

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

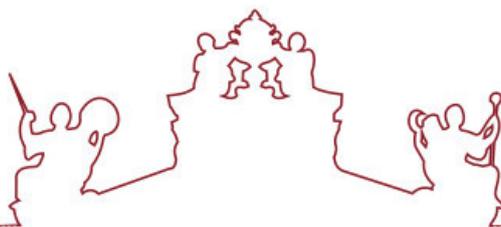
Dissertação

Desenvolvimento de um método para o diagnóstico dos principais fungos associados às doenças do lenho da videira no alentejo.

Maria Inês Pires Silva

Orientador(es) | Carla Marisa Varanda
Maria do Rosário Félix

Évora 2024



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

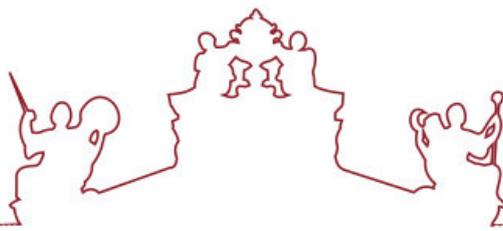
Desenvolvimento de um método para o diagnóstico dos principais fungos associados às doenças do lenho da videira no alentejo.

Maria Inês Pires Silva

Orientador(es) | Carla Marisa Varanda
Maria do Rosário Félix

Évora 2024





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

Presidente | Maria João Cabrita (Universidade de Évora)

Vogais | Carla Marisa Varanda (Universidade de Évora) (Orientador)
Maria Doroteia Campos (Universidade de Évora) (Arguente)

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.

O Pequeno Príncipe

Agradecimentos

Não poderia começar esta dissertação sem agradecer às minhas pessoas, aos que estão diariamente comigo e me fazem sorrir todos os dias. Sem agradecer a todos os que tornaram este sonho possível.

Quero agradecer às minhas orientadoras, professora Maria do Rosário Félix e professora Carla Varanda, por toda a ajuda prestada, conhecimento transmitido, compreensão e dedicação a este projeto, por fazerem do difícil algo mais fácil e possível.

Agradecer também à professora Maria Doroteia Campos, que desde o início acompanhou esta dissertação, esteve sempre disponível para esclarecimento de dúvidas e que me acompanhou em grande parte dos procedimentos laboratoriais. Um agradecimento também ao André, que também acompanhou de perto toda a execução desta dissertação.

Deixo também um agradecimento especial à Adega Mayor, por permitir que o estudo fosse feito a partir de amostras das videiras da vinha da adega, assim como ao André que acompanhou todo o processo de extração das amostras do campo.

Reforçar também o meu reconhecimento e gratidão a todo o pessoal do departamento de fitotecnia que tão bem me receberam e ajudaram no laboratório.

O agradecimento mais especial vai sem dúvida para a minha família, particularmente para os meus pais, irmã e avós que foram o meu pilar nos dias difíceis, que nunca me deixaram desistir e que me incentivaram a realizar este meu sonho.

Quero também agradecer ao Duarte, o meu mestre da Enologia, pela partilha de conhecimento diária, por gostar de ensinar, ajudar e por toda a compreensão que teve para comigo durante os meses que tive de dedicar a este projeto. Aproveito para agradecer também aos meus queridos colegas de trabalho, aos que são e aos que foram, que me acompanharam desde o início desta paixão pela Enologia.

Agradecer também aos meus amigos que estão e estiveram sempre comigo e aos que de uma forma ou outra me acompanharam durante o percurso universitário.

Também agradecer à Universidade de Évora e a todos os docentes que passaram pela minha vida e me ensinaram tanto durante esta minha formação profissional.

Por último, quero reforçar o meu agradecimento à minha avó materna, uma vez que foi ela que me acompanhou de perto durante estes 5 anos de Universidade e que sabe tão bem o que fui, como me dediquei e o como me esforcei. Por isso mesmo, esta conquista é dedicada a ela.

Resumo

O trabalho teve como objetivo desenvolver um método para o diagnóstico dos principais fungos associados às doenças do lenho da videira no Alentejo. Foram recolhidas amostras de videiras de duas castas diferentes Alicante Bouschet e Trincadeira de uma vinha localizada no Norte Alentejo (Campo Maior), com sintomas de doenças do lenho visíveis nas folhas das videiras. Foram diagnosticados vários fungos associados às doenças do lenho, aquando da sequenciação do DNA extraído de cada uma das amostras, entre os quais *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*. Estabeleceu-se um teste de PCR quantitativo multiplex para deteção e quantificação simultânea destes fungos nas amostras recolhidas em Campo Maior. Os resultados apresentados mostram o potencial da reação PCR Multiplex na deteção simultânea e quantificação destes dois fungos, associados às doenças do lenho.

PALAVRAS-CHAVE: Deteção, fungos do lenho, identificação, PCR em tempo real, vinha.

ABSTRACT

Development of a method for diagnosing the main fungi associated with grapevine trunk diseases in Alentejo.

The aim of this work was to develop a method for diagnosing the main fungi associated with grapevine trunk diseases in Alentejo. Samples were taken from vines of two different grape varieties, Alicante Bouschet and Trincadeira, from a vineyard located in the north of Alentejo (Campo Maior), with symptoms of trunk diseases visible on the leaves of the vines. Several fungi associated with trunk diseases were diagnosed by sequencing the DNA extracted from each of the samples, including *Phaeoacremonium minimum* and *Phaemoniella chlamydospora*. A multiplex quantitative PCR test was established for the simultaneous detection and quantification of these fungi in the samples that were collected in Campo Maior. The results show the potential of the Multiplex PCR reaction for the simultaneous detection and quantification of these two fungi associated with trunk diseases.

KEY WORDS: Detection, trunk fungi, identification, real-time PCR, vines.

Índice geral

Índice de Figuras	3
Índice de Tabelas	6
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	7
1. Introdução	8
2. Revisão bibliográfica	11
2.1 A videira no mundo	12
2.2 As doenças do lenho, sintomas e impactos na videira	14
2.3 Incidência das doenças do lenho no mundo	16
2.4 Principais doenças do lenho	17
2.4.1 Pé negro	17
2.4.2 Doença de Petri	19
2.4.3 Escoriose Europeia	20
2.4.5 Escoriose Americana	21
2.4.6 Esca	22
2.4.7 Eutipiose	24
2.5 Métodos de deteção de fungos causadores de doenças do lenho	25
2.5.1 PCR Convencional	26
2.5.2 PCR quantitativo	27
2.5.3 PCR Multiplex	28
2.6 Formas de minimizar a propagação e impacto das doenças do lenho	28
3. Objetivo	31
4. Materiais e Métodos	33
4.1 Marcação das videiras na vinha	34
4.2 Recolha das amostras	36
4.3 Maceração das amostras	37
4.4 Extração do DNA das amostras maceradas	38
4.5 Reação PCR quantitativo para deteção e quantificação simultânea de <i>Phaeoacremonium minimum</i> e <i>Phaemoniella chlamydospora</i>	39
5. Resultados	41
5.1 Extração de DNA	42
5.2 Análise metagenómica	44
5.3 Resultados da segunda extração de DNA	47
5.4 Deteção dos fungos <i>Phaeoacremonium minimum</i> e <i>Phaemoniella chlamydospora</i> no teste multiplex qPCR	48
6. Discussão	52

7. Conclusão e perspectivas futuras	57
8. Referências bibliográficas	59

Índice de Figuras

Figura 1: Dispersão da cultura da vinha no mundo, área em kha (A) e em % (B e C) (Adaptado de: Nogueira et al., 2022).

Figura 2: Percentagem de produção de uvas a nível mundial (Adaptado de: Muntean et al., 2022).

Figura 3: Comparação entre a incidência de sintomas de doenças do lenho e a idade da videira (Adaptado de OIV, 2016).

Figura 4: Raiz de planta afetada com pé negro (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).

Figura 5: Pontuações e necroses visíveis num corte transversal feito na base da videira (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).

Figura 6: Videira morta, afetada pelo pé negro (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).

Figura 7: Tronco de videira afetada pela doença de Petri (Adaptado de: images.app.goo.gl/cAiX7R99KykfTWF37).

Figura 8: Folha de videiras com sintoma de Doença de Petri (Adaptado de: pt.dreamstime.com/doença-de-petri).

Figura 9: Folhas de videira com manchas cloróticas (Adaptado de: www.drapc.gov.pt/base/documentos).

Figura 10: Pâmpano de videira afetada com Escoriose Europeia (Adaptado de: www.ivdp.pt/pt/docs/ficha_escoriose).

Figura 11: Talão de videira salpicada de pontos negros (picnídeos) (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-escoriose-americana-em-vinha).

Figura 12: Folha de videira com pontuações necrosadas (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-escoriose-americana-em-vinha).

Figura 13: Sintomas de Esca na folha da videira (Adaptado de: www.advid.pt/uploads/DOCUMENTOS).

Figura 14: Sintomas de Esca na cepa da videira (Adaptado de: www.advid.pt/uploads/DOCUMENTOS).

Figura 15: Vinha com Eutipiose. Cachos mais pequenos. (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-eutipiose-em-vinha).

Figura 16: Destacamento do ritdoma da planta. (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-eutipiose-em-vinha).

Figura 17: Marcação de videiras da casta T com sintomas de doenças do lenho na folhagem na Adega Mayor, Campo Maior.

Figura 18: Marcação de videiras da casta AB com sintomas de doenças do lenho na folhagem Adega Mayor, Campo Maior.

Figura 19: Linha com videiras sintomáticas da casta Trincadeira.

Figura 20: Linha com videiras sintomáticas da casta Alicante Bouschet.

Figura 21: Sintomas de doenças do lenho em cachos e folhas de uma videira.

Figura 22: Sintomas visíveis nas folhas de doenças do lenho.

Figura 23: Sintomas visíveis em cachos e folhas de uma videira afetada com doenças do lenho.

Figura 24: Videira com sintomas visíveis de doenças do lenho.

Figura 25: Corte de partes do sarmento apanhando a zona de inserção no tronco principal.

Figura 26: Corte das pontas da amostra com a tesoura de poda.

Figura 27: Corte da amostra em pedaços mais pequenos com a tesoura de poda.

Figura 28: Pedacos da amostra no moinho triturador.

Figura 29: Adição de azoto líquido à amostra triturada.

Figura 30: Maceração da amostra com um pilão.

Figura 31: Enchimento dos *ependorfs* com a amostra macerada.

Figura 32: Caixa com todas as amostras antes de serem congeladas.

Figura 33: Preenchimento dos poços com o DNA extraído das amostras.

Figura 34: Amplificação das amostras de Alicante Bouschet e Trincadeira que foram extraídas da Adega Mayor para o fungo *Phaemoniella chlamydospora*.

Figura 35: Amplificação das amostras de Alicante Bouschet e Trincadeira que foram extraídas da Adega Mayor para o fungo *Phaeoacremonium minimum*.

Índice de Tabelas

Tabela 1: Concentração e determinação das razões 260/280 e 260/230 do DNA extraído das amostras das videiras das castas Alicante Bouschet (AB) e Trincadeira (T). A amarelo estão destacadas as amostras que foram enviadas para a empresa de sequenciação do DNA.

Tabela 2: Quantidade de ‘reads’ encontradas no DNA extraído das amostras das videiras. AB- “Alicante Bouschet”.

Tabela 3: Fungos associados às doenças do lenho da videira detetados na sequenciação do DNA extraído das amostras das videiras.

Tabela 4: Quantidade e qualidade do DNA obtido na segunda extração das amostras das videiras.

Tabela 5: Valores de Ct para cada um dos fungos associados às doenças do lenho da videira, em cada uma das amostras.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

OIV- Organização Internacional da Vinha e do Vinho

AB- Alicante Bouschet

T- Trincadeira

CM- Campo Maior

PCR- Reação da Polimerase em cadeia (Polymerase chain reaction)

qPCR- PCR quantitativo

ITS- Internal Transcribed Spacer

Ct- Cycle threshold

N.D. – Não detetado

1. Introdução

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma espécie distribuída mundialmente, devido principalmente à sua grande capacidade de adaptação às diversas condições ambientais (Nogueira et al., 2022). Esta espécie é das mais plantadas em todo o mundo, devido ao seu alto valor comercial e interesse para produção de uvas de mesa, de passa ou para a produção de vinho (Gramaje et al., 2018).

Uma das maiores dificuldades do cultivo da videira é a sua suscetibilidade a uma ampla gama de agentes patogênicos, como vírus, bactérias, nematodes e fungos que podem provocar vários graus de danos nas vinhas. A vinha é suscetível a várias doenças, de entre as quais as doenças do lenho, que têm extrema importância e impacto nesta cultura, estando distribuídas por todo o mundo e causando prejuízos elevados na viticultura. As doenças do lenho são consideradas as doenças mais destrutivas da videira nas regiões produtoras de uva, e têm vindo a ser um motivo de preocupação cada vez maior nos países produtores de uva e de vinho (Ye et al., 2021). As doenças do lenho são uns dos principais stresses bióticos que afetam a videira e que contribuem para a redução da produção e do seu tempo de vida (Chacón et al., 2021). Estas doenças são as principais causadoras da diminuição do número de videiras jovens, principalmente nos países europeus (Claverie et al., 2020). O declínio das videiras jovens inclui as doenças Pé negro, cujo agente causal é *Cylindrocarpon* spp. e Doença de Petri causada por *Phaeoacremonium* spp. e *Phaemoniella chlamydospora*. As doenças do lenho incluem ainda a Escoriose Americana causada por fungos do género *Phomopsis* sendo o principal *Phomopsis viticola*, Escoriose Europeia causada por fungos da família Botryosphaeraceae, a Esca causada por *Phaemoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp., *Fomitiporia mediterranea* e *Ficus punctata* e a Eutipiose causada por *Eutypa* spp. sendo a espécie mais disseminada a *Eutypa lata*.

