

Avaliação do potencial de controlo das podridões da castanha por agentes biológicos

Isadora Agostini

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla
diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Azevedo Rodrigues
Prof^a. Dr^a Rosângela Dallemole Giaretta

Bragança
2022

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto GNOMOCASTROT - Chestnut brown rot disease and the causal agent *Gnomoniopsis castanea*: post-harvest control strategies (CMFPE3; EXPL2021CIMO_02), financiado Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal)/MCTES (CIMO; UIDB/00690/2020)

Dedico este trabalho com muito carinho e gratidão a minha mãe, Deane

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e sua infinita bondade, pelo dom da vida, e pelas infinitas bênçãos que me foram concebidas.

Este trabalho é fruto da parceria entre as duas instituições idealizadoras, as quais ofereceram a oportunidade e proporcionaram os recursos para a realização. Agradeço ao Instituto Politécnico de Bragança-IPB, por todo o conhecimento e crescimento pessoal adquirido neste período. Aos laboratórios de biologia e microbiologia da Escola Superior Agrária, e as técnicas do laboratório pela disponibilização de materiais e instrumentos durante a realização do trabalho. Agradeço especialmente a minha orientadora, Prof^a. Dr^a Paula Cristina Azevedo Rodrigues, por toda a orientação e incentivo, me auxiliando e acreditando no desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a Universidade Tecnológica do Paraná- UTFPR, pela grande oportunidade de realizar o programa de dupla diplomação fora do Brasil, e aos professores que acreditaram no meu potencial, e me incentivaram durante toda a jornada acadêmica, especialmente a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Rosangela Dallemole Giaretta.

Agradeço à Doutora Micaela Álvarez e ao Doutor Josué Delgado, da *Universidad de Extremadura*, Cáceres, Espanha, pelo desenvolvimento da análise proteômica, e ao Doutor Michael Sulyok, da *University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU)*, Viena, Áustria, pelo desenvolvimento da análise metabólica.

Aos amigos de longa data, que se fizeram presente mesmo com a distância. Aos meus colegas da UTFPR e do IPB. Também sou grata a todos os amigos que participaram deste período em Portugal junto comigo, Dalila, Juliana, Leonardo, Maíra, Fernando e outros. Obrigada pela amizade e por todas as memórias, levarei vocês para toda a vida no coração com muito carinho.

Agradeço a minha colega de graduação Mariah, a qual tive a oportunidade de dividir este momento que tanto sonhamos desde o início da faculdade. Juntamente com minhas amigas Ana Carolina e Jaqueline, dividimos a casa, os momentos inesquecíveis, mas também os difíceis, fazendo com que nos tornássemos irmãs. Obrigada por serem minha família em Bragança.

Agradeço com amor, ao meu namorado Lucas, por todos os momentos especiais ao meu lado, por toda a paciência, carinho e companheirismo durante este período. Obrigada

por ter sonhado junto comigo e estar presente em minhas conquistas.

Meu sincero agradecimento a toda minha família. Especialmente a minha avó Dorvalina, por todas as orações, carinho, e palavras de incentivo.

Sou eternamente grata a minha mãe Deane, por ser meu alicerce, me dar forças nos momentos mais difíceis, sempre acreditando que eu conseguiria. Palavras não expressam meu amor e admiração, você é a maior inspiração da minha vida, te amo infinitamente. Agradeço também ao meu padrasto Mikael, por todo apoio emocional e incentivo. Amo vocês e sou grata por tudo o que fazem por mim.

Por fim, agradeço àqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram na idealização deste trabalho.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Organização da tese.....	2
2 REVISÃO BILIOGRÁFICA	3
2.1 O Castanheiro.....	3
2.1.1 Origem e importância em Portugal e na Europa.	3
2.1.2 Distribuição geográfica e importância económica em Portugal.....	4
2.2 Morfologia do Castanheiro Europeu (<i>Castanea sativa</i>).....	6
2.3 Problemas pós-colheita	7
2.3.1 Fungos e podridões.....	8
2.4 Podridão da castanha causada por <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	9
2.4.1 Biologia do patógeno e sintomatologia da doença.....	10
2.5 Métodos de controlo de doenças pós-colheita.....	12
2.5.1 Métodos clássicos.....	12
2.5.2. Métodos biológicos de controlo	13
3 METODOLOGIA	15
3.1 Materiais e Métodos	15
3.1.1 Preparação dos meios de cultura	15
3.1.2 Material biológico	15
3.2 Ensaio preliminar de inibição com produtos comerciais.....	16
3.2.1 Produtos comerciais testados	16
3.2.2 Preparação dos inóculos	17
3.2.3 Preparação e inoculação das placas de Petri	18
3.3 Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais	19
3.4 Avaliação do potencial de controlo dos agentes biológicos Serenade®ASO e BCA1 contra <i>G. smithogilvyi</i>	21
3.4.1 Identificação do agente de biocontrolo BCA1	22
3.4.2 Desenho experimental	22
3.4.3 Medição do halo de inibição	23

3.4.4	Análise de metabolitos secundários por LC-MS/MS	23
3.4.5	Análise comparativa de proteínas.....	24
3.4.6	Análise estatística.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Ensaio preliminar de inibição com produtos comerciais.....	25
4.2	Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais	29
4.3	Avaliação do potencial de controlo dos agentes biológicos Serenade® ASO e BCA1 contra <i>G. smithogilvyi</i>	33
4.3.1	Crescimento do fungo	33
4.3.2	Análise metabolómica	39
5	CONCLUSÕES	48
6	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	55

RESUMO

Após a colheita da castanha (*Castanea sativa* Mill.), a maior preocupação das unidades de processamento é o controlo de agentes de deterioração, incluindo os fungos causadores de podridões. Atualmente, o fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi*, agente causal da podridão castanha, tornou-se o principal causador de perdas de castanha em toda a Europa. Os objetivos deste trabalho foram: i) Analisar *in vitro* a atividade de um biofungicida comercial e de bactérias isoladas em laboratório no controlo dos agentes causais das podridões da castanha, em particular *G. smithogilvyi*; ii) Identificar a(s) bactéria(s) com potencial de controlo; iii) Estudar o modo de ação dos agentes selecionados contra *G. smithogilvyi*. Para tal, foram testados como potenciais agentes de controlo os produtos comerciais Serenade® ASO (*Bacillus amyloliquefaciens*) e Codasil® (solução de silício), e três isolados bacterianos. Como controlo positivo foi usado o fungicida Horizon® (Tebuconazol). Verificou-se que Serenade® ASO, Horizon® e a bactéria BCA1 tiveram efeito de controlo contra *G. smithogilvyi*, *Trichoderma viridescens*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium expansum*, *Mucor racemosus* e *Ciboria batschiana*. Codasil® estimulou o crescimento dos fungos. A bactéria BCA1 foi selecionada como potencial agente de biocontrolo, e foi identificada por métodos moleculares como *B. amyloliquefaciens*. Foram observados nos resultados do halo de inibição, que o agente químico Horizon® apresentou maior inibição do fungo que os tratamentos com agentes de controlo biológico (Serenade® ASO e BCA1). Porém os agentes biológicos causaram um desenvolvimento celular do fungo diferente quando comparado aos outros tratamentos. Na análise metabolómica, foi detectada a presença de Diplodiatoxina, uma toxina que em grandes quantidades causa problemas para saúde do consumidor. Este estudo é o primeiro, a associar o fungo *G. smithogilvyi* à produção desta importante toxina, o que permite concluir que o patógeno, não é só responsável por elevadas perdas na produção de castanha, como também põe em risco a saúde e a segurança do consumo de castanhas contaminadas. Sendo assim, o estudo do uso e identificação de agentes biológicos que controlem a podridão da castanha causada por *G. smithogilvyi*, bem como avaliação e aplicação do uso em armazenamento de pós colheita devem ser avaliados, a fim de proporcionar alternativas biológicas eficazes de controle deste fungo.

Palavras-chave: Podridões pós colheita. Podridão castanha. *Gnomoniopsis smithogilvyi*. Biocontrolo.

ABSTRACT

After the chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is harvested, the main concern of the processing units is the control of spoilage agents, including rot-causing fungi. Currently, the fungus *Gnomoniopsis smithogilvyi*, the causal agent of chestnut brown rot, has become the main cause of chestnut losses throughout Europe. The objectives of this work were: i) To analyze *in vitro* the activity of a commercial biofungicide and bacteria isolated in the laboratory in the control of the causal agents of chestnut rot, in particular, *G. smithogilvyi*; ii) Identify the bacterium(a) with potential control; iii) Study the mode of action of selected agents against *G. smithogilvyi*. For this, the commercial products Serenade® ASO (*Bacillus amyloliquefaciens*) and Codasil® (silicon solution) and three bacterial isolates were tested as potential control agents. As a positive control, the fungicide Horizon® (Tebuconazole) was used. Serenade® ASO, Horizon®, and the bacterium BCA1 were found to have a controlling effect against *G. smithogilvyi*, *Trichoderma viridescens*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium expansum*, *Mucor racemosus* and *Ciboria batschiana*. Codasil® stimulated fungal growth. The BCA1 bacterium was selected as a potential biocontrol agent and was identified by molecular methods as *B. amyloloquefaciens*. It was observed in the inhibition halo results that the chemical agent Horizon® showed greater inhibition of the fungus than treatments with biological control agents (Serenade® ASO and BCA1). However, the biological agents caused a different cellular development of the fungus when compared to the other treatments. The metabolomic analysis, was detected, a presence of Diplodiatoxin, a toxin that in large quantities causes problems for consumer health. This study is the first to associate the fungus *G. smithogilvyi* with the production of this important toxin, which allows us to conclude that the pathogen is not only responsible for high losses in chestnut production, but also puts health and safety at risk to the consumption of contaminated nuts. Therefore, the study of the use and identification of biological agents that control the brown rot caused by *G. smithogilvyi*, as well as the evaluation and application of the use in post-harvest storage should be evaluated, in order to provide effective biological alternatives to control this disease. fungus.

Keywords: Post-harvest rot. Brown rot. *Gnomoniopsis smithogilvyi*. Biocontrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Denominações de Origem Protegida em Portugal.....	5
Figura 2 - Flores masculinas (amentilhos) e femininas (ouriços), ainda imaturos.....	6
Figura 3 – Ouriço e fruto maduros.....	7
Figura 4 - Sintoma de podridão castanha no fruto, causada por <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	11
Figura 5 - Diagrama demonstrativo da inoculação dos fungos com cada um dos agentes teste em diferentes concentrações dos produtos comerciais. As concentrações C1 e C3 representam as concentrações mínima e máxima recomendadas pelo fabricante para utilização. A concentração C2 representa a concentração média recomendada.....	18
Figura 6 - Realização das inoculações.....	19
Figura 7 - Diagrama demonstrativo das inoculações pelo método de confrontação.....	21
Figura 8 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> P10/5-10.....	26
Figura 9 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra <i>Gnomoniopsis smithogilvy</i> UTAD 20.....	26
Figura 10 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra <i>Ciboria batschiana</i> P10/2-11.....	27
Figura 11 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais contra <i>Mucor racemosus</i> P9/1-15.....	27
Figura 12 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais contra <i>Trichoderma viridescens</i> P8/4-6.....	28
Figura 13 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra <i>Penicillium brevicompactum</i> P6/1-5.....	29
Figura 14 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra <i>Penicillium expansum</i> P2/3-3.....	29
Figura 15 - Teste de inibição com agentes biológicos não comerciais contra <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> UTAD3.....	30
Figura 16 – Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> UTAD20.....	31
Figura 17 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra <i>Trichoderma viridescens</i> P8/4-6.....	32
Figura 18 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra <i>Penicillium expansum</i> P2/3-3.....	32
Figura 19 - Teste de confirmação do efeito de inibição dos agentes BCA1, Serenade®ASO e Horizon® contra o fungo <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> . A) isolado UTAD 3; B) isolado UTAD20.....	33
Figura 20 – Teste de inibição dos agentes Horizon®, Serenade® ASO, e BCA1 contra <i>G. smithogilvyi</i> UTAD 20.....	34
Figura 21 - Média do halo de inibição entre o fungo <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> UTAD20, e cada tratamento, ao fim dos 8 dias.....	35
Figura 22 - Observação à lupa do fungo <i>G. smithogilvyi</i> UTAD 20 (controlo). A barra negra representa 250 µm.....	35
Figura 23 - Observação à lupa da zona de contacto entre Horizon® e <i>G. smithogilvyi</i> UTAD20.....	

(1) Micélio; (2) bolsa de esporos. A barra negra representa 500 µm.....	36
Figura 24 - Observação à lupa da zona de contacto entre Serenade® ASO e <i>G. smithogilvyi</i> UTAD 20 com menor (1) e maior (2) ampliação. A barra negra representa 250 µm.	36
Figura 25 - Observação à lupa da zona de contacto entre BCA1 e <i>G. smithogilvyi</i> UTAD20. (1) zona de contacto; (2) micélio. A barra negra representa 500 µm.....	37
Figura 26 - Fotografia de microscopio contendo micélio do fungo <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> do tratamento em branco, e micelio da zona de contacto entre o fungo e os tratamentos Horizon, Serenade ASO e BCA1 em ampliação de 100X e escala de 500µm.....	38
Figura 27 - Média concentração de Brevianamida F (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p>0.05$).	40
Figura 28 – Média concentração de Cyclo(L-Pro-L-Tyr) em (ng/g) em cada tratamento.	41
Figura 29 - Média concentração de Cyclo(L-Pro-L-Val) em (ng/g) em cada tratamento.....	42
Figura 30 - Média concentração de Ácido kójico em (ng/g) em cada tratamento.	43
Figura 31 - Média concentração de Diplodiatoxina em (ng/g) em cada tratamento.	44
Figura 32 - Média concentração de Ácido 3-nitopropiónico em (ng/g) em cada tratamento.....	46
Figura 33 - Média concentração de Integracina A em (ng/g) em cada tratamento.	47
Figura 34 - Média concentração de Integracina B em (ng/g) em cada tratamento.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos utilizados no presente estudo.	16
Tabela 2 - Concentrações de cada produto comercial utilizado.	17

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

O castanheiro Europeu (*Castanea sativa* Mill.), é uma espécie de elevada importância cultural e econômica em Portugal, principalmente da região transmontana, onde é muito cultivado. Comumente, após a colheita, a castanha é vendida a empresas de comercialização e distribuição, onde os frutos passam por processos de limpeza, desinfecção e calibração, a fim de se manterem adequadas, para o consumo *in natura*.

Porém devido ao seu alto teor de humidade, proteínas e minerais, a castanha armazenada torna-se altamente suscetível ao aparecimento de podridões, estas provocadas por diversos fungos, os quais podem comprometer o lote de castanha, por causarem perdas significativas na qualidade dos frutos, reduzindo o rendimento dos produtores e empresas de comercialização. Além disto, as condições de armazenamento inadequadas como: temperaturas muito elevadas, falta de arejamento e ventilação, e excesso de humidade, também favorecem a ocorrência de deteriorações (Gonçalves et al., 2010).

Atualmente um patógeno emergente, que provoca a doença da podridão castanha no fruto do castanheiro, está levando a perdas pós-colheita significativas. O causador deste problema foi identificado e descrito como *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Shuttelworth et al., 2012), syn. *Gnomoniopsis castanea* (Visentin et al., 2012), e atualmente é considerado o principal e mais preocupante agente causal de podridões na cultura da castanha em diversos países do mundo (Lione et al., 2019), incluindo Portugal. Estudos anteriores demonstraram que o fungo está presente nas castanhas portuguesas (Driss, 2019), e que os isolados portugueses deste fungo são altamente agressivos e adaptados a uma elevada gama de temperaturas (Possamai, 2020), podendo pôr em causa a produção de castanha nacional.

Este fungo provoca um efeito massivo na perda de produção de castanha na fase de pós-colheita devido à sua agressividade e rápida disseminação geográfica, o que leva a necessidade de se encontrar métodos de controlo pós colheita eficazes para conter este fungo em castanhas armazenadas.

Os métodos de controlo químico quando utilizados em pós colheita, podem oferecer perigos à saúde humana. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos de controlo biológicos eficazes é muito importante, tanto para assegurar a maior qualidade da castanha ao consumidor, como diminuir a ocorrência de podridões durante o armazenamento do fruto.

1.2 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- i) i) Avaliar *in vitro* o potencial antifúngico de fungicidas biológicos comerciais e de bactérias isoladas no laboratório no controlo de vários agentes causais de podridões da castanha, com especial ênfase no fungo emergente *Gnomonopsis smithogilvyi*, agente causal da podridão castanha;
- ii) ii) Estudar o modo de ação dos agentes selecionados contra *G. smithogilvyi*, e as interações entre fungo e agente de controlo
- iii) iii) Avaliar o efeito dos agentes selecionados sobre o perfil de metabólitos secundários produzidos por *G. smithogilvyi*.

1.3 Organização da tese

Esta dissertação de mestrado está organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo traz de forma sucinta a introdução do trabalho, que engloba o enquadramento do estudo bem como seus objetivos. No segundo capítulo, encontraremos a revisão bibliográfica, a qual caracteriza a importância da realização deste estudo, neste capítulo vamos encontrar uma breve descrição sobre a planta do castanheiro, suas características e sua importância econômica em Portugal e na Europa, bem como os problemas associados a incidência de podridões após a colheita da castanha, na fase de armazenamento do produto. Também encontramos a caracterização eco fisiológica do fungo *G. smithogilvyi*. No terceiro capítulo está apresentada a metodologia utilizada, o material biológico utilizado e os produtos comerciais. No quarto capítulo encontramos os resultados obtidos nas várias fases do estudo. O quinto capítulo compreende as conclusões finais do estudo, comentários sobre o desfecho da pesquisa, e sugestões para futuros trabalhos, onde possa ser explorado com melhorias os resultados obtidos. No sexto capítulo contém as referências de estudos utilizados para a construção deste presente trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Castanheiro

2.1.1 Origem e importância em Portugal e na Europa.

O castanheiro é uma cultura que possui grande importância não só em Portugal, mas em toda a Europa. Pertence ao género *Castanea* e à família Fagaceae. Este género envolve 13 espécies, as quais estão distribuídas e observadas principalmente nas regiões da Ásia (*Castanea crenata* e *Castanea mollissima*), América do norte (*Castanea dentata*) e Europa (*Castanea sativa*) (Mellano et al., 2012).

Considera-se que este género tenha origem asiática, pois sua maior diversidade genética é observada na China. A espécie *C. sativa*, propriamente descrita como o castanheiro europeu, é originária da Grécia e Sul da Itália (Agusti, 2010).

Castanea crenata e *Castanea mollissima*, castanheiros japonês e chinês respectivamente, produzem castanhas menos doces e aromáticas, comparadas a *C. sativa*, além de serem difíceis no descasque. A madeira também possui qualidade inferior. Em seus centros de origem são plantadas em grandes proporções, porém longe da Ásia seu uso é apenas ornamental, sendo assim, não são as preferidas entre os europeus (Aguiar & Tereso, 2021).

