

Microrganismos Associados à Cortiça em Diferentes Fases da sua Fileira

***Maria Natércia Santos, **Maria Helena Bragança e ***Pedro Piloto Casimiro**

*Investigador Principal c/ Habilitação

**Assistente de Investigação

*** Bolseiro de Investigação

Estação Florestal Nacional, Departamento de Protecção Florestal, Quinta do Marquês,
Av. da República, 2780-159 OEIRAS

Sumário. Um elevado número de microrganismos tem sido referido como responsável pela perda de qualidade da cortiça e decorrente alteração da qualidade do vinho, traduzida no que se designa por "gosto a rolha". Tendo como objectivo fundamental contribuir para uma melhor clarificação da microbiologia da cortiça durante o processo árvore - produto final, efectuou-se um estudo sobre as populações fúngicas associadas à árvore, procurando avaliar, num contexto mais amplo, a sua importância como fonte de contaminação das pranchas e do produto final (rolha). Por outro lado, procurou-se através da reunião de informação dispersa sobre a microflora da cortiça ao longo das diferentes fases da sua fileira, integrar os conhecimentos e construir uma base sólida e coerente de conhecimentos para a projecção de novas linhas de investigação nesta matéria. A integração dos resultados das duas componentes, permitiu as seguintes conclusões: a microflora sofre alterações ao longo das diferentes fases da fileira sobreiro - cortiça, reflectindo as diferentes condições ambientais e métodos usados, mas parte das populações isoladas da árvore persistem no produto final o que mostra que a árvore constitui, com grande probabilidade, uma fonte importante de contaminação; uma parte destas populações inclui-se no grupo das que são citadas como capazes de produzir metabolitos secundários implicados na depreciação da cortiça e alteração das características organolépticas do vinho; não foram verificadas diferenças significativas entre a diversidade de populações e o grau de vigor das árvores pelo que, à luz do conhecimento actual, não é legítimo estabelecer uma associação entre o chamado "declínio do sobreiro" e o "gosto a rolha"; a existência de um elevado volume de informação pulverizado e nalguns casos impreciso, dificulta a construção de um quadro de conhecimentos consistente, o que aponta para a necessidade de implementar um programa de acções equilibrado que integre os vários parceiros envolvidos nas diferentes fases da fileira sobreiro - cortiça.

Palavras-chave: sobreiro; fileira da cortiça; microrganismos associados

Cork Oak Associated Microorganisms Throughout Cork Manufacture Process

Abstract. Several microorganisms have been considered responsible for decrease in cork quality and wine off - flavours. To improve the knowledge on cork microbiology throughout

the tree to end product (stopper) steps, the work developed included two components. The first, on fungal populations colonising the tree, aims to evaluate the probable role of the tree as source of both slab and stopper contamination. The second focusing the collection of dispersed information about the microbial populations, throughout the industrial cork steps, has a main objective to constitute a basis for the delineation of further studies on this matter. The integration of results allows the following conclusions: (i) the microbial populations change throughout cork manufacture process, reflecting both the different environmental conditions and methods used; (ii) the persistence of a large part of these populations throughout the several phases (tree to end product), indicates that the tree is, probably one of the most important microorganism source; (iii) a fraction of these populations included in the group are pointed out as capable of producing secondary metabolites that affect both cork and wine quality; (iv) no significant differences between microbial population diversity and tree vigour level were found. The results obtained did not allow a relationship between decrease of tree vigour and wine-off flavours. Dispersed and sometimes inaccurate information makes it difficult to build a consistent knowledge frame, indicating that a well - balanced multidiscipline research program including all the partners involved in cork processing, is an urgent necessity.

Key words: cork oak; cork stopper manufacture; associated microorganisms

Microorganismes Associés au Liège au Cours des Différentes Phases de sa Filière

Résumé. Un grand nombre de microorganismes a été rapporté comme responsable pour la dégradation du liège et l'altération de la qualité du vin, généralement désignée comme «goût de bouchon». Pour perfectionner la connaissance sur la microbiologie du liège tout au cours des phases arbre - bouchon, le travail développé a comporté deux composantes. La première envisage l'amélioration des connaissances sur la mycoflore associée à l'arbre pour évaluer son probable rôle dans la contamination des planches et des bouchons. La deuxième vise à compiler et à intégrer des informations pour l'implémentation d'études sur l'effet de microorganismes dans la qualité du liège et du vin. L'intégration des résultats des deux composantes permet d'obtenir les conclusions suivantes: les populations microbiennes changent tout au long du processus arbre-bouchon à cause de différentes conditions d'environnement et méthodes employées; du fait qu'une partie des microorganismes qui colonisent le liège, avant l'écorçage, est aussi détectée dans le bouchon, l'arbre est probablement une des plus importantes sources de contaminations; une partie des populations détectées est comprise dans le groupe de celles qui ont été référées capables de produire des métabolites secondaires responsables par altérations de la qualité du liège et du vin; la diversité de la microflore ne diffère pas significativement parmi les arbres qui présentent différents degrés de vigueur; les résultats obtenus ne sont pas favorables à l'hypothèse qui considère le dépérissement du chêne liège comme une cause probable du «goût de bouchon». A l'égard de la synthèse de ce sujet, il a été vérifié qu'il y a un grand volume d'information, dans la plupart des cas, dispersée et imprécise, ce qui rend très difficile l'obtention d'une base de connaissance consistante. Cette constatation suggère qu'il faut établir un programme de recherche multidisciplinaire et équilibré englobant les secteurs engagés dans le processus arbre-bouchon.

Mots clés: chêne liège; filière liège; microorganismes associés

Introdução

A adequação tecnológica da qualidade da cortiça aos produtos a que se destina, é determinante na rentabilidade

de todo o sector ligado a esta matéria prima. Assim, os defeitos que apresenta prejudicam o seu desempenho industrial e impõem restrições ao uso do produto final, o mais importante dos quais é sem

dúvida a rolha. Alguns destes defeitos designados como "manchitas de mosca", "mancha amarela", "cortiça cobrilhada", "cortiça formigada" são referidos como resultantes da incidência de fungos e de insectos. (NATIVIDADE, 1950; 1989; LIESE *et al.*, 1983; LEE e SIMPSON, 1990; SIMPSON e LEE, 1990). Para além destes defeitos, a actividade de microrganismos associados à cortiça tem também sido relacionada com a produção de metabolitos que podem conferir ao vinho odores e sabores estranhos, por vezes, reunidos sob a designação comum de "gosto a rolha" (CHARPENTIER, 1977; AZEMA 1979; BUSER *et al.*, 1982; LEFEBVRE. *et al.*, 1983; MAUJEANT *et al.*, 1985; SPRINGETT, 1986 AMON *et al.*, 1989; CODINA *et al.*, 1995; FESTAS *et al.*, 2000) Existem várias definições para o "gosto a rolha" (CARRIÇO, 1997), o qual tem sido particularmente associado à cortiça com "mancha amarela" (MARILL, 1902; MAGIE, 1912), um defeito que, de acordo com estes autores, está relacionado com amadias que permanecem na árvore em condições de humidade elevada e que, para outros autores (PÉS e VODRET, 1971; LISSIA, 2000), é causado por *Armillaria mellea* (Vahl.:Fr) P. Karst. Por outro lado, foram isolados vários fungos (SANTOS, 1992; FRANCHESCHINI *et al.*, 1993, 2002) a partir de tecidos do entrecasco fortemente alterados e de exsudados provenientes de árvores em fase de declínio avançado. Algumas das estruturas destes fungos juntamente com os exsudados, penetram nas lenticelas da cortiça e acompanham-na durante as fases subsequentes, em pilha no campo, preparação na fábrica, transformação industrial e produto final. Face a esta situação levanta-se a questão de saber se esta cortiça, obviamente contaminada por um elevado número de populações e

impregnada de compostos provenientes não só da actividade destas populações mas também produzidos pela árvore em situação de stresse, a que se adicionam outros contaminantes durante as fases subsequentes (SIMPSON, 1990; PEREIRA *et al.*, 2000a), não poderão estar, pelo menos em parte, na origem da alteração organoléptica dos vinhos e decorrente perda de qualidade. Note-se que há um considerável volume de trabalho sobre a microflora que incide na cortiça durante as fases de preparação de pranchas e processamento industrial assim como na rolha, mas sabe-se pouco sobre a microflora da cortiça na árvore, já que os estudos sobre esta matéria têm sido fundamentalmente orientados para a detecção de agentes patogénicos e sua relação com o enfraquecimento do montado. Este estudo teve como objectivo contribuir, por um lado, para clarificar quais as populações que persistem durante as diferentes fases da fileira da cortiça e que poderão ter como origem a árvore, e por outro, reunir informação dispersa que determine patamares de suporte a futuras intervenções.