Os sintomas das doenças do lenho são caracterizados por atraso no desenvolvimento das plantas, menor vigor, dessecamento de inflorescências e cachos, cloroses e/ou avermelhamento precoce das folhas e morte de braços ou das plantas completas. Cortes transversais e/ou longitudinais dos troncos que mostram muitas vezes pontuações e lesões necróticas.

As doenças do lenho constituem um grande problema principalmente na sua deteção precoce porque podem passar despercebidas durante grande parte da sua evolução, manifestando sintomas apenas quando os danos são já irreparáveis. Desta forma, o diagnóstico atempado é de extrema importância de forma que se limite a rápida

propagação da doença para videiras saudáveis. Tal é ainda mais importante pelo facto de não existirem tratamentos curativos para a maioria destas doenças que ameaçam o nosso património vitícola.

2. Revisão bibliográfica

2.1 A videira no mundo

A videira (*Vitis vinifera* L.) é considerada uma das culturas mais importantes a nível mundial, devido essencialmente ao elevado valor comercial das uvas de mesa, uvas passa e produção de vinho (Muntean et al., 2022).

As vinhas de *Vitis vinifera* estão localizadas principalmente na região mediterrânica e noutras regiões de clima temperado de latitudes entre 30° e 50°, tanto no hemisfério Norte como no hemisfério Sul, mais especificamente na Europa Central e no sudoeste da Ásia, desde Marrocos e Portugal até ao norte e sul da Alemanha e a Leste até ao norte do Irão (Gramaje et al., 2018). A videira encontra-se distribuída praticamente por todo o mundo (Figura 1), devido principalmente à sua elevada capacidade de adaptação (Nogueira et al., 2022).

O continente europeu, com 3,55 milhões de hectares de área de vinha e 28,9 milhões de toneladas de uvas, representa cerca de 50% da área mundial (FAOSTAT 2013) e lidera assim a produção a nível mundial (Figura 2), seguido pela Ásia (2,04 milhões de hectares) (Gramaje et al., 2018). Atualmente, a videira constitui um enorme património cultural, além de que esta cultura é muito importante para os países produtores de vinho (Nogueira et al., 2022).

A produção de vinho mobiliza elevados valores monetários, com o mercado global a atingir mais de 29 mil milhões de euros em 2020, maioritariamente sob a forma de vinho engarrafado (OIV, 2020). Assim, qualquer fator que possa conduzir à diminuição do rendimento, perda de qualidade ou degradação da vinha irá afetar substancialmente o retorno económico dos produtores (Nogueira et al., 2022).

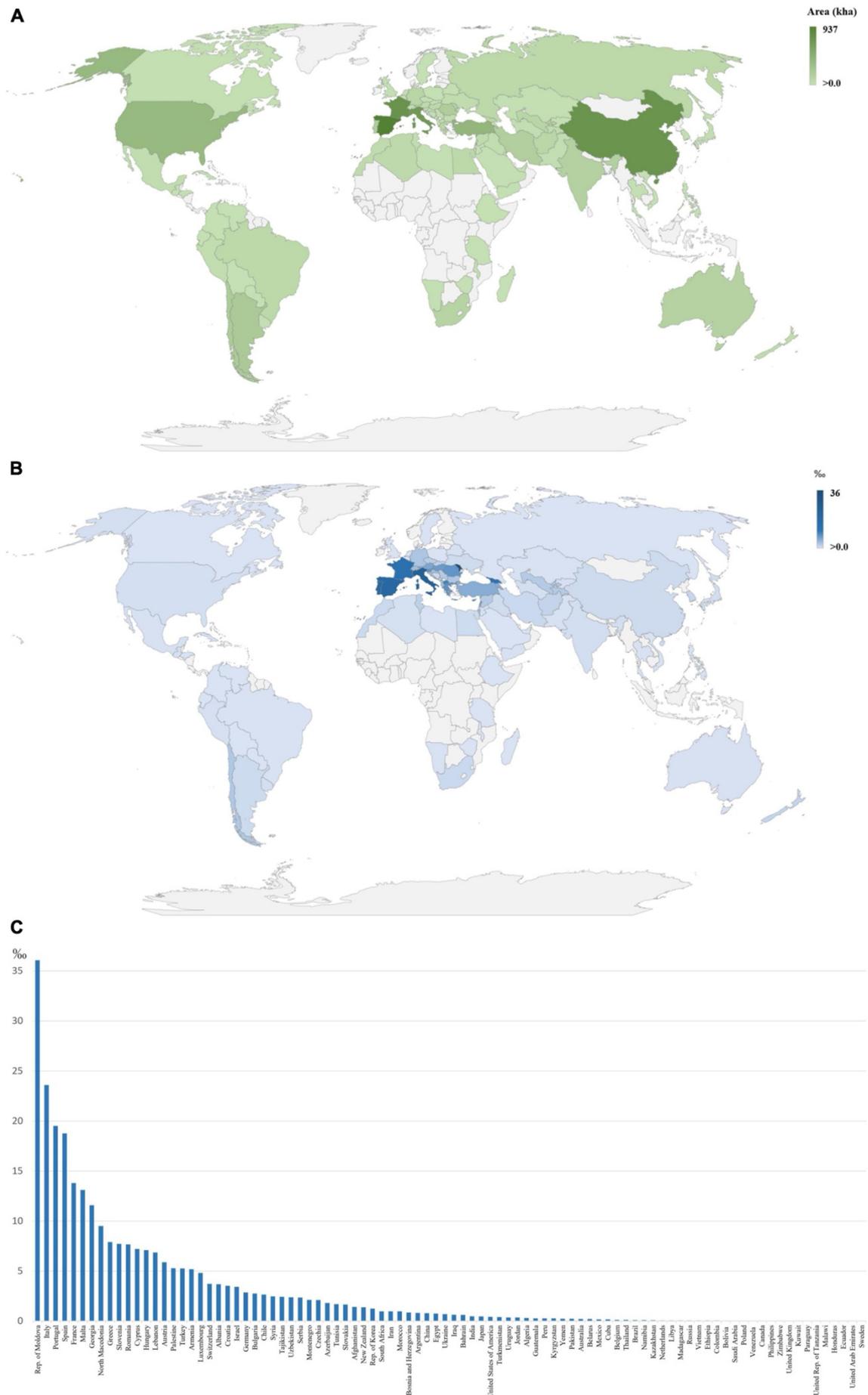


Figura 1: Dispersão da cultura da vinha no mundo, área em kha (A) e em % (B e C) (Adaptado de: Nogueira et al., 2022).

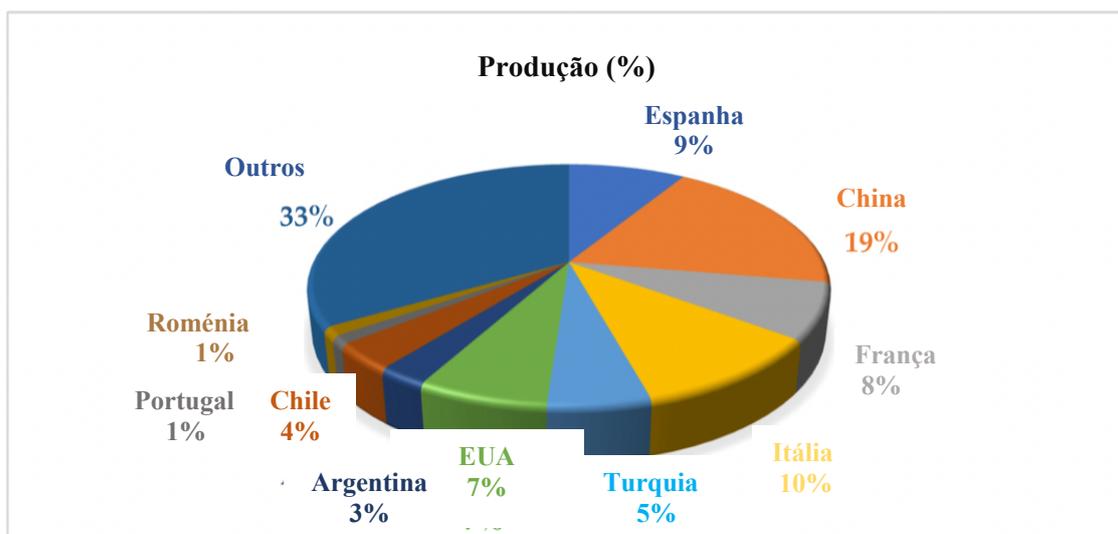


Figura 2: Percentagem de produção de uvas a nível mundial (Adaptado de: Muntean et al., 2022).

2.2 As doenças do lenho, sintomas e impactos na videira

O aparecimento das doenças do lenho está associado a vários fatores, como por exemplo alterações nas práticas culturais e na gestão da cultura, proibição da aplicação de fungicidas, como o arsenito de sódio, contra fungos causadores das doenças do lenho (Chacón et al., 2021) e maus sistemas de condução e poda (Rubio e Garzón, 2011). O aumento da incidência destas doenças, nos últimos anos deve-se essencialmente a fatores ambientais, culturais e patogénicos (Chacón et al., 2021).

As doenças do lenho provocam vários sintomas nas videiras que são observados nas folhas, nos cachos e no tecido vascular, que rapidamente podem levar à morte da planta. Fatores como o clima, a própria vinha e o seu modo de gestão podem levar a diferentes padrões de sintomatologia das doenças do lenho (Nogueira et al., 2022). Estas doenças são provocadas por um grupo de fungos que infetam as videiras principalmente através de feridas de poda, colonizando posteriormente os tecidos vasculares (Mugnai 2011), ou através de aberturas naturais (Gubler et al., 2005). Assim, as feridas da poda são o principal local de entrada dos fungos causadores destas doenças. As doenças do lenho da videira são causadas por vários fungos pertencentes a diferentes famílias (Mondello et al., 2018). Para além das feridas, as doenças do lenho podem ser propagadas através da plantação de bacelos enxertados com infeção proveniente de viveiro (Chacón et al., 2021). A libertação dos esporos dos fungos e a transmissão aérea desses esporos de planta para planta estão associados principalmente à precipitação, à exceção dos agentes

patogênicos causadores da doença do pé negro, que são transmitidos pelo solo (Hrycan et al., 2020). Os fungos causadores das doenças do lenho libertam esporos que facilmente alcançam e proliferam nas videiras, pois são transportados pela chuva, pelo vento, insetos ou até mesmo por outros animais ou haver presença de inóculo no solo (Gramaje et al. 2018). Depois, os fungos colonizam os vasos xilêmicos das videiras, fazendo com que haja uma redução do fluxo de nutrientes e água na planta, e que ocorra liberação de toxinas e haja degradação das paredes celulares dos vasos xilêmicos devido à liberação de enzimas hidrolíticas (Obrador-Sánchez e Hernandez-Martinez, 2020). As videiras têm um maior risco de infecção por fungos causadores das doenças do lenho após a poda, devido ao elevado número de feridas numa planta e à probabilidade de ocorrência de chuva nesse período (Chacón et al., 2021).

Uma das principais dificuldades no controlo destas doenças consiste na identificação de videiras afetadas pelas doenças do lenho, uma vez que os sintomas destas doenças são erráticos e maioritariamente visíveis nas folhas ou nos cachos das videiras, numa fase já avançada do ciclo produtivo, o que dificulta a sua identificação precoce e impossibilita muitas vezes a intervenção atempada. Além disso, existe uma grande diversidade na expressão externa dos sintomas, uma vez que os sintomas nas folhas e nos cachos podem ser visíveis num ano, mas no ano seguinte não, estando esta sintomatologia estreitamente ligada também aos fatores climáticos (Mondello et al., 2018).

As doenças do lenho da videira são causadas por fungos colonizadores do xilema e são consideradas doenças de progressão lenta, com sintomas que por vezes demoram vários anos a aparecer após infecção (Hrycan et al., 2020). Estes colonizam a madeira dos órgãos perenes da videira provocando sintomas como necroses da madeira, descoloração da madeira, infecções vasculares (Bertsch et al., 2013), presença de manchas castanhas ou cancrios e descoloração e secagem das folhas (Larignon et al., 2009). As videiras afetadas pelas doenças do lenho apresentam também sintomas como abrolhamento tardio, botões mortos, cloroses, apoplexia e desenvolvimento anormal dos órgãos da planta. Estes sintomas surgem muitas vezes associados a estas doenças e podem levar à perda de produtividade da videira assim como à sua morte (Fontaine et al., 2016).

Em videiras jovens verificam-se sintomas como vigor reduzido, abrolhamento tardio, ou ausência de abrolhamento, entrenós curtos, folhagem reduzida, cloroses nas folhas e folhas com margens necróticas (Gramaje e Armengol, 2011).

Os agentes patogénicos causadores das doenças do lenho causam frequentemente infeções mistas, é muito raro encontrar uma videira que esteja exclusivamente infetada por uma única espécie de fungos. As doenças do lenho são causadas essencialmente por fungos pertencentes aos Filos Basidiomycota e Ascomycota (Baumgartner et al., 2013).

2.3 Incidência das doenças do lenho no mundo

Tem-se verificado um aumento da percentagem de sintomas associados a doenças do lenho à medida que aumenta a idade da videira (Figura 3) (OIV, 2016).