Historicamente o castanheiro sempre foi amplamente utilizado pelos povos antigos, e teve um papel essencial na economia e na alimentação. Além do uso do fruto para consumo, a madeira também era utilizada como material de construção, na fabricação de móveis e utensílios de cozinha, cestaria e tanoaria e também lenha para aquecimento. As folhas também eram utilizadas, pois sua decomposição ocasionava um enriquecimento significativo do solo. Também eram utilizadas na alimentação animal, e até mesmo como fármacos (Laranjo et al., 2007). Nos tempos atuais continua a ser uma das mais importantes fontes de rendimento nas regiões produtoras, principalmente Trás-os-Montes. Além de considerado patrimônio cultural, está presente em áreas de preservação agroflorestais e paisagens naturais (Bounos, 2001).

A castanha está intimamente ligada a interesses culturais, devido ao seu grande apreço e consumo na culinária tradicional Portuguesa. As castanhas podem ser encontradas cruas, secas, ou congeladas, mas geralmente são consumidas assadas, fritas ou cozidas. O seu uso é comum na confeitaria, pastelaria, chocolates, pudins, sobremesas, pães, bolos, e

diversas outras receitas, durante as principais celebrações que ocorrem em todo o país (Tim, 2012).

Estudos destacam as qualidades nutricionais e efeitos de saúde potencialmente valiosos da castanha, pois é um fruto com baixo teor de gordura, rico em vitaminas, sais minerais principalmente fósforo, potássio e ferro, açúcares e vários outros compostos, incluindo os ácidos graxos poli-insaturados como tocoferol e ácido linoleico, oleico e palmítico, relacionados a prevenção de doenças cardiovasculares. Além disso é uma fonte importante de energia, por conta dos elevados teores de amido e hidratos de carbono (Gonçalves et al., 2010, Vasconcelos et al., 2010). Diversos fatores, incluindo condições ambientais, de armazenamento e variação sazonal, podem influenciar a composição nutricional e a qualidade das castanhas. Portanto a avaliação e seleção de qualidade por fatores físicos como cor, forma, e tamanho, são extremamente importantes para aprovação dos consumidores (Barreira et al., 2013).

2.1.2 Distribuição geográfica e importância económica em Portugal

Na Europa de modo geral, o castanheiro se distribui em regiões situadas ao sul, áreas correspondentes a Península Ibérica, Itália, Balcãs e Ilhas mediterrânicas. A maior parte da área ocupada, cerca de 89 %, está concentrada, em ordem decrescente, na França, Itália, Espanha, Portugal e Grécia (Conedera et al., 2016). Em 2020, Portugal foi o terceiro maior país produtor de castanha na Europa (atrás de Espanha e Itália) com produção de 42180 toneladas (cerca de 13% da produção europeia) [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, acessado em 21/06/2022].

Em Portugal encontra-se distribuída em maior densidade principalmente nas áreas da Terra Fria Transmontana e nas Beiras. Essa aptidão se dá pela sua adaptação ecológica a climas temperados e mediterrâneos. As principais regiões produtoras do país se encontram nas serras centrais, serra da Lousã, Açor e Estrela, assim como nas Beiras Baixa e Alta, Minho, Trás-Os-Montes e Alto Douro, e Serra de São Mamede em Portalegre (Capelo & Catry, 2007).

A fim de assegurar a qualidade das castanhas comercializadas, e conservar a diversidade genética, em Portugal foram estabelecidas áreas com Denominação de Origem Protegida (DOP), as quais têm como objetivo valorizar a castanha portuguesa diante dos mercados nacionais e internacionais. A qualidade ou características são determinadas por

de Trás-os-Montes e Alto Douro, onde existe uma maior área de produção de castanha.

2.2 Morfologia do Castanheiro Europeu (*Castanea sativa*)

A espécie *C. sativa* é uma angiosperma dicotiledônea, monoica, e da família das Fagáceas. Considera-se uma árvore de grande porte que pode atingir cerca de 30 metros de altura e ter uma longa vida útil. As folhas são caducas, possuindo copa semiesférica com muitas e resistentes ramificações (Paiva, 2007).

As flores masculinas estão dispostas em amentilhos. As flores masculinas estão presentes em grandes quantidades na axila das folhas inferiores dos rebentos terminais. As flores femininas se situam abaixo das masculinas (**Figura 2**). O fruto se desenvolve dentro de um envoltório espinhoso, conhecido popularmente como ouriço, onde encontram-se de uma a três castanhas, as quais apresentam formato cônico e achatado. Os ouriços atingem sua maturidade durante setembro a novembro, e adquirem uma cor castanha, como observado na **Figura 3** (Paiva, 2007; Agusti, 2010).

O fruto do castanheiro trata-se de um aquénio volumoso, de cor castanha avermelhada, e que possui pericarpo seco e indeiscente. Sendo assim, é um pseudofruto monospermico, pois geralmente é formado a partir do óvulo que foi fecundado primeiramente (Laranjo et al., 2007).



Figura 2 - Flores masculinas (amentilhos) e femininas (ourijos), ainda imaturos (Fonte: Laranjo et al., 2007)



Figura 3 – Ouriço e fruto maduros

(Fonte: Aguiar & Tereso, 2021)

De modo geral é uma árvore que se desenvolve bem em climas temperados, pois tolera temperaturas mais baixas. Necessita de pelo menos 600 mm de chuva por ano. Suas raízes são fortes e profundas, e crescem bem em solos levemente ácidos de pH 5 a 6,5. Um castanheiro produz entre 7 e 65 kg por árvore, e cerca de 500 a 3.000 kg/ha. Para ser considerado um bom castanheiro deve produzir entre 20 e 25 kg por árvore, totalizando 1.500 a 2.500 kg/ha. Além disso, o castanheiro pode ser consorciado com outras espécies de árvores agrícolas e frutíferas (UTAD, 2022).

2.3 Problemas pós-colheita

A produção de castanha pode ser comprometida em diferentes níveis, em decorrência de estresses abióticos, patógenos e pragas, que podem reduzir o rendimento e a qualidade da castanha tanto em pré-colheita como no pós-colheita (Lione et al., 2019).

Em nosso presente século, a história da produção de castanha passou por épocas de crise devido ao impacto de várias doenças. De acordo com a Refcast- Associação Portuguesa de Castanha (<http://www.refcast.eu/>, acessado em 31/05/2022), as doenças resultam na perda de 40% a 50% da castanha durante o ciclo de produção. Isso pode resultar em uma perda de aproximadamente 12 mil toneladas de castanha, ocasionando uma perda de aproximadamente 24 milhões de euros para a indústria. Custos intermediários elevados causam um aumento de preços, o que não ajuda a competitividade no mercado.

As castanhas estão disponíveis principalmente como frutas frescas, durante a temporada de produção. A fruta possui um teor de água em torno de 50%, considerado um alto teor, fator que pode comprometer sua longevidade. Atualmente, os tratamentos pós-colheita, desenvolvidos para minimizar a deterioração, conseguem manter a qualidade das castanhas e prolongar sua vida útil, mas não conseguem inibir completamente o crescimento de organismos patogênicos (Vettraiño et al., 2019).

A maioria das castanhas colhidas é armazenada para aumentar a doçura e endurecer o pericarpo. Além disso, a melhoria do armazenamento pós-colheita das castanhas pode proporcionar alguns benefícios econômicos, reduzindo a deterioração e prolongando o período de comercialização. No entanto, a deterioração de castanhas associada ao armazenamento representa um grande problema pós-colheita para sua comercialização e os fungos são considerados os principais agentes causais de perdas, resultando em elevadas taxas de podridão da castanha (González et al., 2010).

A infecção dos frutos por agentes de deterioração geralmente ocorre depois que as castanhas caem no chão e são expostas ao solo, matéria vegetal, e água suja durante a colheita (Webber et al., 2022). A expansão de micélios fúngicos nos frutos e a degradação dos cotilédones ocorrem principalmente durante o armazenamento. Nos estágios iniciais da infecção, não é fácil diferenciar frutos levemente mofados ou parasitados dos bons até serem processados ou consumidos (Rutter et al., 1990).

Tradicionalmente, no nordeste transmontano de Portugal, as castanhas são colhidas diretamente do solo, à mão, e armazenadas em sacos de 50 kg. Após as castanhas caírem das árvores, a coleta é feita mecanicamente com máquina de sucção (Rodrigues et al., 2010). Porém, deste modo, inóculos de doenças como folhas, resíduos e outras sujeiras, podem ser transportadas juntamente com as castanhas para os armazéns, favorecendo o desenvolvimento de bolores nos depósitos, o que é facilitado também pelo excesso de humidade e altas temperaturas provocadas pela falta de ventilação. As primeiras castanhas com sinais de infecção serão as que apresentam defeitos e malformações, espalhando para as outras castanhas posteriormente (Álvarez, 2010).

2.3.1 Fungos e podridões.

O rendimento e a qualidade dos frutos podem ser seriamente comprometidos pelo ataque de vários fungos, dos quais podemos citar: *Acrospeira mirabilis*, *Alternaria* spp.,

Aspergillus spp., *Botrytis cinerea*, *Coniophora puteana*, *Cryptodiaporthe castanea*, *Cytodiplospora castanea*, *Discula campestris*, *Dothiorella* spp., *Fusarium* spp., *Neofusicoccum ribis*, *Penicillium* spp., *Pestalotia* spp., *Rhizopus* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma* spp., *Trichothecium roseum* (Lione et al., 2019).

Segundo Rodrigues et al. (2013), fungos como *Botrytis*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Alternaria* spp., habitam naturalmente a superfície externa das castanhas, porém não chegam a causar danos internos quando não possuem furos ou rachaduras na casca do fruto. *Ciboria batschiana*, *Phoma* spp. e *Phomopsis* também são considerados como particularmente relevantes em associação com a deterioração ou mumificação de castanhas (Visentin et al., 2012).

Segundo Moschetti et al. (2014), grande parte das infecções degradantes causadas por microrganismos em castanhas acontece quando os ouriços estão no chão e na apanha, ou seja antes da colheita. Entre este período, os frutos se contaminam rapidamente por estarem expostos a um grande número de inócuos de patógenos provenientes do solo e alta humidade. Além disso, quando a colheita dos frutos é feita em épocas chuvosas, cerca de 30% da safra pode ser comprometida.

Esses fatores, em conjunto, levam a uma diminuição da qualidade e segurança do produto, o que resulta na diminuição do rendimento ao longo da linha de produção. Sendo assim, se torna fundamental empregar soluções viáveis a fim de manter e conservar a qualidade do produto, permitindo um armazenamento e distribuição por mais tempo (Ramalhosa et al., 2010). Devido ao potencial de produção de micotoxinas como aflatoxinas que podem ser cancerígenas, hepatológicas e teratogênicas, a contaminação por fungos, no ponto de vista da segurança alimentar, é de grande importância.

2.4 Podridão da castanha causada por *Gnomoniopsis smithogilvyi*

Neste presente século foi relatado na literatura um grande aumento da ocorrência de podridões em castanhas, apresentando sintomas incomuns aos de outras doenças conhecidas. Tais relatos foram descritos em países como Austrália, Nova Zelândia, Ásia, e também Europa, principalmente na Itália, França, Espanha, e atualmente em Portugal (Shuttleworth et al., 2012, Visentin et al., 2012).

Na atualidade, este patógeno, é considerado o principal fungo emergente causador de podridão em castanhas. Segundo Vettraino et al. (2021) na última década foi observado um

aumento acentuado na incidência de podridão castanha, causada por *G. smithogilvyi* em Itália. Atualmente considerada a ameaça mais importante da castanha, este patógeno está presente na Oceânia, América do Norte e Europa. Ainda é desconhecido seu centro de origem exato, porém estudos procuram justificar a sua atual disseminação e propagação mundial (Pasche et al., 2016).

Anteriormente, por estar descrito em outros países, existiam discordâncias quanto ao nome mais apropriado, para designar o causador desta podridão (Shuttleworth et al., 2015). Deste modo, Shuttleworth et al. (2018) constataram que apesar de relatado como *Gnomoniopsis castaneae* e *Gnomoniopsis smithogilvyi*, embora descritos independentemente em regiões distintas, ambos referem-se a uma única espécie, e portanto são sinônimos. Sendo assim, segundo a base de dados Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>, acessado em 31/05/2022), especializada em taxonomia de fungos, a nomenclatura atual e correta do patógeno é *Gnomoniopsis smithogilvyi* L.A. Shuttlew., E.C.Y. Liew & D.I. Guest (Crous et al., 2012). Concluiu-se também como sendo o mesmo agente causador da podridão da castanha na Austrália, Nova Zelândia e Europa.

2.4.1 Biologia do patógeno e sintomatologia da doença

O patógeno descrito é um ascomiceto e pertence à ordem Diaporthales e a família Gnomoniaceae. Coloniza diferentes tecidos de hospedeiros arbóreos e arbustivos, que incluem também outras espécies cultivadas (Visentin et al., 2012). Além dos sintomas descritos no fruto, este fungo também pode causar podridões em brotos, folhas, ramos e flores de seus hospedeiros. Além disso consegue sobreviver em restos de castanha, principalmente em ouriços, considerados o substrato ideal para geração de peritécios que posteriormente liberam ascósporos (Rai & Dar, 2015; Shuttleworth et al., 2012).

Segundo Crous et al. (2012), o fungo *G. smithogilvyi* é comumente isolado como endófito em flores, folhas e caules assintomáticos e de sementes de castanha podres, pois hiberna como saprófito em restos mortos de castanhas em sua fase sexual. Maresi et al. (2013) também relata a presença deste fungo como endófito em brotações de um e dois anos.

Quanto aos sintomas, em comparação com os frutos de castanhas saudáveis cuja polpa é amarelo-creme, os frutos de castanha infectados pelo fungo apresentam lesões marrons no endosperma e no embrião, como observado na **Figura 4**. Porém, nem sempre os

sintomas são visíveis externamente, o que é problemático para produtores e consumidores (Shuttleworth et al., 2013).

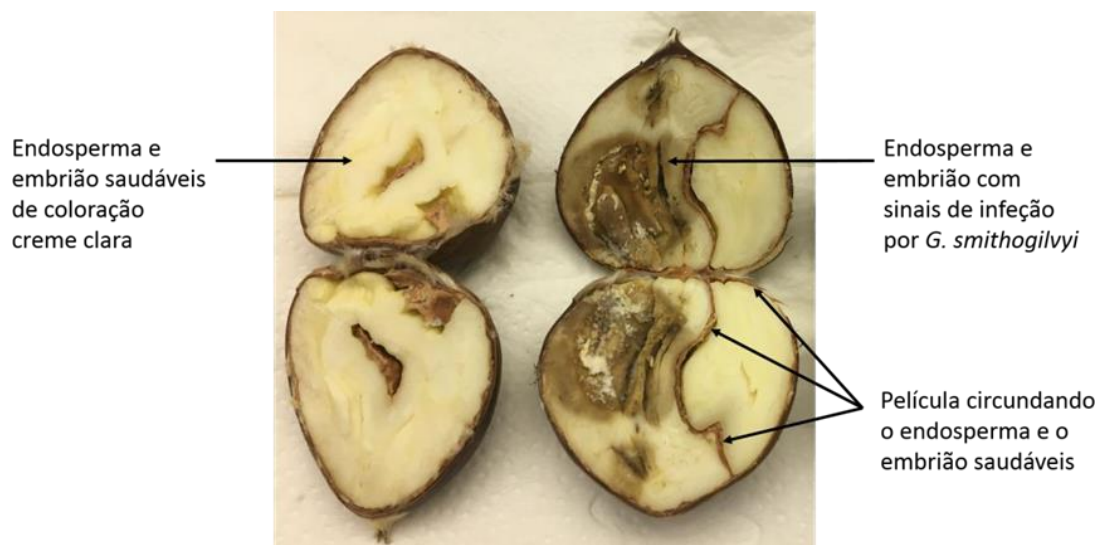


Figura 4 - Sintoma de podridão castanha no fruto, causada por *Gnomoniopsis smithogilvyi*
(Fonte: Possamai et al., 2020)

A podridão causada por este patógeno se caracteriza pela coloração escurecida e acastanhada que apresenta no endosperma, principalmente em seu estágio de pós-colheita, além disso ocorrem modificações na textura do fruto. As lesões podem aparecer como uma margem clara na extremidade do hilo ou do embrião, ou uma combinação destes. Conforme o estágio da doença, os sinais podem ser parecidos aos ocasionados por outros fungos. Porém, os sintomas indicativos de apodrecimento só são visíveis quando o endosperma é examinado, por isto o diagnóstico deve-se basear no isolamento, e não apenas na observação visual (Visentin et al., 2012).

O patógeno descrito, também foi relatado em associação com cancrios em galhos, enxertos e como endófito em tecidos verdes de castanha. Além disso se caracteriza por apresentar tanto um estágio telemórfico, produzindo peritécios em rebarbas, quanto um estágio anamórfico, produzindo acérvulos em galhas da vespa asiática, e em cancrios (Lione et al., 2019; Pasche et al., 2016).

A infecção floral por meio de ascósporos ou conídios leva ao aparecimento da podridão da castanha propriamente dita, mas outras vias não são descartadas (Shuttleworth & Guest, 2017). Embora tanto os ascósporos quanto os conídios sejam infecciosos, ainda há pouca informação disponível sobre o potencial de inócuo no ar e os padrões de deposição de

propágulos do fungo no tempo e no espaço, bem como sobre o papel das variáveis temporais e climáticas nesses padrões (Lione et al., 2021).

2.5 Métodos de controlo de doenças pós-colheita

2.5.1 Métodos clássicos

A eficácia dos tratamentos da castanha após a colheita depende do nível de qualidade das castanhas. Nesta fase, os agricultores selecionam remessas de castanha adequadas para comercialização e armazenamento com base da porcentagem de incidência de podridão avaliada visualmente. A detecção de patógenos com base em inspeção visual pode levar à subestimação da infecção porque *G. smithogilvyi* pode viver como endófito dentro de tecidos assintomáticos (Maresi et al., 2013).

A qualidade fitossanitária da castanha no momento da colheita, pode ter um impacto positivo na qualidade pós-colheita da castanha. As castanhas colhidas do solo demonstraram ter níveis mais altos de patógenos pós-colheita do que as castanhas colhidas diretamente da árvore (Donis-González et al., 2016).

Um tratamento tradicional de pré-armazenamento ainda amplamente utilizado na Europa é a cura em água, onde as castanhas são embebidas em água por 7 a 9 dias para reduzir o inóculo fúngico durante o armazenamento e matar as larvas de insetos dentro da castanha (Botondi et al., 2009).

A hidroterapia (banho frio) e termo-hidroterapia (banho quente), são técnicas muito utilizadas que foram desenvolvidas na Itália durante a década de 1930. A termo-hidroterapia é atualmente o método padrão usado pela sua comprovada capacidade de controlar infestações sem influenciar a qualidade da castanha (Jermini et al., 2006). Estes autores também afirmam que a hidroterapia antes do armazenamento é benéfica, no entanto, uma incidência da doença de um terço de castanhas mofadas ainda é alta, e estratégias de controle adicionais são necessárias para a produção comercial de castanha em áreas com cultura tradicional da castanha de subsistência.