Material e métodos

Populações de fungos associados à cortiça na árvore

A recolha de amostras foi efectuada em cinco parcelas, situadas nas seguintes herdades: Herdade de Besteiros - Pegões; Monte da Fava - Grândola; Herdade da Palma - Alcácer do Sal; Herdade da Ribeira-a-Baixo - Grândola; Herdade do Reguengo Grande - Cercal do Alentejo.

Em cada parcela foram seleccionadas e marcadas 10 árvores, cinco com grau de desfolha 1 (entre 11% e 25%) e cinco com grau de desfolha 3 (entre 51% e

90%), de acordo com uma escala internacionalmente estabelecida (CADAHIA *et al.*, 1991). Em cada árvore recolheu-se, a 1m do solo, três amostras de cortiça, com área aproximada de 150 cm² cada. Estas amostras foram introduzidas em sacos de plástico, esterilizados e transportadas para o laboratório onde se procedeu de imediato às análises.

Para o isolamento dos fungos, as amostras de cortiça foram observadas a olho nu e à lupa para seleccionar as zonas afectadas, sendo removidas da superfície interna e das lenticelas de cada amostra três sub-amostras que foram colocadas em caixas de Petri contendo meio de cultura - PDA, Difco. A partir de cada sub-amostra foram efectuadas três culturas. O número total de culturas efectuadas foi 450 (50 árvores x 3 amostras x 3 sub-amostras). As culturas permaneceram, durante a fase de crescimento dos fungos, em incubadora a 25°C. Sempre que necessário, as culturas foram submetidas a luz fluorescente (lâmpadas TL, 40W/08, da Philips), para induzir a produção de estruturas imprescindíveis à identificação dos isolados.

A identificação dos isolados foi efectuada, com recurso a métodos tradicionais, no Departamento de Protecção Florestal da Estação Florestal Nacional, tendo sido, três destes isolados, identificados pelo Microbial Identification Service - CABI Bioscience, UK.

Comparação da microflora do entrecasco e da cortiça em diferentes fases da sua fileira

Faz-se uma revisão bibliográfica sobre a microflora detectada na árvore e durante as diversas fases da fileira da cortiça, tendo sido apenas consideradas informações tão precisas quanto possível, sobre a fase da fileira em que se

procedeu à recolha do material usado nos diferentes estudos.

Devido a dificuldades que se prendem com a falta de informação sobre a microflora associada a todas as fases dos sucessivos tratamentos a que é submetida a cortiça no percurso árvore-rolha (PEREIRA *et al.*, 1999), agrupámos algumas destas fases de acordo com o que se nos afigurou mais relevante em termos de condições ambientais que poderiam determinar diferenças de maior significado na diversidade e frequência das populações de microrganismos. Foram assim consideradas as seguintes fases: Fase A - entrecasco, Fase B - cortiça na árvore, Fase C - cortiça em pilha no campo, Fase D - cortiça em fábrica antes da cozedura, Fase E - cortiça em fábrica após cozedura (maturação), Fase F - linha de produção de rolhas, Fase G - produto final (rolha).

Resultados

Populações de fungos associados à cortiça na árvore

A Figura 1 expressa as populações de fungos detectados em cada parcela. Observa-se assim que *Tricoderma pseudoconingii* (Oudem.) Rifai, *T. viride* Pers., *Endothiella gyrosa* Sacc., *Mucor hiemalis* Wehmer, *Rhysopus* sp e várias espécies do género *Penicillium* incidem num elevado número de parcelas, constituindo populações estreitamente associadas à cortiça, enquanto que *Cytospora* sp. e *Dichomera* sp. apenas foram detectados em 2 parcelas e *Acremonium* sp., *Glyocladium* sp. *Botrytis silvatica*, Malençon *Aspergillus Níger* Tieghem e *Pestalotia* sp. só foram detectados numa parcela. A não detecção de *Armillaria mellea* não permitiu concluir

sobre a implicação ou não deste patogénio na depreciação das pranchas o que não confirma o referido por outros autores (PÉS e VODRET, 1971; LISSIA, 2000). Contudo, este tipo de estudos, pela sua natureza, apresenta limitações que, por norma, se prendem com fenómenos de competitividade, o que tem como efeito uma acentuada redução do número das populações isoladas face ao número de populações presentes. Pensamos que futuramente deveriam ser optimizados métodos moleculares no sentido de detectar espécies do género *Armillaria*, em amostras de tecidos afectados.

Entre as populações isoladas apenas *E. gyrosa* e *B. silvatica*, forma anamórfica de *Biscogniauxia mediterranea* (de Not.) Kuntze, fazem parte do conjunto de fungos apontados como patogénicos

para o sobreiro, enquanto que os restantes têm comportamento saprofítico.

Considerando cada uma das parcelas, a Figura 1 expressa a frequência de ocorrência (percentagem de árvores colonizadas) de cada população de fungos isolados da cortiça, concluindo-se que, de modo geral, são as populações que se distribuem por um número mais elevado de parcelas que apresentam também uma maior frequência de ocorrência em cada parcela. O género *Penicillium* é entre as populações detectadas a mais frequente, incidindo na totalidade das árvores em estudo. Contudo, o elevado número de espécies deste género detectadas, justifica um estudo suplementar de identificação, que não foi ainda possível implementar, razão pela qual o género *Penicillium* não é considerado na Figura 1.

Quadro 1 - Populações de fungos isoladas da cortiça em parcelas de montado de sobreiro

Fungos	Herdade da Palma	Herdade de Besteiros	Herdade de Reguengo Grande	Herdade da Fava	Herdade de Ribeira - a - Baixo
<i>Acremonium</i> sp	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> .	-	-	-	-	+
<i>Botrytis silvatica</i>	-	-	-	+	-
<i>Cytospora</i> sp.	-	+	-	+	-
<i>Dichomera</i> sp.	-	-	+	+	-
<i>Endothiella gyrosa</i>	+	+	+	+	-
<i>Glyocladium</i> sp.	-	-	+	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	+	+	-	+	+
<i>Penicillium</i> spp.	+	+	+	+	+
<i>Pestalotia</i> sp.	-	-	-	-	+
<i>Rhysopus</i> sp	+	+	-	-	+
<i>Trycoderma pseudocoingii</i>	+	+	+	+	+
<i>Trycoderma viride</i> .	+	+	+	+	+