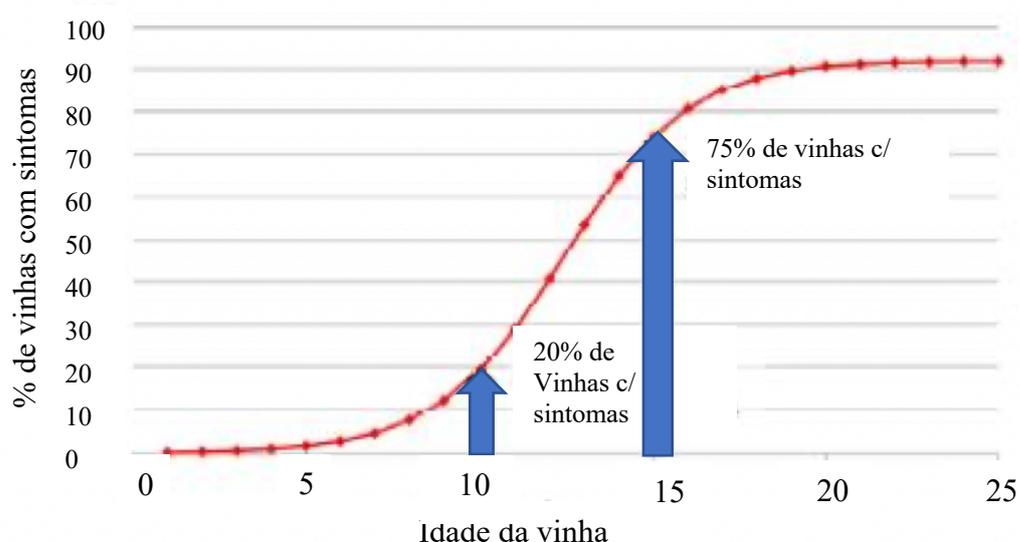


Figura 3: Comparação entre a incidência de sintomas de doenças do lenho e a idade da videira (Adaptado de OIV, 2016).

Segundo dados do OIV, por exemplo, em Espanha, desde 2003 (ano da proibição do arsenito de sódio em Espanha), as doenças do lenho da videira cresceram de 1,8% de vinhas afetadas para 10,5% em 2007 (Rubio e Garzón, 2011); cerca de 13% das vinhas francesas foram afetadas por doenças do lenho; em Itália, verificou-se uma incidência de doenças do lenho da videira de 60% a 80% em algumas vinhas velhas (Muntean et al., 2022). A OIV estima que todos os anos são investidos 1,5 mil milhões de dólares no arranque e replantação das vinhas afetadas por estas doenças (OIV, 2016).

Em Portugal, as doenças do lenho estão bastante dispersas por todas as regiões vitícolas, mostrando uma maior incidência nas regiões dos Vinhos Verdes, Douro, Dão e Alentejo. A Escoriose Europeia e a Esca são as principais doenças das videiras adultas e causam danos e perdas económicas consideráveis (OIV, 2016).

2.4 Principais doenças do lenho

As principais doenças do lenho que afetam as videiras são: Pé Negro e Doença de Petri e Esca, Escoriose Europeia, Eutipiose e Escoriose Americana (Mondello et al., 2018). O Pé Negro e a Doença de Petri afetam os bachelos e vinhas jovens (até oito anos de idade), enquanto doenças como a Esca, a Escoriose Europeia, e a Eutipiose afetam principalmente vinhas mais velhas, com mais de oito anos de idade (Chacón et al., 2021). Estas doenças são consideradas das doenças mais destrutivas para a vinha, sendo que a sua propagação contínua é uma ameaça para a sustentabilidade desta cultura no mundo (Ouadi et al., 2019).

Evidências crescentes apoiam a teoria de que as propriedades estruturais do sistema vascular têm impacto na vulnerabilidade do hospedeiro a agentes patogénicos responsáveis por doenças do lenho (Pouzoulet et al., 2017).

As videiras podem ser afetadas por uma ou mais doenças do lenho ao mesmo tempo, uma vez que as videiras podem ser infetadas com diferentes agentes patogénicos simultaneamente, devido às várias oportunidades de infeção ao longo do período de vida da planta (Gramaje et al., 2018).

2.4.1 Pé Negro

Os fungos associados ao Pé Negro e à Doença de Petri são considerados os principais causadores da morte de vinhas jovens ou porta-enxertos em viveiros (Cardoso et al., 2014). Os agentes patogénicos do Pé Negro são transmitidos pelo solo, e infetam as raízes e a extremidade basal dos porta-enxertos durante a fase de enraizamento (Hrycan et al., 2020). Além disso, as plantas-mãe dos porta enxertos também são consideradas uma das fontes de inóculo de fungos causadores desta doença (Cardoso et al., 2014). Os agentes patogénicos causadores desta doença são fungos dos géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella* e *Ilyonectria* (Armengol., 2013). Os fungos

causadores da doença do Pé negro na videira são também considerados saprófitas, uma vez que têm um ciclo de vida em que as estruturas infecciosas, como os esporos, podem colonizar os restos da poda das videiras ou estar presentes no solo (Nogueira et al., 2022).

Os sintomas característicos da doença do Pé Negro incluem redução da biomassa radicular, assim como dos pelos radiculares e manchas necróticas nas raízes da planta (Figura 4). Além disso, forma-se uma coroa de raízes junto à superfície do solo, de modo a compensar a perda de raízes funcionais da planta. Quando se remove o ritidoma do tronco da videira, este apresenta uma coloração preta (necrose- Figura 5) (Agustí-Brisach e Armengol, 2013). Outros sintomas característicos desta patologia são a redução do vigor das videiras, folhas pequenas, entrenós curtos, cloroses e até mesmo a morte da planta (Figura 6) (Gramaje et al., 2018).



Figura 4: Raiz de planta afetada com Pé Negro (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).



Figura 5: Pontuações e necroses visíveis num corte transversal feito na base da videira (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).

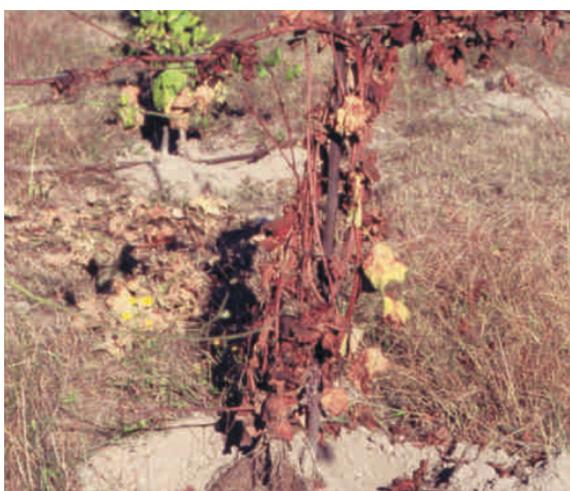


Figura 6: Videira morta, afetada pelo pé negro (Adaptado de: www.drapnorte.gov.pt/drapn/conteudos).

2.4.2 Doença de Petri

As espécies de fungos associadas a esta doença são: *Phaeomoniella chlamydospora*, vinte e nove espécies do género *Phaeoacremonium*, *Pleurostoma richardsiae* e seis espécies do género *Cadophora* (Gramaje e Armengol 2011).

As infeções com estes fungos originam, no interior do tronco, uma estria com necrose castanha (Figura 7), que surge devido à proliferação do fungo dentro e à volta dos vasos do xilema (Fontaine et al., 2016). Os sintomas foliares associados à Doença de Petri são muito semelhantes à sintomatologia associada a distúrbios abióticos, como por exemplo os danos causados pelo inverno, pela geada na primavera, stress hídrico e/ou falta de nutrientes, incluem atrofia, folhagem clorótica com margens necróticas (Figura 8), entrenó curto, folhas murchas e atraso no abrolhamento (Gramaje et al., 2018). A Doença de Petri provoca sintomas visíveis como por exemplo a desnutrição da parte aérea da videira, devido ao bloqueio dos vasos sistémicos causado pelos fungos desta doença (Nogueira et al., 2022).



Figura 7: Tronco de videira afetada pela doença de Petri

(Adaptado de:

images.app.goo.gl/cAiX7R99KykfTWF37).



Figura 8: Folha de videiras com sintoma de Doença de Petri (Adaptado de: pt.dreamstime.com/doenca-de-petri).

2.4.3 Escoriose Europeia

Escoriose Europeia ou “*Botryosphaeria dieback*” é uma doença do lenho causada por fungos de várias espécies da família Botryosphaeraceae (Pimenta, 2018). Foram identificados, até ao momento pelo menos trinta espécies diferentes de fungos causadores desta doença (Yang et al., 2017), uma das quais *Botryosphaeria* spp. Os agentes patogénicos *Diplodia seriata* e *Neofusicoccum parvum* são anamorfos desta doença (Travadon et al., 2016).

Os fungos das espécies *Botryosphaeria* têm ciclos de vida com duas fases alternadas: fase sexuada que ocorre em condições desfavoráveis e fase assexuada, nesta fase formam-se os picnídeos, a partir dos quais se libertam os esporos que são os conídeos (Sánchez e Hernandez-Martinez, 2020). No início da primavera e do ciclo vegetativo da videira, os esporos (conídeos) são libertados e transportados principalmente pelo vento (Denman et al., 2000) infetando a videira, mas apenas quando existem condições favoráveis, principalmente chuva e humidade relativa elevada. Esta doença propaga-se através da penetração dos conídeos nas feridas da planta ou na madeira recém cortada.

Não é muito comum detetarem-se sintomas foliares característicos desta doença, mas por vezes observam-se manchas cloróticas (Figura 9) ou algumas deformações das folhas (Larignon, 2012). Também surgem cancrios em torno do local infetado nos troncos da videira, lesões nos pâmpanos (Figura 10), braços mortos, necroses dos gomos, podridão nos bagos e morte dos cachos (Úrbez- Torres, 2011). Esta doença promove o abrolhamento precoce dos gomos. O lenho pode apresentar fendas castanhas que surgem no xilema, que são sintomas indicativos da morte do lenho (Pimenta, 2018). A proibição da utilização do arsenito de sódio em Portugal, assim como noutros países, contribuiu para o aumento da incidência desta doença e para a sua disseminação nas vinhas (Úrbez-Torres, 2011).



Figura 9: Folhas de videira com manchas cloróticas (Adaptado de: www.drapc.gov.pt/base/documentos/folheto.pdf).



Figura 10: Pâmpano de videira afetada com Escoriose Europeia (Adaptado de: www.ivdp.pt/pt/docs/ficha_escoriose).

2.4.5 Escoriose Americana

A Escoriose Americana ou “*Phomopsis dieback*” é uma doença do lenho causada principalmente pelo fungo *Phomopsis viticola* (Dias, 2010). Os picnídeos são a estrutura de hibernação do fungo na madeira da videira durante o inverno (período de dormência da planta). Quando termina o período de dormência da videira e inicia o abrolhamento dos gomos o fungo continua o ciclo vegetativo infetando os novos gomos e os pâmpanos (Pimenta, 2018).

Os sintomas associados à doença incluem a diminuição da percentagem de abrolhamento dos gomos infetados pelo fungo, assim como cancrios perenes na videira. Este fungo provoca sintomas visíveis em todos os órgãos herbáceos da videira (Úrbez-Torres et al., 2013). Nos sarmentos jovens os sintomas caracterizam-se pela presença de pequenos pontos negros ou de lesões castanhas-picnídeos (Figura 11), já nos ramos mais velhos surge um estrangulamento na base do ramo que pode mesmo levar à separação do sarmento do resto da videira (Fontaine et al., 2016). Nas folhas, podem ser observadas pequenas manchas verdes-pálidas ou amarelas com o centro da mancha necrótico (Figura 12) (Fontaine et al., 2020). Os sintomas de Escoriose Americana que surgem nas folhas da videira muitas vezes podem ser associados aos sintomas causados por ácaros, já que surgem cloroses na folha da videira com o centro da mancha necrótico (Pimenta, 2018). Além destes sintomas, os bagos também podem vir a tornar-se castanhos e murcham

(Úrbez Torres et al., 2013), podendo mesmo ocorrer diminuição da produtividade da planta. Na fase de dormência da planta, os sarmentos têm uma coloração branca e pontuações negras nos entrenós que correspondem aos picnídeos (Fontaine et al., 2020).



Figura 11: Talão de videira salpicada de pontos negros (picnídeos) (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-escoriose-americana-em-vinha).



Figura 12: Folha de videira com pontuações necrosadas (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-escoriose-americana-em-vinha).

2.4.6 Esca

As doenças desencadeadas pelos fungos do complexo da Esca continuam a ser as mais preocupantes na Europa e no mundo (Fontaine et al., 2016). O complexo da Esca é constituído por diferentes fungos que vão originar sintomas que podem ser diferentes de planta para planta, associado maioritariamente a espécies de fungos do Filo Ascomycota (Pacetti et al., 2021). Os fungos associados a esta doença são principalmente *Phaemoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* e *Fomitiporia mediterranea* (Gramaje et al., 2018).

Phaemoniella chlamydospora é um Ascomycota endémico em todas as áreas vitivinícolas do mundo. Este fungo tem um grande impacto no declínio de videiras, conduzindo a perdas económicas significativas na produção de uva. Este fungo coloniza os vasos xilémicos da planta, levando a uma diminuição do diâmetro do xilema e da eficácia do funcionamento dos vasos condutores da planta (Pouzoulet et al., 2017).

Phaeoacremonium minimum é também um fungo Ascomycota que coloniza os tecidos lenhosos da planta e pode ser transmitido através do solo (Carro-Huerga et al., 2023). Este fungo caracteriza-se por produzir metabolitos secundários fitotóxicos (fitotoxinas) e por segregar enzimas que destroem os polissacáridos das paredes celulares das células da planta. As estruturas de frutificação libertam os esporos sexuais, ascósporos, que são importantes para a dispersão deste fungo a longa distância e com condições adversas. Este fungo também pode reproduzir-se de forma assexuada através da produção e libertação de esporos assexuados (conídeos) (Massonet et al., 2018). Em estudos anteriores realizados por Pierron et al. 2015, verificou-se que estes fungos são encontrados principalmente em tecidos lenhosos e que se acumulam à volta dos vasos xilémicos da videira.

