem efeito agonista sobre *F. mediterranea* e, mais tarde, *Pm. minimum* comporta-se como antagonista de *F. mediterranea*, o que não acontece com *Pa. chlamydospora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustí-Brisach, C. & Armengol, J. (2013) – Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 52, n. 2, p. 245-261. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-12662
- Agustí-Brisach, C.; Gramaje, D.; Jiménez, J.-G. & Armengol, J. (2013) – Detection of black-foot disease pathogens in the grapevine nursery propagation process in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 137, n. 1, p. 103-112. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0221-8>
- Andolfi, A.; Mugnai, L.; Luque, J.; Surico, G.; Cimmino, A. & Evidente, A. (2011) – Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*, vol. 3, n. 12, p. 1569-1605. <https://doi.org/10.3390/toxins3121569>
- Arfi, Y.; Levasseur, A. & Recorda, E. (2013) – Differential gene expression in *Pycnoporus coccineus* during interspecific mycelial interactions with different competitors. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, n. 21, p. 6626-6636. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02316-13>
- Baptista, P.; Pereira, E.; Tavares, R. & Lino-Neto, T. (2011) – A importância das interações entre fungos do solo em agroecologia. *Actas do Workshop em Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Bragança, Portugal, 24 Março 2011, p. 159-174.
- Bertsch, C.; Ramírez-Sueroa, M.; Magnin-Robert, M.-M.; Larignon, P.; Chonga, J.; Abou-Mansour, E.; Spagnolo, A.; Clément, C. & Fontaine, F. (2012) – Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, vol. 62, n. 2, p. 243-265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>

- Boddy, L. (2000) – Interspecific combative interactions between wood decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 31, n. 3, p. 185-194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x>
- Boddy, L.; Frankland, J.C. & Van West, P. (eds) (2008) – *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Elsevier, Amsterdam.
- 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*, vol. 22, n. 2, p. 288-295. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12209>
- Bruetz E.; Vallance J.; Gerbore J.; Lecomte P.; Guérin-Dubrana L. & Rey P. (2012) – Endophytic microflora of woody tissue of healthy and trunk diseased-grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 51, n.2, p. 414-415. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11353
- Cabral, A.C.G.P. (2011) – *New insights in Ilyonectria black foot disease of grapevine*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Agronómica, ISA, UTL, Lisboa, 255 pp.
- Cabral A.; Groenewald, J.Z.; Rego, C.; Oliveira, H. & Crous, P.W. (2012a) – *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycological Progress*, vol. 11, n. 3, p. 655-688. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- Cabral, A.; Rego, C.; Nascimento, T.; Oliveira, H.; Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2012b) – Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, vol. 116, n. 1, p. 62-80. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.010>
- Choueiri, E.; Jreijiri, F.; Chlela, P.; Mayet, V.; Comont, G.; Liminana, J.-M.; Mostert, L.; Fischer, M. & Lecomte, P. (2014) – Fungal community associated with grapevine wood lesions in Lebanon. *OENO One*, vol. 48, n. 4, p. 293-302. <https://doi.org/10.20870/oenone.2014.48.4.1696>
- Fischer, M. (2006) – Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine : a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 45, n. sup., p. S30–S42. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1846
- Fischer, M. & Kassemeyer, H.H. (2003) – Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, vol. 42, n. 3, p. 109-116.
- Fokkema, N.J. (1973) – The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, vol. 3, n. 2, p. 195-202. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(73\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90082-9)
- Gramaje, D. (2016) – Uso de la termoterapia con agua caliente para el control de las enfermedades fúngicas de la madera de la vid. *Vida Rural*, n. 3, p. 48-57.
- Gramaje, D. & Armengol, J. (2011) – Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: Potential inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant Disease*, vol. 95, n. 9, p. 1040-1055. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0025>
- Graniti, A.; Surico, G. & Mugnai, L. (2000) – Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1, p. 16-20. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1539
- Gubler, W.D.; Rolshausen, P.E.; Trouillase, F.P.; Úrbez-Torres, J.R. & Voegel, T. (2005) – Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery & Vineyard*, p. 1-9.