Legenda: + isolamento positivo; - isolamento negativo

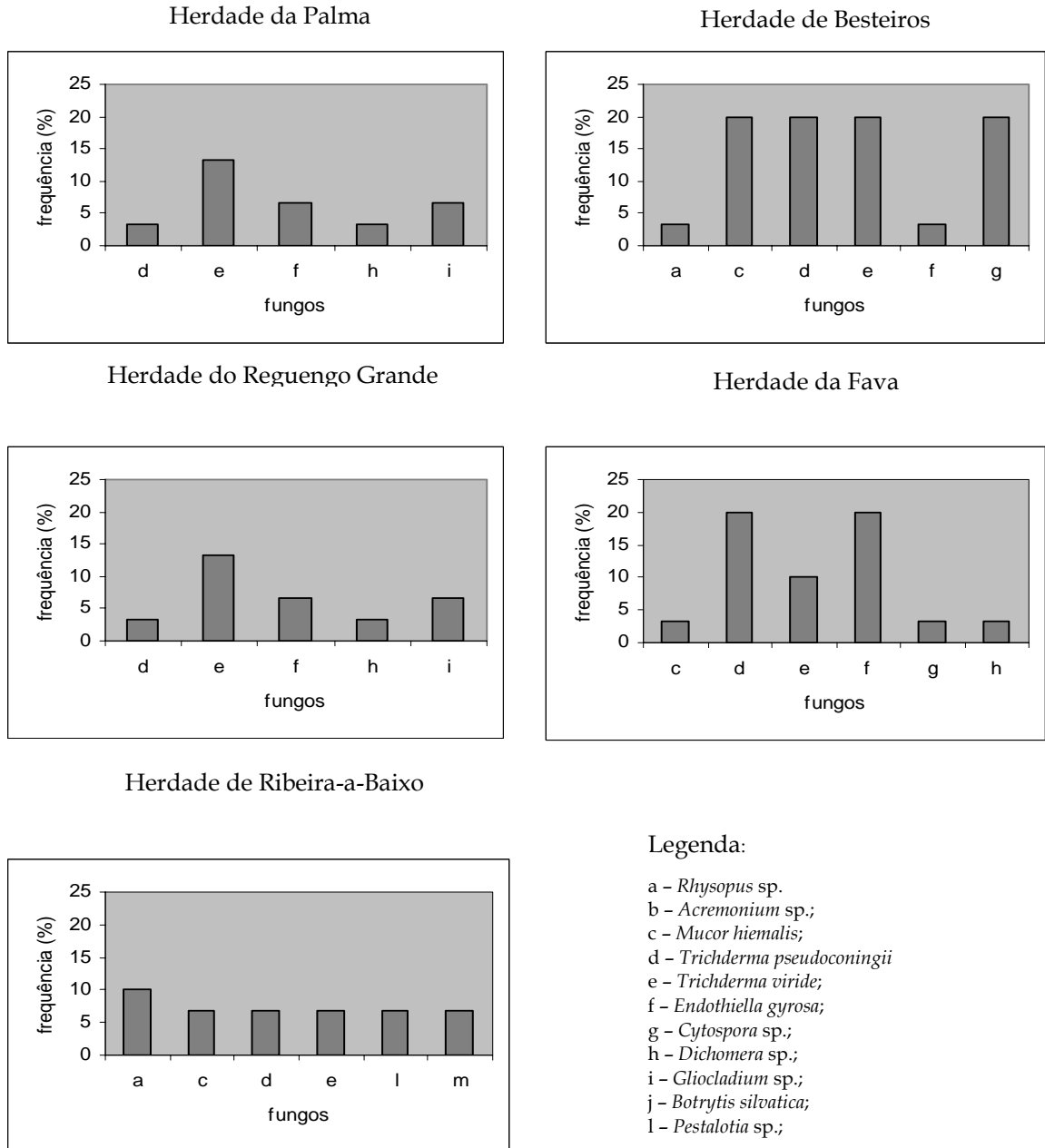


Figura 1 - Frequência de ocorrência de populações de fungos colonizadores da cortiça em diferentes parcelas de montado de sobro

Relativamente a populações isoladas de amostras provenientes de árvores apresentando diferentes níveis de desfolha, não foram detectadas diferenças quantitativas e/ou qualitativas significativas. FRANCHESCHINI *et al.* (2002) obtiveram resultados concordantes num estudo mais alargado que incidiu sobre a microflora do tronco, ramos, gomos e folhas, o que vem também confirmar parcialmente (apenas em termos qualitativos) os resultados alcançados por SANTOS (1992). Relativamente à microflora isolada do entrecasco, também BELIZARIO *et al.* (1992) verificaram, em *Quercus cerris* L., que os microrganismos isolados de zonas afectadas do tronco (zonas com exsudações activas) não diferem qualitativamente dos isolados de zonas sãs. O mesmo autor refere ainda, que, ao contrário do que seria de esperar, nas zonas sãs, a frequência de ocorrência dos isolados é superior à das zonas que apresentavam exsudações em fase activa ou já secas.

Comparação da microflora do entrecasco e da cortiça em diferentes fases da fileira

Face à multiplicidade e dispersão de dados, a síntese que se apresenta teve como objectivo fundamental, seleccionar populações que persistem nalgumas fases da fileira e no produto final (rolha) e constituir-se como base de trabalho para projecção de estudos sobre os efeitos da microflora na qualidade da rolha e do vinho.

Os resultados da síntese efectuada estão expressos no Quadro 2. Observa-se assim que, contrariamente ao que se verifica para a cortiça na árvore e em prancha, o conjunto de populações do entrecasco (Fase A) é maioritariamente (63%) constituído por agentes apontados

como patogénicos para o sobreiro. Este facto explica-se pela diferente natureza dos substratos (entrecasco - tecidos vivos, cortiça - tecidos mortos) e também porque os estudos efectuados, neste tipo de material, têm sido orientados no sentido da detecção de agentes patogénicos. Por outro lado, a microflora da cortiça na árvore (fase B), na qual ainda é possível detectar algumas populações consideradas patogénicas (*Armillaria mellea*, *Biscognauxia mediterrânea*, *Coryneum brachiurum* Link, *C. modonium*, (Tull.) Griff & Maubl.; *Cytospora* spp. *Diplodia mutila* Fr. apu Mont; *Endothiella gyrosa*, *Pestalozia* sp.) é maioritariamente constituída por sapróbios (83%). Durante as fases seguintes, as populações consideradas patogénicas não são praticamente detectadas com excepção de *Endothiella gyrosa* (SANTOS e BRAGANÇA, 1996) que atinge a fase C (cortiça em pilha no campo).

Algumas espécies dos géneros *Penicilium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Streptomyces*, *Acremonium* e *Chrysonilia sithophila* (Montagne) von Arx., colonizam nuns casos o entrecasco, e noutros a cortiça (fase B) assim como o produto final, o que sugere que poderão ter como origem a árvore. Reportando-nos apenas aos trabalhos desenvolvidos em Portugal e considerando apenas as populações saprófitas (já que as patogénicas não ocorrem no produto final), cerca de 55% das populações isoladas da rolha são comuns às da cortiça na árvore (fase B). Se considerarmos que esta fase é, no contexto do estudo da microflora, a que tem sido mais negligenciada, podemos deduzir que a lista dos fungos que percorrem toda a fileira deverá ser

substancialmente mais ampliada. Este facto, a ser verificado, reforça a ideia de que a árvore deverá ser uma importante fonte de contaminação.

Entre estas populações incluem-se algumas das apontadas como veículos de transformação do 2,4,6-Triclorofenol (TCP) em 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) e outros compostos que têm sido associados ao "gosto a rolha" (BUSER *et al.*, 1982; DALY *et al.*, 1984; LEE e SIMPSON, 1990; CODINA *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 1999) e que, de acordo com o Quadro 2, são: *P. purpurogenum* O. Stoll.; *P. roquefortii* Thom, *P. decumbens* Thom.; *P. citrinum* Thom; *P. frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Whemer) Westling); *P. expansum*; *Aspergillus* sp.; *A. níger*; *Mucor* sp.; *Trichoderma viride* Tull; *T. longibrachiatum* Rifai; *Fusarium* sp.; *Streptomyces* sp; *S. odorifer* (Rulman) Waksman; *Cladosporium* sp. Note-se, contudo, que o número de populações isoladas da rolha (cerca de seis dezenas), é superior ao de qualquer das fases precedentes, o que não deverá estar relacionado com uma maior diversidade real da microflora, mas antes com um maior volume de trabalho nesta última fase, o que aliás se justifica dados os objectivos a atingir.