Os tratamentos de pré-armazenamento com cloro e ácido peracético parecem oferecer alguma proteção contra deterioração externa, mas não mostram qualquer eficácia na proteção contra deterioração interna nas condições de armazenamento (Webber et al., 2022). A deterioração pós-colheita da castanha continua a ser um problema significativo

para melhoria por possuir poucos estudos. O produtor de pequena escala muitas vezes adapta um sistema de armazenamento a frio improvisado para armazenar os frutos entre a colheita e a venda das castanhas. Porém, mesmo com o armazenamento refrigerado adequado, se observam perdas (Ekman, 2014).

2.5.2. Métodos biológicos de controle

Os tratamentos químicos pós-colheitas muitas vezes podem apresentar perigos para a saúde dos seres humanos, e também para o meio ambiente, sendo alguns até mesmo proibidos, ou de uso limitado na União Europeia sob o Protocolo de Montreal, como por exemplo produtos à base de bromoetano. Sendo assim o desenvolvimento de métodos biológicos de controle que causem menos impacto para o ambiente e para o consumidor são necessários. A criação de sistemas para minimizar a deterioração, manter a qualidade da castanha e prolongar a sua vida útil diante das condições de armazenamento é fundamental (Vettrano et al., 2019).

O uso de produtos biológicos na agricultura atualmente, além de mais seguro para o ambiente e os seres vivos, tem o objetivo de reduzir a incidência de fungos patogênicos, e eliminar infecções existentes. Alguns ainda têm como objetivo fornecer resistência da planta hospedeira contra perturbações, ainda antes do período pós-colheita (Carvalho et al., 2014).

É descrita na literatura a capacidade das bactérias na degradação de esporos e hifas de fungos patogênicos. Esta capacidade impede o crescimento do fungo, de diversas maneiras, a principal delas é a aderência e degradação das estruturas (Zucchi & de Melo, 2009). De modo geral, organismos endófitos, sejam eles fungos ou bactérias, mostraram uma boa capacidade de proteção contra patógenos e por esta razão apresentam grande potencial (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011).

Trichoderma spp. e *Bacillus* spp. foram relatados como potenciais endófitos. Ruocco et al., 2016 realizaram um dos primeiros estudos com controle biológico de podridão pós-colheita na castanha, principalmente da podridão causada por *Gnomoniopsis* spp. , a fim de diminuir a incidência de doenças na castanha. Baseando-se no tradicional tratamento térmico, foram testados em adição da água uma mistura de enzimas de degradação de parede celular coletada de culturas do fungo *Trichoderma harzianum* Rifai cepa T22. Tal tratamento resultou em uma redução significativa da incidência de podridão da castanha, proporcionando novas e futuras perspectivas para reduzir perdas.

De acordo com Wong et al. (2008), a bactéria endofítica *Bacillus amyloliquefaciens*, produz uma proteína que apresenta atividade antifúngica contra um amplo espectro de vários fitopatógenos. Algumas cepas desta bactéria já são ingrediente em alguns produtos utilizados contra várias doenças na agricultura, as quais incluem *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Pasche, Crovadore, et al., 2016). Sendo assim estes autores sugeriram que inoculações preventivas de antagonistas endófitos podem ser eficazes no biocontrole de *G. smithogilvyi* e de outras podridões.

Além disso, existe um crescente interesse na pesquisa sobre o possível uso de produtos naturais no controle de doenças, como metabólitos secundários microbianos, que podem ser menos prejudiciais para o ambiente, sendo potenciais agroquímicos futuramente. Os metabólitos microbianos apresentam uma série de vantagens químicas e biológicas como fungicidas. Os microrganismos podem sintetizar metabólitos secundários de estruturas químicas versáteis com diversas atividades biológicas. Portanto, encontrar novos compostos que possam ser biodegradáveis e seguros para a saúde humana será essencial para o controle de doenças de plantas (Kumar & Nambisan, 2014).

Como o patógeno relatado foi descoberto ainda recentemente, percebem-se carências de produtos à base de agentes biológicos específicos para o seu controle. Sendo assim, com base em produtos já disponíveis para outros fungos causadores de podridões em outras culturas agrícolas, uma estratégia potencial de controle do fungo *G. smithogilvyi* como agente causal de podridão da castanha poderá passar por realizar estudos de aplicação desses biofungicidas comerciais. Por outro lado, outros microrganismos adaptados à matriz da castanha poderão também ser portadores de potencial de controle contra este fungo patogénico.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura comerciais Potato Dextrose Ágar (PDA, Biolife®), e Plate Count Ágar (PCA, Biolife®) foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. Estes meios foram utilizados para o isolamento, manutenção e repicagem das culturas de fungos e bactérias usadas nos ensaios.

Para os ensaios de biocontrolo, foi usado um meio à base de castanha, para melhor refletir as condições existentes na matriz em estudo. Para preparação do meio de castanha (MC) foram utilizadas castanhas da variedade Longal, fornecidas pela empresa Sortegel, oriundas da região produtora de Trás-os-Montes, Portugal, da safra 2020/2021. As castanhas foram mantidas no congelador a -20 °C até serem processadas. Imediatamente antes da preparação do MC, as castanhas foram descongeladas e selecionadas quanto as suas condições exteriores, sendo eliminadas as que apresentavam algum tipo de defeito, como rachaduras, sinais de infestação por pragas, ou desenvolvimento de fungos. As castanhas selecionadas foram lavadas em água corrente, mergulhadas em água, e cozidas em forno micro-ondas até atingirem consistência macia. Logo após seu cozimento as castanhas foram descascadas e trituradas com auxílio de um processador de alimentos, para formar uma pasta consistente e homogênea.

Em seguida incorporaram-se 200 g de pasta de castanhas e 50 g de ágar, em um litro de água destilada. Todos os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos, e plaqueados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em câmara de fluxo laminar.

3.1.2 Material biológico

Os fungos utilizados neste estudo foram previamente isolados de castanhas e identificados por Driss et al. (2019), com exceção de dois fungos pertencentes a coleção da UTAD- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, identificados molecularmente no IPB através de sequenciação parcial do gene TEF-1^a (**Tabela 1**). Os fungos usados foram selecionados devido à sua elevada incidência e pelo seu papel como agentes de podridão da

castanha. Os fungos de interesse foram repicados a partir de culturas congeladas a -20 °C em solução de 30% glicerol para placas de meio PDA e foram incubados a 25 °C por 7 dias.

Tabela 1 - Fungos utilizados no presente estudo.

Espécie do fungo	Código de isolamento	Código MUM	Nº acesso GenBank
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	P10/5-10	MUM 20.140	MW170364 (TEF-1a)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	P8/4-9	MUM 20.141	MW170365 (TEF-1a)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	UTAD 3	MUM 21.76	OK323164 (TEF-1a)
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	UTAD 20	MUM 21.93	OK323174 (TEF-1a)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	P6/1-5		MW164815 (ITS)
<i>Penicillium expansum</i>	P2/3-3		
<i>Mucor racemosus</i>	P9/1-15		
<i>Ciboria batschiana</i>	P10/2-11		MW164806 (ITS)
<i>Trichoderma viridescens</i>	P8/4-6		MW164831 (ITS)

3.2 Ensaio preliminar de inibição com produtos comerciais

3.2.1 Produtos comerciais testados

No presente ensaio pretendeu-se avaliar o potencial de controlo de fungos causadores de podridão da castanha de dois produtos comerciais já homologados para outras culturas agrícolas e que estão também a ser testados em ensaios de campo num estudo paralelo, são estes: Serenade® ASO (suspensão concentrada com 1.34% de *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713, 10⁹ ufc/g; Bayer; designado como ASO, para este estudo) e Codasil® (Óxido de silício (SiO₂) amorfo 26,1% p/v, Óxido de potássio (K₂O) solúvel em água 14,6% p/v, Aminoácidos livres 5,2% p/v; Hubel Verde; designado como COD para este estudo). Este produto foi utilizado por ser um produto nutritivo, apenas para fins de comparação com os testes que estão a ser feitos em paralelo a campo. O fungicida químico Horizon® (Emulsão óleo em água (EW) com 250 g/L de tebuconazol; Bayer; designado como HOR para este estudo), atualmente usado na cultura do castanheiro, foi usado como controlo positivo. Todos os produtos foram testados em três concentrações diferentes, para verificar a existência de relação dose/resposta. As concentrações usadas estão descritas na Tabela 2, e foram preparadas de acordo com as

recomendações dos fabricantes, por diluição em água estéril. A concentração C2 representa a concentração média recomendada pelo fabricante para utilização no campo. No caso do produto Serenade®ASO, as concentrações C1 e C3 representam as concentrações mínima e máxima recomendadas pelo fabricante para várias culturas agrícolas. No caso dos produtos Horizon® e Codasil®, C1 e C3 representam, respectivamente, metade e o dobro da concentração média C2.

Tabela 2 - Concentrações de cada produto comercial utilizado.

Produto	Concentração do produto comercial	Concentração do ingrediente ativo
Serenade® ASO	C1- 5,5 uL/mL	0,074 g/L
	C2- 10 uL/mL	0,134 g/L
	C3- 16 uL/ mL	0,214 g/L
Horizon®	C1- 0,2 uL/mL	0,05 g/L
	C2- 0,4 uL/mL	0,10 g/L
	C3- 0,6 uL/mL	0,15 g/L
Codasil®	C1- 1,8 uL/mL	-
	C2- 3,6 uL/mL	-
	C3-7,2 uL/ mL	-

3.2.2 Preparação dos inóculos

No presente ensaio foram usados todos os fungos descritos na **Tabela 1**. Os inóculos foram preparados a partir de culturas com 7 dias de crescimento a 25 °C em placas de PDA.

No caso dos fungos *C. batschiana*, *G. smithogilyvi* e *M. racemosus*, devido ao crescimento maioritariamente miceliar, o inóculo consistiu em rodela de agar e micélio com 6 mm de diâmetro cortadas com um fura-rolhas estéril e colocadas no centro de cada placa de Petri. Para os fungos *P. brevicompactum*, *P. expansum* e *T. viridescens*, com forte esporulação, foram preparadas suspensões de esporos. Com a ansa retirou-se os esporos das colônias e foram colocados em tubos Falcon contendo solução de 0,1% Tween 80, estéril. As suspensões foram homogeneizadas com um agitador vortex, por aproximadamente 10 segundos e os esporos foram contados usando uma câmara de Neubauer. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^7 esporos/mL. Após isso com auxílio de pipetas, foi inoculado 10 µL desta suspensão centralmente nas placas.

3.2.3 Preparação e inoculação das placas de Petri

O ensaio foi desenvolvido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo aproximadamente 20 mL dos meios de cultura PDA (meio padrão) e MC (meio modelo). Para cada placa de Petri de cada tratamento, foram colocados os fungos estudados (Tabela 1) centralmente conforme descrito na secção 3.2.2.

Em seguida, embebeu-se discos de imersão estéreis em cada uma das três concentrações de produto descrito na **Tabela 2**, que foram posicionados de forma equidistante nas placas de Petri previamente inoculadas, conforme ilustrado na **Figura 5** e **Figura 6**. Como controlo utilizou-se discos embebidos em água destilada estéril. Todas as etapas descritas foram realizadas em ambiente estéril, em câmara de fluxo laminar. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C, durante 7 dias.

Por se tratar de um ensaio preliminar para avaliação do efeito dos agentes de controlo sobre os vários fungos, e do potencial efeito dose/resposta, apenas foi preparada uma placa de Petri de cada conjugação fungo patogénico x agente de controlo, num total de 36 placas (9 fungos x 3 agentes/produto + 9 fungos x 1 controlo)

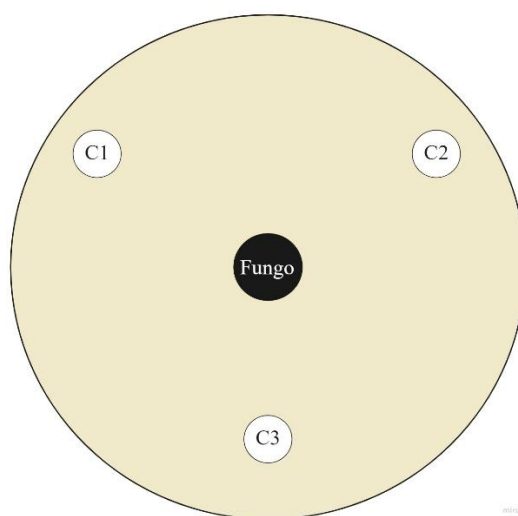


Figura 5 - Diagrama demonstrativo da inoculação dos fungos com cada um dos agentes teste em diferentes concentrações dos produtos comerciais. As concentrações C1 e C3 representam as concentrações mínima e máxima recomendadas pelo fabricante para utilização. A concentração C2 representa a concentração média recomendada.



Figura 6 - Realização das inoculações

3.3 Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais

Devido a problemas técnicos decorrentes de deficiência no funcionamento da autoclave, verificaram-se elevadas taxas de contaminação nas placas resultantes do ensaio anterior. Apesar de os resultados específicos desse ensaio terem ficado quase totalmente inutilizados, verificou-se que alguns dos contaminantes presentes nas placas exerciam um forte efeito de inibição sobre os fungos em estudo. Em consequência, alguns destes contaminantes foram isolados para placas de PCA, e foram também estudados como potenciais agentes de biocontrolo fúngico. Estes contaminantes foram denominados de BCA1, BCA2, BCA3, BCA4. Avaliou-se visualmente os que aparentemente diminuían o crescimento fúngico, e assim foram selecionados para estudo *in vitro* os contaminantes BCA1 e BCA3.

Nesta fase do processo, estes contaminantes apenas foram identificados como bactérias por observação ao microscópio, ficando a identificação específica prevista apenas no caso de se confirmar o efeito antifúngico. Além destas bactérias foi testada também a ação da levedura *Debaryomyces hansenii* FHSCC 253H, depositada na Colecção de Culturas do grupo de Higiene e Segurança Alimentar da Universidade de Extremadura (FHSCC, Cáceres, Espanha), gentilmente fornecida pela Doutora María Micaela Álvarez, a qual foi denominada BCA5. Esta levedura, apesar de isolada de produtos cárneos, demonstrou marcado efeito antifúngico em produtos alimentares, nomeadamente contra espécies do género *Penicillium* (e.g. Andrade et al., 2014; Álvarez

et al., 2022), razão pela qual foi também testada no presente estudo.

Nesta etapa, com base nos resultados preliminares obtidos no ensaio anterior, descartou-se do estudo os fungos *G. smithogilvyi* P10/5-10 e *G. smithogilvyi* P8/4-9 (por apresentarem resultados semelhantes aos restantes isolados da mesma espécie), *M. racemosus* P9/1-15 e *P. brevicompactum* P6/1-5 (por não se verificar potencial de controlo) e *C. batschiana* P10/2-11, por dificuldades de crescimento em condições *in vitro*. Sendo assim, mantiveram-se os fungos *G. smithogilvyi* UTAD 3 e UTAD 20, *P. expansum* P2/3-3 e *T. viridescens* P8/4-6.

Serenade® ASO e Horizon®, foram usados para comparação com agentes biológico comercial e químico comercial, respetivamente, usando a concentração média (C2) descrita na **Tabela 2**. Utilizou-se apenas o meio de cultivo MC, a fim de observar a interação do fungo e do patógeno nas condições modelo semelhantes à do fruto.

No sentido de evitar as contaminações introduzidas pelos discos de imersão observadas no ensaio anterior, neste ensaio foi efetuado o método de confronto, em que o agente patogénico e o agente de controlo são colocados em posições opostas da placa (**Figura 7**). Os agentes de biocontrolo foram semeados em PCA, incubados por 24 horas a 25 °C e semeados numa extremidade da placa de MC com auxílio de uma ansa. No caso dos agentes comerciais, foram colocados nas respetivas placas 10 µL da concentração C2. Os fungos patogénicos foram semeados na outra extremidade da placa conforme descrito anteriormente (suspensão de esporos ou rodela de agar). Após as inoculações foram incubados por 7 dias em estufa de 25 °C.

Por se tratar de um ensaio preliminar para avaliação do efeito dos agentes de controlo sobre os vários fungos, apenas foi preparada uma placa de Petri de cada conjugação fungo patogénico x agente de controlo, sendo assim totalizou-se 24 placas (4 fungos x 5 agentes + 4 fungos x 1 controlo negativo).

Após a observação dos resultados deste ensaio, e uma vez que o foco do presente estudo é o controlo do fungo *G. smithogilvyi*, foi repetida a confrontação entre este fungo (isolados UTAD3 e UTAD20) e os agentes biológicos que demonstraram efeito de controlo (BCA1 e ASO), mantendo o agente químico Horizon® como controlo positivo e o branco como controlo negativo.

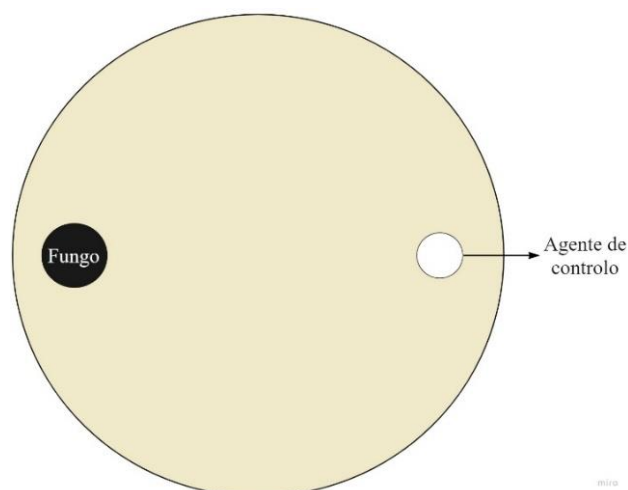


Figura 7 - Diagrama demonstrativo das inoculações pelo método de confrontação.

3.4 Avaliação do potencial de controlo dos agentes biológicos Serenade®ASO e BCA1 contra *G. smithogilvyi*

Como etapa final do presente trabalho, e considerando os resultados obtidos nos ensaios anteriores, foi efetuado um ensaio de confirmação do potencial de controlo dos agentes Serenade® ASO e BCA1 contra o fungo patogénico *G. smithogilvyi*, em comparação com o efeito do fungicida químico Horizon®. Uma vez que nos ensaios anteriores se verificou que os quatro isolados de *G. smithogilvyi* apresentavam comportamento semelhante perante os agentes de controlo testados, o presente ensaio focou-se apenas no isolado UTAD 20, como representativo da espécie. Neste ensaio foram determinados três parâmetros de efeito dos agentes de controlo sobre o patogénico: i) medição do halo de inibição de crescimento; ii) análise do perfil de metabolitos secundários produzidos pelo fungo quando confrontado com os diferentes agentes (análise metabolómica); iii) análise do perfil de proteínas produzidas pelo fungo quando confrontado com os diferentes agentes (análise proteómica). Estes parâmetros permitem avaliar não só o efeito sobre o crescimento do fungo, mas também o efeito sobre o metabolismo e os potenciais mecanismos de ação dos agentes.