O complexo da Esca engloba várias síndromes como Esca, doença da folha listrada da videira, apoplexia, sarampo preto, podridão branca e Doença de Petri (Esca em videiras jovens) (Claverie et al., 2020). Quando estão presentes tanto os sintomas foliares da doença da folha listrada da videira como a podridão branca, a videira encontra-se afetada pela sintomatologia denominada “Esca propriamente dita” (Pacetti et al., 2021).

A Esca é uma doença que afeta os órgãos perenes da videira, produzindo extensas necroses do lenho da videira, através do desenvolvimento lento e sistémico de fungos patogénicos (Pouzoulet et al., 2013). As doenças associadas ao complexo da Esca apresentam sintomas exteriores na planta característicos como a murchidão dos rebentos e dos cachos, estrias foliares (Figura 13) e corte apoplético (Pacetti et al., 2021). Na madeira, podem surgir sintomas como necrose central (Figura 14), podridão branca (sintoma mais comum da Esca), necrose preta, necrose setorial e podem surgir partes incolores no xilema (Pimenta, 2018).

Por sua vez, nas folhas da videira surgem muitas vezes necroses foliares, que podem ter cor amarela nas castas brancas e cor vermelha no caso das castas tintas, as necroses evoluem desde a margem do limbo até às nervuras centrais da folha (Pimenta, 2018). Sabe-se que uma maior disponibilidade de nutrientes na planta pode levar a um maior desenvolvimento dos fungos ao longo do tempo e conseqüentemente, afetar severamente o transporte de seiva nas videiras infetadas pela doença (Lima et al., 2017).

Foram descritas duas formas principais da doença: (i) forma crónica (ou lenta), que envolve a descoloração das folhas em forma de "risca de tigre" e (ii) forma aguda (ou

apoplética), que é caracterizada pela secagem rápida das folhas durante o Verão ou murchidão rápida da planta, levando à morte da videira (Ouadi et al., 2019). Parâmetros como o tipo de cultivar, forma de poda e clima são considerados fatores que afetam o desenvolvimento da Esca (Travadon et al., 2016).



Figura 13: Sintomas de Esca na folha da videira (Adaptado de: www.advid.pt/uploads/DOCUMENTOS).



Figura 14: Sintomas de Esca na cepa da videira (Adaptado de: www.advid.pt/uploads/DOCUMENTOS).

2.4.7 Eutipiose

O principal agente patogénico associado à Eutipiose ou “*Eutypa dieback*” é *Eutypa lata*, pertencente ao Filo Ascomycota (Bertsch et al., 2013), no entanto, existem outras espécies, como *Cryptovalsa ampelina* e *Eutypella spp.* que podem estar associadas a esta doença (Nogueira et al., 2022). A espécie *Eutypa lata* é a mais virulenta e a única espécie conhecida como responsável pelos sintomas foliares (Gramaje et al., 2018).

As hifas do fungo proliferam no lenho da videira infetada, através das quais são libertados os ascósporos, que são dispersos pela chuva, ou pelo vento. Os ascósporos vão penetrar numa nova planta através das feridas da poda, infetando-a (Bertsch et al., 2013).

Por sua vez, na planta surgem sintomas como, entrenó curto, manchas cloróticas nas folhas, folhas enroladas e de dimensões mais pequenas, folhas com necroses nas margens, cachos mais pequenos (Figura 15), heterogeneidade na maturação dos bagos, queda das folhas e menor taxa de produção da planta (Pimenta, 2018). Além destes,

também são característicos desta doença sintomas como necroses nos rebentos, fendas nos tecidos da planta, descoloração da madeira, e o destacamento do ritidoma da videira infetada (Figura 16). Os agentes patogénicos relacionados com esta doença afetam o sistema vascular da videira, levando a uma diminuição do crescimento vegetativo, podendo levar à morte da planta (Nogueira et al., 2022).



Figura 15: Vinha com Eutipiose. Cachos mais pequenos. (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-eutipiose-em-vinha).



Figura 16: Destacamento do ritidoma da planta. (Adaptado de: www.syngenta.pt/doencas-do-lenho-eutipiose-em-vinha).

2.5 Métodos de deteção de fungos causadores de doenças do lenho

Como referido na descrição das sintomatologias das doenças do lenho da videira, os sintomas são muitas vezes indistintos entre elas e difíceis de identificar precocemente de modo a poder fazer uma intervenção curativa ou preventiva. Até ao momento, a identificação de fungos relacionados e causadores das doenças do lenho da videira é feita principalmente por tecnologias moleculares como é o caso da amplificação e sequenciação de fragmentos genómicos (Mondello et al., 2020).

De modo a identificar-se taxonomicamente ao nível da espécie agentes patogénicos associados às doenças do lenho, faz-se atualmente uma sequenciação de várias regiões genómicas obtidas através do isolamento da cultura pura dos fungos associados à infeção (Nogueira et al., 2022).

A identificação dos agentes patogénicos causadores de doenças do lenho é possível através da utilização de técnicas que permitem fazer a amplificação de fragmentos de DNA, como da reação em cadeia da polimerase (PCR convencional), ou através da reação de PCR quantitativo ou em tempo real (qPCR) (Campos et al., 2023). Além disso, também é possível fazer a deteção destes agentes patogénicos utilizando a reação Multiplex PCR (Agustí-Brisach e Armengol, 2013).

2.5.1 PCR Convencional

A reação de PCR convencional, é uma técnica que permite a amplificação de sequências específicas de DNA (Caetano-Anolles, 2013). A técnica foi originalmente descrita por Saiki et al., 1985 onde utilizaram uma DNA polimerase estável ao calor (*Taq* DNA polimerase) com dois ‘primers’ complementares às sequências de DNA nas extremidades 3’ e 5’ da região de DNA a amplificar.

A reação PCR com ‘primers’ específicos para cada espécie pode constituir uma forma fácil de detetar fungos tanto em cultura como em tecidos vegetais (Lecomte et al., 2000). As reações de PCR convencional são consideradas uma escolha rentável em comparação com outras opções de diagnóstico molecular para deteção de agentes patogénicos das plantas (Hariharan e Prasannath, 2021).

A reação PCR convencional, é mais rentável, porque os reagentes utilizados na reação são mais económicos e os equipamentos utilizados são menos dispendiosos (Campos et al., 2023), mas por sua vez é menos sensível do que o PCR quantitativo, porque a análise é feita em gel e só se obtêm resultados ao final de 40 ciclos, e por isso não conseguimos ter noção da quantidade de moléculas do genoma dos microrganismos da amostra.

Em estudos anteriores, verificou-se a eficácia do PCR convencional para a deteção de fungos causadores de doenças do lenho, como por exemplo no estudo realizado por Vicente et al., 2020, que utilizou o PCR tradicional para detetar o fungo *Cadophora luteo-olivacea*, agente causal muito associado à doença de Petri.

2.5.2 PCR quantitativo

O PCR quantitativo (qPCR) permite a detecção e a quantificação de sequências específicas de DNA ou RNA de fungos fitopatogênicos numa reação de PCR em tempo real (Harihanan et al., 2021). A técnica qPCR utiliza sondas ou ‘primers’ que hibridam com um local da sequência-alvo e, durante a amplificação, o número de ciclos necessários para atingir um nível limiar de fluorescência é utilizado para estimar o número inicial de sequências-alvo (Campos et al., 2023). Nesta técnica são utilizados agentes de ligação do DNA de cadeia dupla e corantes fluorescentes como os que são utilizados nas sondas TaqMan. As sondas, destinam-se a hibridar com um local interno na sequência-alvo delimitada por ‘primers’ diretos e inversos, tal como definido para PCR convencional (Campos et al., 2023). A região considerada para a concepção do iniciador e da sonda tem de ser específica do gene alvo (tendo em conta os casos de famílias de genes complexas) e da espécie para garantir a total exatidão do método (Campos et al., 2023).

Na reação PCR quantitativo, são utilizadas sondas fluorescentes, que permitem aumentar a sensibilidade e a especificidade da reação (Campos et al., 2023). Quanto mais intensa for a fluorescência, maior será a concentração de DNA presente na amostra (Ribeiro, 2023).

A utilização da reação de PCR quantitativo (qPCR), é uma ferramenta bastante útil que permite estudar vários agentes de infeção nas plantas como fungos, vírus ou bactérias (Campos et al., 2019).

A utilização da reação qPCR para detetar e quantificar o DNA de fungos associados às doenças do lenho foi relatada em estudos anteriores (Pouzoulet et al., 2013).

Quando comparada com a qPCR, a reação PCR convencional é mais barata, já que o equipamento é menos dispendioso, mas as reações qPCR permitem atingir limiares de detecção mais baixos (Campos et al., 2023). A reação PCR convencional requer consideravelmente mais tempo de trabalho do que o PCR quantitativo, já que a reação é mais simples e rápida de realizar (Espy et al., 2006)

É um método que apresenta grande sensibilidade e especificidade, pois permite a detecção e a quantificação do DNA presente na amostra à medida que a reação decorre, permitindo detetar, quantificar e amplificar o DNA em simultâneo (Ribeiro, 2023)

A reação qPCR tem um baixo risco de contaminação, pois não requer que sejam efetuadas manipulações pós-amplificação (Postollec et al., 2011).

Noutros estudos já tinha sido comprovada a eficácia da técnica de qPCR para deteção de fungos causadores de doenças do lenho (Gáinza-Cortés et al 2020, Halleen et al. 2020, Pouzoulet et al., 2017).

2.5.3 PCR Multiplex

A reação PCR multiplex utiliza uma solução com vários pares de ‘primers’ e permite a amplificação simultânea de vários agentes patogénicos numa única reação (Sint et al., 2012), podendo recorrer tanto ao PCR convencional como ao PCR quantitativo.

Esta técnica é bastante interessante, uma vez que permite reduzir o número de reações necessárias para testar uma amostra para diferentes agentes patogénicos, envolvidos numa sintomatologia, assim como quando é necessário analisar um grande número de amostras, poupando-se tempo e custos (Sint et al., 2012).

Foi desenvolvida, em estudos anteriores realizados por Pouzoulet et al. (2013) uma reação qPCR Multiplex para detetar *Phaemoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum* numa única reação de qPCR.

2.6 Formas de minimizar a propagação e impacto das doenças do lenho

As doenças do lenho da videira, foram apontadas como umas das doenças mais destrutivas, em 2015 pela OIV, e por essa mesma razão são bastantes preocupantes para os viticultores e produtores de vinho (Pimenta, 2018). Atualmente, tem-se verificado um aumento da incidência das doenças do lenho nas videiras, o que é cada vez mais preocupante para os produtores, uma vez que até ao momento não existem métodos de controlo eficazes contra estas doenças (Sánchez e Hernandez-Martinez, 2020). Por isso, é fundamental recorrer a algumas práticas para minimizar a dispersão das doenças do lenho na vinha. Deste modo, é extremamente importante estarmos atentos aos sintomas observáveis nas videiras de modo a conseguirmos identificar as plantas afetadas por estas doenças e podermos tomar os devidos cuidados, como por exemplo marcá-las e podá-las separadamente de modo a evitar a difusão das doenças pela vinha. Deve também evitar-se que os ramos resultantes da poda fiquem na vinha, pois os esporos dos fungos

causadores destas doenças podem germinar nos restos da poda e infetar plantas saudáveis através das feridas da planta. Os ramos cortados devem ser removidos da vinha e queimados. Além disso, a tesoura de poda deve ser descontaminada durante a operação.

Noutros estudos foram referidas algumas medidas preventivas de doenças do lenho que podem contribuir para a diminuição da sua propagação. Fatores como a humidade e arejamento do solo são importantes neste contexto, uma vez que excesso de água no solo reduz o arejamento na zona radicular, promovendo o crescimento e desenvolvimento dos fungos patogénicos do solo associados a estas doenças, criando condições para a sua propagação (Gramaje et al., 2018). Outra forma para minimizar a infeção consiste em adotar sistemas de formação e de poda que exijam menos feridas de poda, reduzindo assim o número de possíveis zonas de entrada de infeção (Travadon et al., 2016). Em estudos anteriores, verificou-se que a proteção das feridas de poda com fungicidas reduziu parcialmente as infeções causadas por fungos da família Botryosphaeriaceae, mas não mostrou grande eficácia na diminuição da proliferação de fungos causadores da Doença de Petri (Gramaje et al., 2018), uma vez que estes entram maioritariamente pelas raízes. Também é possível minimizar a propagação de doenças do lenho através da seleção e plantação de porta-enxertos resistentes aos fungos causadores destas doenças (Ramsing et al., 2021).

O arsenito de sódio era o único fungicida, homologado na Europa, para controlar a Esca, mas foi proibido no início do ano 2000, devido à sua toxicidade tanto para os viticultores como para o ambiente e depois desta proibição não foi encontrado nenhum tratamento eficaz para erradicar as doenças do lenho (Mondello et al., 2019). Por este mesmo motivo, na viticultura, o controlo biológico de agentes patogénicos causadores de doenças do lenho na videira, tem vindo cada vez mais a suscitar curiosidade nos viticultores e produtores de uva. Nos últimos anos, tem havido investigações constantes dedicadas à seleção de agentes biológicos capazes de limitar e controlar as doenças do lenho através da redução das infeções das videiras (Mondello et al., 2018). Ultimamente, verificou-se que a aplicação de espécies de *Trichoderma* nas feridas de poda da videira leva a uma redução dos agentes patogénicos e conseqüentemente à diminuição da percentagem de plantas infetadas (Bigote et al., 2020). Os agentes biológicos de controlo são considerados atualmente os agentes mais eficientes para a gestão sustentável das doenças do lenho tanto na vinha como no viveiro, uma vez que este método de controlo

tem um efeito protetor imediato e uma eficácia bastante prolongada e duradoura (Mondello et al., 2018).

Atualmente não são conhecidas medidas curativas para o controlo de doenças como o Pé Negro e Doença de Petri em viveiros e em vinhas jovens (Gramaje et al., 2018).