De acordo com SANTOS e BRAGANÇA (1996) e PEREIRA *et al.* (1999) o número de populações após cozedura é mais reduzido, mas a sua frequência de ocorrência é muito mais elevada. Este facto deverá estar relacionado com a eliminação de algumas populações após submissão das pranchas à cozedura e também com as condições muito favoráveis ao desenvolvimento exacerbado de alguns microrganismos durante a fase de maturação (Ex: *Trichoderma viride*, *Xylocladium* sp; *Penicillium* spp. e principalmente *Chrysonilia sitophila*) e

subsequente eliminação de outras não só devido a alterações ambientais como por força de fenómenos de competitividade. Mas mesmo que a cozedura cause um decréscimo da diversidade populacional, o ambiente de fábrica fortemente contaminado (ALVAREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000; CODINA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000) poderá determinar contaminações posteriores. A este propósito, QUINTA e MARTINS (1980), referem que durante a cozedura, a temperatura não atinge valores letais para parte dos microrganismos que colonizam as lenticelas, consideradas, pelos mesmos autores, como nichos ecológicos que para além de fornecerem um bom suporte nutricional, mantêm mais estáveis a humidade e a temperatura.

Relativamente a *Chrysonilia sitophila*, devido à sua prevalência em termos de frequência de ocorrência, durante a fase de maturação, realizaram-se estudos que evidenciaram a sua capacidade para produzir enzimas capazes de modificar as propriedades físicas da cortiça (VITORINO *et al.*, 2000). Também CENTENO e CALVO (2001) concluíram que *C. sitophila* a par de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler *Aspergillus níger*, assim como leveduras e bactérias, produzem enzimas capazes de degradar entre outros compostos a celulose e a lenhina, quebrando assim a integridade do material vegetal. Note-se contudo, que estas alterações podem não ser negativas em termos de qualidade da matéria prima para o fabrico de rolhas, já que, algumas opiniões vão no sentido de que a abundante colonização das pranchas na fase de maturação confere à cortiça propriedades favoráveis à sua posterior utilização. Por outro lado, PEREIRA *et al.* (2000a, 2000b) referem que *C. sitophila* não produz 2,4,6-triclo-

roanisol, ou guaiacol, assinalando que poderá até ter um efeito positivo na eliminação de outras populações com provável impacto negativo na qualidade das pranchas.

Apesar de ser amplamente referido que a actividade de microrganismos confere aos vinhos sabores desagradáveis, colocam-se, no entanto, as seguintes dificuldades: a designação "gosto a rolha" tem sido usada de modo indiscriminado, incluindo sabores diferentes, com diversas origens (CARRIÇO, 1997; RIBOULET, 1989; PEREIRA *et al.*, 1999) o que tem gerado situações confusas na abordagem deste tema; os dados sobre a caracterização da microflora em diferentes fases da fileira são insuficientes e pouco precisos já que, a identificação de populações não se tem feito, em boa parte, ao nível específico e muito menos infra - específico (tarefa complexa que exige a intervenção de vários especialistas em vários taxa e nalguns casos, o recurso a novas metodologias), o que retira eficácia à síntese efectuada, em termos de obter uma base consistente de informação; uma parte da bibliografia refere, de modo genérico, que os microrganismos foram isolados de pranchas de cortiça, sem especificarem em que fase da fileira ocorreu a sua detecção, o que gera "vazios" no percurso árvore - produto final, implicando que a síntese expressa no Quadro 2, apresente lacunas de informação. Ainda em relação ao Quadro 2 deve referir-se que as informações nele contidas resultam, na sua maioria, de estudos que incidiram numa fase ou nalgumas fases da fileira da cortiça em ambientes diversos e com recurso a diferentes métodos, sendo esporádicos os estudos conduzidos em contínuo ao longo de todas as fases. Este facto

prejudica também a consistência e precisão da informação, reflectindo a falta de coesão e de coordenação que se tem verificado ao nível desta temática.

Os microrganismos que são associados, de modo genérico, a pranchas de cortiça sem especificação das fases da fileira em que foram detectados são: *Alternaria* sp; *Aspergillus nidulans* (Eidam) Wint.; *A. conicus* Link; *A. glaucus* Link; *A. níger*; *A. ruber* Thom & Church; *A. sydowi* (Bainier & Sartory) Thom & Church; *A. versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi; *Geotrychum candidum* Link: Fr.(Syn. *Oospora lactis*); *Mucor rouxii* Boutroux; *Paecilomyces varioti* Bainier; *Penicillium adametzi* Zaleski; *P. brevicompactum* Dierkx; *P. chrysogenum* Thom; *P. expansum* Link; *Penicillium glaucum* Link; *P. fellutanum* Biourge; *Penicillium frequentans*; *P. minioluteum* Dierkx; *P. multicolor* Grigorieva-Manoilova & Poradielova; *Rhodotorula* sp.; *Rhysopus arrhizus* Fisher; *Sacharomyces* sp. *Sacharomyces italicus* Castelli; *S. cerevisiae* Meyen ex E.C.Hansen; *Sacaramycodes ludwigii* (E.C.Hansen) E.C.Hansen; *Trichoderma hamatum* (Bonorden) Bainier; (VEJA-GARCIA *et al.*, 2000; GOMES, 1983; AZEMA, 1979). Entre estas espécies estão catorze das que constam no Quadro 2 o que significa que algumas das lacunas deste quadro poderiam ser preenchidas de modo a obter informações que configurassem uma provável persistência destas populações ao longo da fileira.

Uma análise global dos resultados apresentadas, orientada para uma associação do chamado "declínio do montado" com alterações na qualidade da rolha e do vinho não parece fazer muito sentido à luz do conhecimento actual. Por um lado, porque as populações que estão realmente

associadas ao enfraquecimento das árvores são populações patogénicas que têm sido isoladas quer de árvores apresentando diferentes níveis de perda de vigor, quer de árvores sãs, o que não aponta para que as contaminações possam ser atribuídas apenas às árvores doentes, e por outro, porque as populações patogénicas praticamente não ocorrem, para além da fase B (cortiça na árvore). Contudo, de acordo com o já expresso na introdução, tem sido observado que a cortiça removida de zonas do tronco em que os tecidos do entrecasco entraram em nítida degenerescência (o que normalmente ocorre em árvores em fase adiantada de enfraquecimento), apresenta as lenticelas impregnadas de uma massa escura que, com grande probabilidade, será constituída por tecidos do entrecasco desagregados, estruturas de microrganismos e metabolitos provenientes da árvore e da actividade destes microrganismos e que poderão causar alterações de carácter físico e químico na cortiça. Consideramos contudo, que esta hipótese não passa disso mesmo, devendo ser encarada como uma pista a explorar numa tentativa de aprofundar o conhecimento, de modo a definir com maior precisão, padrões de intervenção ao nível do descortiçamento e da selecção de pranchas a rejeitar. Deve, no entanto, ser referido que existe uma percepção do problema, o que tem levado a uma atitude rigorosa, traduzida na não utilização de pranchas que apresentam este e outros tipos de defeitos, isto, para além de uma selecção efectuada pela natureza, já que é do conhecimento geral que uma parte da cortiça que cobre zonas mortas do entrecasco resiste à extracção.