A análise metabolómica tem sido aplicada em plantas, e organismos microbiológicos pois pode auxiliar no entendimento do metabolismo destes seres, além de promover melhorias nos cultivos, bem como contribuir para estudos da evolução, fisiologia e bioquímica (Canuto et al., 2018). Sendo assim, esta tem um papel fundamental na compreensão dos metabolitos e suas interações, e por isto foi analisada neste estudo.

3.4.1 Identificação do agente de biocontrole BCA1

Antes de serem efetuados os ensaios finais com a bactéria BCA1, selecionada no primeiro ensaio preliminar pelo seu aparente potencial como agente de biocontrole de *G. smithogilvyi*, esta foi devidamente identificada e caracterizada. A identificação foi efetuada num estudo paralelo, pelo que não se apresenta aqui a descrição detalhada dos métodos utilizados.

A bactéria foi identificada molecularmente como *Bacillus amyloliquefaciens*, através da amplificação e sequenciação da região 16S do gene ribossomal. Uma vez que se verificou pertencer à mesma espécie da bactéria que compõe o produto comercial Serenade® ASO, o isolado BCA1 e a estirpe QST 713 (isolada a partir do produto Serenade® ASO) foram comparadas através da análise de perfil molecular (*fingerprinting*), por amplificação do DNA genómico pelo método *enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR* (ERIC-PCR) usando os primers ERIC1 e ERIC2 (Alves et al., 2007). As duas bactérias foram ainda comparadas quanto ao seu perfil enzimático usando o sistema API ZYM (Biomérieux). Em resultado destas análises, foi verificado tratar-se de estirpes com perfis moleculares e enzimáticos diferentes, pelo que se manteve o ensaio com o isolado BCA1.

3.4.2 Desenho experimental

Mantiveram-se os tratamentos com Serenade® ASO e Horizon®, em concentração média (C2). O BCA1, porém, ao invés de usar-se ansa para fazer a raspagem e inoculação do BCA1, preparou-se uma suspensão celular de concentração idêntica à concentração celular de ASO. Com pipeta de Pasteur despejaram-se 2 mL de solução salina a 0,9% na placa de Petri com meio de cultivo PCA contendo o agente de biocontrole, raspou-se a cultura, e depois transferiu-se para um tubo de Falcon, com auxílio de pipeta de Pasteur. A suspensão foi homogeneizada com um agitador vortex, por aproximadamente 10 segundos. Foi realizada a contagem das bactérias, com uma câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para a concentração de 10^5 células/mL. A inoculação foi feita conforme demonstrado na **Figura 7**, usando 10 µL de cada agente de controlo. A incubação foi de 8 dias em estufa de 25 °C.

O ensaio foi feito em placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo aproximadamente 20 mL de MC, em triplicado, totalizando 12 placas (1 fungo x 3 agentes

x 3 repetições + 1 fungo x 1 controlo negativo x 3 repetições).

3.4.3 Medição do halo de inibição

A partir do primeiro dia de inoculação mediu-se o diâmetro de crescimento do fungo, nas três repetições de cada tratamento com uma régua, por 8 dias consecutivos. Ao final dos 8 dias mediu-se o halo de inibição entre o fungo e os agentes de biocontrolo.

A fins de observação visual das estruturas produzidas pelo fungo em contato com os agentes de controlo, as placas foram observadas com auxílio de lupa Leica MZ95 em conjunto do programa Leica Application Suite V4 (LAS V4.12).

Após observação da lupa, foi recolhido uma pequena quantidade de micélio, com auxílio de bisturi das zonas de contato entre o agente de controlo e o fungo. Coloriu-se a lâmina com azul de etileno, e então as estruturas foram observadas no microscópio Leica ICC50 W, fotografadas em conjunto do programa Leica Application Suite V4 (versão LAS 4.13).

3.4.4 Análise de metabolitos secundários por LC-MS/MS

Após os 8 dias de incubação, realizou-se a recolha de micélio e meio de cultura da zona de inibição, das 3 placas de cada tratamento, os quais foram colocados em Eppendorfs previamente pesados e identificados. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e enviadas ao laboratório, para análise metabolómica.

As análises foram efetuadas pelo método multi-analito de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), no *Department of Agrobiotechnology, IFA-Tulln, Institute of Bioanalytics and Agro-Metabolomics, University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU)*, Viena, Áustria. A deteção e quantificação foram efetuadas num sistema QTrap 5500 MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) TurboIonSpray e um sistema UHPLC série 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). O protocolo LC-MS/MS, com capacidade de deteção de 710 metabolitos fúngicos, foi aplicado conforme previamente descrito (Sulyok et al., 2020). A confirmação dos metabolitos detetados foi obtida por aquisição de duas transições MS/MS por analito (com exceção do ácido 3-nitropropiónico, que exhibe apenas um fragmento iónico), de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/EC.

A precisão do método é verificada regularmente para os analitos mais importantes através da participação em ensaios interlaboratoriais organizados pela BIPEA (*Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques*, França) e pela CODA-CERVA (*National Reference Laboratory for Mycotoxins*, Bélgica).

3.4.5 Análise comparativa de proteínas

Para a análise comparativa de proteínas produzidas pelo fungo nas diferentes condições testadas, uma pequena porção de micélio foi recolhida da zona de inibição, com o cuidado de não recolher meio de cultura. A recolha do micélio foi feita o mais rapidamente possível para todos do tipo *Eppendorf* e a amostra foi imediatamente colocada na arca congeladora de -80 °C até ser liofilizada. As amostras foram enviadas para a Universidade de Extremadura (Cáceres, Espanha), onde estão a ser analisadas segundo o método descrito por Álvarez et al. (2021) e Delgado et al. (2019), usando um equipamento Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um detetor Dionex Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific).

Esta análise descrita ainda está em curso, portanto não se constam seus resultados neste estudo.

3.4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software IBM SPSS® *Statistics* versão 26 (SPSS Inc., Chicago, IL). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para determinação da normalidade dos dados. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP), para $n = 3$. A comparação de médias foi efetuada por análise de variância (ANOVA), usando o teste *post-hoc* de Tukey HSD para comparações múltiplas. A significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio preliminar de inibição com produtos comerciais

Apesar de algumas contaminações, devido aos problemas técnicos citados no capítulo 3, a realização de ensaios preliminares é fundamental para ponderar o seguimento da pesquisa. Para esta avaliação considerou-se os efeitos da interação entre os confrontamentos e o comportamento de crescimento dos fungos em PDA e MC.

Apesar das contaminações pode-se notar que não houve controle muito satisfatório dos fungos *G. smithogilvyi*, utilizando o produto comercial Codasil®, o que explica seu desuso nos testes seguintes. Nesta primeira etapa, este produto comercial foi utilizado apenas para fins de comparação, por se tratar de um produto nutritivo, utilizado para fortalecimento de castanheiros, a fim de torná-lo mais resistente a estresses bióticos e abióticos, segundo seu fabricante, portanto sua utilização *in vitro* não foi satisfatória.

Apesar de as fortes contaminações observadas inviabilizarem os resultados pretendidos neste ensaio, alguns contaminantes exerceram um bom controle dos fungos testados, e por este motivo foram isolados para placas de Petri contendo meio PCA, a fim de serem testados posteriormente como potenciais agentes de biocontrole. O agente BCA3, foi isolado a partir da placa de Petri, contendo MC, do tratamento de controle (branco), correspondente ao tratamento com *G. smithogilvyi* P10/5-10, o qual pode ser observado na **Figura 8**. Mesmo a placa não contendo nenhum tratamento, pois o disco foi embebido apenas em água destilada, o crescimento do fungo foi limitado, ou seja, existe uma contaminação, de caráter desconhecido, que visualmente, apresentou bom controle do fungo, e por este motivo foi também isolada para posteriores testes.

A bactéria BCA1 foi isolada a partir da placa com meio PDA do tratamento Horizon®, contra *G. smithogilvy* UTAD 20, a qual pode ser observada na **Figura 9** exercendo um ótimo controle, uma vez que inibiu totalmente o crescimento do fungo, quando comparado aos outros tratamentos utilizados para ele.

Além da inibição de crescimento, nas zonas de contato entre *G. smithogilvy* e os tratamentos o fungo apresentou um crescimento micelial diferente do evidenciado nos brancos. Suas bordas ficaram escurecidas, o que pode ser devido ao estresse sofrido, influenciando na estrutura celular e na produção de estruturas de resistência.

Os resultados dos outros tratamentos, por possuírem muitas contaminações não

são conclusivos, estão relatados nos **Anexo 1** e **Anexo 2**.

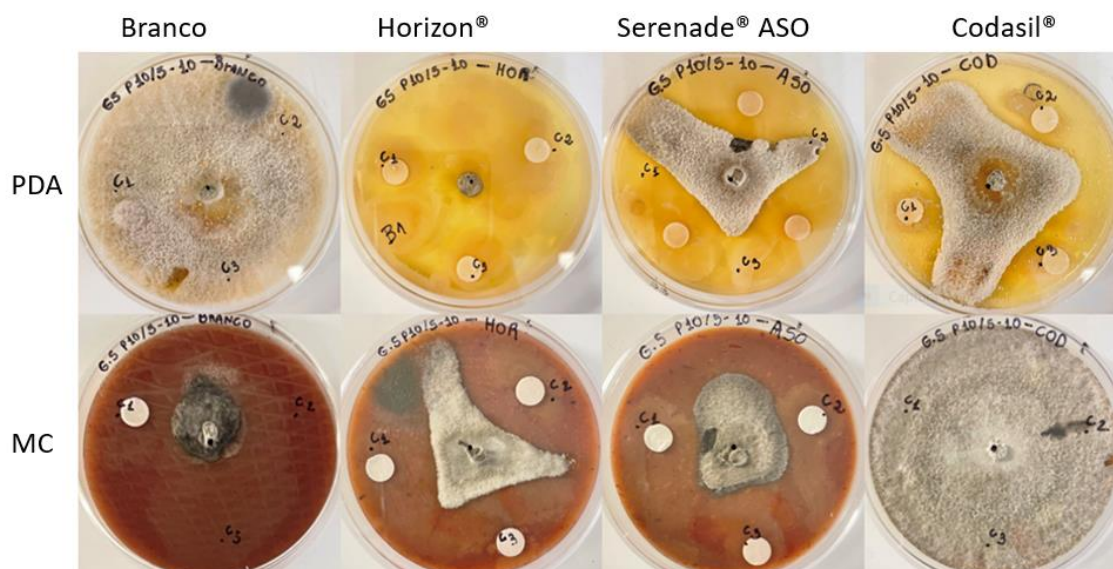


Figura 8 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra *Gnomoniopsis smithogilvyi* P10/5-10

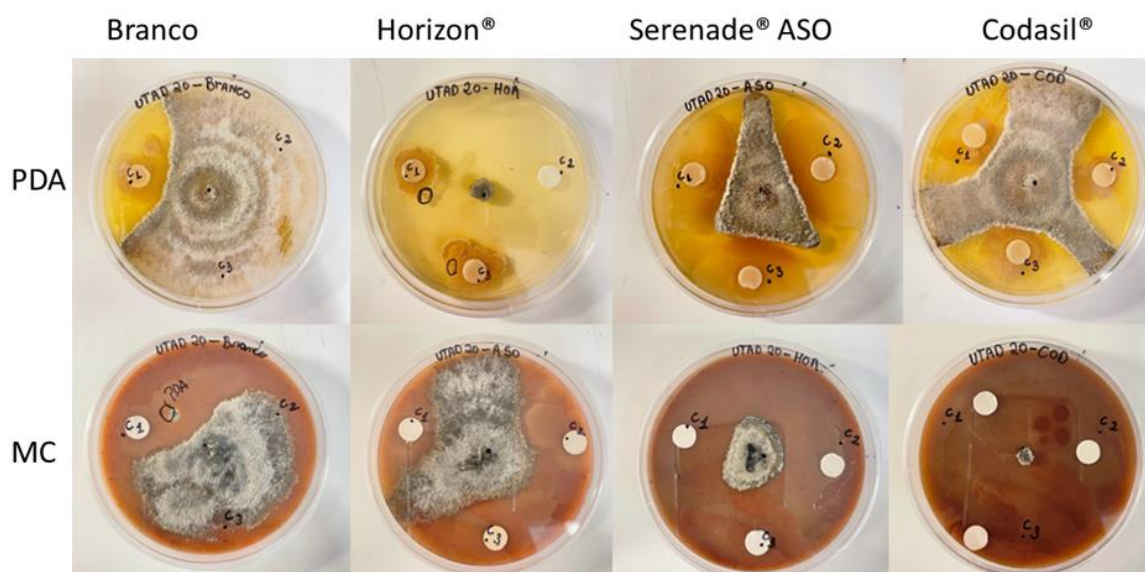


Figura 9 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra *Gnomoniopsis smithogilvyi* UTAD 20

O fungo *C. batschiana* P10/2-11, não apresentou um bom crescimento *in vitro* em meio PDA, e MC. Considerando-se isto e as contaminações existentes, portanto, o estudo *in vitro* do seu controle não proporcionou conclusões satisfatórias, e por isto foi descartado das próximas etapas do estudo (**Figura 10**).

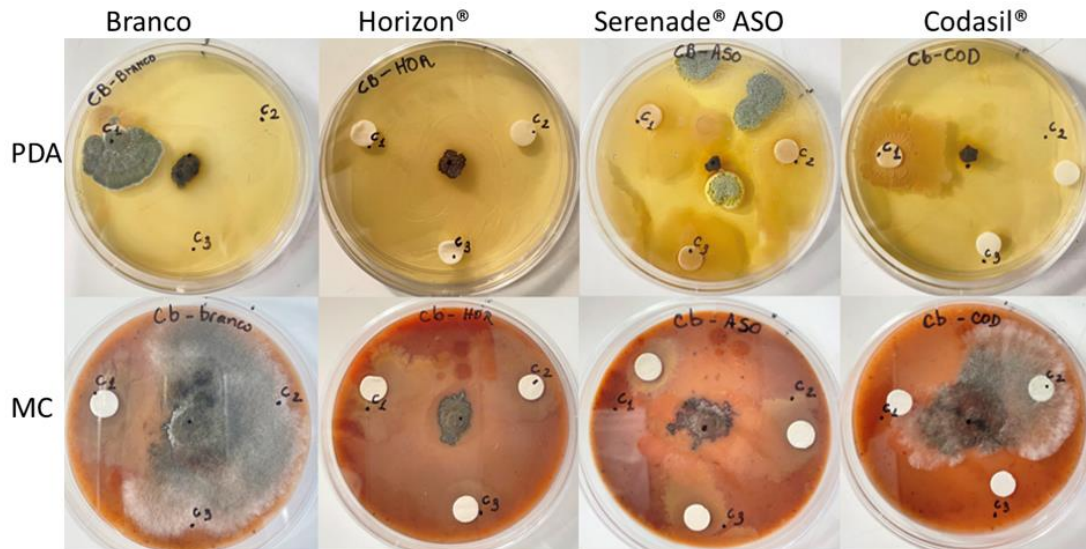


Figura 10 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra *Ciboria batschiana* P10/2-11

No resultado das placas de Petri contendo o fungo *M. racemos* P9/1- 15, é possível observar, seu ótimo crescimento *in vitro*. Os produtos utilizados pouco afetaram o seu crescimento. Porém ainda assim exerceram algum controlo (**Figura 11**).

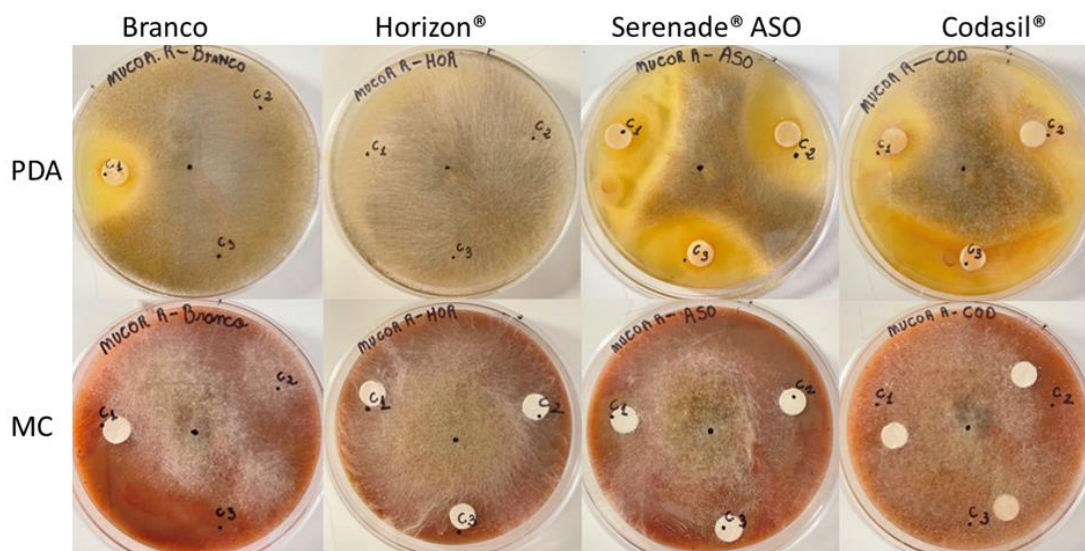


Figura 11 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais contra *Mucor racemosus* P9/1-15

O fungo *T. viridescens* P8/4-6 apresentou um ótimo e rápido crescimento nos meios de cultura (**Figura 12**) é possível observar que o produto Serenade® ASO, apresentou o melhor controle do patógeno. O tratamento químico com Horizon®, onde

neste caso não se observou qualquer contaminação microbiana, não exerceu qualquer controle, independentemente da concentração do produto.

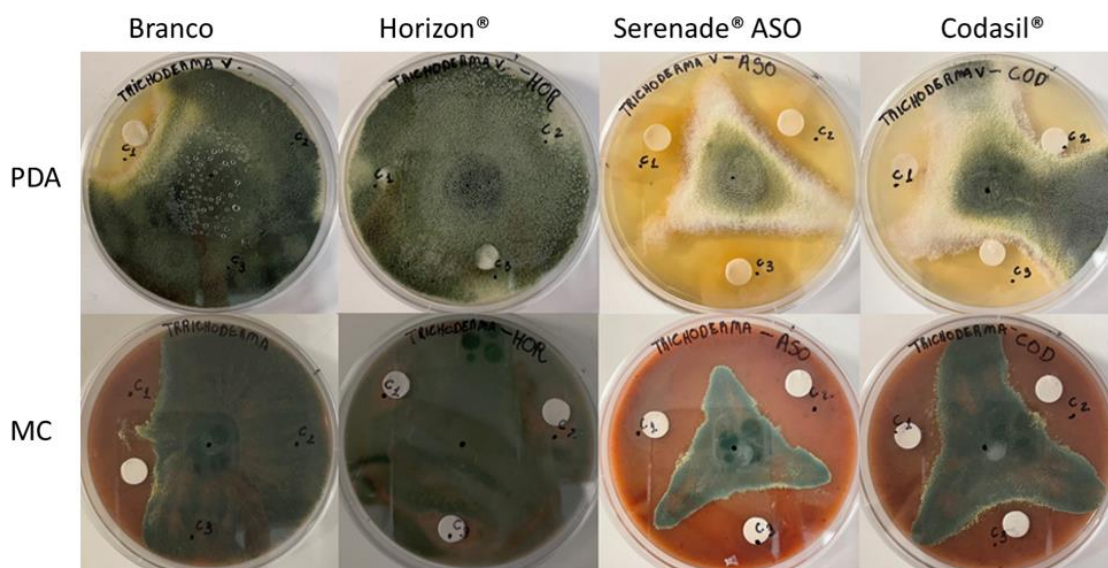


Figura 12 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais contra *Trichoderma viridescens* P8/4-6

Os fungos do gênero *Penicillium*, demonstrados na **Figura 13** e na **Figura 14** são fungos com elevada incidência nas castanhas pós-colheita, e que além de serem causadores de perdas por podridão verde podem também produzir toxinas, o que põe em causa a saúde do consumidor. Neste estudo devido as contaminações, os resultados obtidos não são conclusivos, pois o crescimento do fungo nos tratamentos em branco também foi limitado. No entanto, podemos verificar que, em geral, os vários tratamentos tiveram pouco efeito no controlo destes fungos, principalmente no caso de *P. expansum*.