Relativamente aos agentes patogénicos causadores da Esca, o tiofanato-metílico mostrou-se bastante eficaz no controlo de *Phaeoacremonium minimum*, mas não foi eficiente no combate a *Phaemoniella chlamydospora*. Verificou-se um controlo mais eficaz de *Phaemoniella chlamydospora* através da aplicação de Boro nas feridas de poda (Gramaje et al., 2018).

A identificação e classificação de agentes patogénicos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças do lenho tem sido um trabalho bastante difícil, uma vez que existem vários géneros responsáveis pelas doenças do lenho em videiras (Trouillas e Gubler, 2010a; Mehrabi et al., 2016).

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho consiste em identificar os fungos associados a plantas sintomáticas de doenças do lenho em duas castas de videiras do Alentejo (Trincadeira e Alicante Bouschet). Após a identificação, selecionar os fungos mais prevalentes e desenvolver um método eficaz que permita, rapidamente e de forma sensível, detetar esses fungos em material vegetal de videira. Desta forma pretende-se disponibilizar esta metodologia a viveiristas para a produção de plantas isentas destes agentes causais de doenças do lenho.

4. Materiais e Métodos

4.1 Marcação das videiras na vinha

Em julho de 2022 foram marcadas **15 videiras** da casta Trincadeira (T) e **15 videiras** da casta Alicante Bouschet (AB), na vinha das Argamassas da Adega Mayor, em Campo Maior (Figura 17, 18, 19 e 20). Foram marcadas videiras sintomáticas de várias linhas na vinha (39°02'54"N; 7°05'34"W313 m).

Apenas videiras com sintomatologia visível na folhagem, associada a doenças do lenho foram marcadas (Figuras 21, 22 ,23 e 24).

A marcação foi feita com uma fita de marcação colocada em volta do tronco da planta doente, para que, quando as amostras fossem recolhidas, na altura em que a videira já não tivesse folhas fosse possível identificar quais as plantas que estavam afetadas por doenças do lenho.



Figura 17: Marcação de videiras da casta T com sintomas de doenças do lenho na folhagem na Adega Mayor, Campo Maior.



Figura 18: Marcação de videiras da casta AB com sintomas de doenças do lenho na folhagem Adega Mayor, Campo Maior.



Figura 19: Linha com videiras sintomáticas da casta Trincadeira.



Figura 20: Linha com videiras sintomáticas da casta Alicante Bouschet.



Figura 21: Sintomas de doenças do lenho em cachos e folhas de uma videira.



Figura 22: Sintomas visíveis nas folhas de doenças do lenho-folha tigrada.



Figura 23: Sintomas visíveis em cachos e folhas de uma videira afetada com doenças do lenho.



Figura 24: Videira com sintomas visíveis de doenças do lenho.

4.2 Recolha das amostras

Em dezembro de 2022, após a queda das folhas, procedeu-se à recolha das amostras das plantas marcadas na vinha. As amostras foram recolhidas com uma tesoura de poda, ou com o tesourão, cortando partes do sarmento, apanhando a zona de inserção no tronco principal (Figuras 25 e 26). Foram recolhidas 2 amostras por planta. Algumas das videiras marcadas já não tinham sarmentos, pois estariam bastante debilitadas devido às doenças do lenho, nesses casos recolheu-se parte do tronco da videira com o auxílio de um serrote. As amostras recolhidas foram colocadas em sacos de plástico transparentes. Cada vez que eram recolhidas amostras de uma nova planta procedeu-se à descontaminação das tesouras com álcool para garantir que não haveria contaminação cruzada das plantas com os fungos das videiras que já tinham sido cortadas.



Figura 25: Corte de partes do sarmento apanhando a zona de inserção no tronco principal.



Figura 26: Corte das pontas da amostra com a tesoura de poda.

4.3 Maceração das amostras

O material vegetal utilizado ao longo do ensaio consistia em **15 amostras de T e 15 amostras de AB**.

No Laboratório de Micologia, da Universidade de Évora procedeu-se à maceração das amostras recolhidas. Assim, para cada amostra recolhida no campo, primeiro cortou-se, com a tesoura de poda, pequenos pedaços da amostra (Figura 27), com sintomas visíveis, colocou-se no moinho triturador (IKA A10 basic) e os pedaços foram triturados durante 20s (Figura 28).

Seguidamente, a amostra triturada foi colocada num almofariz e adicionou-se azoto líquido para uma melhor quebra das células e preservação do DNA (Figura 29). Macerou-se a amostra (Figura 30) e como ilustrado na Figura 31 encheram-se dois microtubos para cada amostra recolhida que foram mantidos em gelo durante o processo de maceração. Entre cada maceração desinfectou-se com etanol o moinho, o pincel e a tesoura de poda, assim como, a bancada de trabalho. Após a maceração de todas as amostras, os microtubos foram congelados e mantidos a -20°C (Figura 32).



Figura 27: Corte da amostra em pedaços mais pequenos com a tesoura de poda.



Figura 28: Pedaços da amostra no moinho triturador.



Figura 29: Adição de azoto líquido à amostra triturada.



Figura 30: Maceração da amostra com um pilão.



Figura 31: Colocação da amostra macerada em microtubos.



Figura 32: Caixa com as amostras para armazenamento a -20°C .

4.4 Extração do DNA das amostras maceradas

Através do kit de extração de DNA, procedeu-se à extração do DNA das amostras maceradas anteriormente, tendo-se utilizado o kit DNeasy Plant minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha) com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Depois de feita a extração do DNA das amostras, procedeu-se à análise da quantidade e qualidade de DNA, utilizando o microespectómetro, (Quawell Q9000) de

modo a perceber se o DNA de cada amostra era suficiente e de qualidade para ser sequenciado, de forma a serem identificadas as espécies de fungos presentes em cada uma das amostras.

O DNA total extraído foi eluído em 30 μ l de tampão de eluição e foi enviado para a empresa STABVida (Caparica, Portugal) para Sequenciação de Nova Geração (NGS) da região ITS.

Foi feita uma nova extração de DNA (2º extração) de modo a ter disponível quantidade suficiente de DNA para poder executar a reação de PCR em Tempo Real. A extração do DNA das amostras maceradas foi feita pelo método utilizado na primeira extração, utilizando o kit de extração de DNA DNeasy Plant minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

4.5 Reação PCR quantitativo para deteção e quantificação simultânea de *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*.

Foi realizada uma reação PCR multiplex, de modo a serem detetados, simultaneamente (numa só reação), no DNA extraído anteriormente, dois dos fungos encontrados nas amostras- *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*. A deteção e quantificação simultânea de *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora* foi realizada através de uma reação multiplex PCR em tempo real em todas as amostras recolhidas na Adega Mayor, Campo Maior. Os ‘primers’ utilizados na reação multiplex PCR já tinham sido utilizados em estudos anteriores (Halleen et al. 2020 e Gaínza-Cortés et al 2020). Assim sendo os ‘primers’ utilizados para a deteção de *Phaeoacremonium minimum* foram: ‘primer’ *Forward*: 5’- GCTTCGACGTCCTCGA-3’ e o ‘primer’ *reverse* 5’- GCATTGGCCGGTCTG-3’ e a sonda utilizada foi CAGAATCTACCCAGATCATCGACCAGC (5’FAM). Os ‘primers’ utilizados para a deteção de *Phaemoniella chlamydospora* foram o ‘primer’ *Forward*: 5’- GCTGACGACGTCCAGGGTAA-3’ e o ‘primer’ *reverse* 5’- TCAAGGCCGTGTTACCAGA-3’ e a sonda utilizada *PchProbe*: 5’- CCTCGACGACTACAGACGCGCCA-3’ (5’HEX).

A reação multiplex PCR foi realizada em placas de 96 poços (Figura 33). Primeiramente, foi feita uma mistura de todos os ‘primers’ (400nM de cada um), sonda e

da Master mix 2x SensiFAST ‘Probe’ Hi-ROX Kit (Meridian Bioscience, Newtown, OH, USA) (100nM de cada). Depois colocaram-se 17 μ l deste “mix” em cada poço. Em cada reação PCR foram utilizados 100 ng de DNA, perfazendo um volume total de 20 μ l. Para cada amostra foram realizadas três réplicas técnicas, e em cada placa foram incluídos também três controlos negativos. Durante este procedimento teve-se sempre os devidos cuidados de assepsia para evitar possíveis contaminações. O equipamento utilizado para a reação de qPCR foi um sistema LineGene 9600 Plus (BIOER, Hangzhou, China).

Os valores do ciclo de quantificação (Cq) foram obtidos para cada amostra com as seguintes condições de ciclo: 20s a 95°C para a desnaturação inicial, um programa de amplificação de 40 ciclos a 95°C durante 15s, e 60°C durante 20s. O limiar de fluorescência foi fixado manualmente nos 150.

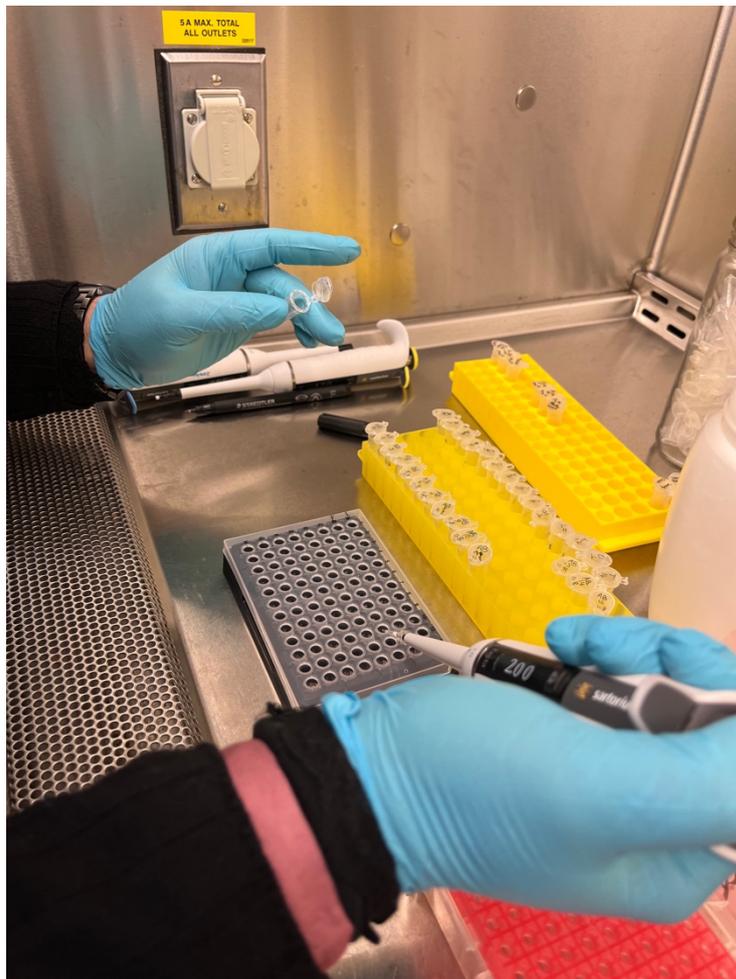


Figura 33: Preenchimento dos poços com o DNA extraído das amostras.

5. Resultados

5.1 Extração de DNA

Das amostras obtidas por maceração, foi feita a extração do DNA e, seguidamente, mediu-se a qualidade (rácios 260/280 e 260/230) e quantidade de DNA (concentração de DNA ng/ul) de todas as amostras. Medir a quantidade e a qualidade do DNA das amostras foi importante, uma vez que foram enviadas para a sequenciação metagenómica apenas as amostras com maior concentração e melhor qualidade de DNA (Tabela 1). Foram enviadas apenas 7 amostras de cada casta, porque as restantes amostras não tinham qualidade suficiente para sequenciação metagenómica, a madeira utilizada no estudo era uma madeira mais velha, mais necrosada onde poderiam ter ocorrido oxidações e a consequente degradação de DNA. Foi feita, posteriormente, uma segunda extração de DNA total a partir do material vegetal macerado e congelado, para se obter mais DNA para a análise de qPCR multiplex.

- **Amostras em teste**

- **Primeira extração**

Tabela 1: Concentração e determinação das razões 260/280 e 260/230 do DNA extraído das amostras das videiras das castas Alicante Bouschet (AB) e Trincadeira (T). A amarelo estão destacadas as amostras que foram enviadas para a empresa de sequenciação metagenômica do DNA.

Amostra	Concentração de DNA total (ng/ul)	260/280	260/230
1 AB CM	107,65	1,453	0,619
2 AB CM	83,1	1,571	0,712
3 AB CM	68,9	1,511	0,696
4 AB CM	282,1	1,28	0,631
5 AB CM	56,8	1,375	0,627
6 AB CM	29,15	1,316	0,443
7 AB CM	82,9	1,433	0,525
8 AB CM	47,3	1,590	0,674
9 AB CM	44,75	1,642	0,699
10 AB CM	39,55	1,786	1,109
11 AB CM	44,9	1,757	0,979
12 AB CM	67,55	1,343	0,624
13 AB CM	148,45	1,490	0,659
14 AB CM	61,85	1,709	0,851
15 AB CM	50,1	1,707	0,671
1 T CM	46,45	1,182	0,300
2 T CM	20,6	1,298	0,360
3 T CM	41,75	1,084	0,234
4 T CM	25,8	1,220	0,384
5 T CM	11,15	1,297	0,368
6 T CM	29,5	1,194	0,272
7 T CM	34	1,18	0,389
8 T CM	11,75	1,169	0,305
9 T CM	138,35	1,213	0,497
10 T CM	19,95	1,174	0,422
11 T CM	57,15	1,143	0,460
12 T CM	32,55	1,150	0,343
13 T CM	8	0,573	0,113
14 T CM	41,15	1,117	0,329
15 T CM	65,90	1,138	0,467

5.2 Análise metagenómica

Para cada uma das amostras enviadas para sequenciação metagenómica foi obtido um número de ‘reads’ que correspondem à quantidade das diferentes espécies de fungos presentes em cada amostra. Fez-se uma análise dos resultados obtidos, sendo que apenas foram seleccionadas da lista de espécies encontradas nas amostras as espécies causadoras de doenças do lenho na videira.