Não se inclui no âmbito deste trabalho a discussão sobre a justeza da designação "gosto a rolha" ou uma abordagem sobre as suas causas, matéria que tem sido objecto de apreciação consistente por parte de outros autores (AZEMA, 1979; RIBOULET, 1989; PEREIRA *et al.*, 1999, 2000a; NAVASCUÉS *et al.*). Contudo, face à síntese efectuada (Quadro 2) constatamos que as populações mais frequentes são, por norma, as que foram objecto de estudo relativamente à produção de compostos com impacte na qualidade do vinho concluindo-se que serão prováveis responsáveis (ou co-responsáveis) por sabores e gostos desagradáveis. A ser assim, faz todo o sentido a questão já frequentes vezes colocada - como explicar que, em média, como referem PEREIRA *et al.* (1999), apenas cerca de 2% das garrafas sejam afectadas? Por certo que esta percentagem seria bem mais elevada. Embora alguns dados apontem no sentido de que algumas das populações microbianas associadas à cortiça possam estar envolvidas na alteração da qualidade do vinho, o conhecimento actual, pouco consistente e impreciso, não legitima as afirmações que sustentam a relação directa entre a incidência de microrganismos e o verdadeiro "gosto a rolha" ou "a podre" caracterizado por RIBOULET (1989), e que transmite ao vinho um cheiro pútrido que o torna impróprio para consumo.

Conclusões

Populações de fungos na cortiça após descortiçamento

Não foram obtidos isolados de *Armillaria mellea*, ou de outras espécies do mesmo género, pelo que os resultados

obtidos não apontam no sentido da associação deste patógeno com a cortiça. Contudo, as limitações dos métodos disponíveis tradicionalmente usados neste tipo de estudos, não permitem excluir de todo, esta hipótese.

Entre as populações de fungos isoladas *Mucor hiemalis*, *Trycoderma pseudoconingii*, *T. viride*, *Endothiella gyrosa*, *Penicillium* spp., são as que apresentam uma distribuição mais vasta (estão presentes na totalidade ou na quase totalidade das parcelas) e são também as mais frequentes em cada parcela.

As populações atrás expressas, com excepção de *E. gyrosa*, estão incluídas nos géneros que, com maior frequência, são referidos como fazendo parte da microflora da rolha. Este facto constitui um indicativo a favor da hipótese de que a árvore deverá ser uma importante fonte de contaminação.

Não foram encontradas diferenças qualitativas significativas da microflora entre árvores sãs e com acentuados sintomas de perda de vigor, o que vem confirmar os resultados de estudos anteriores sobre a matéria.

Comparação da microflora do entrecasco e da cortiça

A comparação da microflora da cortiça na árvore e da rolha, mostra que algumas populações poderão persistir ao longo das sucessivas fases árvore - produto final, o que aponta no sentido de que a árvore deverá constituir uma das principais fontes de contaminação.

A microflora do entrecasco e fases sequenciais da fileira, sofre uma alteração qualitativa no sentido do decréscimo de populações patogénicas

que são praticamente eliminadas a partir do descortiçamento, verificando-se um aumento de sapróbios que, pelo menos em parte, percorrerão toda a fileira árvore - rolha, integrando populações apontadas como produtoras de metabólitos responsáveis pela depreciação da cortiça e do vinho.

As populações mais frequentes são também as que têm sido objecto de estudos que as relacionam com o "gosto a rolha", o que não explica a baixa percentagem de garrafas afectadas.

Face ao conhecimento produzido, não se nos afigura linear que o denominado "declínio do montado" esteja na base da presença de populações com um impacte posterior na qualidade do vinho. A probabilidade de se verificar uma relação entre o "declínio do montado" e alterações negativas no sabor do vinho, parece mais vinculada à hipótese de que a cortiça em contacto com o entrecasco em degenerescência, conterà substâncias que, modificadas ou não, pelos tratamentos e/ou contaminações subsequentes a que é submetida, poderá conferir ao vinho odores e sabores estranhos embora não forçosamente coincidentes com o "gosto a rolha" que torna o vinho impróprio para consumo. Esta hipótese carece, no entanto, de confirmação.

Existe um enorme volume de informação pulverizada e, em muitos casos, imprecisa que dificulta a criação de um suporte consistente de conhecimento para a projecção de um programa de investigação nesta matéria que a fileira exige pela reconhecida relevância social e económica de que se reveste.

Quadro 2 - Microflora do entrecasco e da cortiça em diferentes fases da sua fileira

Populações isoladas	A	B	C	D	E	F	G	Referências Bibliográficas
<i>Acremonium</i> sp.	+	+					+	Moreau (1978); Lee <i>et al.</i> (1984); Simpson & Lee (1990); Ramos (1995); Quadro 1
<i>Acremonium allongon</i>							+	Saccardo (1986)
<i>Acrotesca multispora</i>		+						Saccardo (1886)
<i>Alternaria alternata</i>	+	+					+	;Santos (1992); Ramos (1995); Centeno & Calvo (2000)
<i>Alternaria tenuissima</i>							+	Suarez <i>et al.</i> (1997)
<i>Alternaria</i> sp.							+	Azema(1979); Gomes (1983)
<i>Aposphaeria suberina</i>		+						Saccardo (1884)
* <i>Armillaria mellea</i>	+	+						Azevedo (1976)
<i>Armillaria tabescens</i>	+							Azevedo (1976)
<i>Arthrographis sulfurea</i>		+						Oudemans (1920a),
<i>Aureobasidium pullulans</i>							+	Moreau (1978); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus candidus</i>		+						Oudemans (1920b)
<i>Aspergillus carbonarius</i>		+						Santos & Bragança (1996)
<i>Aspergillus conicus</i>							+	Moreau (1978); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus flavus</i>				+	+	+	+	Azema (1979); Kaminski <i>et al.</i> (1979); Codina <i>et al.</i> (1995) ; Suarez <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus fumigatus</i>							+	Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus glaucus</i>							+	Moreau (1978); Gomes (1983); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus nidulans</i>							+	Gomes (1983); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
** <i>Aspergillus niger</i>	+	+	+				+	Bordas (1904); Azema (1979); Santos (1992); Santos & Bragança (1996); Centeno & Calvo (2000); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000) Quadro 1
<i>Aspergillus spiralis</i>		+						Oudemans (1920c)
** <i>Aspergillus</i> spp.		+	+	+	+	+	+	Schanderl (1964); Charpentier (1977); Azema (1979); Gomes (1983); Riboulet (1983,1989) Lee <i>et al.</i> (1984); Brezovsik (1985); Daly <i>et al.</i> (1984) ; Codina <i>et al.</i> (1995); Ramos (1995); Festas, <i>et al.</i> (2000); Oliveira <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus</i> spp.		+					+	Davis (1981) ; Lee <i>et al.</i> (1984)
* <i>Biscogniauxia mediterranea</i>	+	+						Barbosa (1958); Azevedo & Macara (1963); Ramos (1995); Franceschini <i>et al.</i> (2002)

Quadro 2 – Cont.