- Halleen, F.; Fourie, P.H. & Crous, P.W. (2006) – A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 45, n. sup., p. S55-S67. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1845
- Halleen, F.; Mostert, L. & Crous, P.W. (2007) – Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, vol. 36, n. 3, p. 277-285. <https://doi.org/10.1071/AP07019>
- Halleen, F.; Schroers, H.; Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2004) – Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*, vol. 50, p. 431-455
- Hiscox, J.; Baldrian, P.; Rogers, H.J. & Boddy, L. (2010) – Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, vol. 47, n. 6, p. 562-571. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.007>
- Hiscox, J.; Clarkson, G.; Savoury, M.; Powell, G.; Savva, I.; Lloyd, M.; Shipcott, J.; Choimes, A.; Cumbriu, X.A. & Boddy, L. (2016) – Effects of pre-colonisation and temperature on interspecific fungal interactions in wood. *Fungal Ecology*, vol. 21, p. 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.011>

- Hofstetter, V.; Bart, B.; Croll, D.; Viret, O.; Couloux, A. & Gindro, K. (2012) – What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*, vol. 54, n. 1, p. 51-67. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
- Larignon, P. & Dubos, B. (1997) – Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 103, n. 2, p. 147-157. <https://doi.org/10.1023/A:1008638409410>
- Luini, E.; Fleurat-Lessard, P.; Rousseau, L.; Roblin, G. & Berjeaud, J.-M. (2010) – Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 74, n. 5-6, p. 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.06.007>
- Magnin-Robert, M.; Spagnolo, A.; Alayi, T. D.; Cilindre, C.; Mercier, L.; Schaeffer-Reiss, C.; Van Dorselaer, A.; Clément, C. & Fontaine, F. (2014) – Proteomic insights into changes in grapevine wood in response to esca proper and apoplexy. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 53, n. 1, p. 168-187. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-12913
- Mugnai, L.; Graniti, A. & Surico, G. (1999) – Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, vol. 83, n. 5, p. 404-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404>
- Oliveira, H.; Rego, C. & Nascimento, T. (2004) – Decline of young grapevine caused by fungi. *Acta Horticulturae*, vol. 652, p. 295-304. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.652.37>
- Pierron, R.J.G.; Pouzoulet, J.; Couderc, C.; Judic, E.; Compant, S. & Jacques, A. (2016) – Variations in early response of grapevine wood depending on wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, art. 268. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00268>
- Rego, C. (2004) – *Estudo e caracterização de fungos do género Cyindrocarpon (Neonectria) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal*. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal “Verissimo de Almeida” – Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa, 228 pp.
- Rego, C.; Oliveira, H.; Carvalho, A. & Phillips, A. (2000) – Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1, p. 76-79. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1546
- Rego, C.; Oliveira, H. & Sofia, J. (2012) – Principais doenças parasitárias da videira. In *Manual Bayovitis: a fitossanidade da videira*, pp. 58-71.
- Scheck, H.J.; Vasquez, S.J.; Fogle, D. & Gubler, W.D. (1998) – Grape growers report losses to black foot and grapevine decline. *California Agriculture*, vol. 52, n. 4, p. 19-23. <https://doi.org/10.3733/ca.v052n04p19>
- Sparapano, L.; Bruno, G. & Graniti, A. (2000a) – Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1 p. 46-52. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1542
- Sparapano, L.; Bruno, G. & Graniti, A. (2000b) – Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interactions among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1, p. 53-58. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1543
- Sparapano, L.; Bruno, G. & Graniti, A. (2000c) – Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 39, n. 1, p. 169-177. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1535
- Sparapano, L.; Bruno, G. & Campanella, A. (2001) – Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 40, n. sup., p. S417–S422. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1626
- Surico, G. (2009) – Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 48, n. 1, p. 5-10. http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2870
- Tuininga, A. R. (2005) – Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. In: Dighton, J.; Oudemans, P. & White, J. (Eds.) – *The Fungal Community, Its Organization and Role in the Ecosystem*, 3rd ed. CRC Press, New York, pp. 265-283.
- Úrbez-Torres, J.R.; Haag, P.; Bowen, P. & O’Gorman, D.T. (2014) – Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. *Plant Disease*, vol. 98, n. 4, p. 469-482. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0523-RE>