Nas tabelas 2 e 3, estão destacados o número total de ‘reads’ encontradas em cada uma das amostras, assim como o número de ‘reads’ encontradas na extração que estão associadas a doenças do lenho. Das amostras enviadas para sequenciação para a empresa STABVida, apenas se obtiveram resultados em duas delas, na casta Alicante Bouschet (AB-CM2 e AB-CM14). Não foram obtidos resultados nas restantes amostras de AB nem em nenhuma das amostras da casta T, devido à falta de qualidade do DNA obtido.

Na amostra AB-CM14, foi encontrado um maior número de ‘reads’ (83339), do que na amostra AB-CM2 (69466). Do número total de ‘reads’ encontradas na amostra AB-CM2 apenas 12282 ‘reads’ correspondem a fungos causadores de doenças do lenho, enquanto na amostra AB-CM14 45196 ‘reads’ correspondem a fungos associados às doenças do lenho (Tabela 2).

Tabela 2: Quantidade de ‘reads’ encontradas no DNA extraído das amostras das videiras. AB: ‘Alicante Bouschet’.

	Número total de ‘reads’ encontradas na extração	Número de ‘reads’ dos fungos causadores de doenças do lenho
AB-CM2	69466	12282
AB-CM14	83339	45196

De acordo com a Tabela 3, o género *Neofabraea spp.*, foi o fungo detetado com maior abundância, na ordem dos milhares, em ambas as amostras, seguindo-se os fungos *Seimatosporium vitis* e *Phaemoniella chlamydospora*. *Neofabraea spp.*, diz respeito a 78% do DNA total dos fungos detetados pela amplificação da região ITS associados às doenças do lenho na amostra AB-CM14 e a 58% na amostra AB-CM2. O DNA do fungo *Phaemoniella chlamydospora*, corresponde a 5% do DNA de AB-CM14, e também foi detetado, mas numa quantidade mais baixa na amostra AB-CM2. O fungo *Phaeoacremonium minimum*, foi encontrado em quantidades semelhantes em ambas as amostras.

O género *Acremonium spp.* diz respeito ao fungo encontrado em quantidades mais baixas em ambas as amostras.

Tabela 3: Fungos associados às doenças do lenho da videira detetados na sequenciação de nova geração (NGS) do DNA extraído das amostras das videiras; %- DNA detetado que corresponde apenas aos fungos causadores de doenças do lenho.

Fungos detetados	AB-CM14 ('reads')	%	AB-CM2 ('reads')	%
<i>Neofabraea spp.</i>	35346	78	7134	58
<i>Seimatosporium vitis</i>	6432	15	1922	16
<i>Phaemoniella chlamydospora</i>	2300	5	34	0
<i>Sclerostagonospora rosicola</i>	303	1	11	0
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	272	1	259	2
<i>Sarocladium ochraceum</i>	126	0	1418	12
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	117	0	92	1
<i>Seimatosporium spp.</i>	97	0	0	0
<i>Cytospora juncicola</i>	74	0	0	0
<i>Phellinus rhamni</i>	41	0	0	0

Fungos detetados	AB-CM14 ('reads')	%	AB-CM2 ('reads')	%
<i>Truncatella angustata</i>	38	0	0	0
<i>Neofusicoccum spp.</i>	20	0	0	0
<i>Kalmusia longispora</i>	11	0	0	0
<i>Rosellinia australiensis</i>	9	0	327	3
<i>Coprinellus domesticus</i>	6	0	11	0
<i>Sarocladium hominis</i>	4	0	64	1
<i>Diaporthe ampelina</i>	0	0	869	7
<i>Herpotrichia parasítica</i>	0	0	69	1
<i>Fusarium spp.</i>	0	0	36	0
<i>Sarocladium bactrocephalum</i>	0	0	26	0
<i>Acremonium spp.</i>	0	0	10	0
Total reads	45196	100	12282	100

5.3 Segunda extração de DNA

Na segunda extração de DNA, realizada para os testes de qPCR Multiplex, obtiveram-se os resultados de quantidade e qualidade presentes na **Tabela 4**, que mostram algumas diferenças em relação aos da extração inicial, notando-se menor quantidade e pior qualidade.

Tabela 4: Quantidade e qualidade do DNA obtido na segunda extração das amostras das videiras.

Amostra	Concentração de DNA total (ng/ul)	260/280	260/230
1 AB CM	43,30	1,345	0,296
2 AB CM	92,05	1,409	0,414
3 AB CM	46,35	1,295	0,379
4 AB CM	35,05	1,467	0,467
5 AB CM	54,70	1,404	0,413
6 AB CM	165,15	1,385	0,470
7 AB CM	38,00	1,459	0,427
8 AB CM	54,05	1,374	0,415
9 AB CM	24,70	1,173	0,485
10 AB CM	34,85	1,277	0,298
11 AB CM	52,25	1,258	0,373
12 AB CM	54,40	1,400	0,457
13 AB CM	76,45	1,399	0,438
14 AB CM	44,00	1,189	0,287
15 AB CM	65,70	1,377	0,417
1 T CM	135,15	1,448	0,383
2 T CM	90,65	1,543	0,305
3 T CM	44,50	1,393	0,371
4 T CM	147,05	1,536	0,558
5 T CM	79,05	1,361	0,395
6 T CM	153,35	1,495	0,469
7 T CM	56,95	1,616	0,202
8 T CM	25,25	1,810	0,630
9 T CM	144,40	1,387	0,486
10 T CM	34,90	1,763	0,606
11 T CM	18,65	1,522	0,414
12 T CM	23,45	1,757	0,549
13 T CM	49,10	1,584	0,565
14 T CM	35,65	1,560	0,369
15 T CM	62,65	1,845	1,123

5.4 Detecção dos fungos *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora* no teste multiplex qPCR

Cada uma das amostras do ensaio foi testada para a presença simultânea dos fungos *Phaemoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum*, de modo a confirmar a presença destes fungos nas amostras e a possibilidade de detetar, simultaneamente, na mesma reação multiplex qPCR as duas espécies. Foram selecionados estes dois fungos, porque estavam presentes nas amostras e em estudos anteriores já tinham sido amplificados, mas separadamente, através de reação qPCR.

Na Figura 34, está presente o gráfico obtido quando foi selecionada a amplificação para o fungo *Phaemoniella chlamydospora*, verificando-se que este fungo está presente em grande parte das amostras de DNA extraído das videiras. Por sua vez na figura 35, selecionou-se a amplificação para o fungo *Phaeoacremonium minimum*, verificando-se que este fungo foi detetado numa menor quantidade de amostras, e fazendo o cruzamento das duas amplificações, em menor quantidade do que o fungo *Phaemoniella chlamydospora*. *Phaemoniella chlamydospora*, teve uma maior incidência nas amostras do que *Phaeoacremonium minimum*. É importante reforçar que os fungos foram detetados na mesma reação.

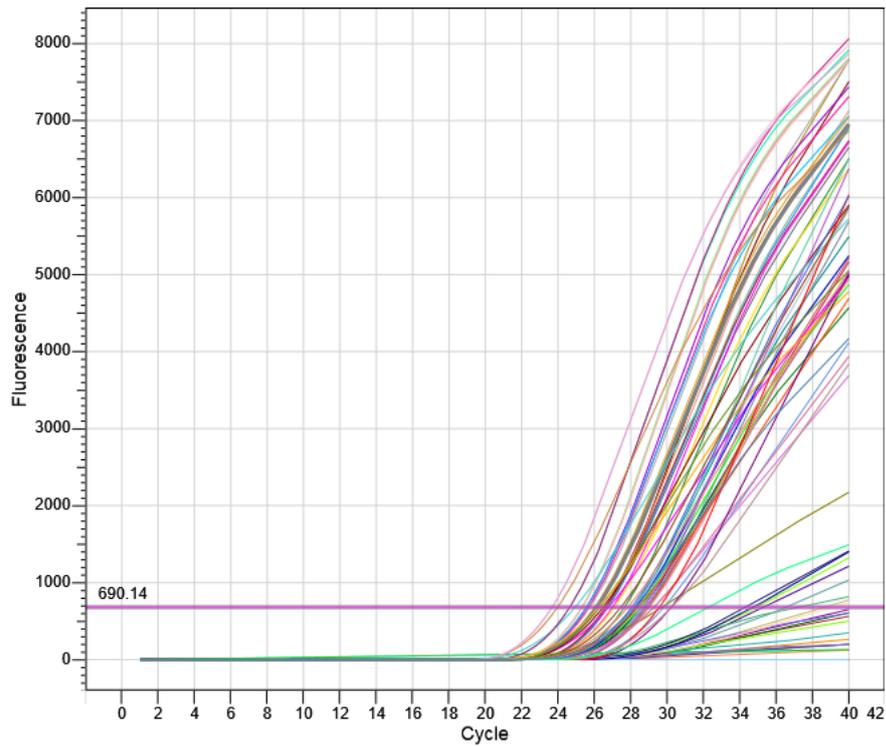


Figura 34: Amplificação das amostras de Alicante Bouschet e Trincadeira para o fungo *Phaeoacremonium minimum*.

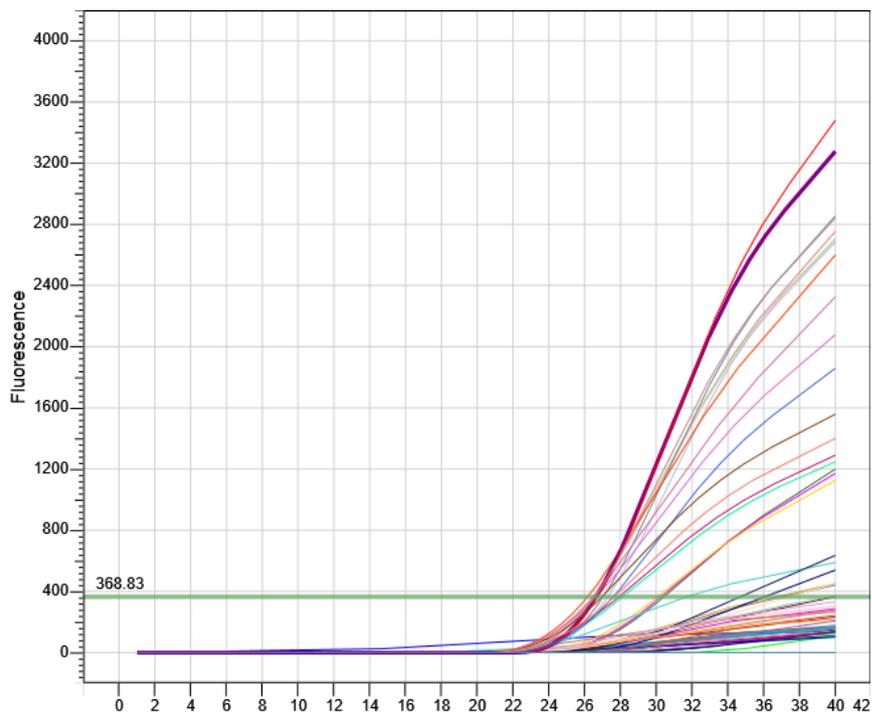


Figura 35: Amplificação das amostras de Alicante Bouschet e Trincadeira para o fungo *Phaeoacremonium minimum*.

Na Tabela 5, encontram-se os valores de Ct obtidos da reação qPCR para cada uma das amostras. Quanto mais elevado o valor de Ct, menor é a quantidade de fungo presente na amostra, quanto mais baixo o valor de Ct, maior é a quantidade de fungo na amostra. Os valores de Ct variaram entre 23.87 e 36.18, sendo que N.D, significa que o fungo não foi detetado na amostra.

Foram detetados os dois fungos em simultâneo, em duas amostras de AB e em oito amostras de T, ou seja, houve a detecção simultânea dos dois fungos em cerca de 33% das amostras, sendo que houve maior detecção dos dois fungos em simultâneo na casta Trincadeira.

Das 30 amostras analisadas, o fungo *Phaemoniella chlamydospora* foi detetado individualmente em oito amostras de AB e em cinco de T. O fungo *Phaemoniella chlamydospora* foi amplificado em grande parte das amostras (76% das amostras).

O fungo *Phaeoacremonium minimum*, não foi detetado isoladamente em nenhuma das amostras. O fungo *Phaeoacremonium minimum*, foi detetado em apenas duas amostras da casta AB, verificando-se uma maior resistência desta casta a este fungo. Por sua vez, verificou-se uma maior sensibilidade da casta T para o fungo *Phaeoacremonium minimum*. O fungo *Phaeoacremonium minimum* foi detetado em 30% das amostras.

Phaemoniella chlamydospora foi detetado num maior número de amostras do que o fungo *Phaeoacremonium minimum*.

Tabela 5: Valores de Ct para cada um dos fungos associados às doenças do lenho da videira, em cada uma das amostras.