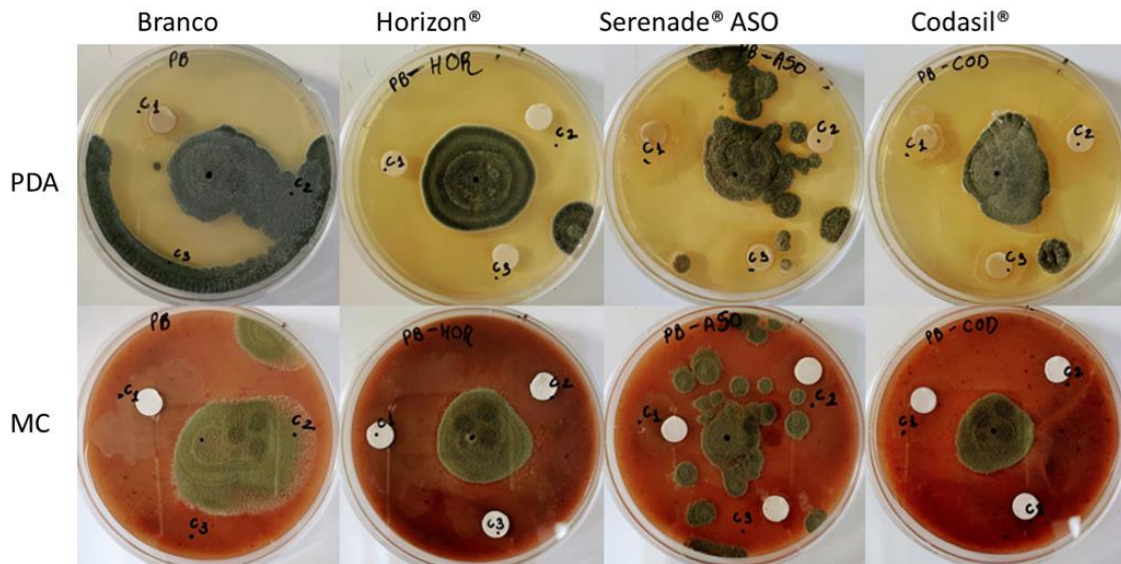


Figura 13 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra *Penicillium brevicompactum* P6/1-5

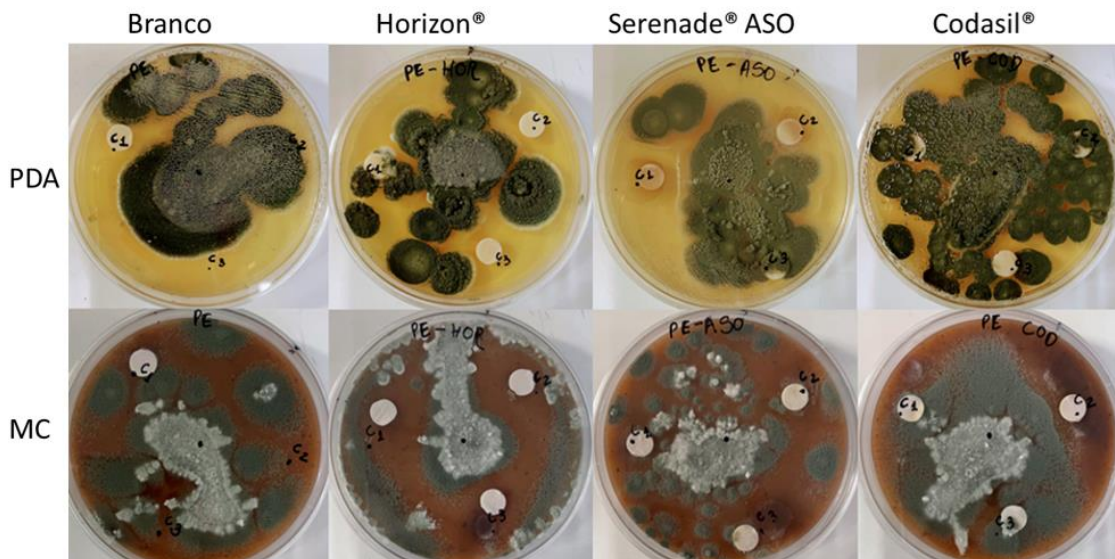


Figura 14 - Teste preliminar de inibição com agentes comerciais contra *Penicillium expansum* P2/3-3

4.2 Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais

No segundo teste efetuado, utilizou-se os agentes isolados das placas citadas no item 3.3. Para os isolados de *G. smithogilvyi* usados neste ensaio (UTAD3 e UTAD20), os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 15** e **Figura 16**. Em geral os tratamentos com a utilização de BCA1 e BCA3 exerceram um controle satisfatório dos patógenos citados, quando em comparação com o controle (branco) e com os agentes

comerciais. O crescimento destas bactérias foi bastante rápido, o que indicia uma boa adaptação à matriz. Esta é uma característica importante no momento de selecionar um potencial agente de biocontrolo. Pelo contrário, a levedura BCA5 não se revelou capaz de controlar o crescimento do patógeno. Nesta etapa as contaminações conseguiram ser controladas, pois substitui-se o método de inoculação aplicado, o que forneceu melhores resultados, e mostrou-se mais eficiente e de maior facilidade para análise visual e obtenção de conclusões importantes para as fases seguintes do trabalho.

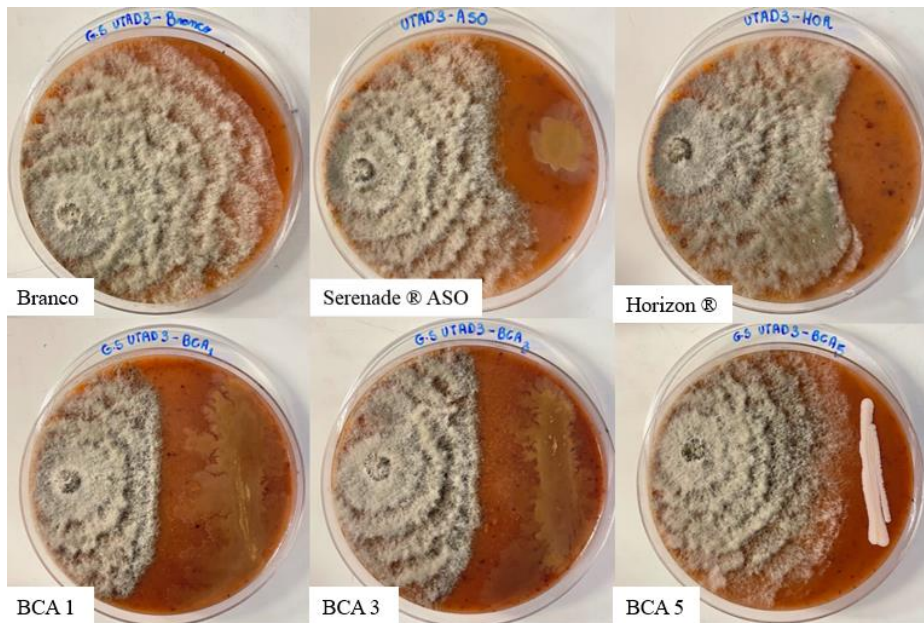


Figura 15 - Teste de inibição com agentes biológicos não comerciais contra *Gnomoniopsis smithogilvyi* UTAD3

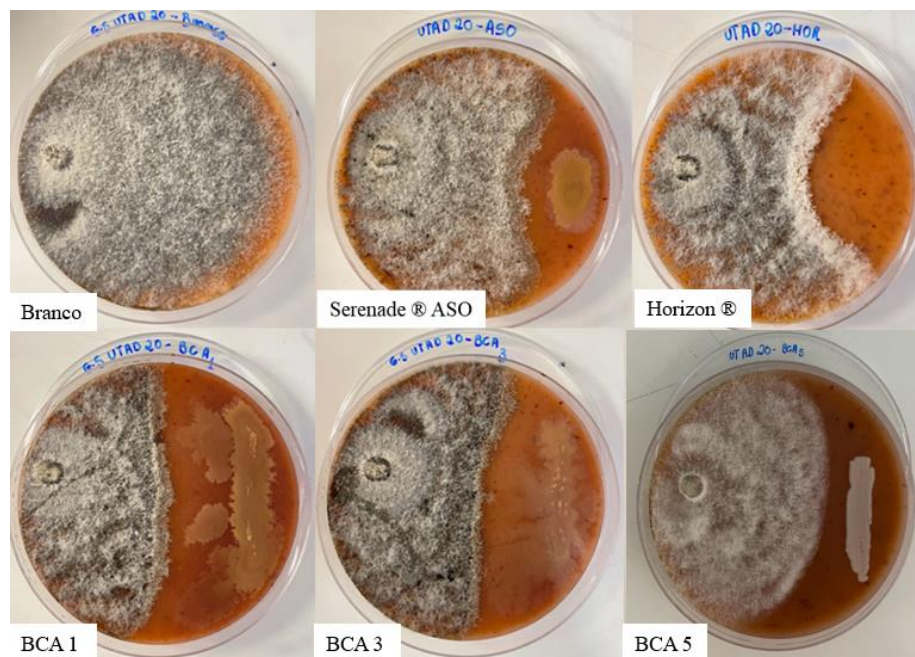


Figura 16 – Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra *Gnomoniopsis smithogilyvi* UTAD20

Os resultados dos testes com os fungos *P. expansum* P2/3-3 e *Trichoderma viridescens* P8/4-6 estão apresentados na **Figura 17** e na **Figura 18** respectivamente. Apesar da ocorrência de algumas contaminações pontuais, sem interferência aparente nos resultados, é possível observar que o agente de controle BCA5 apresentou os piores resultados, não conseguindo controlar o crescimento destes fungos. Sendo assim seu uso foi descartado nos testes seguintes.

Comparando o efeito dos agentes BCA1 e BCA3, o primeiro pareceu exercer um maior efeito de inibição, em particular contra o fungo *P. expansum*. O produto biológico comercial Serenade® ASO apresentou efeito de controle contra *T. viridescens*, sendo que o efeito contra *P. expansum* não é claro em resultado de contaminações. O produto químico Horizon® não apresentou controle satisfatório do crescimento destes fungos. Podemos concluir que o produto tebuconazol não apresenta controle satisfatório dos fungos citados, quando comparado aos agentes biológicos utilizados no estudo.

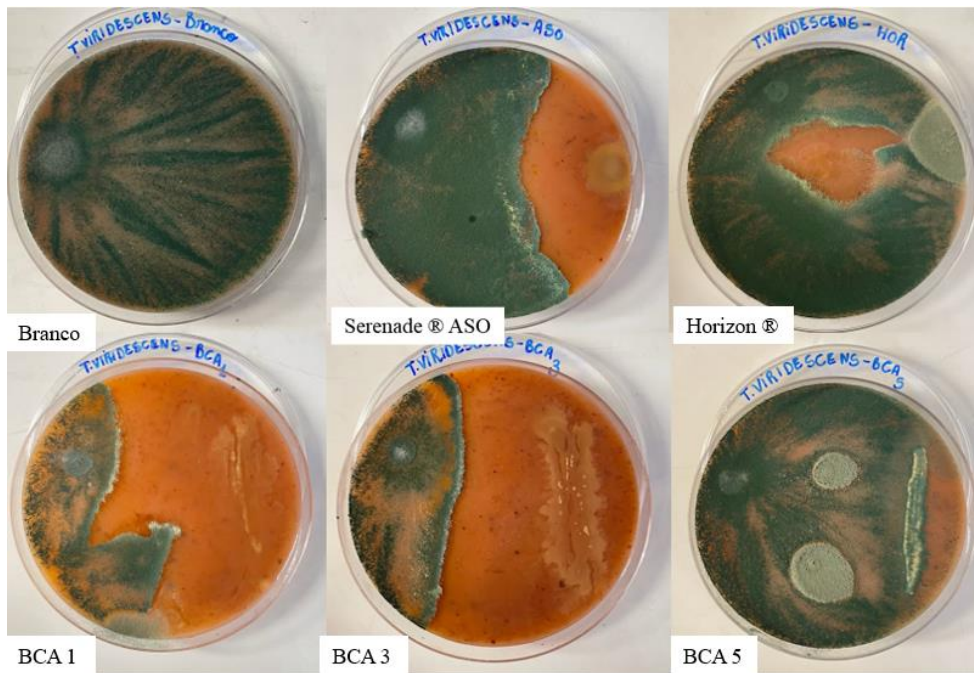


Figura 17 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra *Trichoderma viridescens* P8/4-6

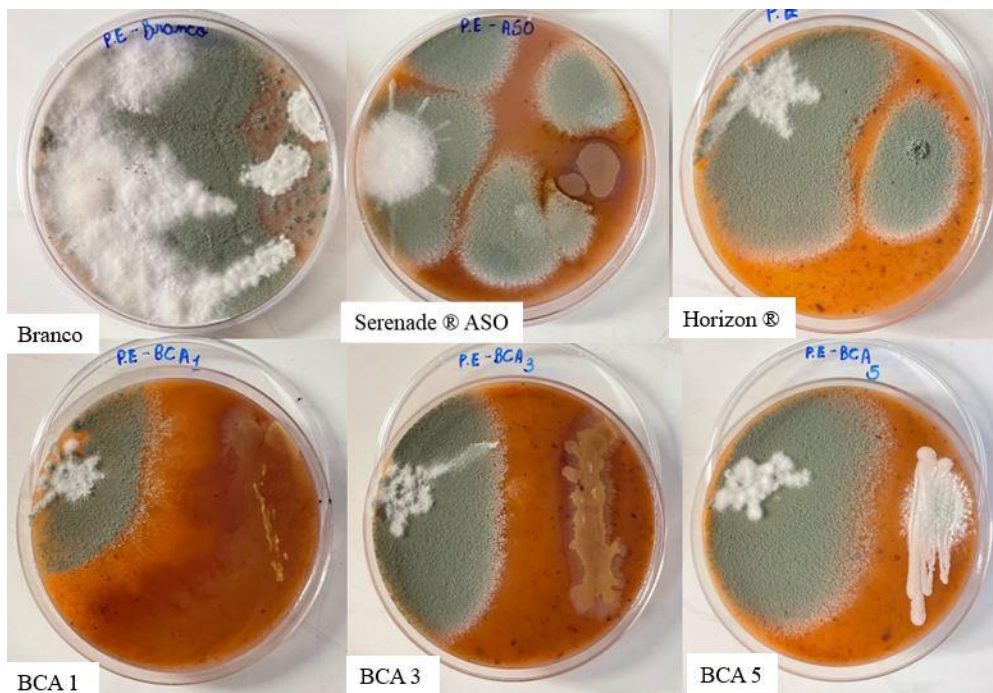


Figura 18 - Teste preliminar de inibição com agentes biológicos não comerciais contra *Penicillium expansum* P2/3-3

Com base nestes resultados, o ensaio foi repetido para *G. smithogilvyi* UTAD3 e UTAD20, para confirmação do efeito positivo dos agentes de biocontrole Serenade®ASO e BCA1, antes de realizar os estudos finais, onde seriam coletadas amostras para a realização de análises mais específicas.

Na **Figura 19** é possível comparar os resultados entre o controlo negativo (branco) e os tratamentos com os vários agentes. O efeito de controlo de BCA1, Serenade® ASO e Horizon® contra o fungo foi confirmado. Uma vez que os dois isolados de *G. smithogilvyi* mostraram reação semelhante aos diferentes tratamentos, as análises seguintes foram efetuadas apenas para o isolado UTAD20.

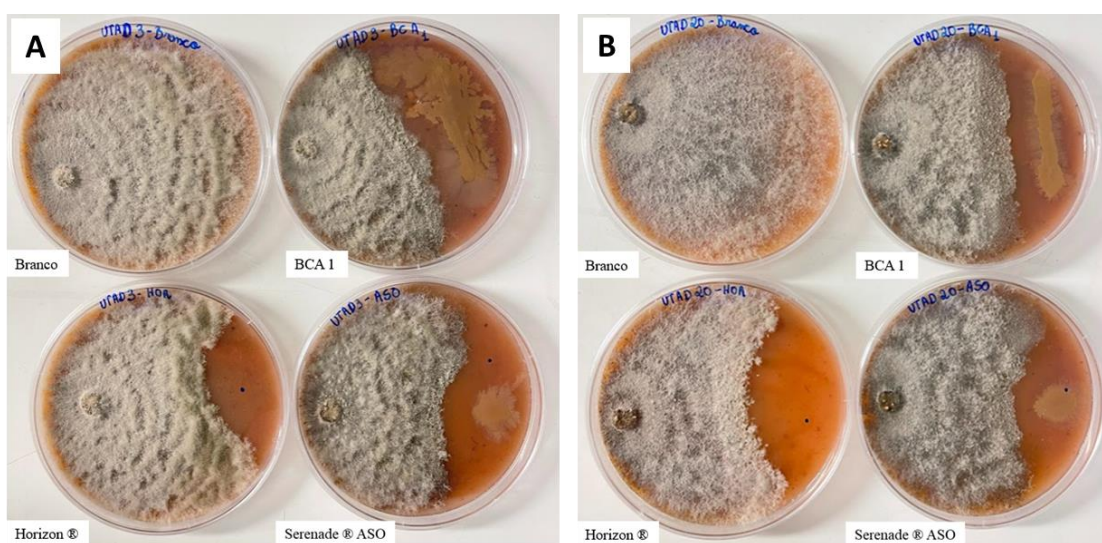


Figura 19 - Teste de confirmação do efeito de inibição dos agentes BCA1, Serenade®ASO e Horizon® contra o fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi*. A) isolado UTAD3; B) isolado UTAD20

4.3 Avaliação do potencial de controlo dos agentes biológicos Serenade® ASO e BCA1 contra *G. smithogilvyi*

A metodologia para realização do último teste está descrita no item 3.5. Mantiveram-se os tratamentos com Serenade® ASO e Horizon®, em concentração média e o BCA1 com enfoque apenas no fungo *G. smithogilvyi* UTAD 20.