Populações isoladas	A	B	C	D	E	F	G	Referências Bibliográficas
<i>*Botrytis silvatica</i>	+	+						Barbosa (1958); Santos (1992); Ramos (1995)
<i>Cândida famata</i>				+	+	+	+	Danesh <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Cândida humicola</i>							+	Suarez <i>et al.</i> (1997)
<i>Cândida sp.</i>	+						+	Schanderl (1964) ; Davis <i>et al.</i> (1981) ; Lefebvre (1983); Lee & Simpson (1990); Simpson & Lee (1990) ; Riboulet (1991)
<i>Coremium candidum</i>		+					+	Oudemans (1920d)
<i>Chrysonilia sithophila</i>		+		+	+	+	+	Azema (1979); Quinta & Martins (1980) ; Lee <i>et al.</i> (1984); Brezovsik (1985); Codina <i>et al.</i> (1995); Davis <i>et al.</i> (1981); Lee & Simpson (1992); Santos & Bragança (1996); Danesh <i>et al.</i> (1997) ; Oliveira <i>et al.</i> (2000); Pereira <i>et al.</i> (2000b) ; Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Cladosporium herbarum</i>						+	+	Quinta & Martins (1980); Daly <i>et al.</i> (1984); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>**Cladosporium sp.</i>				+	+	+	+	Schanderl (1964); Azema (1979); Davis <i>et al.</i> (1981); Lee & Simpson (1990); Riboulet (1991); Suarez <i>et al.</i> (1997) ; Oliveira <i>et al.</i> (2000)
<i>Cryptococcus sp.</i>		+					+	Davis <i>et al.</i> (1981); Lee <i>et al.</i> (1984); Simpson & Lee (1990)
<i>*Coryneum brachyurum</i>	+	+						Ramos (1995)
<i>*Coryneum modomium</i>	+	+						Fonseca (1991a)
<i>Corinebacterium</i>		+						Lee <i>et al.</i> (1984)
<i>*Cytospora microspora</i>	+							Santos (1992)
<i>Cytospora sp.</i>		+						Quadro 1
<i>*Diplodia mutila</i>	+	+						Fonseca (1991b); Santos (1992); Ramos (1995); Francheschini <i>et al.</i> (2002)
<i>Dichomera sp.</i>		+						Quadro 1
<i>*Endhotiella gyrosa</i>	+	+	+					Oliveira (1931); Azevedo (1971); Macara, (1975); Santos & Bragança (1996)
<i>Epicocum sp</i>	+	+						Ramos (1995)
<i>Peziza phellophila</i>		+						Oudemans (1920e)
<i>*Phoma glomerata</i>	+							Santos (1992)
<i>*Fusarium oxysporum</i>				+				Quinta & Martins (1980)
<i>**Fusarium spp.</i>	+	+						Santos (1992); Ramos (1995); Alvarez-Rodriguez <i>et al.</i> (2000)
<i>Geotrichum candidum</i>				+	+	+	+	Quinta & Martins (1980); Gomes (1983)

Quadro 2 – Cont.

Populações isoladas	A	B	C	D	E	F	G	Referências Bibliográficas
<i>Gliocladium sp.</i>		+						Quadro 1
<i>Graphium tectonae</i>	+							Ramos (1995)
<i>Hormodendron atrum</i>		+						Oudemans (1920f)
<i>Kurthia sp.</i>		+						Lee <i>et al.</i> (1984)
<i>Listeria sp.</i>		+						Lee <i>et al.</i> (1984)
<i>Libertella sp.</i>	+	+						Ramos (1995)
<i>Mucor hiemalis</i>		+	+			+	+	Codina <i>et al.</i> (1985); Veja -Garcia (2000); Quadro 1
<i>Mucor mucedo</i>							+	Suarez <i>et al.</i> (1997)
<i>Mucor plumbeus</i>		+		+	+	+	+	Quinta & Martins (1980); Danesh <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000); Lee & Simpson (1992)
<i>Mucor racemosus</i>					+			Quinta & Martins (1980); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
** <i>Mucor spp.</i>		+			+		+	Daly <i>et al.</i> (1984); Riboulet (1991); Codina <i>et al.</i> (1995); Oliveira <i>et al.</i> (2000)
* <i>Ophiostoma spp.</i>	+							Ramos (1995)
<i>Paecilomyces sp.</i>		+	+				+	Moreau (1978); Davis <i>et al.</i> (1981); Daly <i>et al.</i> (1984); Santos & Bragança (1996)
** <i>Penicillium spp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	Charpentier (1977); Azema (1979); Davis <i>et al.</i> (1981); Gomes (1983); Lefebvre <i>et al.</i> (1983); Lee <i>et al.</i> (1984); Brezovsik, (1985); Maujeant <i>et al.</i> (1985); Lee (1990); Simpson & Lee (1990); Riboulet (1991); Santos (1992); Codina <i>et al.</i> (1995); Ramos (1995); Suarez <i>et al.</i> (1997); Alvarez-Rodriguez <i>et al.</i> (2000); Oliveira <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium adametzi</i>							+	Moreau (1978)
<i>Penicillium asymetrica</i>							+	Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium brevi-compactum</i>							+	Moreau (1978); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium charmesinum</i>							+	Brezovsik, (1985)
<i>Penicillium citreo-viride</i>							+	Moreau (1978)
** <i>Penicillium citrinum</i>				+	+	+	+	Moreau (1978); Quinta & Martins (1980); Suarez <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium corylophilum</i>							+	Moreau (1978); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
** <i>Penicillium decumbens</i>				+	+		+	Halim <i>et al.</i> (1975); Azema (1979); Santos & Bragança (1996); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)

Quadro 2 – Cont.

Populações isoladas	A	B	C	D	E	F	G	Referências Bibliográficas
<i>Penicillium echinulatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	Riboulet (1983); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	+	+	+	+	Riboulet (1989)
<i>Penicillium fellutanum</i>							+	Moreau (1978)
** <i>Penicillium frequentans</i>		+	+	+	+	+	+	Moreau (1978); Azema (1979); Quinta & Martins (1980); Gomes (1983); Lefebvre <i>et al.</i> (1983); Riboulet (1983); Codina <i>et al.</i> (1985); Simpson & Lee (1990); Lee & Simpson (1992); Santos & Bragança (1996); Danesh (1997); Suarez <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium glabrum</i>					+		+	Simpson & Lee (1990); Danesh <i>et al.</i> (1997)
<i>Penicillium glaucum</i>							+	Oudemans (1920g); Azema (1979); Gomes (1983)
** <i>Penicillium granulatum</i>		+					+	Moreau (1978); Simpson & Lee (1990); Lee & Simpson (1992); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium implicatum</i>				+	+	+	+	Quinta & Martins (1980)
<i>Penicillium purpurescens</i>							+	Moreau (1978); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium purpurogenum</i>					+			Halim <i>et al.</i> (1975); Santos & Bragança (1996)
<i>Penicillium spinulosum</i>							+	Moreau (1978); Daly (1984)
** <i>Penicillium roquefortii</i>							+	Moreau (1978); Heimann <i>et al.</i> (1983); Riboulet (1983, 1989); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
* <i>Pestalozia sp.</i>		+						Quadro 1
<i>Pycnoporellus metamorphosus</i>		+						Oudemans (1920h)
* <i>Phoma glomerata</i>	+							Santos (1992)
<i>Rhizopus arrhisus</i>							+	Codina <i>et al.</i> (1995)
<i>Rhizopus stolonifer</i>		+			+		+	Suarez <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizoctonia sp.</i>							+	Davis <i>et al.</i> (1981); Daly <i>et al.</i> (1984); Riboulet (1991)
<i>Rhodotorula glutinis</i>				+	+	+	+	Danesh <i>et al.</i> (1997); Pereira <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhodotorula sp.</i>		+	+				+	Schanderl (1964); Davis <i>et al.</i> (1981); Gomes (1983); Lee <i>et al.</i> (1984); Lee & Simpson (1990); Simpson & Lee (1990)
<i>Sacharomyces sp.</i>							+	Davis <i>et al.</i> (1981); Gomes (1983); Lee & Simpson (1990); Riboulet (1991)
<i>Sporodibolus johansonii</i>				+	+	+	+	Danesh <i>et al.</i> (1997); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Sporobolomyces sp.</i>							+	Davis <i>et al.</i> (1981); Lee & Simpson (1990)

Quadro 2 – Cont.