Amostra	<i>Phaeoacremonium minimum</i> (Pm_FAM)	<i>Phaemoniella chlamydospora</i> (Pc_HEX)
	Valores Ct	Valores Ct
AB-1	N.D.	N.D.
AB-2	N.D.	N.D.
AB-3	N.D.	35.86
AB-4	N.D.	29.31
AB-5	N.D.	28.33
AB-6	N.D.	26.97
AB-7	N.D.	N.D.
AB-8	N.D.	N.D.
AB-9	N.D.	26.74
AB-10	N.D.	N.D.
AB-11	N.D.	25.71
AB-12	N.D.	26.79
AB-13	30.34	27.34
AB-14	36.96	27.00
AB-15	N.D.	29.07
T-1	N.D.	29.12
T-2	26.58	25.43
T-3	N.D.	N.D.
T-4	27.25	28.74
T-5	N.D.	26.73
T-6	N.D.	28.64
T-7	N.D.	N.D.
T-8	28.11	24.84
T-9	36.18	34.71
T-10	N.D.	26.39
T-11	26.53	29.08
T-12	N.D.	23.87
T-13	26.73	30.12
T-14	27.48	27.88
T-15	32.53	25.99

6. Discussão

As doenças do lenho representam cada vez mais um problema para a cultura da vinha, uma vez que estas doenças atacam os órgãos da videira levando à morte desta num curto ou longo espaço de tempo. Os elevados riscos de infeção em viveiros e vinhas e a falta de tratamentos curativos reforçam que é necessário encontrarem-se estratégias eficazes para o controlo das doenças do lenho no sector vitivinícola (Mondello et al., 2018). Atualmente não existem estratégias eficazes para controlar as doenças do lenho (Chacón et al., 2021). Até à data, a melhor forma é iniciar o controlo das doenças do lenho no viveiro para se obterem vinhas mais sãs e continuar o controlo na vinha, limitando a contaminação por agentes patogénicos das doenças do lenho (Mondello et al., 2018). Existem cada vez mais trabalhos de investigação que abrangem as doenças do lenho, assim como formas de deteção e de prevenção, já que atualmente continua a ser um problema que não tem uma solução completamente eficaz e viável. É de extrema importância entender a etiologia e a epidemiologia da doença do lenho responsável pela infeção da videira doente de modo que possam ser desenvolvidos programas de controlo e medidas para minimizar o impacto económico causado por estas doenças, assim como considerar algumas perspetivas futuras para a gestão eficaz das doenças do lenho (Gramaje et al., 2018).

A deteção de fungos causadores de doenças do lenho em solos ou em vinhas é essencial para o controlo e minimização da propagação das doenças do lenho em viveiros e novas plantações (Ye. Et al., 2021), assim é de facto importante identificar e utilizar métodos de deteção de fungos nas videiras de modo a identificar as plantas infetadas, marcar estas plantas e tratá-las separadamente das plantas saudáveis. A deteção e a identificação precisas dos fungos que infetam as plantas são essenciais para facilitar a gestão eficaz das doenças, com métodos baseados na sequenciação do DNA que permitem que se faça um diagnóstico exato das doenças das plantas (Hariharan e Prasannath, 2021).

O objetivo deste estudo foi encontrar um método de deteção e quantificação inovador para viveiristas, que permitisse detetar numa só reação e em simultâneo dois fungos causadores de doenças do lenho da videira-*Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*. Neste estudo, os dois agentes patogénicos foram detetados simultaneamente, utilizando o método de deteção Multiplex qPCR em DNA obtido diretamente de material lenhoso, extraído de videiras sintomáticas, das castas AB e T. Foram escolhidas estas duas castas, uma vez que são muito utilizadas na produção de vinho na região do Alentejo, conferindo características valiosas ao vinho e porque existem

vários estudos realizados relativamente à suscetibilidade a diferentes agentes patogénicos e resistência a doenças (Patanita et al., 2022). Assim, primeiramente procedeu-se à extração do DNA das amostras, recolhidas a partir do lenho da planta de videiras que apresentavam sintomas de doença, recorrendo a kits de extração de DNA. A videira é uma espécie lenhosa e este material é de difícil extração, sendo que por isso mesmo foi difícil extrair DNA de boa qualidade do lenho da videira, porque as amostras utilizadas já estavam muito necrosadas, onde poderiam ter ocorrido oxidações e a consequente degradação de DNA. A qualidade do DNA obtida neste estudo foi inferior comparativamente ao estudo realizado por Pouzelet et al., 2013. Esta diferença pode ser explicada pelo estado de degradação das amostras de videira utilizadas para extração do DNA.

Foi feita uma segunda extração de DNA, pois era necessária uma maior quantidade para a reação qPCR. Verificaram-se diferenças significativas entre a primeira e a segunda extração de DNA, notando-se menos quantidade e pior qualidade na segunda extração, o que poderá estar relacionado com o congelamento e descongelamento das amostras para processar levando à ocorrência de degradações.

Decidiu-se fazer a deteção simultânea por qPCR Multiplex de dois fungos que tivessem sido identificados e quantificados nas amostras do estudo da metagenómica, e que tivessem sido detetados em quantidades elevadas. Por isso mesmo, foram selecionados para deteção simultânea (na mesma reação qPCR) os fungos *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*. Pouzolet et al. 2013, fizeram um estudo anterior onde quantificaram com sucesso estes dois agentes patogénicos, a partir de amostras de madeira de videira infetadas.

Estes fungos estão associados às doenças do lenho, mais precisamente à Esca e às Doenças de Petri (Martín et al., 2012). Noutros estudos já tinha sido comprovada a eficácia da técnica de qPCR para deteção destes fungos, mas apenas foi detetado um fungo em cada reação (Gáinza-Cortés et al 2020, Halleen et al. 2020, Pouzolet et al., 2017).

O género de fungo *Neofabraea* aparece quantificado em maior abundância nas amostras recolhidas com sintomas visíveis de doenças do lenho, mas não foi detetado ao nível da espécie, e assim não é possível saber se a espécie causadora das doenças do lenho estaria presente nas nossas amostras, só foi identificado o género. No futuro, poderá vir a ser interessante que sejam feitos estudos aprofundados utilizando este género de fungo,

para perceber se dentro do género existem espécies causadoras de doenças do lenho. Em estudos anteriores, verificou-se que a espécie *Neofabraea kienholzii* pode infectar a videira, causando sintomas como coloração vascular castanha do tronco da planta, o que é um sintoma característico das doenças do lenho (Lengyel et al., 2020).

Gáinza-Cortés et al 2020, detetaram o fungo *Phaemoniella chlamydospora*, em videiras chilenas, recorrendo à qPCR assim como a uma sonda (Taqman) e ‘primers’ específicos. Em estudos anteriores já tinha sido comprovada a especificidade e sensibilidade da sonda Taqman para deteção do fungo *Phaemoniella chlamydospora* (Martín et al., 2012). A especificidade dos ‘primers’ e das sondas (‘probes’) é um passo crucial para o êxito do procedimento (Campos et al. 2023). Por sua vez, Halleen et al. 2020 também recorreram a um método de reação PCR para detetar esporos de agentes patogénicos, nomeadamente de *Phaeoacremonium minimum* em vinhas na África do Sul.

Este estudo mostrou a incidência relativa dos dois agentes patogénicos numa região do Alentejo, mais precisamente Campo Maior. Os resultados mostraram que em algumas das amostras os fungos não foram detetados. Os valores de Ct variaram entre 23.87 e 36.18, sendo que quanto mais elevado for o valor de Ct menor é a quantidade de fungo presente na amostra. Os valores de Ct obtidos neste estudo são semelhantes aos valores de Ct obtidos em estudos anteriores (Martín et al., 2012; Aroca et al., 2008; Edwards et al., 2007).

O fungo *Phaemoniella chlamydospora* foi detetado neste estudo numa percentagem superior das amostras (76%), *Phaeoacremonium minimum*, foi amplificado numa quantidade inferior das amostras (30%), em comparação com estudos anteriores (Pouzoulet et al., 2013), mas o que pode ser explicado pela diferença de fatores bióticos e abióticos entre os locais de onde foram retiradas as amostras.

Assim sendo e fazendo uma interpretação dos resultados obtidos, verifica-se que existe uma maior prevalência do fungo *Phaeoacremonium minimum* na casta T do que na casta AB, mas em estudos anteriores verificou-se uma menor suscetibilidade desta casta a fungos causadores de doenças do lenho (Patanita et al., 2022). Por sua vez, a casta AB apresentou maior suscetibilidade ao fungo *Phaemoniella chlamydospora*. Em estudos anteriores, verificou-se que existiam diferenças significativas na suscetibilidade destas duas castas às doenças do lenho, sendo que a casta AB é mais suscetível a estas doenças do que a casta T (Almeida et al., 2020; Patanita et al., 2022). Além disso, verificou-se que

este fungo não foi encontrado isolado em nenhuma das amostras, pelo que poderão ser feitos estudos mais profundos de modo a avaliar de este fungo está associado a outras espécies e se apenas se manifesta em complexo com outros fungos.

O presente estudo demonstrou ser uma mais-valia e um método de inovador, uma vez que mostrou ser possível a deteção simultânea e eficaz através da reação Multiplex PCR de fungos causadores de doenças do lenho, em material lenhoso de videiras sintomáticas. Outros autores (Gáinza-Cortés et al 2020, Halleen et al. 2020, Pouzoulet et al., 2017) conseguiram através de técnicas de deteção em tempo real detetar os fungos individual, mas o nosso estudo permitiu detetar em simultâneo as duas espécies.

Ferramentas de diagnóstico sensíveis baseadas em reações PCR tornam-se relevantes nas fases iniciais do desenvolvimento da videira para ajudar na prevenção da disseminação de agentes patogénicos causadores de doenças do lenho, permitindo a obtenção de elevados padrões de qualidade e de produção de plantas jovens isentas de agentes patogénicos das doenças do lenho, assim como permite que sejam tomadas decisões de forma mais rápida e precisa nas vinhas (Gáinza- Cortés et al., 2020).

A deteção de agentes patogénicos recorrendo a reações multiplex logo nos viveiros produtores de plantas de videira pode ser uma forma de evitar a transmissão destes agentes patogénicos para as vinhas a serem instaladas, podendo ser considerada uma forma importante e eficaz para a gestão das doenças do lenho (Gáinza- Cortés et al., 2020), minimizando os prejuízos e os impactos económicos enormes que estas doenças têm na produção de uva e de vinho.

Este tipo de diagnóstico por qPCR não é isento de custos para os viveiristas e, consequentemente, refletir-se-á no preço do material vegetal. No entanto, os viveiros que utilizassem este método de deteção poderiam melhorar a qualidade do seu material vegetal e certificá-lo como isento de fungos causadores de doenças do lenho (Pouzoulet et al., 2013).

7. Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo apresenta grande importância, uma vez que foi testado um método de diagnóstico que permitisse a deteção simultânea de dois importantes agentes patogénicos causadores de doenças do lenho, *Phaeoacremonium minimum* e *Phaemoniella chlamydospora*. Este teste mostrou ser rápido, preciso fiável e eficaz em DNA obtido de plantas de videira, de um local do Alentejo (Campo Maior) e de duas castas diferentes (Alicante Bouschet e Trincadeira).

Com este estudo demonstrou-se que é possível fazer a deteção simultânea de fungos causadores de doenças do lenho através de reação multiplex PCR e que o tipo de casta influencia a suscetibilidade da videira a estes dois fungos. Este estudo, demonstrou a possibilidade de serem detetados fungos causadores de doenças do lenho em simultâneo, permitindo que sejam poupados recursos, tempo e dinheiro, tornando a deteção destes fungos mais fácil e rápida numa única reação, e que sejam aplicadas medidas de proteção na vinha o mais depressa possível. Reforça-se a importância deste estudo pois foi comprovada a eficácia de um método de deteção simultânea de fungos causadores de doenças do lenho, podendo facilitar a deteção destes fungos e doenças numa vinha, permitindo uma gestão mais rápida das doenças na vinha, havendo menores perdas para os viticultores e produtores de vinho.

Através deste estudo conseguiu-se desenvolver-se um método de diagnóstico sensível e eficiente que será uma mais-valia os produtores de planta, pois permite fazer uma identificação precoce das plantas doentes, de modo que sejam adotadas técnicas de controlo na vinha, reduzindo a transmissão dos fungos na vinha e a dispersão das doenças, assim como perdas económicas elevadas, garantindo-se a produção de plantas isentas destes agentes patogénicos associados às doenças do lenho. Outra mais-valia deste estudo foi ser feito um teste multiplex, ou seja, com uma só reação identificamos os dois fungos em simultâneo.

No futuro, devem ser feitas reações Multiplex qPCR noutras castas, outros hospedeiros lenhosos, assim como devem ser utilizadas outras sondas que permitam detetar outros agentes patogénicos causadores das doenças do lenho. Além disso, seria importante a otimização dos protocolos de extração de DNA, permitindo a extração de DNA de qualidade das diferentes castas.

8. Referências bibliográficas

- Agustí-Brisach, C., Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology, and management strategies. “Phytopathologia Mediterranea”. Vol. 52 No. 2: 8th IWGTD- Special issue on Grapevine Trunk Diseases. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr_12662.
- Almeida, A., Concas, J., Campos, M.D., Materatski, P., Varanda, C., Patanita, M., Murolo, S., Romanazzi, G., Félix, M.R. (2020). Endophytic Fungi as Potential Biological Control Agents against Grapevine Trunk Diseases in Alentejo Region Biology (2020), 9(12), 420; Doi: 10.3390/biology9120420.
- Aroca, A., Raposo, R., Lunello, P. (2008). A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -*tubulin* gene as the target sequence. “Journal of Microbiology and Biotechnology”; Oct; 80(6):1131–1140. Doi: 10.1007/s00253-008-1647-3.
- Azevedo-Nogueira, F., Gonçalves, H., Rego, C., Fortes, A., Gramaje, D., Lopes, P. (2022). The road to molecular identification and detection of Fungal grapevine trunk diseases. “Frontiers in Plant Science-Plant Pathogen Interactions”; Vol. 13. Doi: 10.3389/fpls.2022.960289.
- Baumgartner, K., Fujiyoshi, P.T., Travadon, R., Castlebury, L.A., Wilcox, W.F., Rolshausen, P.E. (2013). Characterization of species of Diaporthe from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. “Plant Disease”; Vol. 97(7):912-920. Doi: 10.1094/PDIS-04-12-037-RE.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, P., Larignon, J., Chong, E., Abou-Mansour, A., Spagnolo, C., Clément, F. Fontaine (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. “Plant Pathology”; Vol. 62, Issue 2, 243–265. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02674. x.
- Bigot, G., Sivilotti, P., Stecchina, M., Lujan, C., Freccero, A., Mosetti, D. (2020). Long-term effects of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii* on the prevention of esca in different vineyards of Northeastern Italy. “Crop Protection.”; Vol. 137:105264. Doi: 10.1016/j.cropro.2020.105264.