4.3.1 Crescimento do fungo

Os resultados do crescimento fungico das placas de Petri, de cada tratamento após os 8 dias de incubação podem ser observados na **Figura 20**.

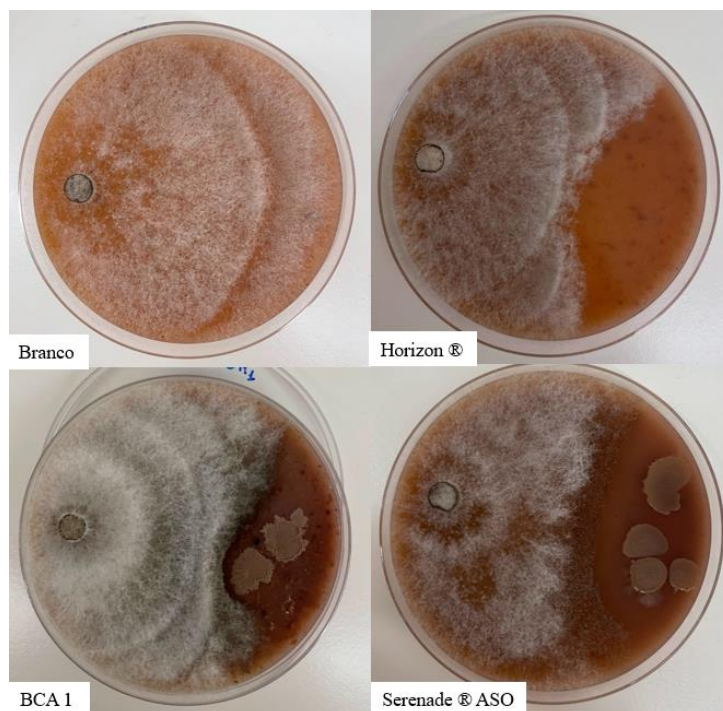


Figura 20 – Teste de inibição dos agentes Horizon®, Serenade® ASO, e BCA1 contra *G. smithogilvyi* UTAD20.

O crescimento do fungo durante os cinco primeiros dias foi muito próximo em todos os tratamentos, porém nos tratamentos BCA1, Serenade® ASO e Horizon®, começa a verificar-se inibição do crescimento do fungo após o sexto dia, momento a partir do qual o crescimento diminuiu significativamente, quando comparado ao tratamento em Branco.

O halo de inibição, ou seja, a zona de contato onde há a maior proximidade entre o fungo e o tratamento foi medida ao final de 8 dias de incubação. Os resultados dessa medição podem ser observados na **Figura 21**. Neste gráfico observamos que o produto químico Horizon® apresentou a maior inibição no crescimento do fungo, ou seja, o crescimento do fungo foi significativamente menor do que comparado aos outros tratamentos, seguido do agente comercial Serenade® ASO, e por último BCA1, com menor efeito inibitório.

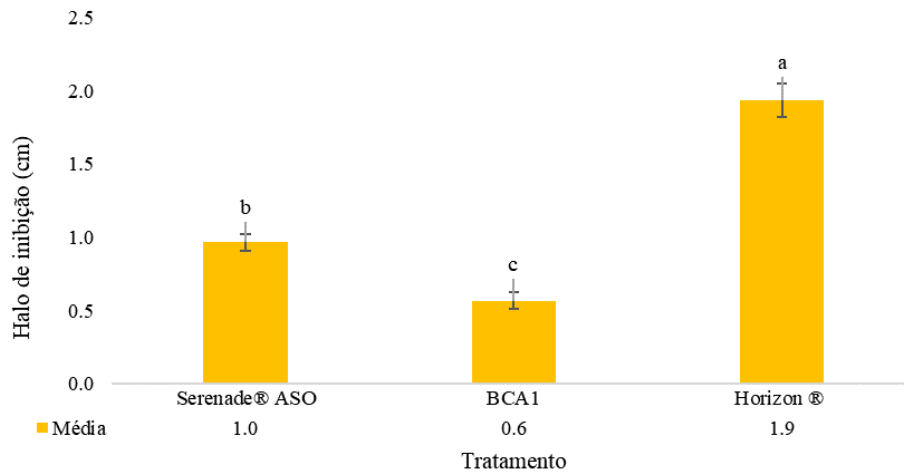


Figura 21 - Média do halo de inibição entre o fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi* UTAD 20, e cada tratamento, ao fim dos 8 dias. (Nota: letras diferentes significam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Tukey, $p < 0.05$).

Além da medição do efeito de inibição dos agentes no crescimento do fungo, foi também avaliado o efeito sobre o desenvolvimento celular do fungo. A **Figura 22**, **Figura 23**, **Figura 24** e **Figura 25** são as observações feitas a lupa do fungo sem tratamento (branco), tratamento químico com o produto Horizon®, e a zona de contacto entre o fungo com os agentes Serenade® ASO e BCA1, respetivamente.

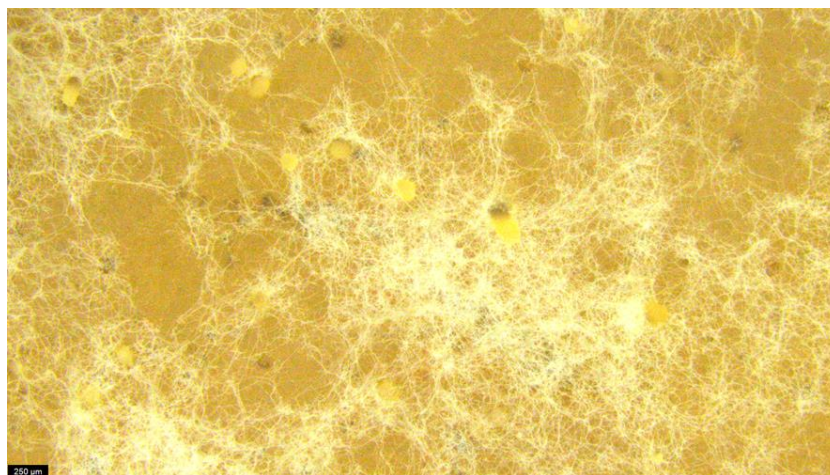


Figura 22 - Observação à lupa do fungo *G. smithogilvyi* UTAD 20 (controlo). A barra negra representa 250 μm .

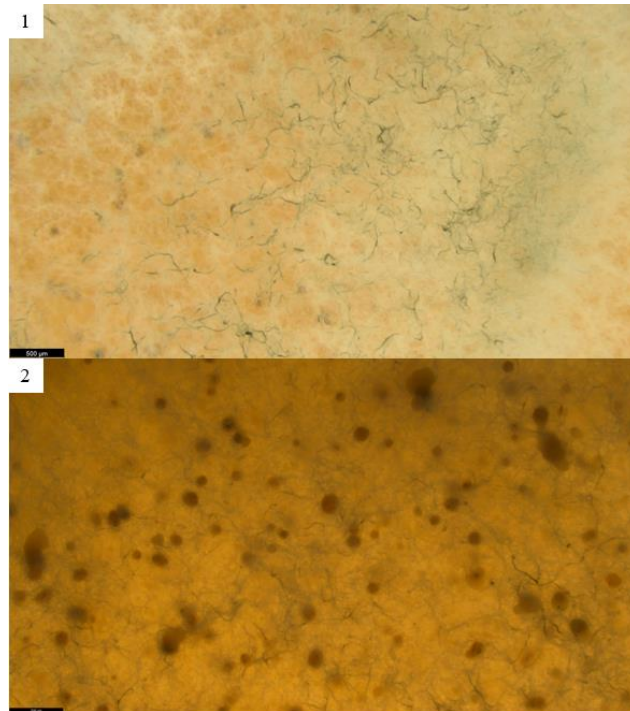


Figura 23 - Observação à lupa da zona de contacto entre Horizon® e *G. smithogilvyi* UTAD20. (1) Micélio; (2) bolsa de esporos. A barra negra representa 500 µm.

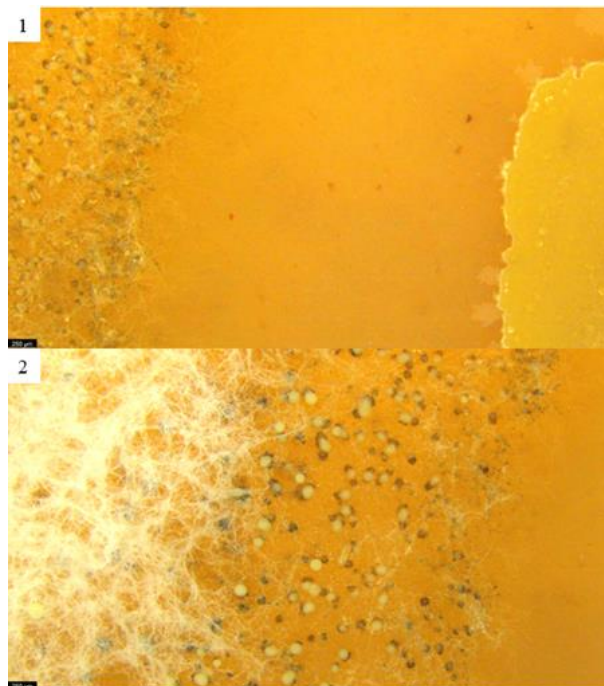


Figura 24 - Observação à lupa da zona de contacto entre Serenade® ASO e *G. smithogilvyi* UTAD 20 com menor (1) e maior (2) ampliação. A barra negra representa 250 µm.

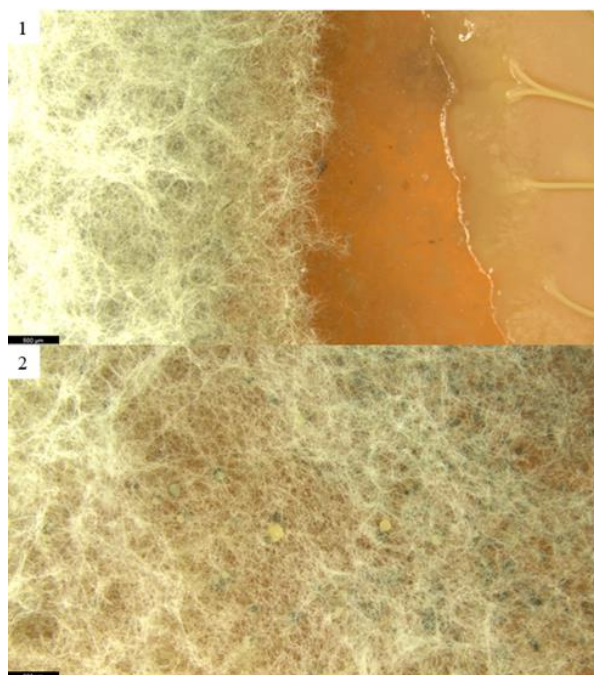


Figura 25 - Observação à lupa da zona de contacto entre BCA1 e *G. smithogilvyi* UTAD20. (1) zona de contacto; (2) micélio. A barra negra representa 500 μm .

Um fato que pode ser observado nas figuras citadas acima é o comportamento micelial do fungo. Nas zonas de contato entre *G. smithogilvyi* UTAD 20 e os tratamentos com Serenade® ASO e BCA1, o fungo apresentou visivelmente um crescimento micelial muito diferente do controle negativo (branco). Suas bordas ficaram escurecidas, o que pode ser devido ao estresse sofrido, influenciando na produção de estruturas de resistência.

Na zona de proximidade entre o fungo e Serenade® ASO é possível ver que a região escurecida apresenta formação de grande número de bolsas de esporos (conidiomata). Por ser a região de maior proximidade com o agente de controle, o stress ocasionado faz com que a reação do fungo seja produzir mecanismos de defesa, formando mais bolsas de esporos e estruturas de resistência. No entanto, no tratamento correspondente ao agente de biocontrole BCA1, é visível a formação de mais micélio e menos bolsas de esporos. Segundo Possamai (2020), comparando o crescimento fungo nas placas contendo o meio de cultura MC, a diferentes temperaturas de incubação, temperaturas mais elevadas estimularam uma maior produção de esporos pelo fungo. Este fator confirma a sua capacidade de adaptação as condições climáticas e aos frutos de castanha, tornando-o um fungo ainda mais agressivo, pois aumenta sua infectividade e desenvolvimento. No presente estudo, aparentemente os diferentes agentes de controle

têm sobre o fungo efeitos diferentes, uma vez que o fungo parece desenvolver crescimento diferente.

Após observação na lupa, foi recolhido uma pequena quantidade de micélio, das zonas de contato entre o agente de controlo e o fungo, as quais foram observadas com auxílio do microscópio.

Na **Figura 26** observa-se em ampliação de 100x a estrutura do micélio do tratamento em branco, em comparação com as estruturas produzidas pelo micélio recolhido da zona de contato entre o fungo e os tratamentos, Horizon®, Serenade® ASO e BCA1.

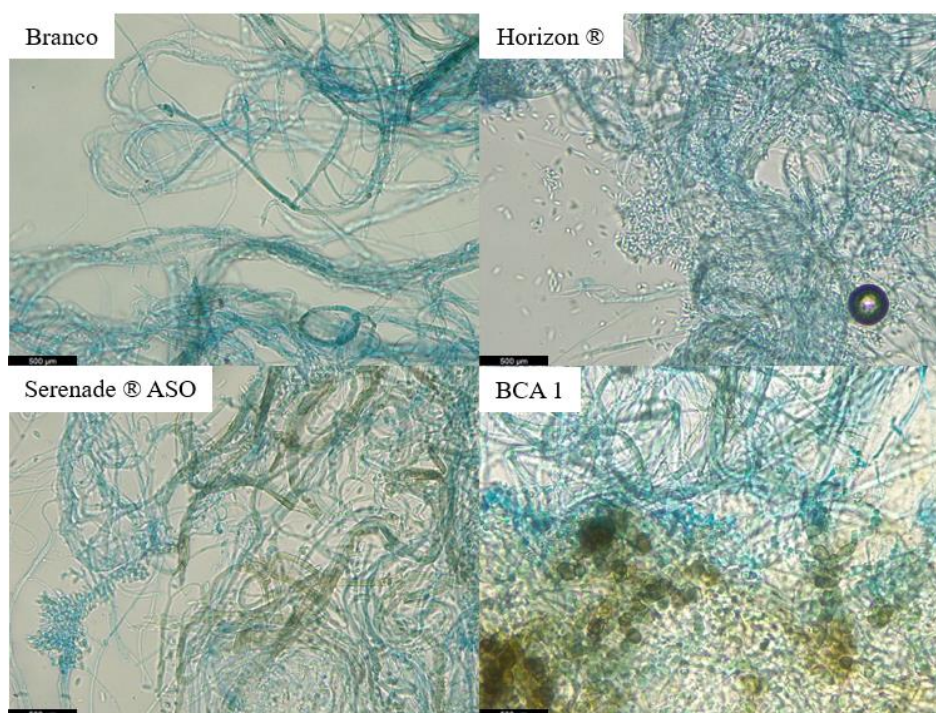


Figura 26 - Fotografia de microscópio contendo micélio do fungo *Gnomoniopsis smithogilvyi* do tratamento em branco, e micélio da zona de contacto entre o fungo e os tratamentos Horizon®, Serenade® ASO e BCA1 em ampliação de 100X e escala de 500 µm.

Pode-se observar e confirmar como dito nas figuras anteriores, um crescimento micelial muito diferente nos tratamentos utilizando-se agentes de controlo biológico. Pode-se observar a produção de estruturas maiores, e diferentes, e visualizar as bolsas contendo muitos esporos, as quais foram descritas anteriormente. Estas bolsas de esporos (conidiomata) são produzidas pelo fungo a fim de promover a disseminação de esporos, e então maior propagação e reprodução no ambiente.

Não é conhecido qual composto presente nos tratamentos de controlo biológico que causa este crescimento diferenciado. Porém sabemos que este fato se deve a condição de stress do fungo em diante de tentar resistir aos efeitos de controlo do agente.

4.3.2 Análise metabolómica

A metabolómica é o estudo científico de processos químicos envolvendo metabólitos, é uma tecnologia orientada para a obtenção de uma visão geral compreensiva, qualitativa e detalhada dos metabólitos presentes em um organismo. Os experimentos deste tipo de análise fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional. Além disso esta técnica engloba diversas tecnologias analíticas, que necessitam ser cuidadosamente selecionadas, de acordo com os metabólitos e a via metabólica de interesse, ou com a questão biológica a ser respondida (Canuto et al., 2018). No presente estudo, a análise de metabólitos secundários produzidos pelo fungo, ajudam a compreender qual o efeito dos diferentes agentes de controlo no metabolismo secundário do fungo, nomeadamente na ativação ou inibição da produção de metabólitos secundários em resposta a diferentes condições de stress.

Com base nos resultados da análise metabolómica, detectaram-se no total 8 metabólitos os quais foram quantificados e identificados como sendo: Brevianamida F, Cyclo(L-Pro-L-Tyr), Cyclo(L-Pro-L-Val), Integracina A, Integracina B, Ácido Kójico, Diplodiatoxina e ácido 3-Nitropropionico.

Nas figuras abaixo são apresentados os valores médios de cada metabolito detetado para cada tratamento, por ng/g de amostra, para o conjunto micélio e meio de cultura da zona de contacto do fungo com o agente de controlo.

A Brevianamida F, também conhecida como ciclo-(L- Trp -L- Pro), pertence a uma classe de produtos naturais 2,5-dicetopiperazinas. É o membro mais simples e precursor biossintético de uma grande família de triptofano-prolina 2,5-dicetopiperazinas biologicamente ativas produzidas por fungos *Aspergillus* sp. Foi isolada de *Aspergillus fumigatus* e também já foi isolada da bactéria *Streptomyces* sp (Bojarska et al., 2021).

Na **Figura 27** observamos que este composto é encontrado em maior quantidade no MC do que nas restantes amostras. Houve diferença significativa entre o MC e os

demais tratamentos ($p < 0,05$), porém os demais tratamentos não diferiram entre si. Não é conhecida a ocorrência natural deste composto na castanha, pelo que a sua riqueza no MC poderá indiciar contaminação microbiana prévia das castanhas usadas para a preparação do MC. Poderá ter ocorrido degradação do composto quando na presença do fungo em estudo. No entanto, não foram encontradas na literatura justificativas que permitam suportar estas conclusões.