Populações isoladas	A	B	C	D	E	F	G	Referências Bibliográficas
<i>Sporotrichum flavicans</i>							+	Saccardo (1886)
** <i>Streptomyces odorifer</i>								Collins <i>et al.</i> (1970)
** <i>Streptomyces</i> sp.		+	+				+	Charpentier (1977); Lefebvre <i>et al.</i> (1983); Riboulet (1989); Codina <i>et al.</i> (1995)
<i>Tomentella cinerascens</i>		+						Saccardo (1895a)
<i>Trichoderma aureoviride</i>							+	Davis <i>et al.</i> (1981)
<i>Trichoderma harzianum</i>							+	Brezovsik (1985)
** <i>Trichoderma longibrahiatum</i>					+	+	+	Danesh <i>et al.</i> (1997); Alvarez-Rodriguez <i>et al.</i> (2000); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000)
<i>Trichoderma pseudoconingii</i>			+					Quadro 1
<i>Trichoderma viride</i>		+	+	+	+	+	+	Moreau (1978); Quinta & Martins (1990); Codina <i>et al.</i> (1995); Santos & Bragança (1996); Veja-Garcia <i>et al.</i> (2000); Quadro 1
** <i>Trichoderma</i> sp		+			+	+	+	Azema (1979); Moreau (1978); Davis <i>et al.</i> (1981); Lee <i>et al.</i> (1984); Daly <i>et al.</i> (1984); Codina <i>et al.</i> (1995); Oliveira <i>et al.</i> (2000)
<i>Trichotecium roseum</i>	+							Santos (1992)
* <i>Valsaria insitiva</i>	+							Santos (1992)
<i>Xilocladium</i> sp.				+	+			Santos & Bragança (1996)

Legenda: (A) entrecasco; (B) árvore; (C) pilha no campo; (D) fábrica antes da cozedura; (E) fábrica após cozedura (maturação); (F) linha de produção de rolhas; (G) rolha; (+) presença dos isolados; (*) Populações patogénicas; (**) Populações referidas como produtoras de compostos que alteram a qualidade da cortiça e do vinho.

Agradecimentos

À colega Maria de Lurdes Inácio pela ajuda na recolha de alguns dados

Este estudo foi financiado pelo projecto POCTI/PRAXIS n.º11237/98

Bibliografia

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.I., LARRIBA, G., COQUE, J.J.R., 2000. Microbiology of cork: isolation of microorganisms producing 2,4,6-trichloroanisole and suberolytic microorganisms. *Congresso Mundial do Sobreiro e da Cortiça*. Lisboa, pp. 831-841.

AMON, J.M., VANDEPEER, J.M., SIMPSON, R.F., 1989. Compounds responsible for cork taint in wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 4: 62-69.

AZEMA, P., 1979. *Étude des différentes théories sur les «goûts de bouchons»* (mimeog.).

AZEVEDO, N.F., MACARA, A.M., 1963. *Quelques observations sur la pathogenicité du "charbon du liber"*. FAO/SCM/LG/63. Anexo IV.

AZEVEDO, N.F.S., 1971. *Forest Tree Diseases*. Direcção dos Serviços Florestais e Aquícolas. Lisboa, 101 pp.

AZEVEDO, N.F.S., 1976. *Écologie des souches de l'Armillaria du Quercus suber L.* *Agriculture Conspictus Scietificus* 39:485-493

- BARBOSA, M.A.F., 1958. O carvão do entrecasco, *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.) Ces. et de Not. Contribuição para o seu estudo. *Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas XXV*: 93-132.
- BELISARIO, A., MOTTA, E., BIOCCA, M., 1992. Occurrence and role of exudations in turkey oak decline in Central Italy. *Proceedings of an International Congress. Selva di Fasano (Brindisi), Italy*, pp. 149 - 154.
- BORJESSON, T.S., STOLLMAN, U.M., SCHNUR, J.L. 1993. Off - odorous compounds produced by moulds on oatmeal agar: identification and relation to growth characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**: 2104-2111.
- BORDAS, M.F., 1904. *Physique biologique de la stérilisation du liège*. (mimeog.).
- BREZOVSIC, L., 1984. The microflora of the cork. *Szeloetermesztes Boroszat* **6**: 321-324.
- BUSER, H.R., ZANIER, C., TANNER, H., 1982. Identification of 2, 4, 6 - trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **30**: 359-362.
- CADAHIA, D., COBOS, J.M., SORIA, S., CLAUSER, F., GELLINI, R., GROSSONI, P., FERREIRA, M.C., 1991. *Observation of Damages to Mediterranean Forest Species*. Ministry for Agriculture, Fisheries and Food. Madrid.
- CARRIÇO, S.R., 1997. *Estudo da composição química, da estrutura celular e dos componentes voláteis da cortiça de Quercus suber L.* Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro.
- CENTENO, S., CALVO, M.A., 2001. Enzymatic activity of micro-organisms isolated from cork wine stoppers. *Microbios* **106** : 69-73.
- CHARPENTIER, M., 1977. Apparation des goûts de bouchon en relation avec le développement des levures dans le liège. *Revue Française de CEnologie* **16**: 60-62.
- CODINA, J., ESTEBAN, C., CALVO, A., 1995. *Influence of microorganisms in cases of cork taint* (mimeog.).
- CODINA, J., LLADO, N., TORRAS, A.C., 2000. Microbiologia ambiental en los procesos de producción de tapones de corcho. Evaluacion de los metodos estatico y dinamico utilizados. *Congresso Mundial do Sobreiro e da Cortiça*. Lisboa, pp. 796-803.
- COLLINS, R.P., KNAAK, L.E., SOBOSKI, J.W., 1970. Production of geosmin and 2-exo-hydroxy-2-methbornane by *Streptomyces odorifer*. *Lloydia* **33**: 199.
- DALY, N.M., LEE, T.H., FLEET, G.H., 1984. Growth of fungi on wine corks and its contribution to cork taints in wine. *Food Technology in Australia* **36**: 22-34.
- DANESH, P., CALDAS, F.M.V., MARQUES, J.J.F., SAN ROMÃO, M.V., 1997. Mycobiota in Portuguese "normal" and "green" cork throughout the manufacturing process of stoppers. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 689-694.
- DAVIS, C., FLEET, G.H., LEE, T., 1981. The microflora of wine corks. *Australian Grapegrower Winemaker* **208**: 42-44.
- FESTAS, I., HERBERT, P., SANTOS, L., CABRAL, M., BARROS, P., ALVES, A., 2000. Ochratoxin in some portuguese wines: method of validation and sceening in Port wine and vinho verde. *American Journal of Eenology and Viticulture* **51**: 150-154.
- FONSECA, N., 1991a. Seca dos ramos (Dieback) em sobreiro e azinheira. Notícia da *Botryosphaeria stevensii* como agente responsável. *Floresta e Ambiente* **12**: 27.
- FONSECA, N., 1991b. Cancro e seca dos ramos (Dieback) em sobreiro e azinheira. Notícia de *Coryneum modomium* como agente responsável. *Floresta e Ambiente* **13**: 60.
- FRANCHESCHINI, A., MARRAS, F., SECHI, C., 1993. Funghi *Signalati sulla Quercia da sughero (Quercus suber L.)*. *Collana Biológica* n° 3. Stazione Sperimentale del Sughero, Tempo Pausania, Italia.
- FRANCHESCHINI, A.A., MADDAU, I., MARRAS, F., 2002. Incidence d'endophytes fongiques impliqués dans le dépérissement du chène liège. *Comptes rendus de la Réunion sur la Protection Intégrée des Forêts de Chênes*. Oeiras, Portugal, pp. 29-36.