- Billones-Baaijens, R., Úrbez-Torres, J. R., Liu, M., Ayres, M., Sosnowski, M., Savocchia, S. (2018). Molecular Methods to Detect and Quantify Botryosphaeriaceae Inocula Associates with Grapevine Dieback in Australia. "Plant Disease"; Vol. 102(8):1489-1499. Doi 10.1094/PDIS-11-17-1854-RE.
- Chacón-Vozmediano, J. L., Gramaje, D., León, M., Armengol, J., Moral, J., Izquierdo-Cañas, P. M., Martínez-Gascuña, J. (2021). Cultivar Susceptibility to Natural Infections Caused by Fungal Grapevines Trunk Pathogens in La Mancha Designation of Origin (Spain). "Plants"; 10, 1171. Doi: 10.3390/plants10061171.
- Campos, M.D., Campos, C., Cardoso, H. (2023). TaqMan *Probes* for Plant Species Identification and Quantification in Food and Feed Traceability. "Methods Molecular Biology"; 2638:301-304. Doi: 10.1007/978-1-0716-3024-2_21.
- Campos, M.D., Zellama, M.S.; Varanda, C.; Materatski, P.; Peixe, A.; Chaouachi, M.; Félix, M.R. (2019). Establishment of a sensitive qPCR methodology for detection of the olive-infecting viruses in portuguese and tunisian orchards. "Frontiers of Plant Science". Vol. 10, 694. Doi: 10.3389/fpls.2019.00694.
- Cardoso, M., Diniz, I., Cabral, A., Rego, C., Oliveira, H. (2013). Unveiling inoculum sources of black foot pathogens in a commercial grapevine nursery. "Phytopathologia Mediterranea". Vol. 52 No.2: 8th IWGTD-Special issue on Grapevine Trunk Diseases. 298-312.
- Calisto, J. (2023). Dissertação de Mestrado- As doenças do lenho em videira: uma abordagem integradora. Advisors: Félix, M., Patanita, M.
- Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, A., Cardoza, R.E, Gutiérrez, S., Casquero, P. A. (2023). Vineyard Management and Physiocochemical Parameters of Soil Affect Native Trichoderma Populations, Sources of Biocontrol Agents against *Phaeoacremonium minimum*. "Plants", Vol. 12, 887. Doi: 10.3390/plants12040887.

- Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F., Wery, J. (2020). Current knowledge on grapevine trunk diseases with complex etiology: A systemic approach. "Phytopathologia Mediterranea". Vol.59 No.1,29-53. Doi: 10.36253/phyto-11150.
- Dias, F.J.A. (2010). Black dead arm e escoriose: avaliações epidemiológicas e meios de luta química. Lisboa: ISA, 50 p.
- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I., Wingfield M.J. (2000). An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. "Studies in Mycology" No. 45: 129–140.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T., Salib, S. (2007). Comparison of the molecular tests single PCR, nested PCR, and quantitative PCR (SYBR-Green and TaqMan)- For detection of *Phaeomoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. "Phytopathologia Mediterranea". Vol. 46 No.1: 5th IWGTD- Special Issue on Grapevine Trunk Diseases.58–72. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1852.
- Espy, M. J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. Smith, T.F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. "Clinical Microbiology Reviews". Vol. 19(1):165-256. Doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) (2013). Crops and Livestock Products; Ministry of Agriculture: Prague, Czech Republic.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. "Food Microbiology". Vol. 28, Issue 5, 848-861. Doi: 10.1016/j.fm.2011.02.008.
- Fontaine, F., Lloreda, M., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, A.Z., Borgo, M., Rego, C., Corio-costet, M.F. (2016). Grapevine trunk diseases. A review. "OIV Publications", 1st Edition. 24 p. 979-10-91799-60-7. hal-01604038.

- Gáinza-Cortés, F., Roa-Roco, R., Arraño-Salinas, P., Rodríguez- Herrera, P., Lolas, M. A., Caris-Maldonado, J. C., Silva-Flores, P., González, A. (2020). Distribution of three grapevine trunk pathogens in Chilean vineyards, determined using molecular detection from asymptomatic woody pruning material. "Phytopathologia Mediterranea" 59(3): 503-513. Doi: 10.14601/Phyto-11274.
- Gramaje, D., Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. "Plant Disease". Vol. 95(9), 1040-1055. Doi: 10.1094/PDIS-01-11-0025.
- Gramaje, D., Úrbez- Torres, J. R., Sosnowski, M. R. (2018). Managing Grapevine Trunk Diseases with Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. "Plant Disease". 102(1), 12-39. Doi:10.1094/PDIS-04-17-0512-FE.
- Gubler, W. D., Rolshausen, P.E., Trouillase, F.P., Urbez, J. R., Voegel, T. (2005). Grapevine trunk diseases in California. "Practical Winery and Vineyard". Vol. 25, 1-9.
- Hrycan, J., Hart, M., Bowen, P., Forge, T., Úrbez-Torres, J. R. (2020). Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. "Phytopathologia Mediterranea". Vol.59 No.3:11th IWGTD-Special Issue on Grapevine Trunk Diseases. 395-424. Doi: 10.14601/Phyto-11275
- Halleen, F., Baloyi, M.A., Bester, M.C., Mostert, L. (2020) Aerial inoculum patterns of Petri disease pathogens in South African vineyards and rootstock mother blocks. "Phytopathologia Mediterranea". Vol.59 No.3: 11th IWGTD- Special Issue on Grapevine Trunk Diseases. 515-536. Doi: 10.14601/Phyto-11370.
- Hariharan, G.; Prasannath, K. (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. "Frontiers in Cellular Infection Microbiology".10, 600234. Doi: 10.3389/fcimb.2020.600234.
- Obrador-Sánchez, J.A., Hernandez-Martínez, R. (2020). Microscope observations of Botryosphaeriaceae spp. in the presence of grapevine wood. "Phytopathologia Mediterranea". Vol.59 No.1: 119-129. Doi: 10.14601/Phyto-11040.

- Larignon P. (2012). Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agentes pathogènes. Vignevin, 2ème édition. 74.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C, Bertsch (2009). Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. “Comptes Rendus Biologies”. Vol.332, 765–783. Doi: 10.1016/j.crv.2009.05.005.
- Lecomte, P., Péros, J.P., Blancard, D., Bastien, N., Délye, C. (2000). PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. “Applied and Environmental Microbiology” 66(10):4475-4480. Doi: 10.1128/aem.66.10.4475-4480.2000.
- Lengyel, S., Knapp, D.G., Karácsony, Z., Geml, J., Tempfli, B., Kovács, G.M. Váczy, K.Z. (2020). *Neofabraea kienholzii*, a novel causal agent of grapevine trunk diseases in Hungary. “European Journal of Plant Pathology” Vol. 157, 975–984 Doi:10.1007/s10658-020-02043-4.
- Lima, M.R.M., Machado, A.F., Gubler, W.D. (2017). Metabolomic study of chardonnay grapevines double stressed with esca-associated fungi and drought. “Phytopathology”. 107(6): 669–680. Doi: 10.1094/PHYTO-11-16-0410-R.
- Martín, M.T., Cobos, R., Martín, L., López-Enríquez, L. (2012). Real-Time PCR Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. “Applied Environmental Microbiology”. Vol. 78: Doi: 10.1128/AEM.07360-11.
- Massonet, M., Morales-Cruz, A., Minio, A., Figueroa-Balderas, R., Lawrence, D.P., Travadon, R., Rolshausen, P.E., Baumgartner, K., Cantu, D. (2018). Whole-Genome Resequencing and Pan-Transcriptome Reconstruction Highlight the Impact of Genomic Structural Variation on Secondary Metabolite Gene Clusters in the Grapevine Esca Pathogen *Phaeoacremonium minimum*. “Frontiers in Microbiology” Vol.9. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01784.
- Mondello, V., Giambra, S., Conigliaro, G., Francesca, N., e Burrmano, S. (2020). Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in young vineyards in Sicily.

“Phytopathologia Mediterranea”. Vol.59 No.3: 11th IWGTD-Special issue on Grapevine Trunk Diseases. 453–463. Doi: 10.14601/Phyto-11169.

Mondello, V., Larignon, P., Armengol, J., Kortekamp, A., Vaczy, K., Prezman, F., Serrano, E., Rego, C., Mugnai, L., Fontaine, F. (2019). Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. “Phytopathologia Mediterranea”. Vol. 57 No. 3: 10th IWGTD-Special issue on Grapevine Trunk Diseases. 369–383. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-23942.

Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., Fontaine, F. (2018). Grapevine trunk diseases a review of fifteen years of trials for their control with chemical and biocontrol agents. “Plant disease”. Vol. 102 No.7. 1189-1217. Doi: 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.

Mugnai, L. (2011). Editor's note and dedication. “Phytopathologia Mediterranea.”. Vol.50, no.4, pp. 3-4. Supplement, 7th IWGTD-Special issue on Grapevine Trunk Diseases. Doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-10446.

Muntean, M.D., Dragulinescu, A.M., Tomoiaga, L.L., Comsa, M., Racoare, H.S., Sirbu, A.D., Chedea, V.S. (2022). Fungal Grapevine Trunk Diseases in Romanian Vineyards in The Context of the International Situation. “Pathogens” 11(9):1006. Doi: 10.3390/pathogens11091006.

Ouadi, L., Bruez, E., Bastien, S., Vallance, J., Lecomte, P., Domec, J.C., Rey, P. (2019). Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. “PLOS ONE”. 14(9). Doi: 10.1371/journal.pone.0222586.

Pacetti, A., Moretti, S., Pinto, C., Compant, S., Farine, S., Bertsch, C., Mugnai, L. (2021). Trunk Surgery as a Tool to reduce Foliar Symptoms in diseases of the Esca Complex and Its Influence on Vine Wood Microbiota. “Fungi”. 7(7), 521. Doi: 10.3390/jof 7070521.

Patanita, M., Albuquerque, A., Campos, M.D., Materatski, P., Varanda, C., Ribeiro, J.A., Félix, M.R. (2022). Metagenomic Assessment Unravels Fungal Microbiota Associated to

Grapevine Trunk Diseases. “Horticulturae”. 8(4), 288. Doi: 10.3390/horticulturae8040288.

Pimenta, R., (2018). Dissertação de Mestrado- Pesquisa de fungos endofíticos presentes em videira (*Vitis vinifera L.*) com capacidade antagonista contra os principais agentes causadores da doença do lenho da videira no Alentejo. Advisors: Félix. M. R., Varanda. C.

Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Daydé, J., Lummerzheim, M., Jacques, A. (2013). A method to detect and quantify *Phaeoaniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. “Applied Microbiology and Biotechnology”. Vol. 97(23):10163-75. Doi: 10.1007/s00253-013-5299-6.

Pouzoulet, J., Scudiero, E., Schiavon, M., and Rolshausen, P. E. (2017). Xylem vessel diameter affects the compartmentalization of the vascular pathogen *Phaeoaniella chlamydospora* in grapevine. “Frontiers in Plant Science”. Vol.8:1442. Doi: 10.3389/fpls.2017.01442.

Ramsing, C.K., Gramaje, D., Mocholí, S., Agustí, J., Cabello Sáenz de Santa María, F., Armengol, J., Berbegal, M. (2021). Relationship Between the Xylem Anatomy of Grapevine Rootstocks and Their Susceptibility to *Phaeoacremonium minimum* and *Phaeoaniella chlamydospora*. “Frontiers in Plant Science”. Vol.12: 726461. Doi: 10.3389/fpls.2021.726461.

Ribeiro, J. (2023). Programa de Doutorado em Ciências Agrárias e Ambientais. Identification and quantification of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in tomato plants.

Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. “Nature”. Vol. 324(6093), 163–166. Doi: 10.1038/324163a0.

- Sint, D., Raso, L., Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing *primer* efficiencies and improving detection success. “Methods in Ecology and Evolution”. Vol.3(5), 898–905. Doi: 10.1111/j.2041-210X.2012. 00215.x
- Travadon, R., Lecomte, P., Diarra, B., Lawrence, D.P., Renault, D., Ojeda, H., Rey. P., Baumgartner, K. (2016). Grapevine pruning systems and cultivars influence the diversity of wood-colonizing fungi. “Fungal Ecology”. Vol.24(A): 82–93. Doi: 10.1016/j.funeco.2016.09.003).
- Úrbez-Torres, J.R. (2011). The status of Botriosphaeriaceae species infecting grapevines. “Phytopathologia Mediterranea”. Vol. 50: 7th IWGTD-Special issue on Grapevine Trunk Diseases. S5-S45.
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Smith, R.J., Gubler, W.D. (2013). Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. “Plant Disease”. Vol.97(12):1571-1579. Doi: 10.1094/PDIS-11-12-1072-RE.
- Vicente, J., Alonso, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. (2020). Specific and sensitive PCR detection of *Cadaphora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. “Crop Protection”. Vol. 132. 0261-2194. Doi: 10.1016/j.cropro.2020.105140.
- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Crous, P.C. (2017). Families, genera, and species of Botryosphaeriales. “Fungal Biology”. Vol. 121(4): 322–346. Doi: 10.1016/j.funbio.2016.11.001.
- Ye, Q., Zhang, W., Jia, J., Li, X., Zhou, Y., Han, C., Wu, X., Yan, J. (2021). Fungal pathogens associated with black foot of grapevine in China. “Phytopathologia Mediterranea”. Vol.60(2): 303-319. Doi: 10.36253/phyto-12353.