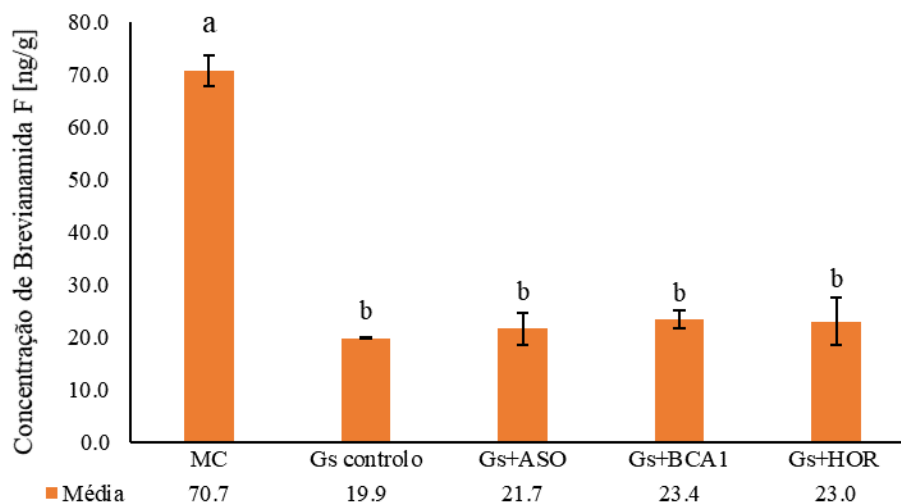


Figura 27 - Média concentração de Brevianamida F (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$). MC: meio de castanha; Gs controlo: fungo em cultura pura; Gs+ASO, Gs+BCA1 e Gs+HOR: fungo em confronto com os respetivos agentes de controlo)

Cyclo(L-pro-L-tyr), também denominado maculosim, é um peptídeo cíclico homodético que é um dipeptídeo composto de L-prolina e L-tirosina unidos por ligações peptídicas, uma pirrolopirazina e membro dos fenóis. Deriva de uma L-prolina e uma L-tirosina. É encontrado em organismos como *Streptomyces* spp; (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maculosin>).

Este composto foi detetado apenas no MC (**Figura 28**), não sendo detetado em nenhum dos tratamentos. A razão para ser encontrado apenas em meio de cultura não foi encontrada na literatura.

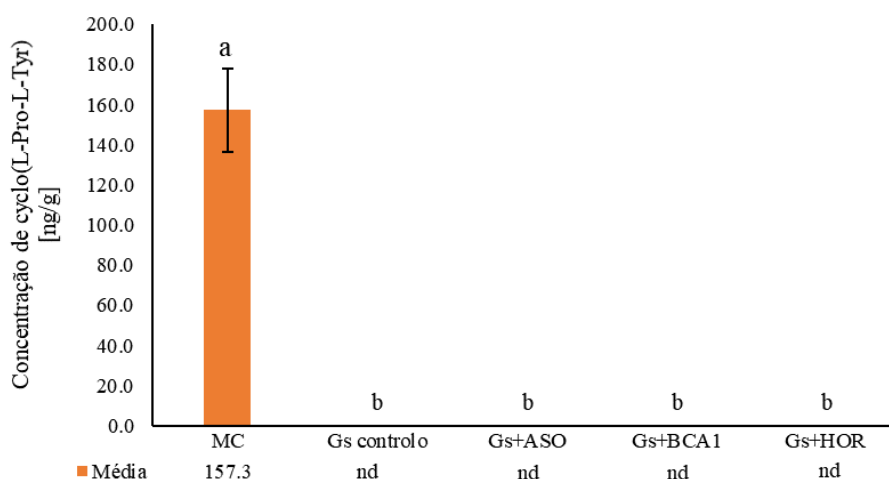


Figura 28 – Média concentração de Cyclo(L-Pro-L-Tyr) em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$) nd: não detetado

Cyclo(L-Pro-L-Val) também é uma dicetopiperazina, formada pela fusão de valina e prolina, relatada como metabólito secundário de fungos e bactérias. Já foi isolada da esponja marinha *T. ignis*, da bactéria *B. pumilus* e no fungo *A. fumigatus* (<https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/cyclo-l-pro-l-val-cay27961-25>).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, é capaz de ativar N-acilmosserina lactonas (AHLs), e também ativar ou antagonizar outros sistemas de detecção de quórum baseados em LuxR (<https://www.benchchem.com/product/b057749>).

Embora seu modo de ação não seja conhecido, sua atividade sugere a existência de crosstalk entre os sistemas de sinalização bacteriana (<https://toku-e.com/cyclo-l-pro-l-val/>).

Como pode ser observado na **Figura 29** e à semelhança do composto anterior, este metabólito foi encontrado em grande concentração no MC. O tratamento Gs+HOR também apresentou uma pequena quantidade, porém sua produção neste caso também ainda é desconhecida. Nos tratamentos restantes, ou seja, em Gs controlo, Gs+ASO e Gs+ BCA1 não se detectou esta substância.

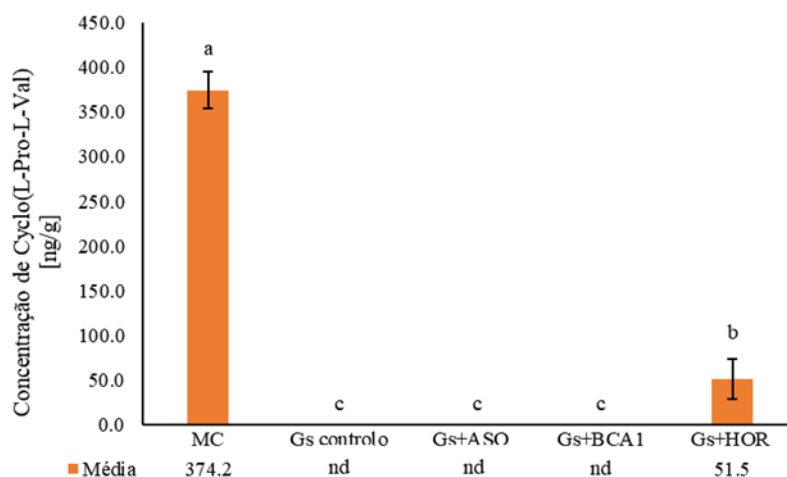


Figura 29 - Média concentração de Cyclo(L-Pro-L-Val) em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$). nd: não detectado

Os dipeptídeos cíclicos, também conhecidos como dicetopiperazinas (DKP), são as formas cíclicas mais simples de peptídeos amplamente difundidos na natureza, e possuem ampla diversidade estrutural e biofuncional. DKPs, especialmente as que contêm prolina, devido às suas características únicas, como, entre outras, conformação extra rígida, alta resistência à degradação enzimática, aumento da permeabilidade celular e capacidade expansível de se ligar a diversos alvos com melhor afinidade, surgiram nos últimos anos como plataformas biológicas para grandes descobertas (Bojarska et al., 2021).

Muitas DKPs à base de prolina foram caracterizados para indicações antifúngicas, entre elas, o composto Cyclo(L-Pro-L-Tyr) foi constatado por inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (Kumar & Nambisan, 2014). Os mesmos autores também relataram o isolamento de DKPs contendo prolina, entre elas Cyclo(L-Pro-L-Tyr), de um filtrado de cultura de uma estirpe bacteriana de *Bacillus*, associada a um nematoide entomopatogênico, os quais demonstraram atividade significativamente maior do que o fungicida comercial bavistina contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Pencillium expansum*.

Sua interação neste estudo necessita de análises aprofundadas, pois este composto mostrou apresentar amplo espectro de atividade antimicrobiana, o que significa que esses compostos devem ser estudados pois podem ter potencial para uso

como agentes de biocontrole.

O ácido kójico é um produto metabólico fúngico produzido por algumas espécies de *Aspergillus*, durante a fermentação aeróbia, utilizando carboidratos como fonte de energia. É um ácido orgânico derivado de pirona que inibe a tirosinase e, portanto, é um inibidor da formação de pigmentos em tecidos vegetais e animais. Além disso este ácido pode ser um inibidor do crescimento de bactérias, fungos e multiplicação de vírus (Siddiquee, 2018). Na **Figura 30**, podemos observar que todos os tratamentos apresentaram valores elevados de ácido kójico, sendo que o tratamento Gs+controle apresentou diferença significativa relativamente ao tratamento Gs+HOR ($p=0.042$). Os outros tratamentos não diferiram entre si. A justificativa para a sua presença seria que este composto está presente em muitos organismos na natureza, e por isso pode ser encontrado nas amostras.

O esperado atualmente é que vários novos metabólitos secundários sejam descobertos com base no gênero *Aspergillus*. Porém, os objetivos mais difíceis quando falamos de metabólitos é relacionar e determinar quais são as condições físicas e ambientais que levam à ativação de genes específicos associados à transcrição e tradução dos diversos metabolismos secundários que uma espécie é capaz de produzir (Siddiquee, 2018), e qual o papel destes metabólitos na natureza.

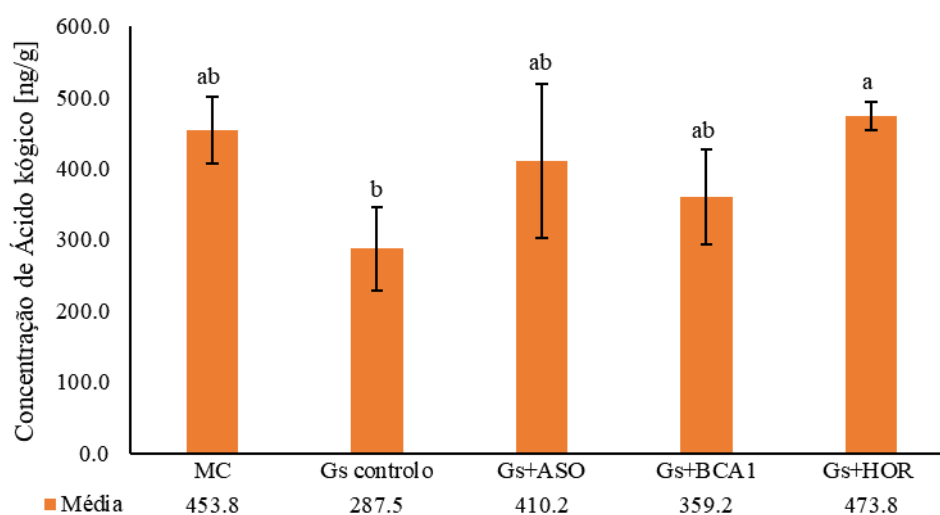


Figura 30 - Média concentração de Ácido kójico em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p>0.05$).

A Diplodiatoxina é um composto produzido pelo fungo *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton, (syn. *Dyplodia maydis*). Este fungo é um dos principais agentes causadores de podridão na cultura do milho pelo mundo. A diplodiatoxina pode ser encontrada e isolada em restos culturais apodrecidos de milho. Este metabolito está associado a uma neurotoxicose, diplodiose, um distúrbio nervoso que acontece em bovinos e ovinos de pastagem quando estes se alimentam de resíduos de cultura de milho infectados (Rogers et al., 2014). O fungo que produz este composto é da mesma família do fungo *G. smithogilvyi* (família Gnomoniaceae). Sendo assim é provável que este fungo seja capaz de produzir esta toxina.

Na **Figura 31**, podemos observar a média das quantidades de composto presente em cada tratamento. O tratamento de controlo, ou seja, apenas de MC sem fungo, apresentou quantidades residuais deste composto, significativamente inferiores às amostras contendo fungo.

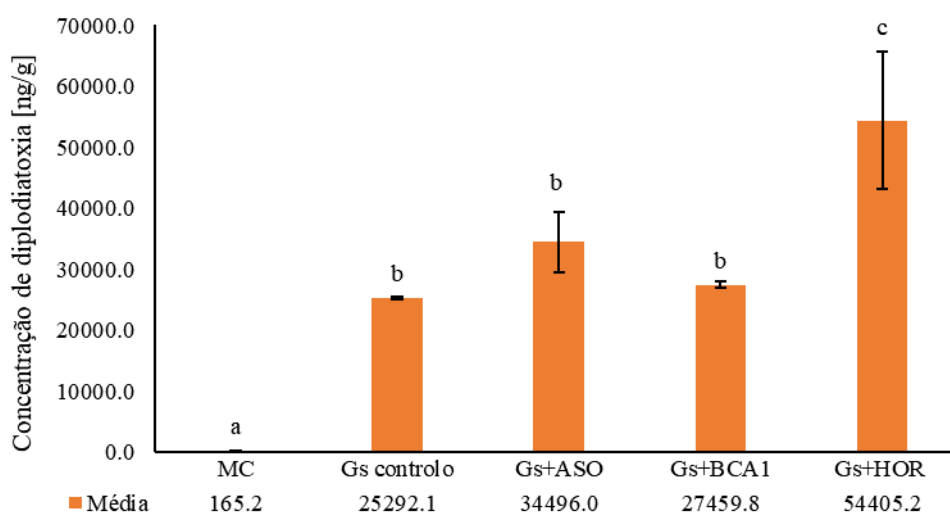


Figura 31 - Média concentração de Diplodiatoxina em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$)

Na amostra somente de meio de castanha quantificou-se apenas 165 ng/g em média. Esta toxina pode estar presente no MC pois a probabilidade de as castanhas usadas no estudo conterem alguns resquícios de contaminação com o fungo em estudo é grande. Nas restantes amostras, em que o MC foi contaminado com o fungo, percebemos uma grande quantidade de composto produzido, o que indica que a presença

do fungo é o responsável pela produção desta toxina. Este é, do nosso conhecimento, o primeiro estudo que associa o fungo *G. smithogilvyi* à produção desta importante toxina, o que permite concluir que este fungo é não só responsável por elevadas perdas na produção de castanha, como pode pôr em causa a segurança do consumidor de castanhas contaminadas.

Pode verificar-se ainda que o produto Horizon® estimula de forma significativa a produção da toxina pelo fungo, quando comparado com os tratamentos com os agentes biológicos. Podemos concluir que os agentes biológicos são, na perspectiva da segurança do consumidor, mais favoráveis do que o agente químico tradicionalmente usado no controlo desta podridão.

O ácido 3-nitropropiónico, também conhecido como 3-NPA, é retratado como um metabolito presente em plantas. Para alguns mamíferos, este composto é extremamente neurotóxico, e possui atividade anti-fitopatógeno. Essa substância pode ser produzida pelos fungos *Phomopsis*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e desempenha um papel significativo na defesa de algumas plantas contra herbívoros (Flores et al. 2013).

Chomcheon et al, (2005) referem que este ácido foi encontrado em extratos de diversas linhagens de fungos endofíticos. Neste estudo foi isolado de caldo de fungo do género *Phomopsis* e exibiu atividade antimicobacteriana potente. Além disto, estes autores também verificaram que os endófitos produzem altos níveis deste composto e, portanto, este pode ser acumulado em certas plantas associadas a estes endófitos, ou seja, a partir da interação entre endófito e planta.

Na **Figura 32**, podemos observar novamente que a menor quantidade detectada foi para o tratamento contendo meio de cultura MC. O tratamento com Horizon® apresenta a mais elevada concentração de 3-NPA, embora não seja significativamente diferente das amostras Controlo e Serenade® ASO. Por seu lado, o agente BCA1 é aquele que mais reduz a produção do metabolito, de forma significativa relativamente ao Horizon®, mas não relativamente ao Controlo e ao Serenade® ASO.

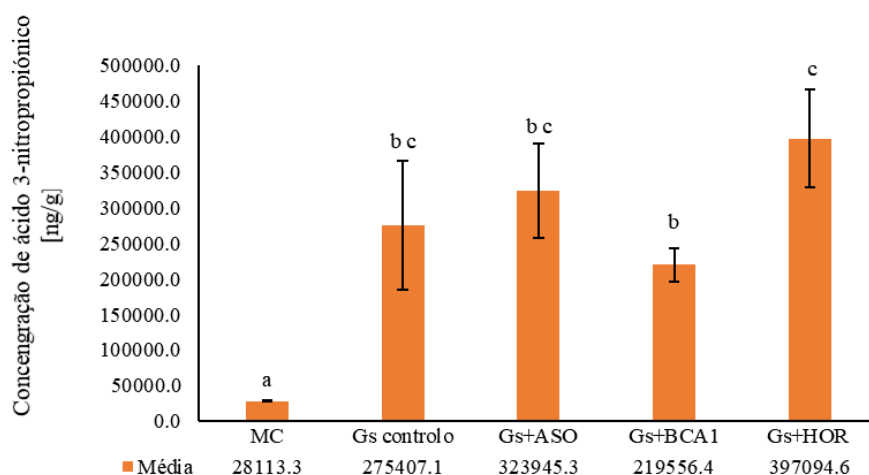


Figura 32 - Média concentração de Ácido 3-nitropropiónico em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$)

Nas **Figura 33** e **Figura 34**, são apresentados os resultados obtidos para os metabolitos Integracina A e Integracina B, respectivamente. No tratamento de controlo contendo apenas MC, ou seja, o único sem a inoculação do fungo, não se detectou a presença deste composto. Sendo assim, a sua interação e importância neste estudo é desconhecida. Em qualquer dos casos, pode verificar-se que o tratamento com HOR reduz de forma significativa a produção destes metabolitos, quando comparado com o tratamento de controlo. Sendo assim, é provável que estes sejam compostos produzidos pelo fungo, visto que o MC foi o único onde não foram detetados estes metabolitos. Não foram encontradas informações sobre os compostos Integracina A e Integracina B, relacionados com a agricultura. No entanto, um estudo recente reconhece a produção destes metabolitos pelo fungo endofítico *Cytospora* sp., verificando forte efeito citotóxico destes metabolitos contra as linhas celulares cancerígenas humanas HepG2 (Wei et al., 2020).