- GOMES, J.V.M., 1983. Aspectos microbiológicos ligados à desinfecção das rolhas de cortiça usadas no engarrafamento de vinho do Porto. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais, Cortiça* **531**: 5-11.
- HALIM, A.F., NARCISO, J.A., COLLINS, R.P., 1975. Odorous constituents of *Penicillium decumbens*. *Mycologia* **67**: 1159-1165.
- HEIMANN, W., RAPP, A., VOELTER, L., KIMPER, W., 1983. On the formation of mouldy smell in wine. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **79**: 103-107.
- KAMINSKI, E., LIBBEY, L.M., WASOWICZ, E., 1972. Identification of the dominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology* **24**: 721-726.
- LEE, T.H., SIMPSON, R.F., VANDEPEER, J.M., FLEET, G.H., DAVIS, C.R., DALY, N.M., YAP, A.S.J., 1984. Microbiology of wine corks. *V Australian Wine Industry Technical Conference*. Perth, Australia, pp. 435-450.
- LEE, T.H., SIMPSON, R.F., 1990. Cork and oak taints in wine. *Proceedings of the "New Zealand Grape and Wine Symposium - Present and Future"*. Auckland, New Zealand. Wellington Society of Viticulture and Oenology, pp. 43-47
- LEFEBVRE, A., RIBOULET, M., BOIDRON, N., RIBEREAU-GAYON, P., 1983. Incidence des microorganismes du liège sur les altérations olfactives du vin. *Sciences des Aliments* **3**: 265-278.
- LIESE W., GUNZERODT, H., PARAMESWARAN, N., 1983. Alterações biológicas da qualidade da cortiça que afectam a sua utilização. *Boletim do Instituto de Produtos Florestais, Cortiça* **541**: 177-297.
- LISSIA, F., 2000. As rolhas de cortiça. Os problemas de engarrafamento. *Floresta e Ambiente* **49**: 25-28.
- MACARA, A.M., 1975. Estimativa em 1975 dos prejuízos causados pelas principais doenças do sobreiro num montado da região ribatejana. *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais, Cortiça* nº 444. Lisboa.
- MAIGE, M.A., 1912. Études sur la «tache jaune» du liège. *Bulletin de la Station de Recherche Forestière du Nord de l'Afrique* **1**: 10-27, cit. Natividade (1950).
- MARRIL, S., 1902. Notes sur la «tache jaune» du liège. *Bulletin de la Station de Recherche Forestière du Nord de l'Afrique* **1**: 331-335, cit. Natividade (1950).
- MOREAU, 1978. La mycoflore des bouchons de liège. Son évolution au contact du vin. Consequences possibles du métabolisme des moisissures. *Revue de Mycologie* **42**: 155-189.
- MAUJEANT, A., MILLERY, P., LEMASRESQUIER, H., 1985. Explications biochimiques et métaboliques de la confusion entre goût de bouchon et goût de noisi. *Revue Française d'Œnologie* **99**: 55-62.
- NATIVIDADE, J.V., 1950. *Subericultura*. Ministério da Economia. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Lisboa, 387 pp.
- NAVASCUÉS, E., CALDERÓN, F., SUÁREZ, J.A., El metabolismo microbiano en el binomio corcho-vino. http://www.acenologia.com/ciencia54_1.htm
- OLIVEIRA, A.B., 1931. Apontamentos para o estudo de duas doenças do sobreiro. *Revista Agronómica* **19**: 37-56.
- OLIVEIRA, A.C., PERES, C., PEREIRA, C.S., PIRES, J.M., BARRETO, M.T.C., SAN ROMÃO, M.V., MARQUES, J.J.F., 2000. Colonização fúngica nos ambientes fabris de preparação da cortiça. *Congresso Mundial do Sobreiro e da Cortiça*. Lisboa, pp. 790-795.
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920a. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 856, cit. Francheschini et al. (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920b. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 856, cit. Francheschini et al. (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920c. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 856, cit. Francheschini et al. (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920d. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 855, cit. Francheschini et al. (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920e. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 855, cit. Francheschini et al. (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920f. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 857, cit. Francheschini et al. (1993).

- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920g. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 856, cit. Francheschini *et al.* (1993).
- OUDEMANS, C.A.J.A., 1920h. *Enumeratio Systematica Fungorum* **2**: 856, cit. Francheschini *et al.* (1993).
- PEREIRA, C.S., DANESH, P., MARQUES, J.J.F., SAN ROMÃO, M.V., 1999. O gosto a rolha em vinhos - estado actual dos conhecimentos. *Ciência e Técnica. Vitivinícola* **14**: 79-99.
- PEREIRA, C.S., MARQUES, J.J.F., SAN ROMÃO, 2000a. Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception - a critical review. *Critical Reviews in Microbiology* **26**: 147 - 162.
- PEREIRA, C.S., PIRES, A., VALLE, M.J., BOAS, L.V., MARQUES, J.J.F., SAN ROMÃO, M.V., 2000b. Role of *Chrysonilia sitophila* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles. *Journal of the Industrial Microbiology and Biotechnology* **24**: 256-261.
- PÉS, A., VODRET, A., 1971. Il gusto di tappo nei vini in bottiglia. *Collana Tecnologica* **3**: 1-12. Station Experimentale del Suggero. Tempo pausania, Sassari, Italia.
- QUINTA, M.L., MARTINS, 1980. Contribuição para o estudo micológico do processo de fabrico de rolhas de cortiça em Portugal. *I Jornadas Luso Espanholas de Micologia*. Lisboa, 15 p.
- RAMOS, H.P.M., 1995. *Contribuição para o Estudo da Micoflora do Sobreiro*. Relatório do trabalho de fim de curso. Instituto Superior de Agronomia, 81 p.
- RIBOULET, J.M., 1983. Os «gostos a rolha». *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais, Cortiça* **539**: 227-228.
- RIBOULET, J.M., 1989. Goûts de bouchon: le point sur les origins et les recherches. *Revue des CEnologues* **53**: 41-43.
- RIBOULET, J.M., 1991. *Cork tastes*. Australian Wine Research Institute, reprint n° 388.
- SACCARDO, P.A., 1884. *Syllogne Fungorum* **3**: 58, cit. Francheschini *et al.* (1993).
- SACCARDO, P.A., 1886. *Syllogne Fungorum* **4** : 277, cit. Francheschini *et al.*(1993).
- SACCARDO, P.A., 1895a. *Syllogne Fungorum* **11**: 117, cit. Francheschini *et al.* (1993).
- SANTOS, M.N.S., 1992. Micoflora do entrecasco de sobreiros em declínio. *Actas do 2º Encontro sobre os Montados de Sobro e Azinho*. Évora, pp. 211-216.
- SANTOS, M.N.S., BRAGANÇA, M.H., 1996. Caracterização da micoflora da cortiça desde o descortiçamento à cura. *Silva Lusitana* **4**:129-136.
- SIMPSON, R.F., 1990. Cork taint in wine: A review of the causes. *Wine Industry Journal* **5**: 288- 297.
- SIMPSON, R.F., LEE, T.H., 1990. The microbiology and tains of cork and oak. *International Oenological Symposium*. Cascais, Portugal, pp. 663-667.
- SRINGETT, M.B, 1986. Project *Quercus* Report. Cork taint - a review (mimeog.).
- SHANDERL, H., 1964. Microbiologia da cortiça. *Boletim da Junta Nacional da Cortiça* **305**: 51-55.
- SUAREZ, I.A., NAVASCUÉS, E., CALDERÓN, F., VILA, J., COLOMBO, B., GARCIA-VALLEJO, 1997. Présence de champignons et concentration de chloanisoles pendant le processus de fabrication des bouchons de liège pour l'embouteillage des vins. *Bolletim de l'O.I.V.* **70**: 790-794.
- VEGA-GARCIA, R., GONZÁLEZ-ANDRADOS J.R., MUÑOZ, C., 2000. Evolución de la flora microbiana en tapones de corcho con el tiempo de contacto corcho-vino. *Congreso Mundial sobre o Sobreiro e a Cortiça*. Lisboa, pp. 530-537.
- VITORINO, S., FARELEIRA, P., ALMEIDA-VARA, E., TENREIRO, R., SAN ROMÃO, M.V., 2000. Optimization of expression conditions of cellulolytic complex from *Chrysonilia sitophila*. *Congreso Mundial do Sobreiro e da Cortiça*. Lisboa, pp. 458-460

Entregue para publicação em Novembro de 2003
 Aceite para publicação em Fevereiro de 2004