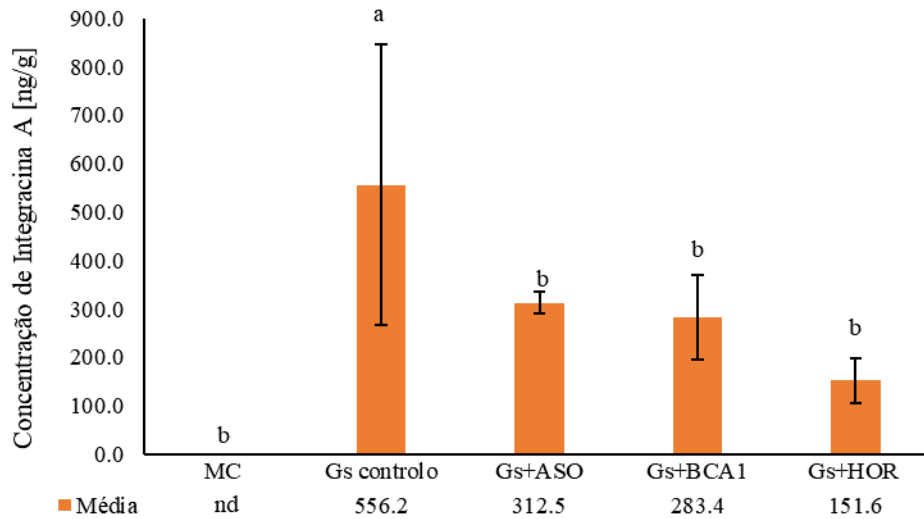


Figura 33 - Média concentração de Integracina A em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$)

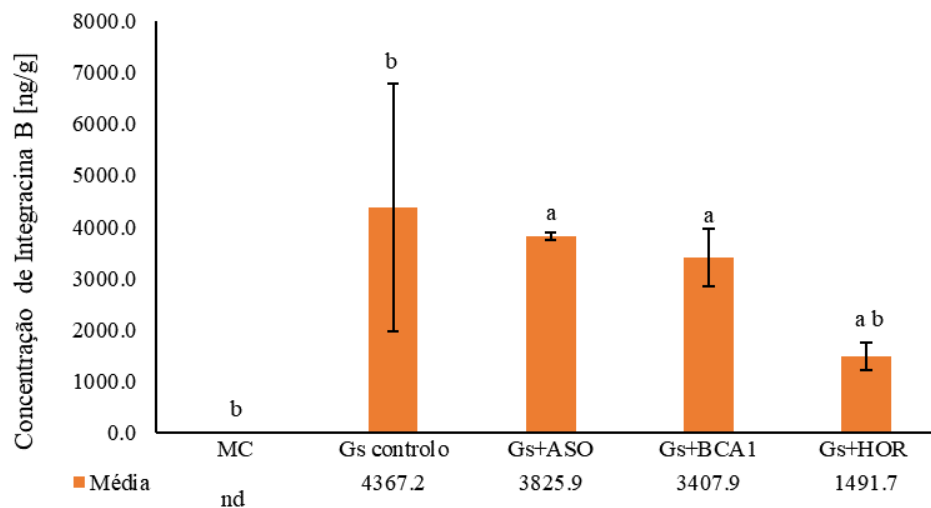


Figura 34 - Média concentração de Integracina B em (ng/g) em cada tratamento. Nota: letras iguais significam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$)

5 CONCLUSÕES

A qualidade no armazenamento pós colheita de castanhas, é um problema frequente na região de Trás os Montes, sendo assim medidas para reduzir o problema são necessárias. Neste sentido, o objetivo principal deste estudo foi analisar *in vitro* a atividade de um fungicida biológico comercial e de bactérias isoladas em laboratório no controlo dos agentes causais das podridões da castanha, em particular a causada pelo patógeno emergente *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

A comparação entre agentes de biocontrolo e entre tratamentos químicos já conhecidos e aplicados neste estudo, foi necessária para observar se os tratamentos alternativos exercem um controle satisfatório do patógeno, quando comparados aos existentes no mercado. Analisou-se *in vitro* a inibição contra fungos, de fungicidas comerciais, biológicos e químicos. Levando em conta a importância da utilização de organismos biológicos no controle de doenças, em substituição aos produtos químicos que causam malefícios a saúde e ao meio ambiente, avaliou-se também o potencial de uma bactéria isolada em laboratório, denominada BCA1.

Os resultados obtidos com a bactéria BCA1, identificada como *B. amyloloquefaciens*, mostraram visualmente uma diminuição muito satisfatória, e, portanto, prosseguiu-se com a avaliação de seus potenciais mecanismos de ação sobre o fungo.

O agente químico Horizon® apresentou o maior halo de inibição e sendo assim controlou mais o crescimento do fungo. Porém os agentes biológicos Serenade® ASO e BCA1, causaram um crescimento e desenvolvimento celular diferente no fungo *G. smithogilvyi*.

A análise dos metabolitos secundários produzidos pelo fungo permitiu determinar que *G. smithogilvyi* produz o composto diplodiatoxina. Por ser uma toxina que causa problemas para a saúde humana e animal, o conhecimento da sua presença em frutos de castanha relacionada ao fungo, é muito importante, pois assim é reforçada a importância do controlo deste patógeno. Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relaciona este fungo com a produção desta toxina. Os metabolitos secundários produzidos por este fungo são ainda desconhecidos por diversos motivos, entre eles a emergência do patógeno, o qual foi descoberto recentemente e ainda está

sendo estudado por pesquisadores.

De modo geral, os testes de biocontrole demonstraram que todos os tratamentos provocaram redução do crescimento dos fungos testados. Como os testes realizados foram todos *in vitro*, necessitam de aplicação prática, em escala industrial. Visto que a abordagem utilizada nesta pesquisa é uma das pioneiras desenvolvidas na região de Trás os Montes, em Portugal, a carências de algumas informações devem ser investigadas e abordadas em estudos futuros.

6 REFERÊNCIAS

- Aguiar, C., & Tereso, J. (2021). Sistemática, distribuição, ecologia e história do castanheiro em Portugal. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/25021/1/Carlos%20%26%20Joa%C3o%20Tereso.pdf>
- Águsti, M. (2010). Fruticultura (2a ed.). Universidad Politécnica.
- Andrade, M. J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J. J., Jespersen, L. (2014). Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.004>
- Álvarez, M., Delgado, J., Núñez, F., Cebrián, E., Andrade, M.J., 2021. Proteomic analyses reveal mechanisms of action of biocontrol agents on ochratoxin A repression in *Penicillium nordicum*. *Food Control*, 129, 108232. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108232>
- Álvarez, M., Delgado, J., Núñez, F., Roncero, E., Andrade, M. J. (2022). Proteomic approach to unveil the ochratoxin A repression by *Debaryomyces hansenii* and rosemary on *Penicillium nordicum* during dry-cured fermented sausages ripening. *Food Control*, 137, 108695. doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108695.
- Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158, 112–121.
- Barreira, J. C. M., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Antonio, A. L., Kaluska, I., Botelho, M. L., Bento, A., & Oliveira, M. B. P. P. (2013). Effects of gamma and electron beam irradiations on the triacylglycerol profile of fresh and stored *Castanea sativa* Miller samples. *Postharvest Biology and Technology*, 81, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.02.005>
- Bojarska, J., Mieczkowski, A., Ziora, Z., Skwarczynski, M., Toth, I., Shalash, A. O., Parang, K., El-Mowafi, S. A., Mohammed, E. H. M., Elnagdy, S., Alkhazindar, M., & Wolf, W. M. (2021). Cyclic dipeptides: The biological and structural landscape with special focus on the anti-cancer proline-based scaffold. *Biomolecules*, 11(10), 1515. <https://doi.org/10.3390/BIOM11101515/S1>
- Botondi, R., Vailati, M., Bellincontro, A., Massantini, R., Forniti, R., & Mencarelli, F. (2009). Technological parameters of water curing affect postharvest physiology and storage of marrons (*Castanea sativa* Mill., Marrone fiorentino). *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 97–103. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2008.06.010>
- Bounos, G. (2001). Inventory of Chestnut Research, Germplasm and References. <https://www.fao.org/3/ad235e/ad235e00.htm>
- Canuto, G. A. B., Da Costa, J. L., Da Cruz, P. L. R., De Souza, A. R. L., Faccio, A. T., Klassen, A., Rodrigues, K. T., & Tavares, M. F. M. (2018). Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, 41(1), 75–91. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>
- Capelo, J. H. & Catry, F. X. (2007). A distribuição do castanheiro em Portugal (The distribution of chestnut in Portugal). <https://www.researchgate.net/publication/240615034>

- Carvalho, J. (2014). Métodos de luta alternativos contra a doença da tinta do castanheiro. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais, Universidade de Lisboa, 74 pp.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Isarangkul, D., & Kittakoop, P. (2005). 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? *Journal of Natural Products*, 68(7), 1103–1105. <https://doi.org/10.1021/NP050036A/ASSET/IMAGES/LARGE/NP050036AF1.JPEG>
- Conedera, M., Rigo, D. d, Krebs, P., & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species*. <https://doi.org/10.36684/30-2020-1-92-98>
- Costa, R., Ribeiro, C., Valdiviesso, T., & Afonso, S. (2008). Variedades de Castanha das Regiões Centro e Norte de Portugal. https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/variedades_castanha_norte_centro_portugal.pdf
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Shivas, R. G., Burgess, T. I., Decock, C. A., Dreyer, L. L., Granke, L. L., Guest, D. I., Hardy, G. E. S. J., Hausbeck, M. K., Hüberli, D., Jung, T., Koukol, O., Lennox, C. L., Liew, E. C. Y., Lombard, L., McTaggart, A. R., Pryke, J. S., Roets, F., ... Groenewald, J. Z. (2012). Fungal planet description sheets: 107-127. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, 138–182. <https://doi.org/10.3767/003158512X652633>
- Delgado, J., Núñez, F., Asensio, M. A., Owens, R. A. (2019). Quantitative proteomic profiling of ochratoxin A repression in *Penicillium nordicum* by protective cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108243>
- Donis-González, I. R., Fulbright, D. W., Ryser, E. T., & Guyer, D. (2010). Efficacy of postharvest treatments for reduction of molds and decay in fresh Michigan chestnuts. *Acta Horticulturae*, 866, 563–570. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2010.866.76ser>
- Donis-González, I. R., Guyer, D. E., & Fulbright, D. W. (2016). Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4514–4522. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7667>
- Driss, J. O. (2019). Chestnut rots: disease incidence and molecular identification of causal agents. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biotecnológica, Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal.
- Ekman, J. (2014). Improved postharvest management of chestnuts. Project report. Horticulture Innovation Australia Ltd, ISBN 0 7341 3461 4
- Gonçalves, B., Borges, O., Costa, H. S., Bennett, R., Santos, M., & Silva, A. P. (2010). Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, 122(1), 154–160. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.02.032>
- INE, 2021. Estatísticas Agrícolas 2020. Instituto Nacional de Estatística, Lisboa. ISSN 0079-4139
- Jermi, M., Conedera, M., Sieber, T. N., Sassella, A., Schärer, H., Jelmini, G., & Höhn,

- E. (2006). Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 877–885. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2428>
- Kumar, S. N., & Nambisan, B. (2014). Antifungal activity of diketopiperazines and stilbenes against plant pathogenic fungi in vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 741–754. <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0567-6/TABLES/5>
- Laranjo, J. (2013). A fileira da castanha em Portugal: uma fileira de oportunidades. *Agrotec Revista Técnico Científica Agrícola*, 2. <http://hdl.handle.net/10316.2/33570%0D>
- Laranjo, J., Ferreira Cardoso, J., Portela, E., & Abreu, C. G. (2007). Castanheiros. In *Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents*.
- Lione, G., Danti, R., Fernandez-Conradi, P., Ferreira-Cardoso, J. V., Lefort, F., Marques, G., Meyer, J. B., Prospero, S., Radócz, L., Robin, C., Turchetti, T., Vettraiño, A. M., & Gonthier, P. (2019). The emerging pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae*: the challenge posed by a versatile fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 671–685. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1597-2>
- Lione, G., Giordano, L., Sillo, F., Brescia, F., & Gonthier, P. (2021). Temporal and spatial propagule deposition patterns of the emerging fungal pathogen of chestnut *Gnomoniopsis castaneae* in orchards of north-western Italy. *Plant Pathology*, 70(9), 2016–2033. <https://doi.org/10.1111/PPA.13451>
- Maresi, G., Oliveira Longa, C. M., & Turchetti, T. (2013). Brown rot on nuts of *Castanea sativa* Mill: An emerging disease and its causal agent. *IForest*, 6(5), 294–301. <https://doi.org/10.3832/IFOR0952-006>
- Martins, A. A. A., & Lourenço, J. M. (2012). Carta dos solos e carta da aptidão da terra do nordeste de Portugal. 36.
- Mellano, M. G., Beccaro, G. L., Donno, D., Marinoni, D. T., Boccacci, P., Canterino, S., Cerutti, A. K., & Bounous, G. (2012). *Castanea* spp. biodiversity conservation: Collection and characterization of the genetic diversity of an endangered species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(8), 1727–1741. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9794-x>
- Moscetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Haff, R. P., Contini, M., & Massantini, R. (2014). Detection of Mold-Damaged Chestnuts by Near-Infrared Spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 83–90. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2014.02.009>
- Pasche, S., Calmin, G., Auderset, G., Crovadore, J., Pelleteret, P., Mauch-Mani, B., Barja, F., Paul, B., Jermini, M., & Lefort, F. (2016a). *Gnomoniopsis smithogilyvi* causes chestnut canker symptoms in *Castanea sativa* shoots in Switzerland. *Fungal Genetics and Biology*, 87, 9–21. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2016.01.002>
- Pasche, S., Crovadore, J., Pelleteret, P., Jermini, M., Mauch-Mani, B., Oszako, T. & Lefort, F. (2016b). Biological control of the latent pathogen *Gnomoniopsis smithogilyvi* in European chestnut grafting scions using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiology*, 75, 113–122. <https://doi.org/10.12657/DENBIO.075.011>
- Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 291–315.

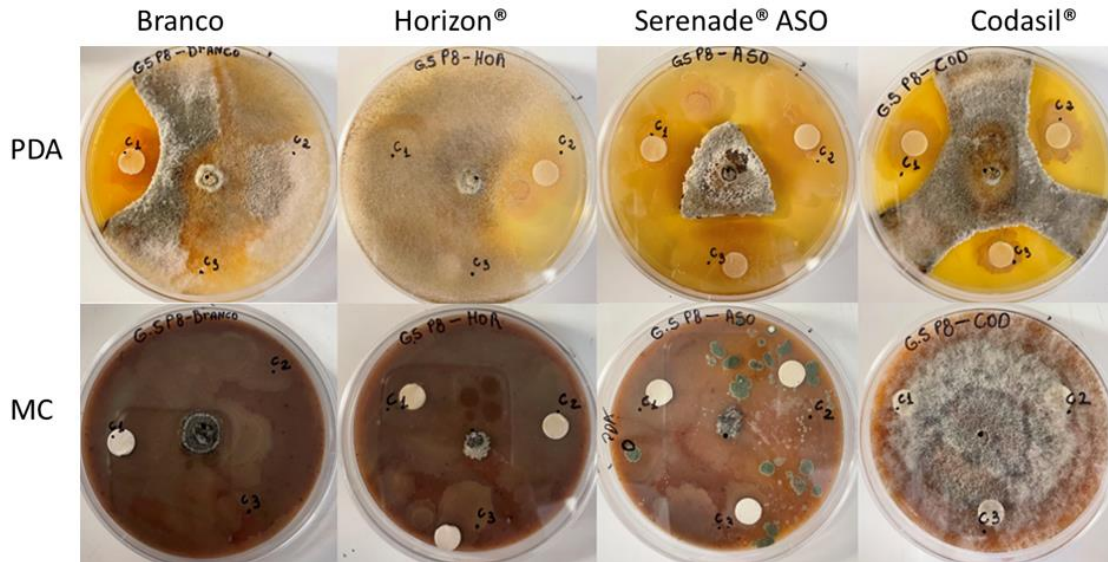
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080508-081831>

- Possamai, G. (2020). Podridão da castanha em Trás-os-Montes: caracterização morfológica, ecofisiológica e molecular do agente causal *Gnomoniopsis smithogilvyi*. Dissertação de mestrado em Agroecologia, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.
- Rai, M., & Dar, A. (2015). *Gnomoniopsis smithogilvyi*, a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/3/8>
- Ramalhosa, E., Antonio, A. L., & Bento, A. (2010). Conservação das castanha: o presente e o futuro. In 9a Feira Internacional Do Norte: Norça, Norpesca & Norcastanha. Bragança.
- Rodrigues P, 2010. Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialisation. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Braga, 329 pp.
- Rodrigues P, Venâncio A, Lima N, 2013. Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European Journal of Plant Pathology* 137: 197–209. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0233-4>
- Rogers, K. D., Cannistra, J. C., Gloer, J. B. & Wicklow, D. T. (2014). Diplodiatoxin, chaetoglobosins and diplonine associated with a field outbreak of *Stenocarpella* ear rot in Illinois', *Mycotoxin Research*, 30(2), 61–70. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0188-0>
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Varlese, R., Aliberti, A., Carpenito, S., Woo, S. L., Scala, F., & Lorito, M. (2016). New tools to improve the shelf life of chestnut fruit during storage. *Acta Horticulturae*, 1144, 309–315. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2016.1144.46>
- Shuttleworth, L. A., & Guest, D. I. (2017). The infection process of chestnut rot, an important disease caused by *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Gnomoniaceae, Diaporthales) in Oceania and Europe. *Australasian Plant Pathology*, 46(5), 397–405. <https://doi.org/10.1007/S13313-017-0502-3>
- Shuttleworth, L. A., Guest, D. I., & Walker, D. M. (2018). The fungus, the Code and the mysterious publication date: Why *Gnomoniopsis smithogilvyi* is still the correct name for the chestnut rot fungus. *IMA Fungus*, 9(2), 78–79. <https://doi.org/10.1007/BF03449443/METRICS>
- Shuttleworth, L. A., Liew, E. C. Y., & Guest, D. I. (2012). *Gnomoniopsis smithogilvyi* sp. nov. *Fungal Planet Description Sheets* 107- 127: *Persoonia* 28: 138–182. 28(June), 142–143.
- Shuttleworth, L. A., Liew, E. C. Y., & Guest, D. I. (2013). Survey of the incidence of chestnut rot in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 42(1), 63–72. <https://doi.org/10.1007/S13313-012-0170-2/FIGURES/6>
- Shuttleworth, L. A., Walker, D. M., & Guest, D. I. (2015). The chestnut pathogen *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Gnomoniaceae, Diaporthales) and its synonyms. *Mycotaxon*, 130(4), 929–940. <https://doi.org/10.5248/130.929>
- Siddiquee, S. (2018). Recent Advancements on the Role of Biologically Active Secondary Metabolites from *Aspergillus*. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications*, 69–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00004-1>

- Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D. & Krska, R. (2020). Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 2607–2620
- Tim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 4, Fruits. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*, 4, 1–1022. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2>
- UTAD, J. B. (2022). Jardim Botânico UTAD | *Castanea sativa*. https://jb.utad.pt/especie/Castanea_sativa
- Vasconcelos, M. C. B. M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. S., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1578–1589. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4016>
- Vettraino, A. M., Bianchini, L., Caradonna, V., Forniti, R., Goffi, V., Zambelli, M., Testa, A., Vinciguerra, V., & Botondi, R. (2019). Ozone gas as a storage treatment to control *Gnomoniopsis castanea*, preserving chestnut quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 6060–6065. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9883>
- Vettraino, A. M., Luchi, N., Rizzo, D., Lucia Pepori, A., Pecori, F., & Santini, A. (2021). Rapid diagnostics for *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) in chestnut nuts: new challenges by using LAMP and real-time PCR methods. *AMB Express*, 11, 105. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01266-w>
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G., & Cardinale, F. (2012). *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology*, 94(2), 411–419.
- Webber, J. B., Gordon, D., Rosati, A., Meier, N., Gold, M., & Revord, R. (2022). Postharvest Spoilage Incidence and Prestorage Treatment in Chinese Chestnut and Complex Hybrid Cultivars. *HortTechnology*, 32(2), 164–171. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04981-21>
- Wei, C., Deng, Q., Sun, M. & Xu, J. (2020). Cytospyrone and Cytospomarin: Two New Polyketides Isolated from Mangrove Endophytic Fungus, *Cytospora* sp. *Molecules*, 25, 4224; doi:10.3390/molecules25184224
- Wong, J. H., Hao, J., Cao, Z., Qiao, M., Xu, H., Bai, Y., & Ng, T. B. (2008). An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2008.03917.X>
- Zucchi, T., & de Melo, I. (2009). Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos. In *Embrapa Meio Ambiente* (pp. 69–84).

ANEXOS

Anexo 1: Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais, fungo *Gnomoniopsis smithogilvy* P8/ 4-9



Anexo 2: Teste preliminar de inibição com agentes biológicos comerciais fungo *Gnomoniopsis smithogilvy* UTAD 3



